

NPHS2 MUTATION C412T (R138X) IN INDONESIAN CHILDREN WITH STEROID RESISTANT NEPHROTIC SYNDROME

Dedi.Rachmadi¹, Ani Melani Maskoen², Juliastuti²

¹Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung

²Unit Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran . Bandung

Abstract

NPHS2 mutation C412T (R138X) had been identified in steroid resistant nephrotic syndrome (SRNS) children with different ethnics. We investigated the NPHS2 mutation C412T (R138X) as the risk factor of SRNS. The genotypic and alleles frequency was also evaluated. A case-control study was designed in this research. Genomic DNA from SNRS patients as cases, patients with steroid sensitive nephrotic syndrome (SNSS) as controls A, and patients without renal disease or congenital anomaly as controls B were screened by PCR-ARMS. To determine the strength of NPHS2 mutation C412T (R138X) as a risk factor against SRNS we used Odds ratio. A chi-square (X^2) test is used to compare observed genotype frequencies to expected frequencies estimated assuming Hardy-Weinberg equilibrium. We studied 229 patients consist of 88 patients with SRNS, 76 patients with SNSS, and 65 patients without renal disease or congenital anomaly (164 M/65F; mean age 82.43 ± 45.87 months, range 12-196 months). This study revealed that NPHS2 mutation C412T (R138X) was found in 40 (45%) SRNS patients and 29 (38%) SSNS patients ($X^2 = 0.891$; $p = 0.345$; OR (95% CI): 1.35 (0.72-2.52). Allele frequencies of C and T in SNRS patients, controls A and controls B were 0.767, 0.233; 0.809, 0.191; and 0.80, 0.20 respectively. There were large values of chi-square test for genotype of CC,CT and TT in group SRNS, controls A and controls B ($X^2_{(1d.f)}$: 5.126, 4.234, and 4.062 respectively). Conclusion, NPHS2 mutations C412T (R138X) is not the risk factor of SRNS in Indonesian children. Large values of X^2 in SRNS, controls A and controls B groups indicated a large deviation.

Keyword: NPHS2 mutation C412T (R138X), SRNS, genotype frequency, allele frequency.

HUBUNGAN MUTASI GEN NPHS2 C412T (R138X) DENGAN SINDROM NEFROTIK IDIOPATIK RESISTEN STEROID ANAK INDONESIA*

Dedi.Rachmadi¹, Ani Melani Maskoen², Juliastuti²

¹Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran-RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung

²Unit Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung

Abstrak

Mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) telah diketahui pada penelitian sindrom nefrotik resisten steroid (SNRS) di luar negeri pada berbagai etnik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hubungan mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) dan SNRS pada penderita anak Indonesia, selain itu dinilai juga frekuensi alel dan frekuensi genotipnya. *Metoda.* Metoda penelitian ini berupa kasus-kelola, penderita SNRS sebagai kelompok kasus dan penderita sindrom nefrotik sensitif steroid (SNSS) sebagai kontrol A. Untuk melihat frekuensi alel dan frekuensi genetik dibandingkan dengan kelompok kontrol B yaitu kelompok yang tidak mempunyai penyakit ginjal atau kelainan bawaan. Semua sampel dilakukan isolasi DNA, kemudian diperiksa dengan PCR-ARMS. Untuk mengetahui kekuatan hubungan mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) sebagai faktor risiko SNRS dihitung Ratio Odds, sedangkan untuk membandingkan frekuensi genotip yang diobservasi dan frekuensi genotip yang diharapkan berdasarkan rumus dari Hardy-Weinberg. Sebanyak 229 penderita (laki-laki 164, perempuan 65; umur antara 12-196 bulan, dengan umur rata-rata $82,43 \pm 45,87$ bulan) diikuti dalam penelitian ini, terdiri dari 88 penderita SNRS, 76 penderita SNSS dan 65 penderita bukan penyakit ginjal atau kelainan bawaan. Hasil penelitian ini menunjukkan mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) didapat 40 (45%) dari kelompok penderita SNRS dan 29 (38%) dari kelompok penderita SNSS ($\chi^2 = 0.891$; $p = 0.345$; OR (95% CI): 1.35 (0.72-2.52). Frekuensi alel C dan T pada kelompok kasus SNRS: 0,767 dan 0.233, kelompok kontrol A (SNSS): 0,809 dan 0,191 dan kelompok kontrol B: 0,80 dan 0.20. Didapatkan nilai tes χ^2 yang besar untuk genotip CC, CT dan TT pada kelompok kasus (SNRS), kelompok kontrol A (SNSS) dan kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kelainan bawaan) ($\chi^2_{(d.f 1)}$): masing-masing 5,126; 4,234 dan 4,062). Simpulan, mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) bukan merupakan faktor risiko SNRS pada penderita anak Indonesia. Nilai χ^2 yang besar berarti terdapat deviasi yang besar dari populasi sampel penelitian.

Kata kunci: Mutasi gen NPHS2 C412T (R138X), SNRS, frekuensi genotip, frekuensi alel.

Pendahuluan

Sindrom nefrotik merupakan kelainan yang ditandai dengan adanya edema, proteinuria masif, hipoalbuminemia dan pada sebagian besar dengan hiperkolesterolemia. Angka kejadian sindrom nefrotik pada anak berkisar 2-7 kasus dari 100.000 anak yang berumur kurang dari 16 tahun.¹ Di Indonesia diperkirakan 6 kasus pertahun dari setiap 100.000 anak kurang dari 14 tahun.²

Dalam dekade sekarang, sindrom nefrotik dibagi dalam dua katagori berdasarkan respon terhadap pengobatan standar dengan steroid, yaitu sindrom nefrotik sensitif steroid (SNSS) dan sindrom nefrotik resisten steroid (SNRS).^{3,4} Disebut SNSS bila mengalami remisi dalam 4 minggu pengobatan dengan steroid sedangkan bila tidak mengalami remisi dalam 4 minggu dengan pengobatan steroid disebut SNRS^{1,4}. Respon terhadap pengobatan steroid ini merupakan indikator penting untuk prognosa dari sindrom nefrotik.⁵ Sindrom nefrotik pada anak 85-90% merupakan SNSS, hanya 10-15% yang merupakan SNRS.^{3,6,7} Walaupun persentase SNRS relatif kecil tetapi 50% penderita SNRS ini akan berkembang menjadi gagal ginjal terminal dalam waktu 1-4 tahun.⁵ SNRS merupakan salah satu penyebab gagal ginjal terminal yang susah diatasi pada penderita berumur kurang 20 tahun.⁸ Belum ada alasan yang pasti mengapa ada penderita sindrom nefrotik mempunyai respon terhadap steroid dan yang lainnya resisten.

Penelitian-penelitian genetik akhir-akhir ini pada manusia dan model binatang menunjukkan peranan yang sangat penting dari protein podosit dalam mempertahankan barier filtrasi glomerulus. Telah diketahui protein podosit tersebut diantaranya nephrin, podocin dan α -actinin 4.⁹ Gen ACTN4 yang mengkode α -actinin 4", adanya mutasi pada gen ini didapat pada kasus SNRS autosomal dominant.¹⁰ Gen NPHS1 dan NPHS2 yang

mengkode protein nephrin dan podocin. Adanya mutasi pada gen NPHS1 akan terjadi sindrom nefrotik kongenital tipe Finnish,¹¹ sedangkan mutasi pada gen NPHS2 akan terjadi SNRS bentuk familial¹² dan non familial.¹³

Podocin merupakan protein spesifik dari sel podosit yang ikut mempertahankan struktur celah diafragma bersama bersama protein spesifik lainnya, terdiri dari 383 asam amino, di sintesa melalui gen NPHS2. Gen NPHS2 terletak pada kromosom 1q25-31.

Mutasi gen NPHS2 pada SRNS sporadik atau non familial didapatkan 10,5% pada penelitian Weber dkk,¹⁴ peneliti lain mendapatkan 15%-28%.¹⁵⁻¹⁷ Penelitian lain menunjukkan 26% mutasi gen NPHS2 baik homozigot atau heterozigot pada penderita SNRS, sedangkan pada penderita SNSS tidak ditemukan adanya mutasi gen NPHS2.⁸ Mutasi gen NPHS2 pada penderita SNRS anak Israel-Arab (familial dan non familial), 55% menunjukkan mutasi homozigot pada C412T (R138X), sedangkan analisis mutasi gen NPHS2 pada penderita SNRS anak Israel-Yahudi tidak didapatkan mutasi gen NPHS2. Adanya perbedaan etnik pada kejadian mutasi NPHS2 dapat menjelaskan penderita SNRS keturunan Arab di Israel mempunyai prognosa yang lebih buruk dibandingkan dengan penderitanya keturunan Yahudi¹³. Mutasi gen NPHS2 pada exon 3, C412T (R138X) pada SNRS ditemukan juga pada penelitian-penelitian lainnya.^{12-13,16-17}

Pada SNRS anak Indonesia belum diketahui adanya pola mutasi gen NPHS2. Karena hasil-hasil penelitian banyak menemukan mutasi gen di exon 3 C412T (R138X), maka menjadi pemikiran peneliti untuk meneliti kemungkinan adanya mutasi pada lokasi tersebut pada penderita SNRS anak Indonesia.

Meskipun terdapat berbagai kelemahan penggunaan ARMS-PCR dalam mendeteksi adanya mutasi, tetapi karena mudah, cepat dan lebih murah maka dipakai

dalam mendeteksi adanya kemungkinan mutasi gen NPHS2 di exon 3 C412T (R138X) pada penelitian ini. Teknik ARMS-PCR ini dapat mengamplifikasi sekuen DNA dengan tidak mengamplifikasi alel yang lain. Teknik ini berdasarkan pasangan yang sesuai atas pasangan basa diantara ujung 3' nukleotida dari primer PCR dan target DNA.¹⁸

Identifikasi mutasi gen NPHS2 pada penderita SNRS berguna untuk menghindari pemberian steroid yang tidak diperlukan sehingga terhindar dari efek samping steroid yang tidak diinginkan dan dapat memprediksi rekurensi penyakit setelah dilakukan transplantasi ginjal. Selain itu adanya mutasi gen NPHS2 tersebut akan memberikan sumbangan dalam klasifikasi penyakit yang lebih lengkap

Berdasarkan latar belakang penelitian diatas, maka dilakukan penelitian untuk mengetahui hubungan mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) dan SNRS, serta mengetahui frekuensi alel dan frekuensi genotip C412T (R138X) pada penderita sindrom nefrotik anak Indonesia.

Metode

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu darah perifer penderita SNRS sebagai kasus dan penderita SNSS sebagai kontrol A, sedangkan kontrol B adalah anak sehat yang tidak menderita penyakit ginjal atau kelainan bawaan. Subyek penelitian adalah penderita sindrom nefrotik idiopatik yang kontrol ke poliklinik ginjal anak atau yang dirawat di rumah sakit senter pendidikan (RSUP. Dr. Hasan Sadikin Bandung, RSUPN. Dr.Cipto Mangunkusumo Jakarta, RSUP.Dr. Kariadi Semarang, RSUP. Dr. Sardjito Yogyakarta, RSUP. Dr. Sutomo Surabaya, RSU Syaiful Anwar Malang, RSU. Sanglah Denpasar, RSUP. Muhamad Husin Palembang, RSUP. Adam Malik Medan, RSUP.Dr.

Wahidin Sudiro husodo Makassar dan RSUD Menado) pada periode Januari 2006 – Desember 2007. Untuk evaluasi frekuensi alel dan frekuensi genotip diambil sampel darah dari anak yang tidak menderita penyakit ginjal/ kelainan kongenital. Sebagai kriteria inklusi adalah anak penderita sindrom nefrotik idiopatik dan berusia antara 1 -14 tahun. Sedangkan kriteria eksklusi adalah penderita sindrom nefrotik sekunder. Isolasi DNA dan pemeriksaan mutasi gen NPHS2 di exon 3 C412T (R138X) dengan PCR-ARMS di Laboratorium UPK Fakultas Kedokteran Universitas Padjadjaran Bandung. Penelitian ini merupakan penelitian analitik observasional dengan rancangan kasus-kontrol. Untuk melihat adanya hubungan antara mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) dengan SNRS dihitung *Odds ratio* (OR). Frekuensi alel C dan T mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) pada tiap kelompok dihitung dari jumlah alel tersebut dibagi dengan jumlah seluruh alel pada lokus gen tersebut. Tes kelayakan dari genotip dengan cara membandingkan frekuensi genotip yang diobservasi dengan frekuensi genotip yang diharapkan menurut rumus Hardy-Weinberg.¹⁹ DNA diisolasi dari darah tepi yang diambil menggunakan tabung yang berisi EDTA. Metoda yang digunakan adalah metoda Isolation Kit dari Pharmacia. Kemudian 200 ng DNA digunakan sebagai templat untuk PCR. Metode PCR yang digunakan adalah Amplification Refractory Mutation System. Primer yang digunakan untuk mendeteksi mutasi pada ekson 3 ini adalah:

Primer mutasi : 5'-3' GGTTGTACAAGAGTAATGGAAAGAGTAATTATATTAT

Primer normal: 5'-3' GGTTGTACAAGAGTAATGGAAAGAGTAATTATATTAC

Primer reverse: 5'-3' TGAAGAAATTGGCAAGTCAG

Reaksi PCR: total vol 25 ul, berisi 1,5 ul DNA, primer 10 pg, 2,5 ul dNTP (200 uM), 2,5 ul buffer PCR (10x), dan 0,5 unit enzim taq polymerase. Temp denaturasi 95⁰C 2 menit,

diikuti dengan 38 siklus, temp.denature 94⁰C 10 detik, temp annealing 54⁰C selama 10 detik, temp ekstensi 72⁰C selama 10 detik. Hasil PCR kemudian dielektroforesis dengan menggunakan gel agarose 2%. Penelitian ini telah diajukan dan mendapat persetujuan dari Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran UNPAD – RS. Dr. Hasan Sadikin Bandung.

Hasil

Besarnya sampel keseluruhan sebanyak 229 yang terdiri dari kelompok kasus (SNRS) 88, kelompok kontrol A (SNSS) 76 dan kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/kongenital) 65, jenis kelamin laki-laki 164 (71,6%) dan perempuan 65 (28,4%). Umur antara 12-196 bulan dengan umur rata-rata 82,43 ± 45,87 bulan. Distribusi jumlah sampel penelitian yang berasal dari tiap Rumah Sakit Senter Pendidikan terdapat pada Tabel 1.

Tabel 1. Distribusi Jumlah Sampel Penelitian

No	Rumah Sakit Senter Pendidikan	Kasus (SNRS)	Kontrol A (SNSS)	Kontrol B (Bukan Penyakit Ginjal/ Kongenital)	Jumlah
1.	Bandung	23	23	23	69
2.	Jakarta	14	14	13	41
3.	Semarang	6	6	7	19
4.	Yogyakarta	15	0	0	15
5.	Surabaya	3	2	3	8
6.	Malang	6	6	6	18
7.	Bali	3	3	3	9
8.	Palembang	3	5	5	3
9.	Medan	8	7	0	15
10	Makassar	7	7	5	19
11.	Menado	0	3	0	3
Jumlah		88	76	65	229

Hasil PCR-ARMS gen NPHS2 C412 (R138X) pada ketiga kelompok berdasarkan genotip CC (normal), CT (mutasi heterozigot) dan TT (mutasi homozigot) terdapat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil PCR-ARMS gen NPHS2 C412T (R138X) pada Ketiga Kelompok Penelitian

Hasil PCR	Kelompok		
	Kasus (SNRS)	Kontrol A (SNSS)	Kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital)
CT (heterozigot)	39 (44,3 %)	29 (38,2 %)	26 (40,0 %)
TT (homozigot)	1 (1,1 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)
CC (normal)	48 (54,5 %)	47 (61,8 %)	39 (60,0 %)

Tabel 3. Mutasi Hasil PCR-ARMS gen NPHS2 C412T (R138X) pada Ketiga Kelompok Penelitian

Mutasi (Hasil PCR)	Kelompok		
	Kasus (SNRS)	Kontrol A (SNSS)	Kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital)
Mutasi	40 (45,5 %)	29 (38,2 %)	26 (40,0 %)
Tidak mutasi	48 (54,5 %)	47 (61,8 %)	39 (60,0 %)

Keterangan : $\chi^2 = 0,977$; $p = 0,614$

Dari Tabel 3 di atas dapat dihitung:

1. Perbandingan kelompok kasus (SNRS) dan kelompok kontrol A (SNSS):

$$\chi^2 = 0,891; p = 0,345; OR (95 \% CI) : 1,35 (0,72 - 2,52)$$

2. Perbandingan kelompok kasus (SNRS) dan kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital):

$$\chi^2 = 0,453; p = 0,501; OR (95 \% CI): 1,25 (0,65 - 2,39)$$

3. Perbandingan kelompok kontrol A (SNSS) dan kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital):

$$\chi^2 = 0,050; p = 0,823; OR (95 \% CI): 0,93 (0,47 - 1,82)$$

4. Perbandingan kelompok kasus (SNRS) + kelompok kontrol A (SNSS) dan kelompok Kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital):

$$\chi^2 = 0,08; p = 0,774 OR (95\% CI): 1,09 (0,58 - 2,04)$$

Dari perhitungan di atas tampak tidak ada hubungan bermakna antara mutasi dengan kejadian SNRS/SNSS.

Tabel 4. Frekuensi Alel C dan Alel T dari populasi Kasus (SNRS)

Mutasi (Hasil PCR)	Genotip			Total
	CC	CT	TT	
Jumlah Individu	48	39	1	88
Jumlah Alel C	96	39	0	135
Jumlah Alel T	0	39	2	41
Jumlah Total Alel	96	78	2	176

$$\text{Frekuensi Alel C=p} = \frac{2 n_{CC} + n_{CT}}{2 N} = \frac{(2 \times 48) + 39}{2 \times 88} = \frac{135}{176} = 0,767$$

$$\text{Frekuensi Alel T=q} = \frac{2 n_{TT} + n_{CT}}{2 N} = \frac{(2 \times 1) + 39}{2 \times 88} = \frac{41}{176} = 0,233$$

Tabel 5. Frekuensi Alel C dan Alel T dari populasi Kontrol A (SNSS)

Mutasi (Hasil PCR)	Genotip			Total
	CC	CT	TT	
Jumlah Individu	47	29	0	76
Jumlah Alel C	94	29	0	123
Jumlah Alel T	0	29	0	29
Jumlah Total Alel	94	58	0	152

$$\text{Frekuensi Alel C=p} = \frac{2 n_{CC} + n_{CT}}{2 N} = \frac{(2 \times 47) + 29}{2 \times 76} = \frac{123}{152} = 0,809$$

$$\text{Frekuensi Alel T=q} = \frac{2 n_{TT} + n_{CT}}{2 N} = \frac{(2 \times 0) + 29}{2 \times 76} = \frac{29}{152} = 0,191$$

Tabel 6. Frekuensi Alel C dan Alel T dari populasi Kontrol B

Mutasi (Hasil PCR)	Genotip			Total
	CC	CT	TT	
Jumlah Individu	39	26	0	65
Jumlah Alel C	78	26	0	104
Jumlah Alel T	0	26	0	26
Jumlah Total Alel	78	52	0	130

$$\text{Frekuensi Alel C} = p = \frac{2 n_{CC} + n_{CT}}{2 N} = \frac{(2 \times 39) + 26}{2 \times 65} = \frac{104}{130} = 0,80$$

$$\text{Frekuensi Alel T} = q = \frac{2 n_{TT} + n_{CT}}{2 N} = \frac{(2 \times 0) + 26}{2 \times 65} = \frac{26}{130} = 0,20$$

Tes Chi-kuadrat (χ^2)

Digunakan untuk menguji kesesuaian antara *observed genotype frequencies* dengan *expected frequencies* berdasarkan teori Hardy-Weinberg.¹⁹

$$\text{Rumus : } \chi^2 = \text{Sum} / (\text{observed-expected})^2 / \text{expected} /$$

Tabel 7, 8 dan 9 memuat perhitungan tes Chi-kuadrat untuk genotip CC, CT dan TT pada masing-masing kelompok.

**Tabel 7. Tes Chi-kuadrat untuk genotip CC, CT dan TT pada Kasus
SNRS berdasarkan Teori Hardy-Weinberg**

Nilai	Genotip			Total
	CC	CT	TT	
<i>Observed</i>	48	39	1	88
<i>Expected</i>	$88xp^2$	$88x2pq$	$88xq^2$	
	51,8	31,4	4,8	
<i>Observed-Expected</i>	-3,8	7,6	-3,8	
$(Observed-Expected)^2$	14,44	57,76	14,44	
$(Observed-Expected)^2 / Expected$	0,279	1,839	3,008	

$$X^2 = 0,279 + 1,839 + 3,008 = 5,126$$

Dengan *degree of freedom* 1 dari tabel Chi-kuadrat diperoleh $p = 0,024$ (yang bermakna).

Artinya : Nilai observasi (hasil mutasi pada kelompok kasus) tidak sesuai dengan teori Hardy-Weinberg.

**Tabel 8. Tes Chi-kuadrat untuk genotip CC, CT dan TT pada Kontrol A
SNSS berdasarkan Teori Hardy-Weinberg**

Nilai	Genotip			Total
	CC	CT	TT	
<i>Observed</i>	47	29	0	76
<i>Expected</i>	$76xp^2$	$76x2pq$	$76xq^2$	
	49,7	23,5	2,8	
<i>Observed-Expected</i>	-2,7	5,5	-2,8	
$(Observed-Expected)^2$	7,29	30,25	7,84	
$(Observed-Expected)^2 / Expected$	0,147	1,287	2,80	

$$X^2 = 0,147 + 1,287 + 2,80 = 4,234$$

Dengan *degree of freedom* 1 dari tabel Chi-kuadrat diperoleh $p = 0,040$

(yang bermakna).

Artinya : Nilai observasi (hasil mutasi pada kelompok kasus) tidak sesuai dengan teori Hardy-Weinberg.

Tabel 9 Tes Chi-kuadrat untuk genotip CC, CT dan TT pada Kontrol

B berdasarkan Teori Hardy-Weinberg

Nilai	Genotip			Total
	CC	CT	TT	
<i>Observed</i>	39	26	1	65
<i>Expected</i>	$65xp^2$	$65x2pq$	$65xq^2$	
	41,6	20,8	2,6	
<i>Observed-Expected</i>	-2,6	-5,2	-2,6	
$(Observed-Expected)^2$	6,76	27,04	6,76	
$(Observed-Expected)^2 / Expected$	0,162	1,30	2,60	

$$X^2 = 0,162 + 1,30 + 2,60 = 4,062$$

Dengan *degree of freedom* 1 dari tabel Chi-kuadrat diperoleh $p = 0,044$ (yang bermakna).

Artinya : Nilai observasi (hasil mutasi pada kelompok kasus) tidak sesuai dengan teori Hardy-Weinberg.

Pembahasan

Dari hasil penelitian ini didapatkan mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) pada kelompok kasus (SNRS) 40 (45,5%) dengan mutasi heterozigot 39 (44,3%) dan homozigot 1(1,1%), sedangkan pada kelompok kontrol A (SNSS) dan pada kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital) didapatkan mutasi heterozigot masing-masing 29 (38,2%) dan 26 (40,0%) serta tidak ditemukan mutasi homozigot (Tabel 2 dan 3). Hasil penelitian

ini berbeda dengan hasil penelitian yang terdapat dalam kepustakaan yang menyebutkan mutasi gen NPHS2 secara keseluruhan pada SNRS terjadi pada 20-30%.^{15,20-22} Mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) pada SNRS ditemukan pada penelitian dengan sekuensing berupa mutasi homozigot dan merupakan mutasi *nonsense*.^{12-13,16-17} Mutasi *nonsense* yang terjadi akibat substitusi C oleh T pada posisi basa 412 menjadi TGA yang merupakan stop kodon pada urutan asam amino 138 sehingga proses translasi berhenti dan menghasilkan protein yang lebih pendek. Pada penelitian ini dengan menggunakan PCR-ARMS hanya ditemukan 1 mutasi homozigot, sedangkan yang lainnya berupa mutasi heterozigot. Tingginya mutasi yang terdeteksi dengan ARMS-PCR pada penelitian ini baik pada kelompok kasus (SNRS), kelompok kontrol A (SNSS) ataupun pada kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital) menunjukkan kemungkinan terdeteksinya pita nonspesifik/ *multiple bands* atau primernya cocok dengan tempat yang berbeda, hal ini dimungkinkan terjadi karena kondisi optimasi PCR belum tercapai atau karena teknik pembuatan primer spesifiknya kurang baik.

Hasil perhitungan statistik dari kelompok kasus (SNRS) dan kelompok kontrol A (SNSS) didapat: $\chi^2 = 0,891$; $p=0,345$ OR(95% CI): 1,35 (0,72-2,52), ini menunjukkan tidak ada hubungan bermakna antara mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) dengan kejadian SNRS atau dengan kata lain mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) bukan merupakan faktor risiko untuk terjadinya SNRS. Berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh Frishberg dkk (2002) yang mendapatkan mutasi gen NPHS2 pada 27 penderita SNRS anak Israel-Arab (familial dan nonfamilial), 15 penderita (55%) menunjukkan mutasi homozigot pada C412T (R138X), sedangkan analisis mutasi gen NPHS2 pada 13 penderita SNRS anak Israel-Yahudi tidak didapatkan mutasi gen

NPHS2. Adanya perbedaan etnik pada kejadian mutasi NPHS2 dapat menjelaskan penderita SNRS keturunan Arab di Israel mempunyai prognosis yang lebih buruk dibandingkan dengan penderita keturunan Yahudi.¹³ Perbedaan latar belakang genetik juga terbukti pada 36 anak-anak Jepang yang menderita SNRS tidak didapatkan mutasi gen NPHS2.²³

Frekuensi alel merupakan ekspresi jumlah penggandaan dari tiap alel dari satu populasi.²³ Pada Tabel 4, 5, 6 dapat dilihat frekuensi alel C (p) dan frekuensi alel T (q) dari tiap populasi, yaitu untuk populasi kasus SNRS 0,767 dan 0,233; populasi kontrol A (SNSS) 0,809 dan 0,191; populasi kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital) 0,80 dan 0,20. Ini berarti jumlah penggandaan alel C dari populasi kelompok kasus (SNRS), populasi kelompok kontrol A (SNSS) dan populasi kelompok kontrol B (bukan penyakit ginjal/ kongenital) masing-masing 76,7%, 80,9% dan 80,0% sedangkan penggandaan alel T pada tiap populasi kelompok masing-masing 23,3%, 19,1% dan 20%.

Pada Tabel 7,8,9 didapat hasil pengujian kesesuaian antara frekuensi genotip CC, CT dan TT yang diteliti dengan frekuensi genotip yang diharapkan berdasarkan teori Hardy-Weinberg untuk masing-masing kelompok menunjukkan nilai p yang bermakna, ini berarti frekuensi genotip CC, CT dan TT hasil penelitian ini pada semua kelompok populasi tidak sesuai dengan teori Hardy-Weinberg. Hal ini disebabkan etnik yang tidak seragam pada masing-masing populasi tersebut, meskipun pengambilan sampel diusahakan pada daerah/ suku yang sama.

Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan sebagai berikut:

1. Mutasi gen NPHS2 C412T (R138X) bukan merupakan faktor risiko terjadinya resistensi pada penderita sindrom nefrotik yang mendapat pengobatan steroid.
2. Frekuensi genotip CC, CT dan TT hasil penelitian ini pada semua kelompok populasi tidak sesuai dengan teori Hardy-Weinberg.

Saran

1. Hasil ARMS-PCR yang menunjukkan mutasi gen selanjutnya dilakukan sequencing untuk melihat apakah betul mutasi atau pita non spesifik/ *multiple bands*.
2. Untuk perhitungan frekuensi alel atau frekuensi genotip harus dari populasi etnik yang sama/ homogen.

Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini menggunakan dana RISBIN IPTEKDOK tahun 2006-2007. Untuk itu kami sampaikan terima kasih kepada Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan (Litbangkes) Depkes RI yang telah menyediakan dana penelitian dan juga ucapan terima kasih disampaikan kepada Lembaga Biologi Molekuler Eijkman yang telah membantu dan membina penelitian ini sehingga penelitian ini dapat diselesaikan.

Daftar Pustaka

1. Clark AG, Barrat TM. Steroid responsive nephrotic syndrome. Dalam: Barrat TM, Avner ED, Harmon WE, penyunting. *Pediatric nephrology*, edisi ke-4. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. h.731-48.
2. Wirya W. Sindrom nefrotik. Dalam: Alatas H, Tambunan T, Trihono PP, penyunting. *Buku ajar nefrologi anak*. Jakarta-IDAI; 2002. h.381-426.
3. Niaudet P. Steroid resistant idiopathic nephrotic syndrome. Dalam: Barrat TM, Avner ED, Harmon WE, penyunting. *Pediatric nephrology*, edisi ke-4. Baltimore: Lippincott William & Wilkins; 1999. h.749-63.
4. Haycock G. The child with idiopathic nephrotic syndrome. Dalam: Webb N, Postlethwaite P, penyunting. *Clinical paediatric nephrology*, edisi ke-3. New York: Oxford university press; 2003. h.341-66.
5. Niaudet P. Nephrotic syndrome in children. *Curr Opin Pediatr*. 1993;5:174-9.
6. Meyers KEC, Kujubu DA, Kaplan BS. Minimal change nephrotic syndrome. Dalam: Nelson EG, Couser WG, penyunting. *Immunologic renal disease*. Philadelphia: lippincott-Raven; 1997. h.975-92.
7. Kelsch RC, Sedman AB. Nephrotic syndrome. *Pediatr Rev*. 1993;14:30-38.
8. Ruf RG, Lichtenberger A, Karle SM, Haas JP, Anacleto FE, Schultheiss M, Zalewski I, Imm A, Ruf EM, Mucha B, Bagga A, Neuhaus T, Fuchshuber A, Bakaloglu A, Hildebrandt F, and The Arbeitsgemeinschaft Fur Padiatrische Nephrologie Study Group. Patients with mutations in NPHS2 (Podocin) do not respond to standard steroid treatment of nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:722-32.
9. Antignac C. Genetic models: clues for understanding the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *J Clin Invest*. 2002;109:447-9.
10. Kaplan JM, Kim SH, and North KN. Mutations in ACTN4 , encoding α -actinin4 cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet*. 2000;24:251-6.
11. Kestila M, Lenkkeri U, and Mannikko M et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein, nephrin, is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell*. 1998;1:575-82.
12. Boute N, Gribouval O, and Roselli S et al. NPHS2, encoding the glomerular protein podocin is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet*. 2000;24:349-54.
13. Friesberg Y, Rinat C, Megged O, Shapira E, Feinstein S, and Rothschild R. Mutations in NPHS2 encoding podocin are a prevalent cause of steroid resistant nephrotic syndrome among Israeli-Arab children. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:400-5.
14. Weber S, Gribouval O, Esquivel EL, Morinière V, Tetè M.J, Legendre C, Niaudet P, Antignac C. NPHS2 mutation analysis shows genetic heterogeneity of steroid-resistant nephrotic syndrome and low post transplant recurrence. *Kidney Int*. 2004;66:571-9.
15. Karle S, Uetz B, Ronner V, Glaeser L, Hildebrandt F, Fuchshuber A, Members of the APN Study Group: Novel mutations in NPHS2 are detected in familial as well as sporadic steroid resistant nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:388-93.
16. Caridi G, Bertelli R, Carrea A, Di Duca M, Catarsi P, Artero M, Carraro M, Zennaro C, Candiano G, Musante L, Seri M, Ginevri F, Perfumo F, Ghiggeri GM. Prevalence, genetics, and clinical features of patients carrying podocin mutations in steroid-

- resistant nonfamilial focalsegmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 2001; 12: 2742-6.
17. Caridi G, Bertelli R, Di Duca M, Dagnino M, Emma F, Muda AO. Broadening the spectrum of diseases related to podocin mutations. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14:1278-86.
 18. Strachan T, Read AP. Amplifying DNA: PCR and cell-based DNA cloning. Dalam: *Human molecular genetics*, edisi ke 3. New York. Garland Science;2004. h.121-3.
 19. Winter PC, Hickey GI, Fletcher HL. Genes in populations: Hardy-Weinberg equilibrium. Dalam *Instant notes Genetics*, edisi ke 2. Oxford. Bios Scientific Publisher Ltd; 2002. h.206-13.
 20. Pollak MR. Inherited podocytopathies: FSGS and nephrotic syndrome from a genetic viewpoint. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13:3016-23.
 21. Niaudet P. Genetic form of nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2004;19:1313-18.
 22. Caridi G, Perfumo F, Ghiggeri GM. NPHS2 (podocin) mutations in nephrotic syndrome. Clinical spectrum and fine mechanisms. *Pediatr Research.* 2005;57:54R-61R.
 23. Maruyama K, Iijima K, Ikeda M, Kitamura A, Tsukaguchi H, Yoshiya K, Hoshii S, Wada N, Uemura O, Satomura K, Honda M, Yoshikawa N. NPHS2 mutations in sporadic steroid-resistant nephrotic syndrome in Japanese children. *Pediatr Nephrol.* 2003;18: 412-6.