

**UJI KEBERADAAN VARIASI GENETIK INSERSI G-156GG PROMOTER
OSTEOPONTIN PADA ANAK POPULASI JAWA DENGAN ORANG TUA
STROKE ISKEMIK**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi**



Oleh:

Endang Rahayu Tri Purwandhany

NIM 0910753017

**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2013

HALAMAN PERSETUJUAN

TUGAS AKHIR

**UJI KEBERADAAN VARIASI GENETIK INSERSI G-156GG PROMOTER
OSTEOPONTIN PADA ANAK POPULASI JAWA DENGAN ORANG TUA**

STROKE ISKEMIK

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Farmasi

Oleh :

Endang Rahayu Tri Purwandhany

NIM: 0910753017

Menyetujui untuk diuji:

Pembimbing I

Pembimbing II

dr Yuyun Yueniwati, MKes, SpRad

NIP. 19681031 199601 2 001

Valentina Yurina, SSi, MSi

NIP. 198302092 010122 001

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI KEBERADAAN VARIASI GENETIK INSERSI G-156GG PROMOTER
OSTEOPONTIN PADA ANAK POPULASI JAWA DENGAN ORANG TUA
STROKE ISKEMIK

Oleh :

Endang Rahayu Tri Purwandhany
NIM : 0910753017

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 9 Juli 2013

dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji I

Prof.Dr.dr.M Rasiad Indra, MS
NIP. 195005251 980021 001

Penguji II/Pembimbing I

Penguji III/Pembimbing II

dr Yuyun Yueniwati, MKes, SpRad
NIP. 19681031 199601 2 001

Valentina Yurina, SSi, MSi
NIP. 198302092 010122 001

Mengetahui,
Ketua Program Studi

Drs. Bambang Sidharta, MS., Apt.
NIP. 19481216 198002 1 001



Untuk Allah yang Maha mencintai
Semoga Engkau Ridho dengan Tugas akhir ini
Ibu, bapak, terima kasih atas seringnya telepon
dimalam hari. Tak ada yang lebih indah dari itu

KATA PENGANTAR

Maha suci Allah atas segala keberkahan yang telah Ia berikan. Inilah persembahan bagi kebaikan ilmu pengetahuan. Tugas akhir yang berjudul “Uji Keberadaan Variasi Genetika Insersi G-156GG pada Anak Populasi Jawa dengan Orang Tua Stroke Iskemik” diharapkan akan menambah kekayaan referensi dalam penelitian di bidang biomolekular.

Biomolekular merupakan bidang ilmu yang sangat menarik dan perlu untuk diperdalam mengingat pentingnya pengembangan ilmu ini bagi penemuan obat baru atau deteksi dini penyakit. Penulis berharap selain bisa menemukan nilai keilmuan dalam tugas akhir ini, pembaca juga dapat menemukan keistimewaan penciptaan Allah yang ada didalam tubuh manusia. Penulis berharap agar karya ini bisa menguatkan keyakinan pembaca bahwa tidak ada hal sekecil apapun yang terjadi karena kebetulan.

Dengan selesainya tugas akhir ini, penulis mengucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada:

1. Dr. dr Karyono M, SpPA sebagai dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
2. Dr. dr Yuyun Yueniwati, M.Kes., Sp. Rad sebagai pembimbing pertama yang dengan sabar dan sigap selalu bersedia membantu jika saya mengalami kesulitan.
3. Valentina Yurina. S.Si., M.Si sebagai pembimbing kedua yang selalu ada ketika saya membutuhkan bantuan dan tidak segan menegur saya ketika melakukan kesalahan.
4. Prof.Dr.dr.M Rasjad Indra, MS sebagai penguji dalam ujian proposal maupun tugas akhir, yang dengan sabar bertanya dan memberikan masukan demi jalannya penelitian ini dan demi hasil yang memuaskan.

5. Para analis di laboratorium Fisiologi, Mba Umi, Mba Kiki, Pak Satuman, Mas Haris, Mas Uki, dan Mas Budi yang selalu bersedia membantu, memberikan masukan pada hasil penelitian saya selama di laboratorium.
6. Yang paling saya cintai Ibunda Hendaryati dan Ayahanda Nuruddin Arraniri yang tidak lelah menyemangati dan menghibur saya di kala sedang lelah mengerjakan Tugas Akhir dan tugas dakwah.
7. Teman satu proyek Nurus Sobah yang sudah sangat sering membantu saya dalam mengerjakan tugas akhir dan menjelaskan hal-hal yang tidak saya mengerti, Mba Afifi Inayah atas konsultasi dan sarannya. Teman-teman seperjuangan di kelas Farmasi 2009, Mba Zia, Mba Lala, teman-teman dakwah dan guru saya selama belajar di Farmasi.
8. Semua pihak yang membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari masih banyak hal yang harus diperbaiki dalam penulisan karya ini, oleh karena itu penulis membuka diri untuk semua kritik dan saran yang membangun. Akhir kata, semoga Tugas akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan

Malang, 9 Juli 2013

Penulis

ABSTRAK

Purwandhany, Endang Rahayu Tri. 2013. Uji Keberadaan Variasi Genetik Inseri G-156GG Promoter Osteopontin Pada Anak Populasi Jawa Dengan Orang Tua Stroke Iskemik. Tugas Akhir, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr.dr Yuyun Yueniwati., M. Kes., Sp. Rad. (2) Valentina Yurina. S.Si., M.Si.

Latar belakang: Penebalan Intima Media Arteri carotis dapat memprediksikan kemungkinan terjadinya aterosklerosis dini. Penebalan intima media ini dipengaruhi oleh mutasi titik pada promoter osteopontin, salah satunya pada G-156GG. Tujuan: penelitian ini bertujuan menganalisa adanya hubungan antara variasi genetik gen pengkode OPN (SNP -156) pada anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik. Metode: 19 sampel kelompok kasus adalah anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik berumur 10-21 tahun dan 13 sampel kelompok kontrol adalah anak dengan orang tua sehat. Analisa dilakukan dengan pengukuran intima media arteri carotis lalu dibandingkan dengan hasil *genotyping* menggunakan PCR dan sekuensing. Hasil: dua dari enam sampel yang mengalami variasi genetik adalah kelompok kasus. Hubungan variasi genetik dengan penebalan intima media arteri carotis ditunjukkan dengan nilai Odd Ratio yaitu 2.100 (CI 0.297- 14.875), nilai Odd Ratio tersebut berarti bahwa variasi genetik tidak bermakna sebagai faktor risiko. Penelitian ini menunjukkan bahwa tidak ada hubungan polimorfisme terhadap penebalan intima media arteri carotis. Kesimpulan: Terdapat variasi genetik pada titik G-156 GG pada anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik dan terdapat kecenderungan penebalan intima media arteri carotis yang terjadi pada sampel yang mengalami variasi genetik, meskipun tidak bermakna secara statistic. Diperlukan analisa lebih lanjut dengan jumlah sampel yang lebih representatif dalam menggambarkan hubungan kedua variabel ini.

Kata kunci: variasi genetik, osteopontin, inseri G-156GG, populasi jawa, intima media arteri carotis

ABSTRACT

Purwandhany, Endang Rahayu Tri. 2013. Genetic Variation Presence Test Insertion Osteopontin Promoter G-156GG of Javanese Children with Parental Ischemic Stroke. The Final Pharmacy study Program, Medical Faculty University of Brawijaya. Supervisors: (1) Dr.dr Yuyun Yueniwati., M. Kes., Sp. Rad. (2) Valentina Yurina. S.Si., M.Si.

Background: Carotid artery Intima Media Thickening can predict the likelihood of premature atherosclerosis. Thickening of intima media had influenced by mutation promoter G-156GG in osteopontin. Objectives: to analyze the relationship between genetic variation in gene encoding OPN (SNP -156) in the Javanese children population with parental ischemic stroke. Methods: 19 samples case group taken from Javanese children population with parental ischemic stroke aged 10-21 years and 13 control groups consisted children with healthy parents. The analysis carried out by measuring carotid artery intima media compared with the results of genotyping using PCR and sequencing. Results: two of six samples detected have genetic variation from cases group. The relationship of genetic variation that occurred with carotid artery intima-media thickening as indicated by the value of the Odd Ratio 2.100 (CI 0297-14875) show that polymorphism is not significant risk factor. This study showed that there is no relationship of polymorphisms on carotid artery intima-media thickening. Conclusion: There is G-156 GG genetic variation in Javanese children population with parental ischemic stroke and there is a propensity of carotid artery intima-media thickening that occurs in sample with genetic variations, although it is not statistically significant. Further analysis needed with more representative sample to describe the relationship between G-156 GG genetic variation and carotid artery intima-media thickening.

Keywords: genetic variation, osteopontin, insertion of G-156GG, Javanese population, carotid artery intima-media

DAFTAR ISI

Judul.....	i
Halaman Persetujuan	ii
Halaman Pengesahan	iii
Halaman Peruntukan	iv
Kata Pengantar	v
Abstrak	vii
Daftar Isi	ix
Daftar Tabel.....	xi
Daftar Gambar.....	xii
Daftar Singkatan.....	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah Penelitian	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Stroke iskemik	5
2.1.1 Definisi stroke iskemi.....	5
2.1.2 Epidemiologi	6
2.1.3 Patofisiologi stroke iskemi	7
2.1.4 Mekanisme aterosklerosis	10
2.1.5 Penebalan carotid intima media	12
2.1.6 Hubungan aterosklerosis dan penebalan karotid arteri intima media	13
2.2 tinjauan tentang osteopontin.....	13
2.2.1 definisi osteopontin	13
2.2.2 fungsi osteopontin	14
2.2.3 hubungan osteopontin dengan penebalan carotid intima media.....	15
2.2.4 polimorfisme osteopontin	15
2.2.5 Fungsi Neuroprotektif Osteopontin pada Stroke	16
2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	17



2.3.1	Pengertian PCR (Polymerase Chain Reaction)	17
2.3.2	Prinsip Penggunaan PCR	18
2.3.3	Aplikasi PCR untuk Deteksi SNP	19
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN		
3.1	Kerangka Konsep Penelitian	21
3.2	Hipotesis Penelitian	22
BAB 4 METODE PENELITIAN		
4.1	rancangan Penelitian	23
4.2	Populasi dan Sampel	24
4.3	Variabel Penelitian	24
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian	25
4.5	Definisi Operasional	26
4.6	Bahan dan Instrument Penelitian	25
4.7	Prosedur Penelitian/ pengumpulan Data	26
4.8	Diagram Alur Penelitian	29
4.9	Analisa Data	29
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA		
5.1	Karakteristik Hasil Penelitian	32
5.2	Ketebalan Intima Media Carotis	35
5.3	Analisis Genotyping polimorfisme OPN	37
BAB 6 PEMBAHASAN		
6.1	Hasil Analisis Migrasi	56
6.2	Hasil Sekuensing	57
6.3	Variasi Genetik pada lokasi -156	58
6.4	OPN sebagai terapi	63
BAB 7 PENUTUP		
7.1	Kesimpulan	65
7.2	Saran	66
DAFTAR PUSTAKA		67
LAMPIRAN		72

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1 Subtype stroke iskemik akut berdasarkan klasifikasi TOAST	5
Tabel 5.1 karakteristik Sampel	30
Tabel 5.2 Hasil Laboratorium	33
Tabel 5.3 hasil Pemeriksaan Ultrasonografi	33
Tabel 5.4 Komparasi Kelompok Kontrol-Kasus Anak Perempuan	34
Tabel 5.5 Komparasi Kelompok Kontrol-Kasus Anak Laki-laki	35
Tabel 5.6 Komparasi ketebalan intima media arteri carotis dengan faktor pengganggu	36
Tabel 5.7 Hasil analisis Primer OPN	39
Tabel 5.8 Optimasi PCR untuk amplifikasi Gen target OPN menggunakan Master Mix lama	40
Tabel 5.9 Optimasi Kondisi PCR untuk amplifikasi gen target OPN menggunakan master mix Pfu High Fidelity	41
Tabel 5.10 Optimasi Kondisi PCR untuk Amplifikasi gen target OPN menggunakan Master mix terbaru	43
Tabel 5.11 Deskripsi Hasil Sequencing dengan program CLC Workbench ed 5	50
Tabel 5.12 Deskripsi Hasil Sequencing dengan program Sequencher	52

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Mekanisme glutamate dalam meningkatkan influx kalsium	9
Gambar 2.2 kaskade terjadinya iskemia serebral	10
Gambar 2.3 Mekanisme pembentukan sel busa.....	11
Gambar 2.4 Cetakan Basa DNA menggunakan <i>Dye-terminating Sequencing</i> yang dilabel dengan flourosense	11
Gambar 5.1 Distribusi sampel berdasarkan Jenis Kelamin pada sampel kasus	31
Gambar 5.2 Distribusi Sampel berdasarkan Jenis Kelamin pada sampel Kontrol	32
Gambar 5.3 Sekuens Homo sapien Chromosome 4	36
Gambar 5.4 Elektroforegram sampel DNA.....	37
Gambar 5.5 Elektroforegram hasil PCR OPN	44
Gambar 5.6 Hasil Sekuensing dengan Primer Forward	45
Gambar 5.7 hasil sekuensing dengan Primer reverse	45
Gambar 5.8 Hasil analisa BLAST OPN	46
Gambar 5.9 Analisis Mutasi basa nomor -156 pada Hasil PCR dengan Primer Forward	47
Gambar 5.10 Analisis Mutasi basa nomor -156 pada Hasil PCR dengan Primer Forward	48
Gambar 6.1 Hasil sekuensing salah satu sampel	55

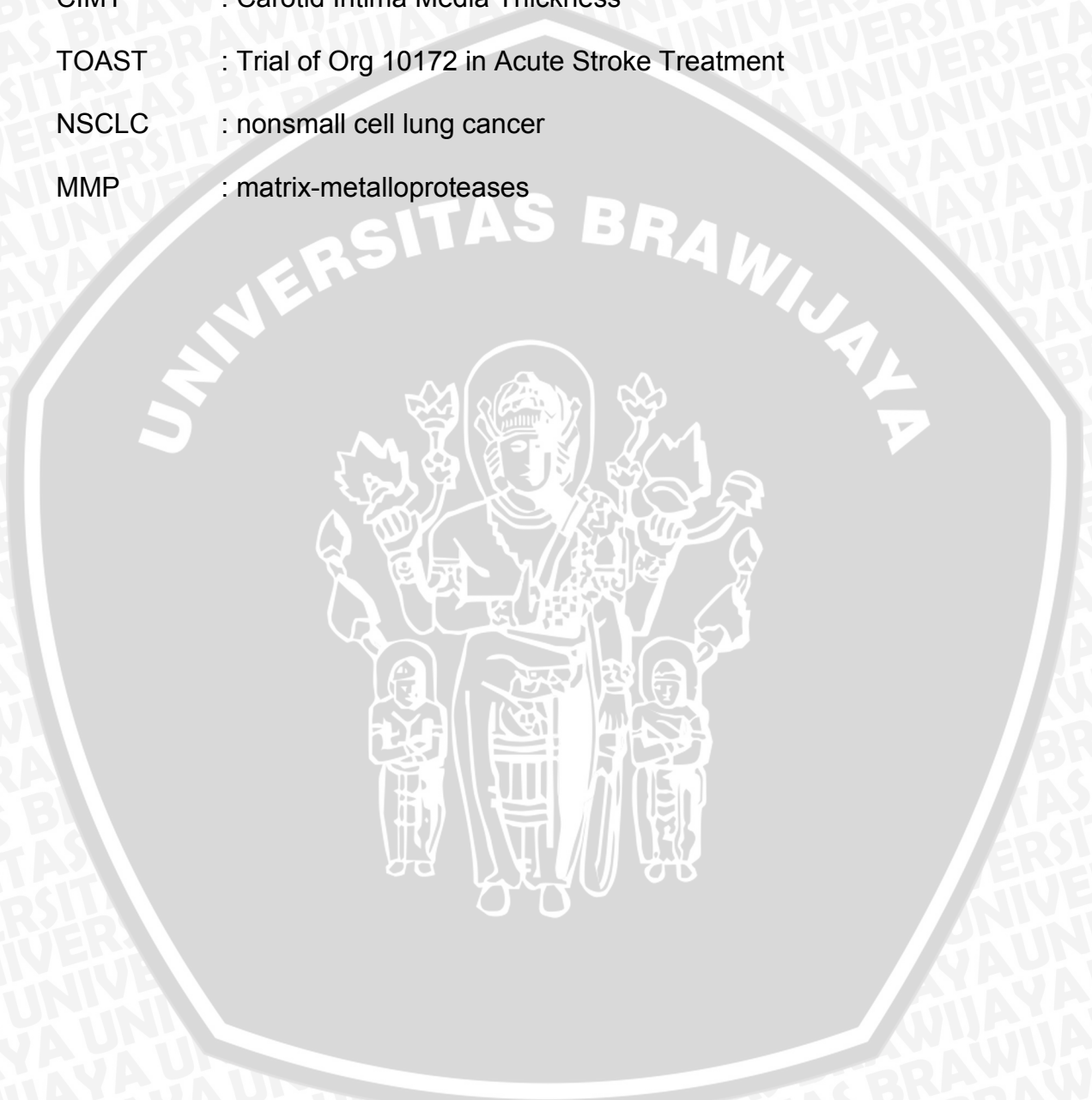
DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Keterangan Kelaikan Etik (Ethical Clearance).....	73
Lampiran 2 Data Dasar.....	74
Lampiran 3 Sekuens Osteopontin (OPN).....	75
Lampiran 4 Uji Normalitas	81
Lampiran 5 Uji Homogenitas	84
Lampiran 6 Uji Komparasi	85
Lampiran 7 Uji Korelasi	98
Lampiran 8 Uji Non Parametrik analisa Kualitatif	101



DAFTAR SINGKATAN

- CIMT : Carotid Intima Media Thickness
TOAST : Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
NSCLC : nonsmall cell lung cancer
MMP : matrix-metalloproteases



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data World Health Organization, 15 juta orang menderita stroke diseluruh dunia setiap tahun, 5 juta diantaranya meninggal dunia sementara 5 juta yang lain mengalami kelumpuhan permanen. Rata-rata kematian karena stroke di Eropa setiap tahunnya sekitar 650.000 kematian (World Health Report, 2002). Di Inggris, stroke merupakan penyebab kematian terbesar yang menyebabkan sekitar 53.000 kematian setiap tahun (sekitar 9% dari seluruh kematian) (Scarborough *et al.*, 2009). Stroke pada anak terjadi pada sekitar satu di setiap 4.000 kelahiran. Risiko stroke sejak kelahiran hingga usia 18 tahun mendekati angka 11 kasus per 100.000 anak setiap tahun. Diperkirakan terdapat sekitar 3.000 anak dan dewasa di bawah 20 tahun yang mengidap stroke di Amerika pada tahun 2004. Fakta menunjukkan bahwa stroke merupakan satu dari 10 penyebab kematian pada anak di dunia (Lloyd *et al.*, 2009).

Di Indonesia, stroke merupakan penyakit dengan penyebab kematian terbesar yaitu sekitar 15,4% kematian, disusul hipertensi, diabetes, kanker, dan penyakit paru obstruktif kronis. Data Riskesdas 2007, menunjukkan di perkotaan, kematian akibat stroke pada kelompok usia 45-54 tahun sebesar 15,9%, sedangkan di pedesaan sebesar 11,5%. Hal ini menunjukkan bahwa baik di Indonesia maupun di dunia, stroke telah banyak menyerang usia produktif bahkan anak-anak (Depkes, 2012).

Stroke iskemik (*ischemic attack*) adalah salah satu penyakit kardiovaskular yang terjadi akibat adanya sumbatan dan menyebabkan timbulnya gejala-gejala penurunan fungsi neurologis karena kekurangan aliran darah (Koda-Kimble, 2009). Stroke iskemik disebabkan adanya sumbatan pada pembuluh darah besar intrakranial yang dapat menyebabkan tingginya angka kematian. Kondisi penyumbatan ini biasa disebut dengan aterosklerosis. Sumbatan ini dapat terjadi pada beberapa pembuluh darah besar antara lain *middle cerebral artery* (MCA), *internal carotid artery*, dan *basilar artery* (Fauci *et al.*, 2008). Adanya sumbatan dapat disebabkan karena adanya plak berupa lipid, inflamasi, dan infiltrasi sel atau karena penebalan intima media arteri karotis atau *common carotid artery* (CCA) *intima media thickness* (IMT) (Roquer *et al.*, 2011).

Peningkatan ketebalan intima media arteri karotis dilaporkan terjadi pada fase awal proses aterosklerosis. Ketebalan intima media arteri karotis biasa digunakan sebagai pengukuran terjadinya aterosklerosis secara umum. Studi menunjukkan bahwa peningkatan ketebalan intima media arteri karotis merupakan prediktor kuat terjadinya komplikasi koroner dan serebrovaskularis (Magyar, 2002).

Terdapat hubungan yang kuat antara penebalan intima media arteri karotis dengan polimorfisme yang terjadi pada promotor osteopontin. Osteopontin adalah fosfoglikoprotein adhesive yang menunjukkan beberapa fungsi dalam proses fisiologis dan patologis yang berbeda, termasuk didalamnya perbaikan tulang, imunitas yang dimediasi sel, penjagaan dan pembentukan kembali integritas jaringan selama proses inflamasi, dan metastase tumor. Polimorfisme pada promotor osteopontin

ini dapat terjadi pada berbagai tempat antara lain T-443C, T-66G, dan G-156GG (Giacopelli *et al.*, 2004). G-156GG merupakan alel yang masih belum banyak diteliti dibandingkan dengan kedua alel yang lain.

Stroke sebagai penyakit degeneratif dengan jumlah penderita yang banyak, semakin hari banyak menyerang pasien usia muda. Hal ini menggiring penelitian terkait stroke pada pengendalian faktor risiko sebagai bentuk pencegahan. Salah satu faktor risiko yang berpengaruh pada kasus stroke iskemik adalah over ekspresi OPN yang bisa disebabkan oleh adanya variasi genetic, salah satunya pada titik G-156GG. Belum ada studi khusus yang dilakukan untuk mengetahui hubungan populasi stroke iskemik pada populasi Jawa dan tingkat prevalensi stroke iskemik di Indonesia. Oleh karena itu, perlunya dilakukan penelitian ini adalah untuk melihat hubungan ketebalan intima media arteri karotis pada anak popuasi Jawa berdasarkan keberadaan variasi genetik promoter osteopontin pada alel G-156 GG.

1.2 Rumusan Masalah

1. Apakah terjadi variasi genetik pengkode OPN (SNP -156) pada anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik?
2. Apakah terdapat hubungan antara variasi genetik pengkode OPN (SNP -156) dengan penebalan intima media arteri carotis?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah:

1. untuk mengidentifikasi adanya variasi genetik pengkode OPN (SNP -156) pada anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik.

2. Untuk menganalisa hubungan antara variasi genetik pengkode OPN (SNP -156) dengan penebalan intima media arteri carotis.

1.4 Manfaat penelitian

1.4.1 Manfaat akademik

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menambah referensi sumber terkait alel yang berperan dalam penebalan intima media karotis sehingga dapat dijadikan sumber pijakan bagi penelitian-penelitian terkait variasi genetik osteopontin selanjutnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat digunakan pada studi di masa mendatang dalam mengevaluasi potensi penggunaan OPN untuk memprediksi intervensi yang dapat dilakukan untuk memperbaiki luaran penyakit kardiovaskular, termasuk stroke.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Stroke Iskemik

2.1.1 Definisi stroke iskemik

Stroke iskemik adalah nekrosis yang terjadi pada jaringan central nervous system (CNS). Stroke iskemik bisa memperlihatkan gejala ataupun tidak. Stroke iskemik yang memperlihatkan gejala merupakan manifestasi klinis dari disfungsi otak fokal dan global, spinal, atau retina yang disebabkan karena nekrosis tadi (Easton *et al.*, 2009).

Table 1.1 Subtype stroke iskemik akut berdasarkan klasifikasi TOAST

Large-artery atherosclerosis (embolus/ thrombosis)

Cardioembolism (high-risk/ medium-risk)

Small-vessel occlusion (lacune)

Stroke of other determined etiology

Stroke of undetermined etiology

- a. Two or more causes identified
- b. Negative evaluation
- c. Incomplete evaluation

Barford *et al* mengatakan bahwa luaran ataupun kekambuhan stroke tergantung pada subtype stroke. Pada tabel diatas telah diperlihatkan lima kelompok klasifikasi yang digunakan dalam penelitian klinis. Penggunaan klasifikasi TOAST dapat menutupi kekurangan dari pemeriksaan klinis di satu sisi akan tetapi tidak mampu menjelaskan hasil pemeriksaan dengan sangat tepat disisi yang lain, sehingga klasifikasi TOAST tidak selalu bisa diterapkan pada semua penelitian klinis (Amarenco *et al.*, 2009).

Penyebab utama terjadinya stroke iskemik antara lain aterosklerosis pada pembuluh arteri besar (makroangiopati), kardioemboli, dan penyakit pada pembuluh darah kecil otak (mikroangiopati). Penyebab lain yang lebih jarang ditemukan antara lain vaskulitis otak, penyakit hematologi dan lain-lain (Grau *et al.*, 2001)

2.1.2 Epidemiologi

Di seluruh dunia, 15 juta orang menderita stroke setiap tahun, 5 juta diantaranya meninggal dunia sementara 5 juta yang lain mengalami kelumpuhan permanen. Pada kasus kematian rata-rata karena stroke di Eropa, setiap tahunnya terdapat sekitar 650.000 kematian (World Health Report, 2002). Adapun di Inggris, stroke merupakan penyebab kematian terbesar yang menyebabkan sekitar 53.000 kematian setiap tahun (sekitar 9% dari seluruh kematian) (Scarborough *et al.*, 2009). Selain pada orang dewasa, stroke pada anak juga terjadi pada sekitar satu dari setiap 4.000 kelahiran. Sejak kelahiran hingga usia 18 tahun risiko stroke mendekati angka 11 kasus per 100.000 anak setiap tahun. Pada tahun 2004, diperkirakan terdapat sekitar 3.000 anak dan dewasa dibawah 20 tahun yang mengidap stroke di Amerika. Data-data epidemiologi ini menunjukkan bahwa stroke merupakan satu dari 10 penyebab kematian pada anak di dunia (Lloyd *et al.*, 2009).

Di Indonesia, salah satu penyakit penyebab kematian terbesar dengan persentase 15,4% adalah stroke, yang diikuti disusul hipertensi, diabetes, kanker, dan penyakit paru obstruktif kronis. Menurut data Riskesdas 2007, terdapat perbedaan angka kematian akibat stroke di kota dan di desa. Di perkotaan, kematian akibat stroke pada kelompok

usia 45-54 tahun sebesar 15,9%, sedangkan di pedesaan sebesar 11,5% (Depkes, 2012).

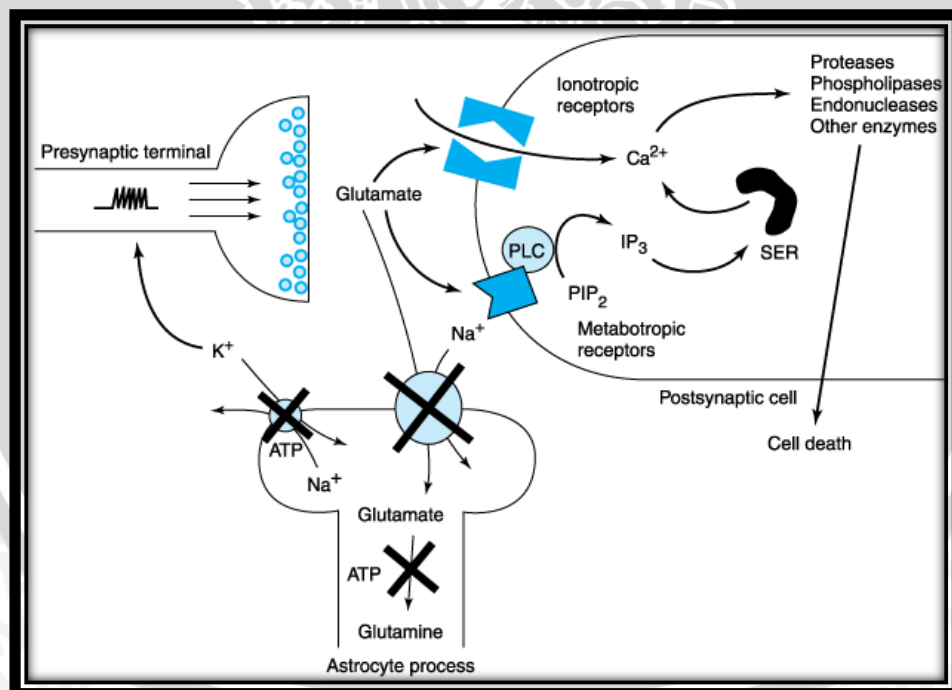
2.1.3 Patofisiologi stroke iskemik

Penyumbatan akut pada pembuluh darah intrakranial menyebabkan berkurangnya aliran darah menuju otak. Besarnya penurunan kecepatan aliran darah hingga mencapai nilai nol menyebabkan kematian jaringan otak dalam 4-10 menit. Jika darah kembali mengalir sebelum sebagian besar sel mengalami kematian, maka pasien akan mengalami gejala sementara (*transient*), contohnya TIA (*Transient Ischemic Attack*). Jaringan yang mengelilingi bagian yang tersumbat mengalami iskemik reversibel disebut *Ischemic Penumbra* (Fauci *et al.*, 2008).

Dua mekanisme utama yang menyebabkan kerusakan otak pada stroke adalah iskemik dan perdarahan. Pada stroke iskemik, yang mewakili sekitar 80% dari semua stroke, penurunan atau hilangnya aliran darah menyebabkan pasokan glukosa menjadi berkurang yang selanjutnya mengakibatkan kegagalan mitokondria dalam memproduksi ATP (Gambar 2.1). Tanpa ATP, pompa ion pada membran sel neuron berhenti berfungsi, terjadi depolarisasi neuron, sehingga kalsium intraseluler meningkat (Fauci *et al.*, 2008).

Depolarisasi seluler juga menyebabkan pelepasan glutamate dan aspartate. Proses ini disebut dengan eksitotoksisitas. Glutamat, yang pada dasarnya berada di dalam sambungan sinaptik, dilepaskan di area ekstraseluler yang kemudian akan berikatan dengan reseptor N-methyl-D-aspartate dan alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxanole propionate

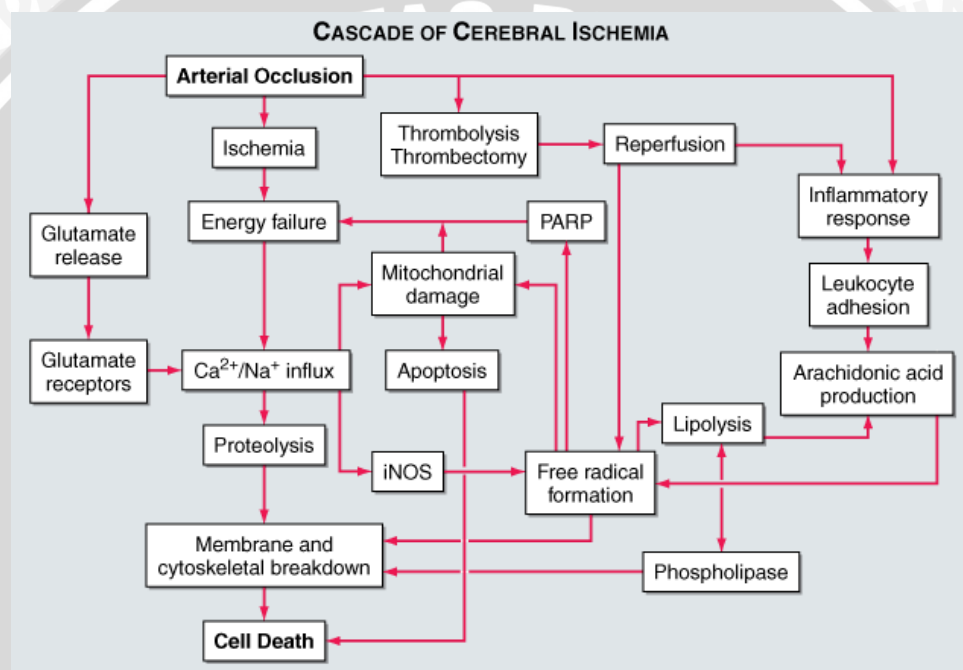
(AMPA). Ditempatinya reseptor NMDA dan AMPA oleh glutamate akan meningkatkan *influx* ion kalsium, natrium, dan klorida serta meningkatkan *efflux* kalium. Peningkatan konsentrasi kalsium, natrium, dan klorida intrasel menyebabkan pembengkakan pada neuron dan glia (edema sitotoksik). Hal ini disebabkan karena aktivasi beberapa enzim destruktif seperti protease, lipase, dan endonuklease yang mengakibatkan pelepasan produk metabolit berupa oksigen radikal bebas, hidroksida ($-OH$), nitric oxide (NO) dan sitokin. Produk metabolik tersebut merupakan penyebab hilangnya integritas seluler berupa rusaknya membran sel dan struktur protein sel neuron, yang akhirnya menyebabkan kematian sel (Deb *et al.*, 2009). Mekanisme di atas dijelaskan dalam Gambar 2.2.



Gambar 2.1 Mekanisme glutamate dalam meningkatkan influx kalsium (McPhee *et al.*, 2005)

Ketika terjadi iskemia otak, mikroglia, atrosit, sel endotel, dan neuron melepaskan sitokin, seperti Interleukin-1 (IL-1) dan Tumor Necrosis Factor (TNF- α), yang menyebabkan leukosit berkumpul,

teraktivasi dan akhirnya menempel pada sel endotel. Leukosit juga akan mengaktifkan bahan vasoaktif seperti radikal bebas, metabolit asam arakidonat (sitokin), dan asam nitrat. Vasoaktif itu menyebabkan vasodilatasi, vasokonstriksi, peningkatan permeabilitas sel, dan peningkatan jumlah leukosit di dinding endothelium. Hal ini menyebabkan kerusakan membran dan sitoskeletal (Shah, 1997).



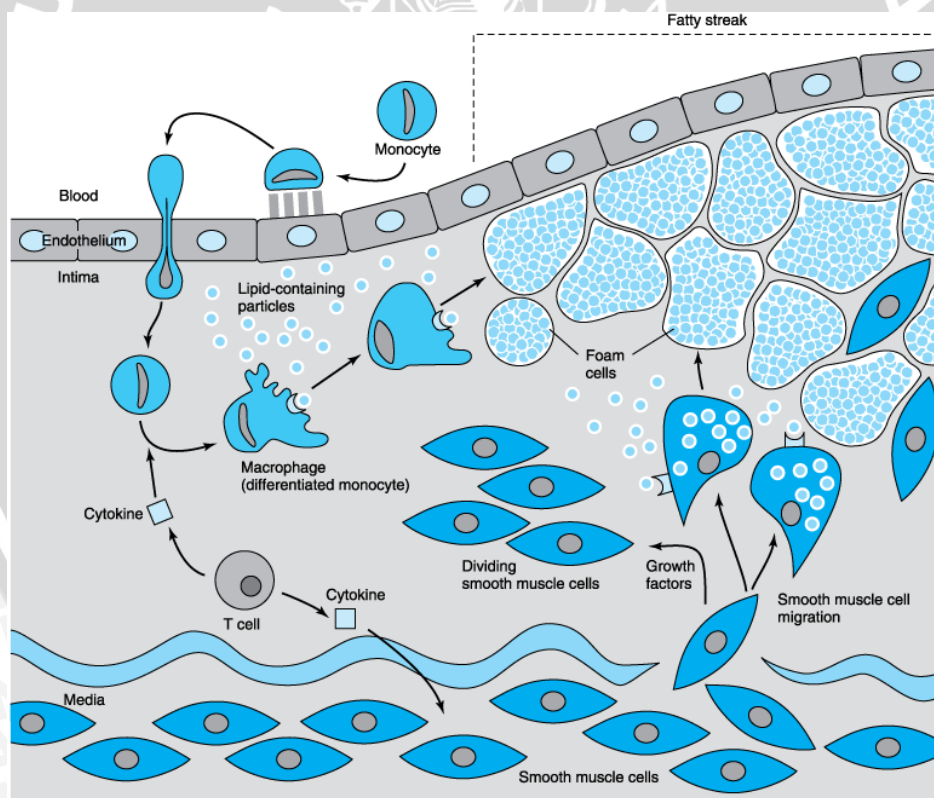
Gambar 2.2 kaskade terjadinya iskemia serebral (McPhee *et al.*, 2005).

2.1.4 Mekanisme Aterosklerosis

Aterogenesis merupakan proses panjang yang menyebabkan perubahan berupa obstruksi luminal oleh bahan seluler maupun aselular. Perubahan itu dapat berupa (a) lapisan lemak, lesi dini yang terlihat berwarna kekuningan pada area intima, bergantung pada akumulasi dari lemak yang berikatan dengan makrofag, terjadi sekitar 30 % pada anak dibawah 5 tahun; (b) lesi yang semakin meningkat dengan lemak ekstraselular pada pembuluh arteri, hal ini terjadi pada anak-anak dan

remaja; (c) *complicated fibrous plaque*: area sentral aselular dari lipid yang tertutup oleh sel otot polos dan kolagen, terjadi pada orang berumur diatas 30 tahun (Deb *et al.*, 2009).

Proses aterosklerosis diawali infiltrasi *low-density lipoprotein* (LDL) pada area subendotel. Sel endotel merupakan sel dengan kecenderungan tinggi untuk dirusak oleh aliran darah. Sel endotel juga merupakan tempat akumulasi lemak terbanyak. LDL dioksidasi atau diubah oleh makrofag membentuk sel busa (*foam cell*). LDL teroksidasi ini memiliki efek menstimulasi pelepasan sitokin dan menghambat produksi Nitric Oxide (McPhee *et al.*, 2005).



Gambar 2.3 Mekanisme pembentukan sel busa (McPhee *et al.*, 2005).

Sel otot polos vaskular di sekitar sel busa akan distimulasi dan menyebabkan pengurangan jumlah kolagen dan matriks seluler yang lain. Pada akhirnya sel otot polos juga menjadi sel busa dan lemak

terakumulasi baik pada intrasel maupun ekstrasel. Setelah terjadinya stroke, monosit berikatan dengan sel endotel, menembus ruang endothelium dan menjadi makrofag di jaringan yang aktif. Makrofag akan mengikat LDL yang teroksidasi dan berubah menjadi sel busa. Sel T melepaskan sitokin yang juga mengaktifasi makrofag. Sitokin menyebabkan proliferasi sel otot polos. Sel otot polos ini kemudian bermigrasi ke ruang subendotelial lalu berubah menjadi sel busa. Sel busa inilah yang merupakan kunci berkembangnya lesi aterosklerosis (Mc Phee *et al.*, 2005).

2.1.5 Penebalan Carotid Intima Media

Penebalan Carotid Intima Media (CIMT) didefinisikan sebagai sebuah ukuran jarak antara permukaan luminal –intimal dan permukaan media-adventitial pada arteri carotid. Lebih spesifik lagi, CIMT adalah dua garis berpola yang dilihat melalui B-mode vaskular ultrasound, gambar ini terdiri atas: persimpangan antara lumen pembuluh dan intima; persimpangan antara media dan adventitia (Laviakis *et al.*, 2010). CIMT merupakan prediktor kuat terjadinya stroke, dimana pengukuran penebalan arteri CIMT memiliki ketepatan tinggi dalam memprediksi terjadinya infark miokard (O'Leary *et al.*, 1999).

CIMT bisa menjadi skrining yang sangat optimal dikarenakan beberapa hal: 1) CIMT dapat secara langsung menggambarkan kondisi vaskular tidak seperti biomarker lain seperti low density lipoprotein (LDL) atau c-reaktive (protein yang jumlahnya meningkat sebagai respon terjadinya inflamasi). 2) CIMT dengan melakukan pemeriksaan plak dapat dilakukan pada setiap alat USG dan dapat diatur dengan kecepatan dan

biaya yang menguntungkan. 3) CIMT dapat dengan mudah diukur melalui software pendeteksi otomatis, pemeriksaan ini juga bebas radiasi sehingga aman untuk dilakukan (Laviakis *et al.*, 2010) .

2.1.6 Hubungan Aterosklerosis dan Penebalan Karotid Arteri Intima Media

CIMT merupakan marker pengganti aterosklerosis yang bermakna CIMT dapat digunakan dalam memperkirakan terjadinya aterosklerosis pada pembuluh darah arteri karotis. Hubungan antara aterosklerosis dan penebalan arteri karotis intima media yaitu, semakin tebal arteri karotis intima media, semakin tinggi tingkat kejadian infark miokard dan stroke (Coll *et al.*, 2008). Dalam sebuah penelitian dijelaskan hubungan antara nilai penebalan arteri karotis intima media dan subtipe stroke iskemik mempunyai nilai statistik yang signifikan berdasarkan klasifikasi TOAST (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment), hal ini bermakna bahwa peningkatan nilai rata-rata CIMT berhubungan kuat dengan stroke iskemik (Mutu *et al.*, 2012).

Pada studi klinis, pengukuran CIMT berhubungan dengan faktor risiko kardiovaskular. Selama bertahun-tahun, studi klinis telah membuktikan hasil yang mendukung peran pengukuran CIMT dalam memprediksi kejadian kardiovaskular (Coll *et al.*, 2008). Lorenz *et al* merangkum data CIMT dari 37.000 individu dan dari data itu dapat disimpulkan bahwa pada penambahan 0.1 mm CIMT terdapat peningkatan 10%-15% risiko mengalami infark miokard dan peningkatan 13%-18% untuk mengalami stroke.

2.2 Osteopontin

Osteopontin (OPN) adalah phosphoglikoprotein adhesif yang memiliki beberapa fungsi fisiologis dan patologis, termasuk didalamnya pembentukan kembali tulang, meningkatkan aktivitas imun yang dimediasi sel, menjaga integritas sel selama terjadinya proses inflamasi, dan metastase sel tumor. OPN memiliki struktur protein yang kompleks. OPN terdiri dari sekitar 300 asam amino, tergantung pada spesiesnya (Giacopelli *et al.*, 2004).

Protein ini mengandung motif Arg-Gly-Asp (RGD) yaitu bagian dari glikoprotein ekstraseluler yang memediasi penempelan dengan sel melalui ikatannya dengan reseptor integrin. Protein ini dapat ditemukan pada seluruh cairan tubuh, pada jaringan bentuk matriks protein ekstraseluler dan sebagai sitokin pada cairan tubuh yang bisa menempati beberapa reseptor termasuk $\alpha V\text{-}\beta 3$ dan reseptor integrin lainnya, dan protein ini juga bisa menjadi ligan untuk beberapa variasi bentuk CD44. Interaksi OPN dengan reseptor dan ligan tersebut menyebabkan aktifnya jalur signaling sel, memediasi interaksi sel-matriks dan interaksi sel-sel (Giacopelli *et al.*, 2004).

2.2.1 Fungsi Osteopontin

Secara umum, OPN melakukan dua aktivitas, adhesi (menempel) dan migrasi (berpindah). Aktivitas adhesi ini disebabkan kandungan motif RGD yang mampu berikatan dengan reseptor integrin. Secara fungsional, OPN mempunyai fungsi penting dalam keadaan fisiologi normal juga pada proses patologis. Selama proses tumbuh kembang, osteopontin berperan dalam proses gastrulasi pada notochord dan pada bagian

kondensasi kartilago dan pembentukan tulangdan jaringan epitel (Scatena *et al.*, 2007).

Dalam reaksi inflamasi, OPN dapat mengaktifasi migrasi makrofag dan menstimulasi migrasi sel otot polos dari bagian medial ke bagian intima. Aktivasi makrofag dan stimulasi sel oto polos ini menyebabkan peningkatan jumlah sel busa seperti yang terjadi pada proses aterosklerosis. OPN diekspresikan pada makrofag setelah terjadinya luka miokard dan selama pemulihan luka pada kulit. Selain itu, ekspresi anti sense OPN dapat menurunkan tumorigenitas dan kemampuan metastases sel (Nau , 2000).

2.2.2 Hubungan Osteopontin Dengan Penebalan Carotid Intima Media

OPN direekspresikan dalam proses proliferasi dan migrasi sel pada pembuluh darah yang berhubungan dengan pembentukan neointima dan pada sel inflammasi, lesi aterosklerosis manusia, sel endotel angiogenik, dan pada makrofag. OPN juga diekspresikan pada sel otot polos yang berhubungan dengan lesi restenotik (penyempitan pembuluh darah yang terjadi kembali) manusia (Scatena *et al.*, 2007).

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa ekspresi berlebih OPN menyebabkan menebalnya lapisan medial dan meningkatkan formasi neointima. Hal tersebut terjadi karena peningkatan proliferasi sel otot polos produksi MMP (matrix-metalloproteases) yang distimulasi oleh OPN melalui aktivasi nF-κB. Saat terjadi luka sel otot polos akan bermigrasi ke area luka dan menginduksi terjadinya restenosis. Dalam hal ini, restenosis merupakan mekanisme perbaikan pada pembuluh darah setelah terjadinya luka. Dalam proses ini, ekspresi berlebih OPN dapat

meningkatkan respon proliferasi neointimal yang selanjutnya akan berkembang menjadi restenosis. Dalam penelitian ini dapat disimpulkan penghambatan pada ekspresi gen OPN pada area luka dapat menjadi terapi untuk mencegah terjadinya restenosis (Isoda *et al.*, 2002).

2.2.3 Polimorfisme Osteopontin

Polimorfisme merupakan istilah yang menggambarkan variabilitas jenis, bentuk, ukuran dan komposisi yang nilainya berbeda dalam berbagai disiplin ilmu. Dalam bidang genetik, istilah ini lebih spesifik dalam menggambarkan frekuensi terjadinya variasi pada lokus tertentu dalam genome. Polimorfisme genetik bisa terjadi pada bagian pengkode gen (exon) atau bagian yang tidak mengkode gen (Housman, 1995). Polimorfisme yang terjadi pada promoter osteopontin berdampak pada peningkatan aktivitas transkripsi protein tersebut. Ekspresi berlebih OPN dapat distimulasi karena terjadinya respon inflamasi misalnya arthritis, remodeling miokard setelah terjadinya infark, dan penyembuhan luka pada vaskular (Giacopelli *et al.*, 2004).

Beberapa polimorfisme telah ditemukan pada gen OPN, diantaranya berhubungan dengan *oligoarticular (pauciarticular) juvenile idiopathic arthritis*, *nephrolithiasis*, dan *chronic hepatitis C*. Studi terbaru menunjukkan bahwa pasien dengan G/G genotype pada nt -156 di promoter OPN lebih sering didiagnosa dengan advanced stage (IIIB-IV) nonsmall cell lung cancer (NSCLC) daripada mereka dengan genotip yang lain (Zhao *et al.*, 2012). Dalam sebuah studi klinis, ditemukan peningkatan CIMT pada pasien stroke yang memiliki alel C pada OPN C-

443T SNP. Meskipun beberapa penelitian telah memperlihatkan terjadinya polimorfisme pada alel C-443T, namun belum diketahui dengan tepat konsekuensi polimorfisme pada promotor C-443 T terhadap regulasi transkripsi. Berbeda dengan alel T-66G, polimorfisme pada promotor ini terbukti dapat memprediksi risiko seseorang mengalami penyakit makrovaskular (Fuentes *et al.*, 2008). Polimorfisme lainnya adalah G-156 GG (rs17524488) yang dilaporkan berhubungan secara signifikan dengan peningkatan aktivitas OPN (Zhao *et al.*, 2012).

2.2.4 Fungsi Neuroprotektif Osteopontin pada Stroke

Dalam sebuah studi klinis yang dilakukan secara *in vitro* maupun *in vivo*, OPN terbukti dapat digunakan dalam terapi penyakit stroke karena fungsinya sebagai neuroprotektor. OPN terbukti meningkatkan sel yang hidup setelah terjadinya iskemia. Sebagai neuroprotektor, OPN bekerja melalui aktivasi P42/P44 MAPK/ Akt/ PI3K dan interaksi pada reseptor integrin. Aktivasi P42/P44 MAPK/ Akt/PI3K menyebabkan peningkatan fosforilasi dari Akt yang memiliki fungsi neuroprotektif dengan meningkatkan ekspresi OPN. Aktivasi reseptor integrin oleh OPN membuat neuron dapat mentoleransi toksisitas glutamate. Mekanisme OPN dalam mencegah kematian sel antara lain: mensintesis nitrit oxide, meningkatkan aktivitas NF- κ B, dan meningkatkan aktivitas PI3K. Fungsi-fungsi di atas meningkatkan ekspresi OPN dan meningkatkan fungsi neuroprotektifnya (Meller *et al.*, 2005).

Hanya saja, pada studi klinis di atas, pemberian OPN pada mencit dilakukan dengan memberikannya secara langsung ke otak. Hal ini menjadi hambatan dalam penggunaannya sebagai agen terapi. Cara

pemberian yang mungkin dapat dilakukan adalah dengan pemberian intranasal (Meller *et al.*, 2005). Dalam penelitian lain, OPN dapat diberikan intra nasal dan hasilnya menunjukkan bahwa OPN intranasal efisien untuk diberikan pada mencit dengan target kerja di otak (Doyle *et al.*, 2008). Secara umum, OPN telah banyak diteliti sebagai terapi pada beberapa penyakit, yang paling berkembang diantaranya adalah sebagai target terapi pada kanker payudara. OPN dapat digunakan sebagai biomarker dalam mendeteksi terjadinya kanker payudara dan dapat dijadikan target terapi dalam manajemen kanker payudara (Kundu *et al.*, 2011).

2.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)

2.3.1 Pengertian PCR (Polymerase Chain Reaction)

Polymerase Chain Reaction (PCR) merupakan suatu teknik amplifikasi DNA yang dilakukan secara *in vitro* yang berbeda dengan replikasi DNA *invivo*. Perbedaannya adalah pada replikasi *in vitro* tidak menggunakan enzim dalam melakukan beberapa reaksinya misalnya enzim ligase, primer RNA yang menggantikan fungsi enzim primase, *Taq* polymerase yang menggantikan fungsi DNA polymerase, dan menggunakan temperatur tinggi yang menggantikan fungsi enzim helikase, SSB protein, dan topoisomerase. Teknik PCR dapat digunakan untuk mengamplifikasi segmen DNA dalam jumlah jutaan kali dalam beberapa jam. PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. DNA untai ganda dipisahkan dengan denaturasi

termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel pada daerah tertentu dari target DNA. Taq atau DNA Polimerase yang tahan panas digunakan untuk memperpanjang primer dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP dan dTTP) dan buffer yang sesuai (Handoyo *et al.*, 2000).

Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 – 40 siklus. Target DNA yang diinginkan akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat. Penggandaan ini akan menghasilkan jumlah yang cukup untuk digunakan menentukan urutan basa DNA dengan menggunakan metode sekuensing (Mullis, 1993).

2.3.2 Prinsip Kerja PCR

Teknik penggandaan DNA target pada PCR dilakukan dengan mengulang setiap siklus yang terdiri dari tiga langkah berikut (Almubarak *et al.*, 2010):

1. Denaturasi (*melting step*) untuk memisahkan antara dua *strand* DNA, langkah ini membutuhkan temperatur yang sangat tinggi yakni sekitar 95⁰ C selama 10-20 detik.
2. Tahap *annealing*, membuat primer berikatan dengan urutan komplementnya pada DNA *template*, langkah ini membutuhkan temperatur yang lebih rendah yakni 50-60⁰ C
3. Tahap pemanjangan (*Elongation*), ketika primer telah berikatan pada templatnya, sintesis DNA dapat dimulai. Temperatur harus dinaikkan menjadi 70⁰C yang merupakan temperatur optimal untuk enzim Taq atau DNA polimerase tahan panas.

2.3.3 Aplikasi PCR Untuk Deteksi SNP

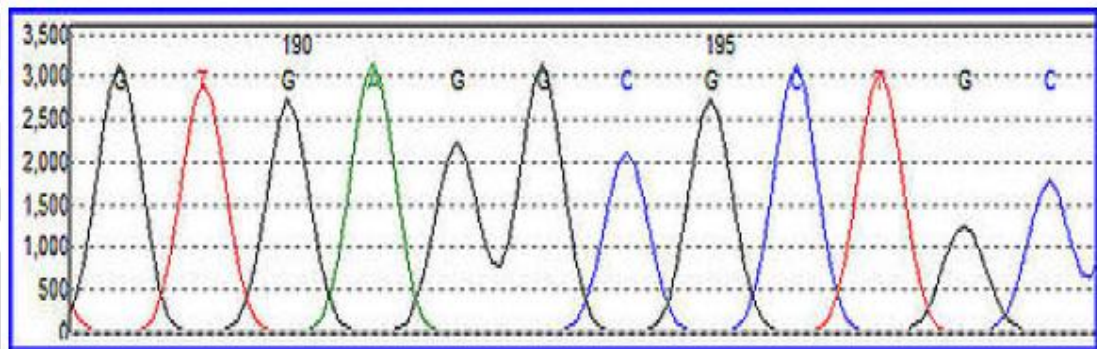
SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) merupakan pasangan basa yang berbeda pada satu individu dengan individu lain yang terdistribusi secara acak pada genome dan diturunkan dari generasi ke generasi. SNP berkontribusi untuk memperlihatkan kemiripan keluarga misalnya kemiripan fisiologis dan risiko untuk mengalami gangguan tertentu yang kemungkinan diperoleh dari orang tuanya. Dalam dunia kedokteran, SNP telah menjadi salah satu parameter yang dapat digunakan dalam mencari alternatif terapi yang baru. (Mullis, 1993).

Analisa SNP dapat dilakukan dengan berbagai teknik genotyping misalnya penggunaan hibridisasi dengan enzim restriksi dan teknik DNA sekuensing yang berbasis analisis fragmen. Salah satu teknik yang banyak digunakan adalah teknik DNA sekuensing. Dengan teknik DNA sekuensing, dapat diketahui basa yang menyusun suatu DNA. Teknik DNA sekuensing harus diawali dengan metode PCR. DNA yang akan ditentukan urutan basanya akan dijadikan cetakan untuk kemudian diamplifikasi agar jumlahnya mencukupi untuk selanjutnya dilakukan proses sekuensing. Oleh karena itu PCR mempunyai peran penting dalam bidang penelitian obat (Papp *et al.*, 2003).

2.3.4 DNA Sekuensing

DNA sekuensing merupakan metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa nukleotida adenine, guanine, sitosin, dan timin pada molekul DNA. Urutan basa DNA dapat diketahui dengan prosedur kimia melalui pemecahan molekul DNA yang terlabeli secara parsial pada setiap pengulangan basa. Panjang dari fragmen yang terlabeli akan mengidentifikasi posisi dari basa. Reaksi yang memotong basa DNA,

secara khusus dibagi menjadi dua. Pertama, reaksi yang memotong basa adenine, guanine, sitosin dan timin, kedua reaksi yang memotong sitosin saja. Produk DNA akan dipisahkan berdasarkan panjang pasang basa melalui elektroforesis, kemudian urutan DNA dapat dibaca melalui pola radioaktif (Mushi, 2012).



Gambar 2.4. Cetakan Basa DNA menggunakan *Dye-terminating Sequencing* yang dilabel dengan flourosense (Mushi, 2012).

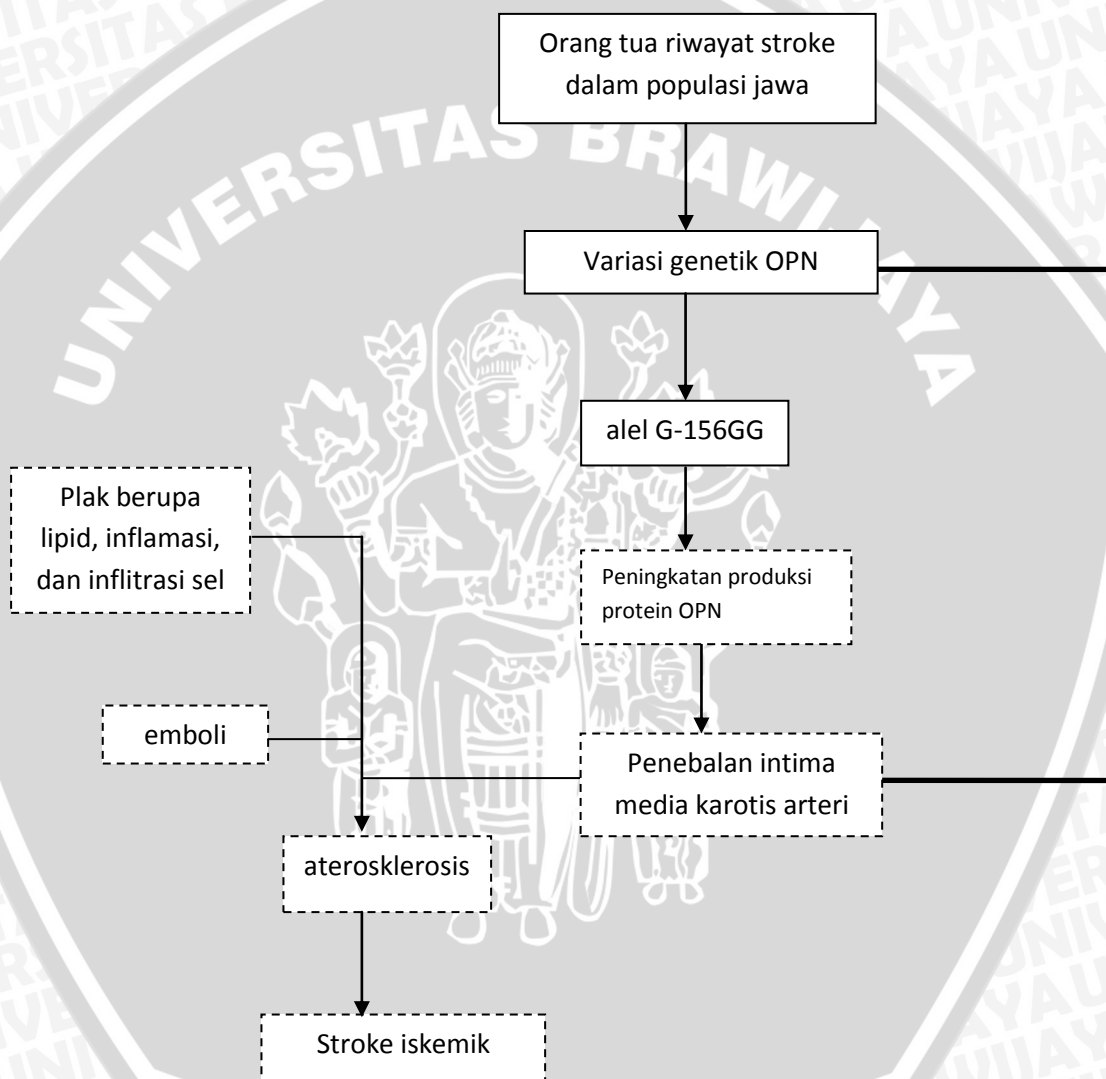
Terdapat beberapa metode DNA sekuensing yang dapat digunakan, antara lain *Maxam – Gilbert sequencing*, *Chain-termination methods*, *Dye-terminator sequencing*, *Automation and sample preparation*, dan *Large scale sequencing strategies*. Gambar diatas menunjukkan urutan basa DNA yang diketahui melalui metode *Dye-terminating Sequencing*. Adapun metode yang umum digunakan adalah metode *Chain-termination methods (Sanger Methods)* yang dinilai lebih efisien dan lebih minim radioaktif dibandingkan dengan metode yang lain (Mushi, 2012).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka konsep penelitian

- Skema



Keterangan:

- : Diteliti
- : tidak diteliti
- : Berpengaruh
- : Berhubungan



- Penjelasan:

Adanya riwayat keluarga yang mengalami stroke iskemik merupakan salah satu faktor risiko yang memungkinkan seseorang untuk mengalami penyakit kardiovaskular. Penelitian terbaru menemukan hubungan yang kuat antara riwayat orang tua yang menderita infark miokard dan peningkatan ketebalan intima media carotid arteri pada anak-anak (Barra S. et al, 2009). Riwayat keluarga mengindikasikan kemungkinan adanya faktor genetik yang mempengaruhi progresi dari penyakit kardiovaskular. Adanya variasi genetik pada gen pengkode protein OPN dapat dihubungkan dengan penebalan intima media arteri karotis. Penebalan intima media arteri karotis ini merupakan salah satu penyebab utama stroke iskemik, di samping penyebab-penyebab lain yaitu emboli dan timbulnya plak karena lipid, lemak, dan inflamasi sel. Hubungan yang kuat antara variasi genetik gen pengkode OPN dengan peningkatan intima media arteri karotis mengindikasikan bahwa adanya variasi genetik gen pengkode OPN ini dapat menjadi indikator awal kemungkinan terjadinya penebalan pada intima media carotid arteri.

3.2 Hipotesis penelitian

1. Terdapat terdapat hubungan antara variasi genetik pengkode OPN (SNP -156) dengan sampel dari populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik
2. Terdapat hubungan antara variasi genetik pengkode OPN (SNP -156) dengan penebalan intima media arteri karotis

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitikal. Observasional yakni dengan melihat dan memperhatikan hasil deteksi yang dilakukan pada sampel sedangkan analitikal karena pada penelitian terdapat grup pembandingan. Dalam penelitian ini peneliti tidak melakukan suatu tindakan atau perlakuan terhadap pasien.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi

Anak berusia 10 - 21 tahun dengan orang tua kandung (ayah dan atau ibu) penderita stroke iskemia.

4.2.2 Sampel

Kasus :

Anak berusia 10 - 21 tahun dengan orang tua kandung (ayah dan/atau ibu) penderita stroke iskemia yang sedang atau pernah di rawat inap di RS Saiful Anwar Malang atau berobat di poliklinik Neurologi RS Saiful Anwar Malang.

Kontrol :

Anak berusia 10 - 21 tahun dengan orang tua kandung sehat, tidak terdapat riwayat stroke, penyakit jantung, diabetes mellitus dan hipertensi.

4.2.3 Besar Sampel

Jumlah sampel dihitung sesuai rumus besar sampel untuk studi kasus kontrol, sebagai berikut: $\frac{2 \times (Z\alpha + Z\beta)^2 \times \sigma^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2}$

Di mana:

$n_1 = n_2$: Jumlah kasus = kontrol

$Z\alpha$: $\alpha = 5\%$; $Z\alpha = 1,96$

$Z\beta$: $\beta = 10\%$; $Z\beta = 0,842$

σ^2 : Standar deviasi dari parameter yang akan diukur (faktor risk)

$\mu_1 - \mu_2$: Selisih proporsi kelompok tanpa riwayat orang tua stroke iskemi dan kelompok dengan riwayat orang tua stroke iskemi (Barra *et al*, 2009)

Sehingga

$$= \frac{2 \times (1.96 + 0.84)^2 \times 0.014^2}{(0.076 - 0.062)^2}$$

$$= \frac{0.00307328}{0.000196}$$

$$= 15.68 \text{ dibulatkan jadi } 16$$

Jadi, $n_1 = n_2 = 16$

4.3 Variabel Penelitian

Variabel penelitian terdiri dari :

- Variabel bebas: Polimorfisme promoter Osteopontin
- Variabel terikat: Penebalan intima media arteri karotis

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Tempat penelitian di Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini dilaksanakan pada April-Desember 2012.

4.5 Definisi Operasional

1. Amplifikasi gen : proses penggandaan dan perbanyak DNA yang dapat dilakukan dengan PCR. Dari proses amplifikasi gen ini, akan diperoleh banyak rantai DNA yang mencukupi untuk selanjutnya dilakukan sequencing
2. Sekuensing DNA: metode yang digunakan untuk menentukan urutan basa nukleotida adenine, guanine, sitosin, dan timin pada molekul DNA, yang dapat diketahui dengan prosedur kimia melalui pemecahan molekul DNA yang terlabeli secara parsial pada setiap pengulangan basa.
3. Analisis migrasi: teknik pemisahan komponen DNA bermuatan berdasarkan perbedaan tingkat migrasinya dalam sebuah medan listrik. Hasil dari analisis migrasi berupa pita/ *band* yang menunjukkan besar kecilnya pasang basa

4.6 Bahan dan Alat/Instrumen Penelitian

4.6.1 Alat/ Instrument Penelitian

- a. Alat untuk amplifikasi gen: Tip 1-10 μL , Tip 20-200 μL , microtube, Mikropipet 0.5-10 μL , Mikropipet 5-200 μL , *thermal cyclcer*
- b. Alat untuk melakukan Elektroforesis: Timbangan Chyo, *Hotplate Stirrer* model L-81, Alumunium foil, Stirrer, Erlenmeyer, Gelas ukur 100 ml,

Gelas beaker 1000 ml, Mikropipet 0.5-10 μ L, Tip putih, Parafilm, Elektrophoresis system

4.6.2 Bahan

PCR

- DNA template
- Primer forward
- Primer reverse
- *Pfu* dengan $MgSO_4$
- *Pfu* DNA polymerase
- DNtP mix
- Aquades

Eletroforesis

- Agarosa 0.4 g
- EtBr 1 μ L
- TAE 10x 30 ml
- DNA marker
- Loading dye
- Etanol
- Sampel dan kontrol

4.7 Prosedur Penelitian/ Pengumpulan Data

4.7.1 Analisa genotyping polimorfisme OPN

1. Dilakukan analisa primer spesifik untuk deteksi SNP-156 pada gen pengkode OPN. Pasangan primer diperoleh dari jurnal dengan melihat besarnya cakupan basa DNA yang dapat digandakan, yaitu primer spesifik OPN berupa forward primer: 5'ATTACAATTCGTGACTGCC3' dan reverse primer: 5'CAAACGCCGACCAAGGTACA3' (Giacopelli *et al.*, 2004). Kemudian dilakukan analisa menggunakan program DNASTAR dan primer BLAST atas kedua primer tersebut (DNASTAR, Inc).
2. Dilakukan pengumpulan sampel darah.
3. dikumpulkan sampel darah perifer pada tabung mengandung EDTA. DNA kromosom diisolasi menggunakan prosedur kit ekstraksi

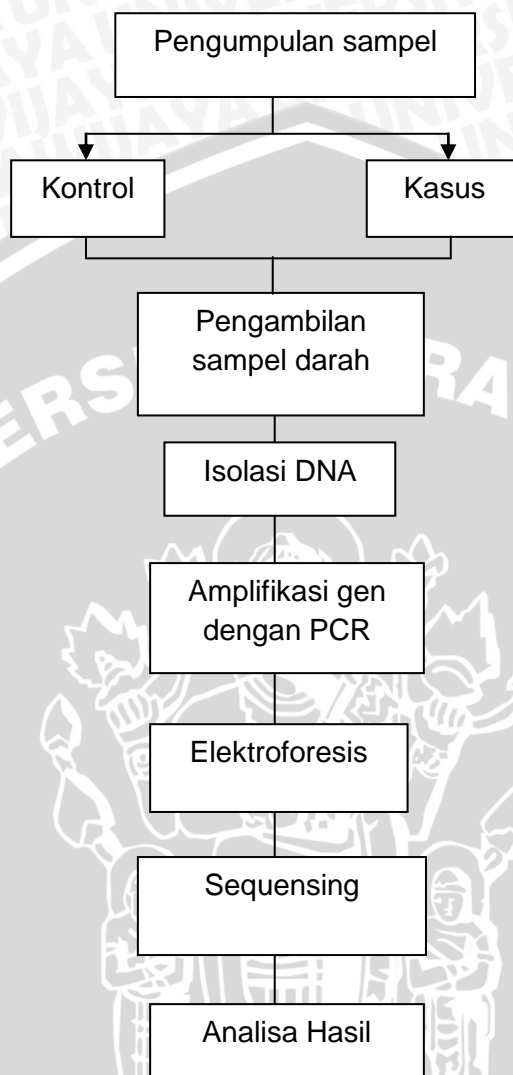
Wizard® Genomic DNA purification Kit (Promega). Prinsip isolasi DNA adalah pemecahan dinding sel, yang diikuti dengan pemisahan DNA dari komponen-komponen lain. Dengan demikian akan diperoleh kualitas DNA yang lebih baik dan murni. Hasil isolasi DNA dikarakterisasi menggunakan analisis migrasi dengan gel agarosa. DNA hasil isolasi digunakan sebagai template/cetakan untuk mengamplifikasi encoding DNA untuk OPN.

4. Dilakukan amplifikasi gen osteopontin dari DNA hasil isolasi diawali dengan memasukkan komposisi PCR pada masing-masing eppendorf, yakni memipet Master mix sebanyak 10 μL , Primer Forward sebanyak 1 μL , Primer reverse 1 μL , DNA template 1 μL , Aquades 7 μL untuk masing-masing sampel dan memipet Master mix sebanyak 10 μL , Primer Forward sebanyak 1 μL , Primer reverse 1 μL , Aquades 8 μL untuk control. PCR dilakukan dibawah kondisi: 95°C selama 2 menit, kemudian 34 siklus untuk 94 °C selama 30 detik, temperature anneling 55°C selama 30 detik, dan 72 °C selama 60 detik, dengan postelongasi pada 72 °C selam 5 menit.
5. Dilakukan karakterisasi oleh analisis migrasi menggunakan analisis migrasi gel agarose berkonsentrasi 1% dengan prosedur:
 - Dibuat TAE buffer 10x dengan komposisi: 9.68 tris base, 2.284 mL asam asetat, dan 4 mL Na_2EDTA 0.5 M. Kemudian TAE 10x diencerkan menjadi 1 x
 - Untuk membuat gel, dimasukkan 0.4 g agarosa kedalam 40 ml TAE 1 x lalu dipanaskan pada suhu 175°C dengan kecepatan tertentu hingga mendidih dan bening dan ditambahkan EtBr 1 μL .

setelah dingin, dimasukkan ke dalam wadah cetakan gel, ditunggu hingga beku.

- Untuk melakukan analisis migrasi, gel dimasukkan kedalam chamber analisis migrasi lalu DNA marker dimasukkan pada salah satu sumuran. Untuk sampel, campurkan loading dye dengan sampel dan kontrol di atas kertas parafilm lalu masukkan ke dalam sumuran. Alat dinyalakan selama 60 menit dengan tegangan 80 volt.
- 6. Dilakukan purifikasi pada produk amplifikasi gen kemudian ditentukan urutan nukleotidanya dengan sekuenser otomatis.
- 7. Dilakukan sekuensing / penentuan urutan nukleotida.
- 8. Dilakukan analisis hasil sekuensing. Hasil sekuensing dianalisa menggunakan Basic Local Alignment Search Tools (BLAST) <http://ncbi.nih.nlm.gov>, program CLC main workbench 5 dan program Sequencher.

4.8 Diagram Alur Penelitian



4.9 Analisis Data

Data yang didapat dianalisis dengan menggunakan analisis korelasi data kualitatif. Adapun analisa statistiknya dilakukan dengan menggunakan program statistik SPSS for window versi 16,0.

BAB 5**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**

Sampel penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian sebelumnya (Yueniwati, 2010). Sampel kelompok kasus adalah anak kandung penderita stroke iskemi populasi Jawa berumur 10-21 tahun, yang pernah atau sedang dirawat dibagian Neurologi RS Saiful Anwar Malang dan atau berobat di poliklinik Neurologi di RS Saiful Anwar Malang. Kelompok kontrol adalah anak populasi Jawa dengan orang tua sehat. Jumlah sampel kelompok kasus adalah 19 orang dan kelompok kontrol adalah 13 orang.

Sebelum dilakukan analisis, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dari data-data yang diperoleh, berupa hasil pemeriksaan laboratorium dan hasil ultrasonografi. Uji normalitas data menggunakan metode uji Kolmogorov-Smirnov. Data dikatakan terdistribusi normal apabila mempunyai nilai signifikansi (p) lebih besar dari $\infty = 0.05$. Hasil dari uji ini memperlihatkan data telah terdistribusi normal (lihat lampiran)

Dilakukan pula uji homogenitas data. Data dikatakan homogen apabila mempunyai nilai signifikansi (p) lebih besar dari $\infty = 0.05$. Hasil dari uji ini memperlihatkan data telah memenuhi uji homogenitas data (lihat lampiran).

5.1 Karakteristik Sampel Penelitian

Karakteristik sampel penelitian diperlihatkan pada tabel berikut

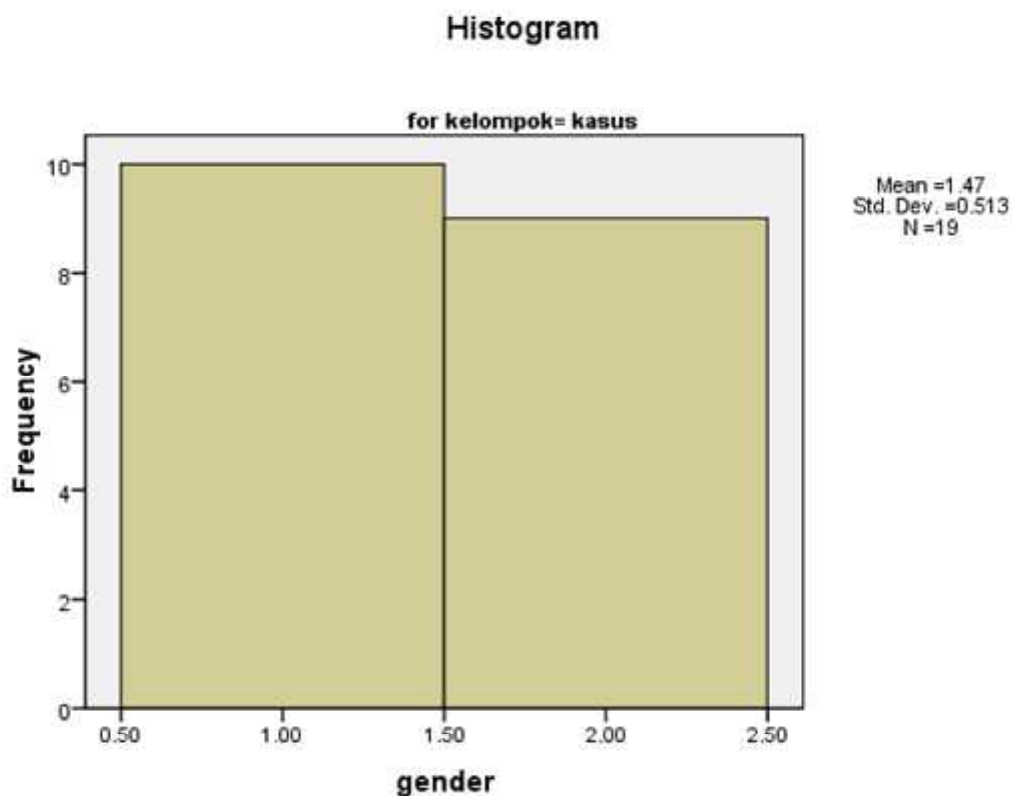
Tabel 5.1 karakteristik Sampel

	Kasus	Kontrol	p value
Umur (tahun)	19.13	12.65	0.041
Tinggi badan (cm)	161, 76 (7.59)	163, 73 (12.07)	0.608
Berat badan (kg)	58.82 (13.71)	53.20 (16.87)	0.330
Indeks massa tubuh (kg/m ²)	22.37 (4.28)	19.44 (3.95)	0.057
Tekanan darah sistolik	118,95 (12.42)	115,00 (11.18)	0.357
Tekanan darah diastolic	17.55	14.96	0.397

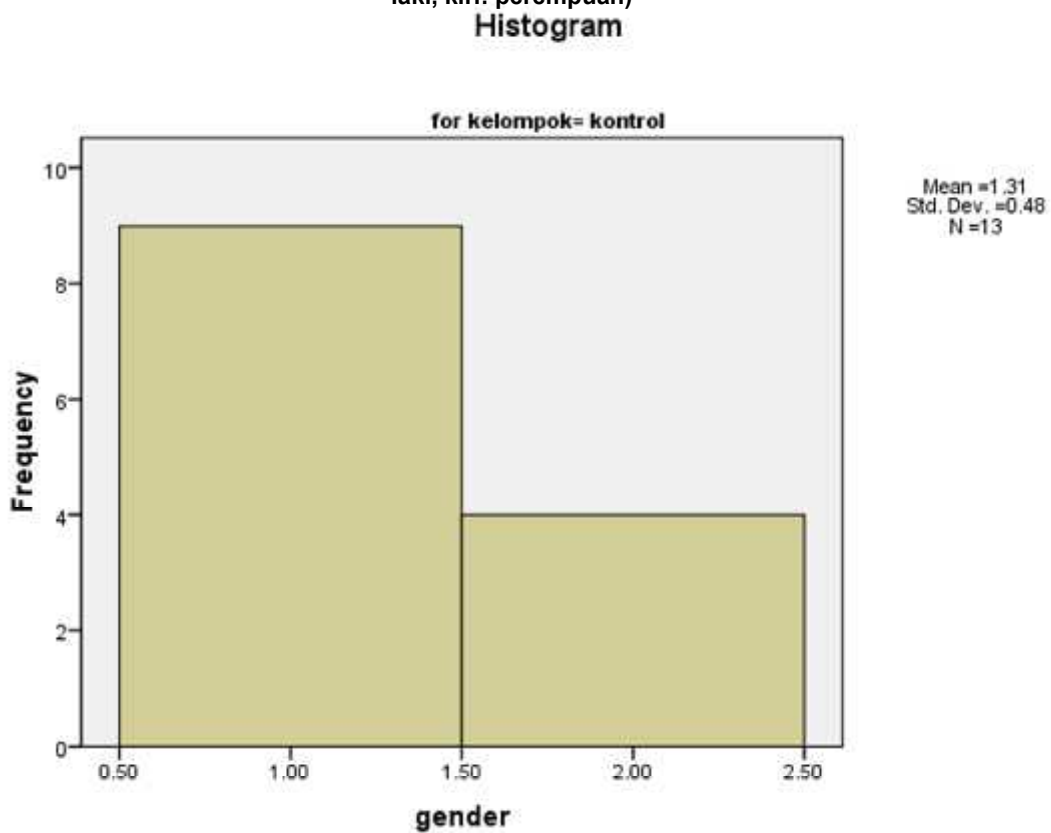
Independent samples t tests

Dari tabel diatas terlihat, variabel tinggi badan, berat badan, *body mass indeks*, tekanan darah sistolik dan diastolic memiliki nilai $p > \alpha = 0.05$ maka H_0 di terima (H_1 di tolak), sehingga dapat disimpulkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan antara sampel kontrol dan kasus. Sedangkan untuk umur memiliki nilai $p < \alpha = 0.05$ maka H_0 ditolak (H_1 diterima), sehingga dapat disimpulkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara sampel kontrol dan kasus.

Pada kelompok kasus terdapat 10 (52,63%) laki-laki dan 9 (47,37%) perempuan, sedangkan pada sampel kontrol terdapat 9 (69,23%) laki-laki dan 4 (30,77 %) perempuan. Distribusi berdasarkan jenis kelamin dapat dilihat pada diagram di bawah:



Gambar 5.1 Distribusi sampel berdasarkan jenis kelamin pada sampel kasus (kanan: laki-laki, kiri: perempuan)



Gambar 5.2 Distribusi sampel berdasarkan jenis kelamin pada sampel kontrol (kanan: laki-laki, kiri: perempuan)

Berikut adalah karakteristik data hasil pemeriksaan laboratorium:

Tabel 5.2 Hasil Laboratorium

	Kasus	Kontrol	p value
Glukosa puasa (mg/dl)	81.89 (12.93)	79.31 (5.31)	0.442
Kolesterol total (mg/dl)	183,11 (39.02)	158,15 (23.57)	0.032
Kolesterol LDL	112.58 (33.24)	88.46 (19.22)	0.015
Kolesterol HDL	50.89 (8.12)	58.85 (12.80)	0.062
Trigliserida	115,74 (61.10)	64.62 (20.80)	0.003

Independent samples t tests

Berdasarkan data diatas, dapat diketahui, kolesterol total, kolesterol LDL, dan trogliserida menunjukkan $p < \alpha = 0.05$, maka H_0 di tolak (H_1 di terima). Kesimpulannya terdapat perbedaan yang signifikan antara data kasus dan kontrol. Selanjutnya glukosa puasa dan kolesterol HDL menunjukkan $p > \alpha = 0.05$, maka H_0 di terima (H_1 di tolak). Kesimpulannya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kasus dan kontrol.

5.2 Ketebalan Intima Media Karotis

Data ketebalan intima-media karotis arteri di peroleh dengan menggunakan ultrasonografi B mode resolusi tinggi. Pemeriksaan dilakukan pada arteri karotis comunis kanan dan kiri, di ukur ketebalannya dan diameter arteri karotisnya. Data tersebut kemudian dihitung rata-ratanya. Hasilnya adalah sebagai berikut.

Tabel 5.3 Hasil pemeriksaan ultrasonografi

	Kasus	Kontrol	p value
Mean ketebalan intima media kanan (mm)	0.57 (.012)	0.60 (0.018)	0.513
Mean ketebalan intima media kiri (mm)	0.56 (0.012)	0.58 (0.024)	0.794
Mean ketebalan intima media kanan dan kiri (mm)	0.56 (0.010)	0.59 (0.018)	0.602
Mean diameter karotis kanan (mm)	6.37 (0.062)	6.515 (0.014)	0.488
Mean diameter karotis kiri (mm)	6.37 (0.050)	6.615 (0.047)	0.177

Independent samples t tests

Berdasarkan data diatas dapat diketahui, mean ketebalan intima media kanan, kiri, kanan dan kiri, diameter kanan serta diameter kiri menunjukkan nilai $p > \alpha = 0.05$, maka H_0 di terima (H_1 di tolak). Kesimpulannya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kasus dan kontrol.

Selanjutnya dilakukan komparasi kelompok kasus-kontrol berdasarkan jenis kelamin, sebagai berikut:

Tabel 5.4 komparasi kelompok kontrol-kasus anak perempuan

	Kasus	Kontrol	p value
Mean ketebalan intima media kanan kiri (mm)	0.059 (0.014)	0.05 (0.0115)	0.269
Kolesterol total (mg/dl)	195.22 (44.72)	173.25 (22.76)	0.267
Kolesterol LDL	116.67 (39.64)	95.00 (14.49)	0.179
Kolesterol HDL	57.44 (4.71)	64.00 (17.94)	0.521
Trigliserida	133.56 (66.88)	79.75 (12.41)	0.045
Indeks massa tubuh (kg/m^2)	21.09 (2.97)	16.57 (2.26)	0.018

Independent samples t tests

Berdasarkan data diatas, dapat diketahui, mean ketebalan intima media kanan kiri, kolesterol total, kolesterol LDL, dan HDL menunjukkan $p > \alpha = 0.05$, maka H_0 di terima (H_1 di tolak). Kesimpulannya terdapat tidak perbedaan yang

signifikan antara data kasus dan kontrol. Selanjutnya trigliserida dan indeks massa tubuh menunjukkan $p < \alpha = 0.05$, maka H_0 di tolak (H_1 diterima).

Kesimpulannya terdapat perbedaan yang signifikan antara kasus dan kontrol.

Tabel 5.5 Komparasi kelompok kontrol-kasus anak laki-laki

	Kasus	Kontrol	p value
Mean ketebalan intima media kanan kiri (mm)	0.054(0.005)	0.063 (0.019)	0.191
Kolesterol total (mg/dl)	172.20 (31.42)	151.44 (21.77)	0.111
Kolesterol LDL	108.90 (27.97)	85.55 (21.08)	0.055
Kolesterol HDL	45 (5.54)	56.55 (10.29)	0.011
Trigliserida	99.70 (53.74)	57.88 (20.64)	0.042
Indeks massa tubuh (kg/m²)	23.52 (5.07)	20.71 (3.94)	0.194

Independent samples t tests

Berdasarkan data diatas, dapat diketahui, mean ketebalan intima media kanan kiri, kolesterol total, kolesterol LDL, dan indeks massa tubuh menunjukkan $p > \alpha = 0.05$, maka H_0 di terima (H_1 di tolak). Kesimpulannya terdapat tidak ada perbedaan yang signifikan antara data kasus dan kontrol. Selanjutnya trigliserida dan HDL menunjukkan $p < \alpha = 0.05$, maka H_0 di tolak (H_1 diterima). Kesimpulannya terdapat perbedaan yang signifikan antara kasus dan kontrol.

Selain variasi genetik, terdapat kemungkinan lain penyebab terjadinya penebalan intima media arteri karotis. Untuk mencegah kemungkinan pengaruh dari faktor-faktor tersebut, maka ditentukan *confounding factor* yang di nilai berpengaruh terhadap ketebalan intima media arteri karotis yakni diabetes mellitus dengan parameter glukosa puasa, dyslipidemia dengan parameter profil lipid, dan obesitas dengan parameter indeks massa tubuh.

Tabel 5.6 Komparasi ketebalan intima media arteri karotis dengan faktor pengganggu

	>=0.05 mm	<0.05 mm	p value
Umur (tahun)	16.86	16.40	0.903
Tinggi badan (cm)	1.5736E2 (8.87747)	1.6402E2 (9.36024)	0.113
Berat badan (kg)	54.7143 (20.00803)	57.0460 (13.85824)	0.780
Indeks massa tubuh (kg/m²)	21.5343 (5.69855)	21.0768 (4.01922)	0.847
Tekanan darah sistolik	1.1286E2 (12.53566)	1.1860E2 (11.68332)	0.305
Tekanan darah diastolic	13.50	17.34	0.291
Glukosa puasa (mg/dl)	77.42 (6.02)	81.80 (11.32)	0.189
Kolesterol total (mg/dl)	182.24 (32.09)	170.32 (36.45)	0.411
Kolesterol LDL	107.14 (26.17)	101.56 (31.98)	0.644
Kolesterol HDL	59.71 (14.13)	52.58 (9.49)	0.245
Trigliserida	85.85 (56.92)	97.52 (54.92)	0.640

Independent samples t tests

Berdasarkan data diatas, dapat diketahui, mean ketebalan intima media kanan kiri, kolesterol total, kolesterol LDL, trigliserida, HDL, indeks massa tubuh, tinggi badan, berat badan, tekanan darah sistolik dan diastolic menunjukkan $p > \alpha = 0.05$, maka H_0 di terima (H_1 di tolak). Kesimpulannya tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara data ketebalan intima media normal dan tidak.

5.3 Analisis Genotyping Polimorfisme Osteopontin (OPN)

Bagian dari gen target pengkode promotor osteopontin diamplifikasi dengan primer spesifik yang mengenali bagian promotor pada nukleotida -917 hingga +94. Dari penjelasan tersebut dapat kita ketahui panjang basa yang akan diamplifikasi adalah sebanyak 1011 pasang basa, yaitu basa -917 hingga basa +94, sehingga setelah dilakukan elektroforesis diharapkan diperoleh pita pada panjang basa 1000 bp.

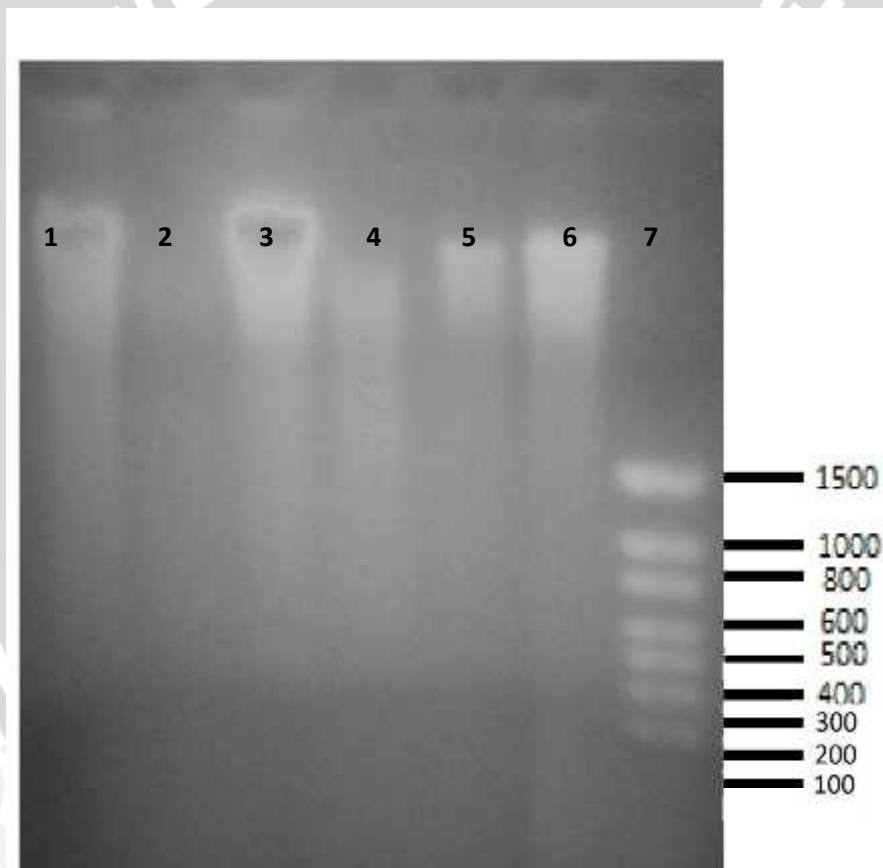


Gambar 5.3: sekuens homo sapiens chromosome 4 genomic contig, GRCh37.p5 Primery Assembly, dengan SNP OPN T-156 GG.
 Keterangan Gambar: sekuens bergaris bawah merah: primer OPN fwd dan rev; sekuens dengan background biru: mRNA; sekuens dengan background hijau: intron (NCBI Reference Sequence: NT_016354.16).

Sebelum dilakukan perbanyakan, dilakukan berbagai optimasi PCR baik kondisi maupun komposisi hingga ditemukan kondisi dan komposisi ideal. Produk PCR yang terdiri dari beberapa pita tidak memungkinkan untuk dilakukan sekuensing sebab hal itu akan mengacaukan urutan basa nukleotida yang sebenarnya. Optimasi kondisi meliputi penyesuaian suhu aneling yang berkisar 45°-57°C (sesuai dengan Tm primer). Suhu aneling sangat penting untuk menjamin primer menempel pada lokasi yang tepat. Optimasi lain adalah suhu elongasi (umumnya 72°C), suhu dan waktu denaturasi yang akan membuka ikatan *double helix*, jumlah siklus yang juga harus disesuaikan agar produk yang dihasilkan banyak tapi juga tidak banyak mengalami kesalahan. Adapun optimasi komposisi misalnya pemilihan master mix dan penyesuaian konsentrasi primer.

Konsentrasi primer yang terlalu tinggi dapat menyebabkan *mispriming* atau primer dimer sedangkan konsentrasi Mg^{2+} yang akan mempengaruhi penempelan primer pada DNA dan DNA template. Kemudian dilakukan analisis migrasi dari hasil PCR tersebut dengan menggunakan elektroforesis DNA agarosa 1%.

Meskipun bukan sampel baru, namun sampel masih dalam kondisi baik, ditunjukkan dari hasil elektroforegram yang dilakukan pada beberapa sampel.



Gambar 5.4 Elektroforegram sampel DNA
Keterangan: 1-6: sampel, 7: DNA Marker

Rancangan awal design primer diperoleh dari sebuah jurnal (Giacopelli, 2010) yang memperlihatkan beberapa alternative primer yang digunakan dalam

amplifikasi gen OPN. Primer ini dibuat agar dapat mencakup tiga daerah mutasi yang telah banyak dijelaskan dalam berbagai penelitian sebelumnya yaitu -66, -156, dan -443. Keberhasilan PCR sangat dipengaruhi oleh penggunaan primer yang di desain dengan benar. Oleh karena itu, diperlukan analisis primer yang digunakan meliputi suhu *melting* (T_m), kandungan basa G/C, kandungan sekuen yang saling komplementer satu sama lain, serta panjang primer. Karakteristik primer spesifik yang digunakan, dianalisis menggunakan program primer design BLAST dan program DNASTar. Hasil analisis primer spesifik disajikan pada tabel berikut. 0053083939

Tabel 5.7 Hasil analisis primer OPN

Nama/ Sequences	TM	Lokasi	GC%	Panjang primer (nt)	Self dimer	Hair pin	Pair dimer	Product length
OPN fwd 5'ATTACAATTCGTG ACTGCCTGCC3'	55.86	-917 sd -894	47.83	23	5	5	8	1011 nt
OPN rev 5'TGTACCTTGGTC GGCGTTTG 3'	55.14	+74 sd +94	55.00	20	6	3		

Dari hasil analisis spesifik pasangan primer tersebut diketahui bahwa primer telah memenuhi syarat untuk digunakan dalam melakukan amplifikasi sampel DNA. Primer ini diharapkan dapat menghasilkan satu pita spesifik yang hanya terbentuk pada 1011 bp. Syarat-syaratnya antara lain, kedua primer mempunyai suhu *melting* yang tidak berbeda jauh, panjang kedua primer berkisar antara 18-30 basa, persen G/C yang berkisar antara 45-60 % dari seluruh basa, serta jumlah *self dimer*, *hair pin*, dan *pair dimer* yang tidak terlalu banyak.

Pertama kali sampel DNA diamplifikasi dengan menggunakan master mix yang telah mengandung semua bahan yang dibutuhkan. Optimasi pada suhu penempelan dimulai pada suhu 55°C sesuai dengan T_m terdekat dari hasil analisis primer. Optimasi ini memberikan hasil yang baik dengan menunjukkan terbentuknya satu pita spesifik di panjang basa 1000 bp. Setelah mencoba beberapa sampel, diperoleh hasil yang negatif. Selanjutnya dilakukan beberapa cara yakni dengan mengganti master mix, primer, dan dd H₂O dengan aliquot yang baru. Namun, tetap tidak menunjukkan hasil yang positif. Kegagalan ini dimungkinkan karena penyimpanan master mix yang tidak tepat sehingga kondisi master mix menjadi tidak stabil. Berikut adalah ringkasan dari variasi komposisi yang diberikan.

Tabel 5.8 Optimasi kondisi PCR untuk amplifikasi gen target OPN menggunakan master mix lama

	I	II	III	IV	V
Jumlah master mix (µL)	10	10	10	10	10 (Aliquote baru)
Jumlah primer 10 pmol/µL (µL)	1	1	1	1 (Aliquote baru)	1 (Aliquote baru)
Jumlah template (µL)	1	1	1	1	1
Suhu anneling (° C)	55	55	55	55	55
Lama anneling (detik)	30	30	30	30	30
Suhu elongasi (° C)	72	72	72	72	72
Lama elongasi	1'	1'	1'	1'	1'
Jumlah siklus	35	35	35	35	35
Hasil	1 pita pada 1000 bp	1 pita pada 1000 bp	negatif	negatif	negatif

Oleh karena optimasi komposisi tidak menunjukkan hasil yang baik, maka dilakukan optimasi dengan menggunakan master mix yang baru. Master mix yang di pilih kali ini adalah master mix yang menggunakan pfu DNA polymerase. Pfu DNA polymerase merupakan salah satu enzim polymerase yang mempunyai waktu paruh lama, bersifat thermostabil dan mempunyai mekanisme

proofreading. Dengan mekanisme *proofreading* ini suatu kesalahan penambahan basa saat amplifikasi dapat diperbaiki.

Dilakukan pula beberapa variasi komposisi. Variasi komposisi tersebut meliputi variasi jumlah primer, jumlah template, penggantian dNTP lama dengan dNTP baru, serta penambahan gliserol 5% v/v, DMSO 5% v/v dan DMSO 100% v/v. Optimasi kondisi meliputi perubahan suhu *annealing*, *elongasi*, dan *pre denaturasi*, beserta lamanya.

DMSO 5% v/v dan 100% v/v merupakan kosolven bertujuan untuk membantu mengatasi kesulitan polimerase selama proses pemanjangan sehingga dapat meningkatkan spesifisitas sekuens amplifikasi. Gliserol 5% v/v, dapat digunakan untuk meningkatkan hasil produk amplifikasi dan juga berperan sebagai *enzyme stabilizer*. Dilakukan pula perubahan pada kondisi *annealing* dengan menurunkan suhunya menjadi 54°C dan 50°C. Penurunan suhu *annealing* dengan harapan akan memunculkan pita meskipun tidak spesifik. Jika muncul banyak pita maka dilakukan peningkatan suhu sedikit demi sedikit agar terbentuk pita yang spesifik pada panjang basa yang diinginkan.

Berikut ini adalah rangkuman variasi optimasi yang dilakukan.

Tabel 5.9 Optimasi kondisi PCR untuk amplifikasi gen target OPN menggunakan master mix Pfu High Fidelity

	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Jumlah primer 10 pmol/ μ L (μ L)	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Jumlah template (μ L)	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1
dNTP (μ L)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)	0.5 (baru)
Gliserol 5% (μ L)	-	-	-	-	-	-	-	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	-	-
DMSO 5% (μ L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.25	-
DMSO 100% (μ L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.25
Suhu annealing ($^{\circ}$ C)	55	57	54	50	50	50	55	55	55	55	50	45	48	50
Lama annealing (detik)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
Suhu elongasi ($^{\circ}$ C)	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72	72
Lama elongasi	1'	1'	1'	1'	1'	2'	2'	1'	1'	1'	1'	1'	1'	1'
Lama pre denaturasi	2'	2'	2'	2'	2'	2'	5'	2'	2'	2'	2'	2'	2'	2'
Jumlah siklus	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35	35
Hasil	Sme ar 2 pita di <10 0 dan 200	1 pita diba wah 100 bp	1 pita diba wah 100 bp	1 pita diba wah 100 bp	neg atif	negati f	negati f	1 pita dibaw ah 100 bp	Smea r, 1 pita dibaw ah 100 bp	1 pita dibaw ah 100 bp	1 pita dibaw ah 100 bp pada kontro l	1 pita dibaw ah 100 bp	negati f	1 pita dibaw ah 100 bp pada kontro l

Oleh karena optimasi suhu aneling tidak memperlihatkan hasil positif, maka dilakukan penggantian dNTP dengan dNTP baru maka suhu dikembalikan ke suhu awal yaitu 55 °C. namun tetap tidak menunjukkan hasil yang positif. Penggantian dNTP dengan dNTP baru ini disebabkan kemungkinan kondisi dNTP yang sudah tidak stabil lagi karena kondisi penyimpanan yang kurang tepat atau karena produk yang sudah *out of date*. Selanjutnya kembali dilakukan penurunan suhu aneling menjadi 45 °C dan 48 °C yang diharapkan dapat meningkatkan yield. Namun tetap tidak menunjukkan hasil yang positif. Selain perubahan suhu aneling, dilakukan pula perubahan waktu fase pre denaturasi, aneling, dan elongasi dengan tujuan memberikan cukup waktu untuk terjadinya masing-masing fase secara sempurna. Pada langkah ke IX, tabung eppendorf dimasukkan ke dalam *thermal cycler* setelah suhu mendekati 95°C. Langkah ini ditujukan agar proses denaturasi lebih maksimal sehingga pemisahan *double helix* juga lebih maksimal.

Oleh karena optimasi komposisi dan kondisi dengan menggunakan master mix baru tidak menunjukkan hasil yang positif, maka optimasi coba dilakukan dengan dua macam master mix yakni Go Taq Green dan 2x PCR master mix. Optimasi berupa penurunan suhu aneling menjadi 53°C dan 54°C. Penurunan suhu aneling ditujukan untuk meningkatkan yield Sedangkan peningkatan suhu dilakukan jika telah banyak pita yang terbentuk sehingga bisa lebih spesifik. Seperti yang terlihat ketika suhu aneling ditingkatkan menyebabkan terbentuknya pita yang tidak spesifik. Setelah optimasi dilakukan diperoleh hasil positif band yang muncul pada panjang basa 1000 bp. pada tipe master mix 2x PCR master mix soln dengan suhu aneling 54 °C selama 10 detik dan suhu elongasi 72 °C selama 45 detik. Optimasi dilakukan sekali lagi sebab

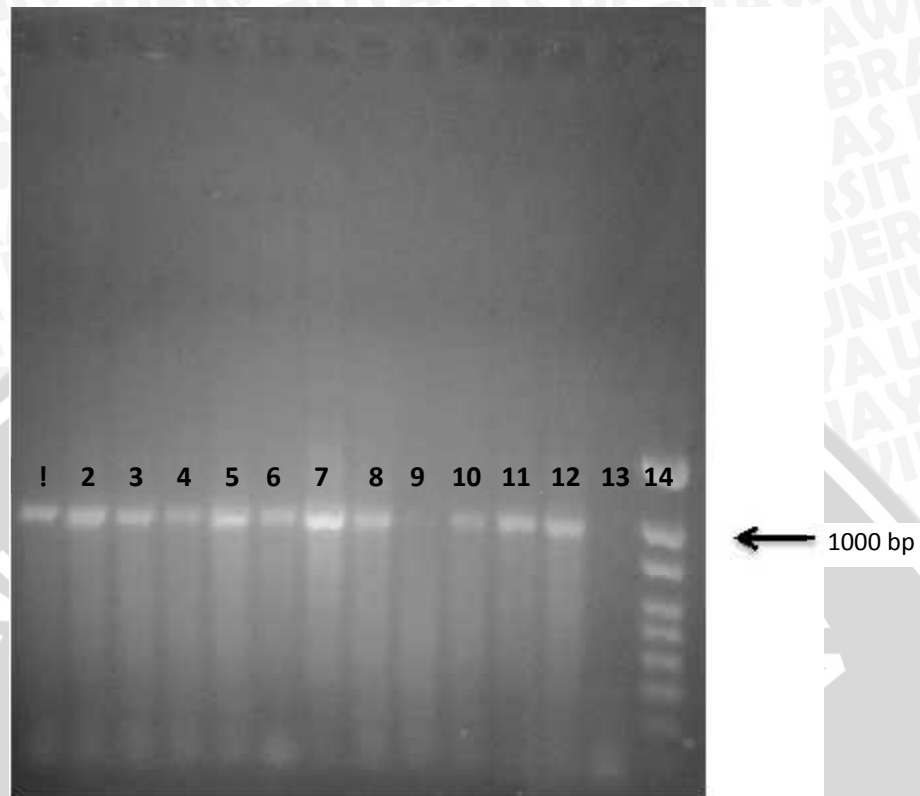
ada beberapa sampel yang masih negatif band atau mempunyai pita yang tipis.

Optimasi berupa peningkatan suhu annealing menjadi 45.5°C dan peningkatan jumlah DNA template, primer, dan lama waktu elongasi.

Tabel 5.10 Optimasi Kondisi PCR untuk Amplifikasi gen target OPN menggunakan master mix baru

	I	II	III	IV	V	VI
Tipe master mix	Go Taq green	2x PCR master mix soln (intron)	2x PCR master mix soln (intron)	2x PCR master mix soln (intron)	2x PCR master mix soln (intron)	2x PCR master mix soln (intron)
Jumlah primer 10 pmol/μL (μL)	1	1	1	1	1	1.5
Jumlah template (μL)	1	1	2	1	1	3
Suhu annealing (°C)	55	55	54	53	56	54.5
Lama annealing (detik)	30	10	10	10	10	10
Suhu elongasi (°C)	72	72	72	72	72	72
Lama elongasi	2'	45"	45"	1'	1'	50"
Jumlah siklus	35	35	35	35	35	35
Hasil	1 pita dibawah 100 bp	Smear, 2 pita terjelas pada 1000 bp dan 100 bp	1 pita pada 1000 bp	1 pita pada 1000 bp namun warna band kurang tajam	2 pita pada 1000 bp dan dibawah 100 bp	Beberapa sampel positif, ada pula yang negatif band

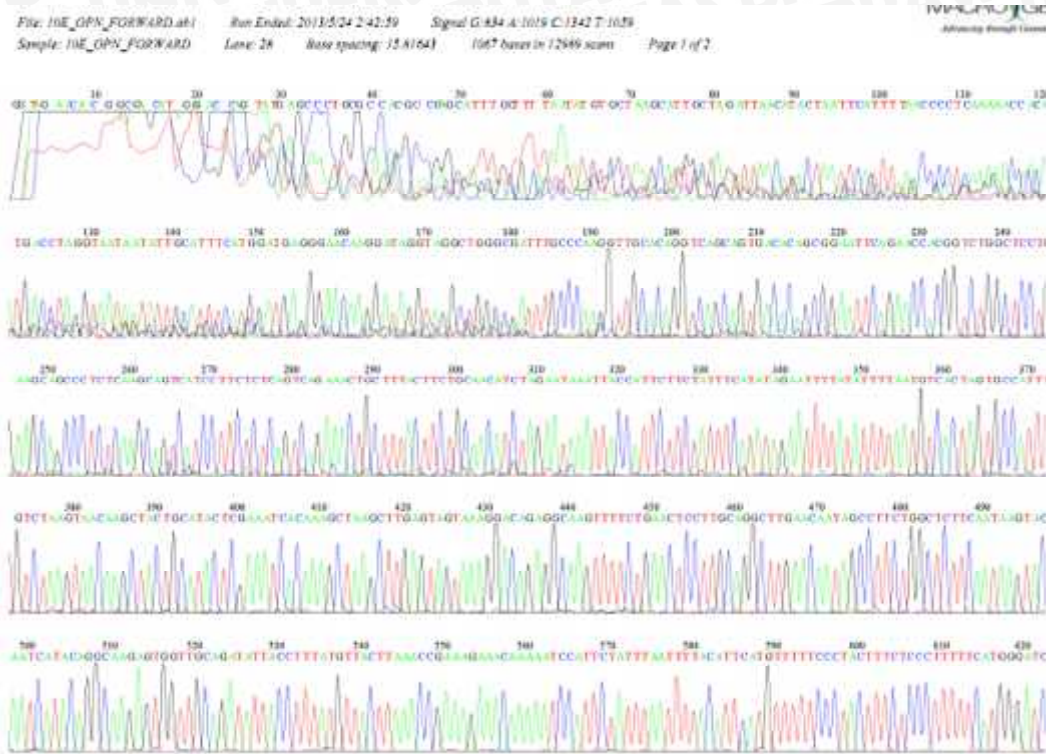
Adapun hasil PCR dengan kondisi optimasi terbaik sebagai berikut.



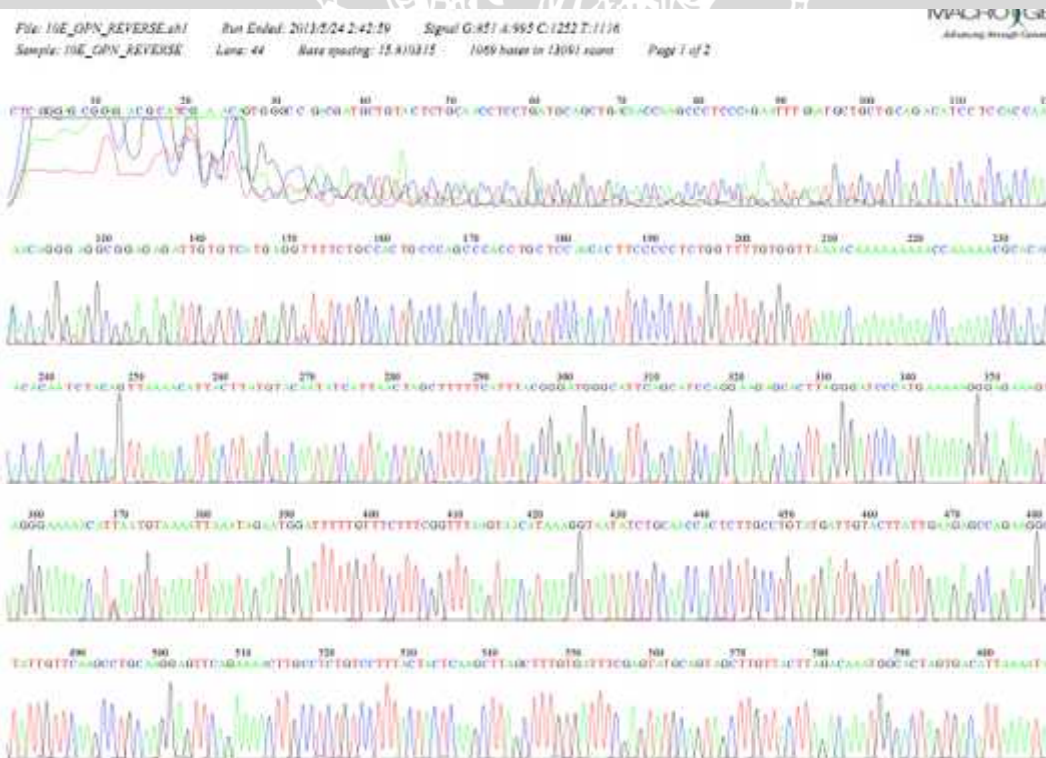
Gambar 5.5 Elektroforegram hasil PCR OPN
Keterangan: 1-12: sampel, 13: kontrol negatif, 14: Marker

Selanjutnya adalah melakukan perbanyakkan hasil PCR dengan jumlah yang cukup untuk dilakukan sekuensing.

Berikut adalah hasil PCR yang telah disekuensing:



Gambar 5.6 Hasil sekuensing dengan primer forward



Gambar 5.7 Hasil sekuensing dengan primer reverse

Urutan basa nukleotida yang telah disekuensing diidentifikasi dengan program BLAST yang dapat di akses di <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. hasil identifikasi ini akan menunjukkan adanya homologi antara sampel hasil sekuensing dengan urutan basa nukleotida OPN pada genbank. Berikut ini adalah hasil identifikasi salah satu sampel dengan program BLAST.

Homo sapiens chromosome 4 genomic contig, GRCh37.p10 Primary Assembly
 Sequence ID: [ref|NT_016354.19|](#) Length: 115591997 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1642 bits(889)	0.0	922/938(98%)	1/938(0%)	Plus/Plus

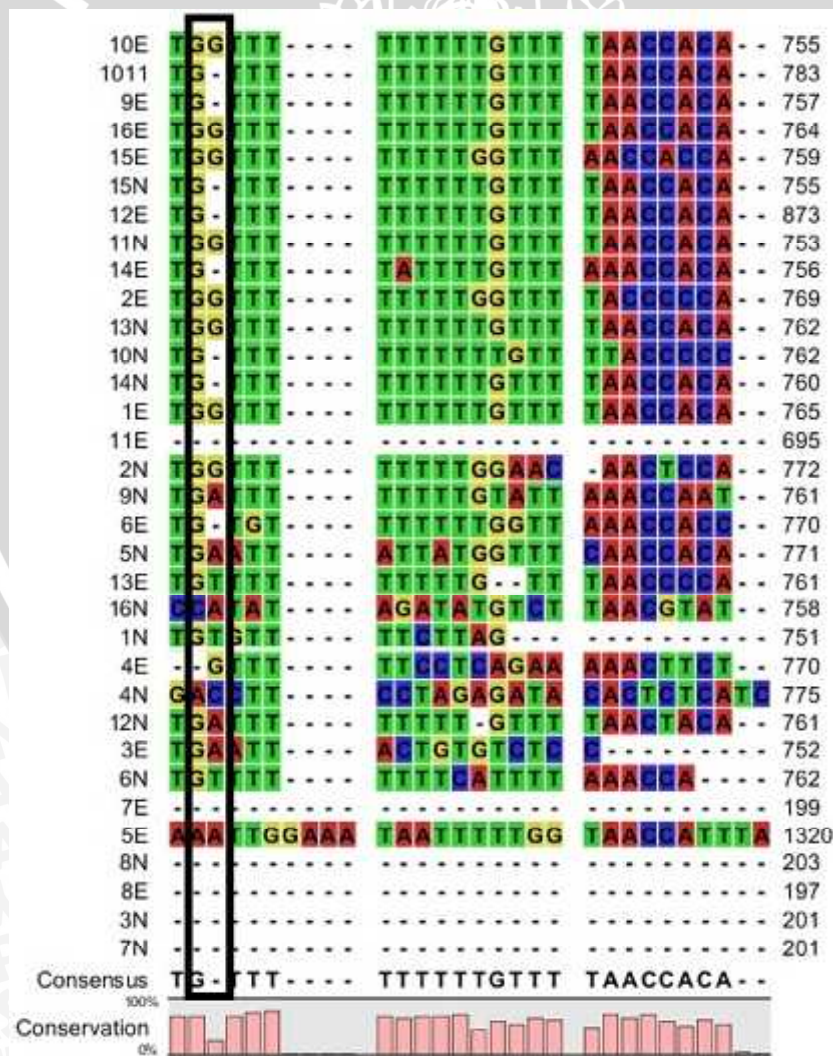
Range 1: 13443738 to 13444674 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Features: [129419 bp at 5' side: matrix extracellular phosphoglycoprotein isoform b](#)
[1095 bp at 3' side: osteopontin isoform OPN-a precursor](#)

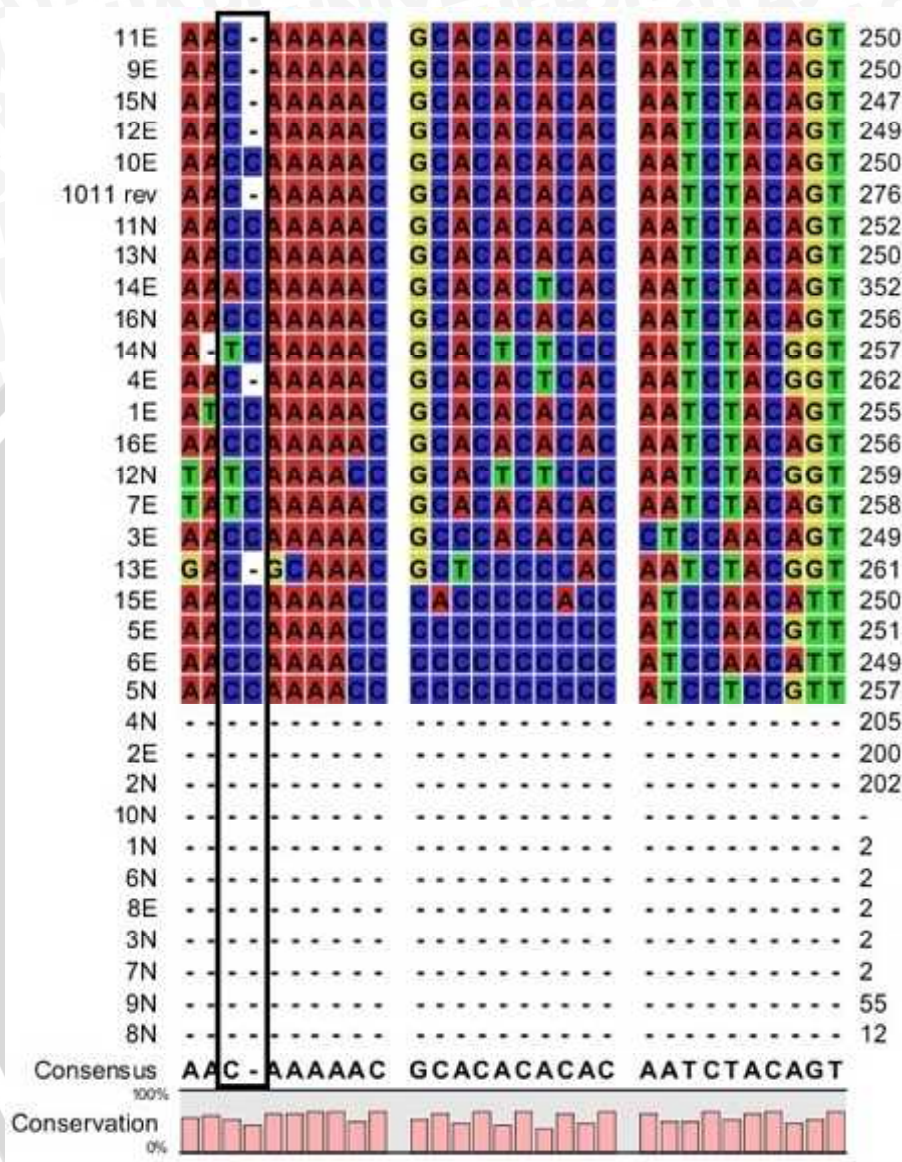
Query	42	ACGCCGAGCATTTCGTTTcaaatatgtgctaaagcattgcttagattaacatactaatcatt	101
Sbjct	13443738	ACGCCGAGCATTTCGCACTCAATATGTGCTAAGCATTGCTAGTTTAAACATACATAATTCAIT	13443797
Query	102	ttaacccctcassaaaccacatgacctaggtatataatattgcatctcatggatgqgggaac	161
Sbjct	13443798	TAAACCCCTCAA AAAACCCCATGCCTAGCTAATAGTATTGCATTTTCATGGATGAGGGAAAC	13443857
Query	162	aaggataggtaggctgggggattttgcccagggttgccacaggtcagcagtgacacagggga	221
Sbjct	13443858	AAGGATAGGTAGGCTGGGCGATTTGCCCAAGGTTGCACAGGTCAGCAGTGACACAGCGGA	13443917
Query	222	attcagaaccacggctctggctctctgaaagcagccctctcaagcgcGCATCCTTCTCTCAGT	281
Sbjct	13443918	ATTCAGAACCAACGGCTCTGGCTCTCTGAAGCAGCCCTCTCAAGCAGTCATCTCTCTCAGT	13443977
Query	282	CAGAACTGCTTTACTTCTGCAACATCTAGATAAATTACCATTCTTCTATTTCATATAG	341
Sbjct	13443978	CGAAACTGCTTTACTTCTGCAACATCTAGATAAATTACCATTCTTCTATTTCATATAG	13444037
Query	342	AATTTATATTTTAAATGTCCTAGTGCATTTGTCTAAGTAACAAGCTACTGCATACTCG	401
Sbjct	13444038	AATTTATATTTTAAATGTCCTAGTGCATTTGTCTAAGTAACAAGCTACTGCATACTCG	13444097
Query	402	AAATCACAAGCTAAGCTTAGTGTAAAGGACAGAGGCAAGTTTTCTGACTCCTTGCA	461
Sbjct	13444098	AAATCACAAGCTAAGCTTAGTGTAAAGGACAGAGGCAAGTTTTCTGACTCCTTGCA	13444157
Query	462	GGCTTGAACAATAGCCCTTCTGGCTCTTCAATAAGTACAATCATAAGGCAAGAGTGGTTG	521
Sbjct	13444158	GGCTTGAACAATAGCCCTTCTGGCTCTTCAATAAGTACAATCATAAGGCAAGAGTGGTTG	13444217
Query	522	CAGATATTACCTTTATGTTACTTAAACCGAAGAAACAAAATCCATTCTATTTAATTTT	581
Sbjct	13444218	CAGATATTACCTTTATGTTACTTAAACCGAAGAAACAAAATCCATTCTATTTAATTTT	13444277
Query	582	ACATTCAATGTTTTCCCTAGTTTCTCCCTTTTTTCATGGGATCCCTAAGTGTCTTCTCTGG	641
Sbjct	13444278	ACATTAAATGTTTTCCCTACTTTCTCCCTTTTTTCATGGGATCCCTAAGTGTCTTCTCTGG	13444337
Query	642	ATGCTGAATGCCCATCCCGTAAATGAAAAAGCTAGTTAATGATATTGTACATAAGTAATG	701
Sbjct	13444338	ATGCTGAATGCCCATCCCGTAAATGAAAAAGCTAGTTAATGATATTGTACATAAGTAATG	13444397
Query	702	TTTTAACTGATATTGTTGTTGTTGGG:ttttgggttttttttttttttAACCACAAAACCA	761
Sbjct	13444398	TTTTAACTGATATTGTTGTTGTTGGGTTTTG-TTTTTTTTTTTTTTAAACCACAAAACCA	13444456
Query	762	GAGGGGGAAGTGTGGGAGCAGGTGGGCTGGGCAGTGGCAGAAAACATCATGACACAATCT	821
Sbjct	13444457	GAGGGGGAAGTGTGGGAGCAGGTGGGCTGGGCAGTGGCAGAAAACCTCATGACACAATCT	13444516
Query	822	CTCCGCTCCTGTGTTGGTGGAGGATGTCTGCAGCAGCATTTAAATTTCTGGGAGGGCTT	881
Sbjct	13444517	CTCCGCTCCTGTGTTGGTGGAGGATGTCTGCAGCAGCATTTAAATTTCTGGGAGGGCTT	13444576
Query	882	GGTTGTCAGCAACAGCAGGAGGAGGCAGACAGCATCGTGGGACCAGACTCGTCTCA	941
Sbjct	13444577	GGTTGTCAGCAACAGCAGGAGGAGGCAGACAGCATCGTGGGACCAGACTCGTCTCA	13444636
Query	942	GGACTATTGCCGCTTCTCAGCCAAACGCCGACCAAGG 979	
Sbjct	13444637	GGCCAGTTGCAGCCTTCTCAGCCAAACGCCGACCAAGG 13444674	

Gambar 5.8 Hasil BLAST OPN

Hasil identifikasi di atas menunjukkan adanya homologi yang tinggi antara urutan basa nukleotida OPN yang diperoleh dari genbank dengan hasil sekuensing sampel PCR. Hal ini dapat diketahui dari nilai *identities*-nya yang mencapai 98%. Hasil sekuensing kemudian dianalisis dengan menggunakan program CLC Main Workbench 6 untuk melihat ada tidaknya mutasi. Hasil analisis pada basa -156 menunjukkan adanya mutasi pada beberapa sampel. Mutasi yang terjadi adalah penambahan basa guanin. Berikut adalah hasil analisis hasil sekuensing dengan menggunakan program CLC Main Workbench 6.



Gambar 5.9 Analisis mutasi basa nomor -156 pada hasil PCR dengan primer forward



Gambar 5.10 Analisis mutasi basa no -156 pada hasil sekuensing dengan primer reverse

Mutasi terjadi pada basa nomor -156 yaitu terjadi insersi atau penyisipan basa guanin. Mutasi ini terjadi baik pada sampel kontrol dan sampel kasus. Tidak semua sampel yang disekuensing dengan primer forward terlihat pada primer reverse, begitu pula sebaliknya.

Dari program analisis CLC Main Workbench 6 diperoleh hasil sebagai berikut:



Tabel 5.11 deskripsi hasil sekuensing dengan CLC WorkBench

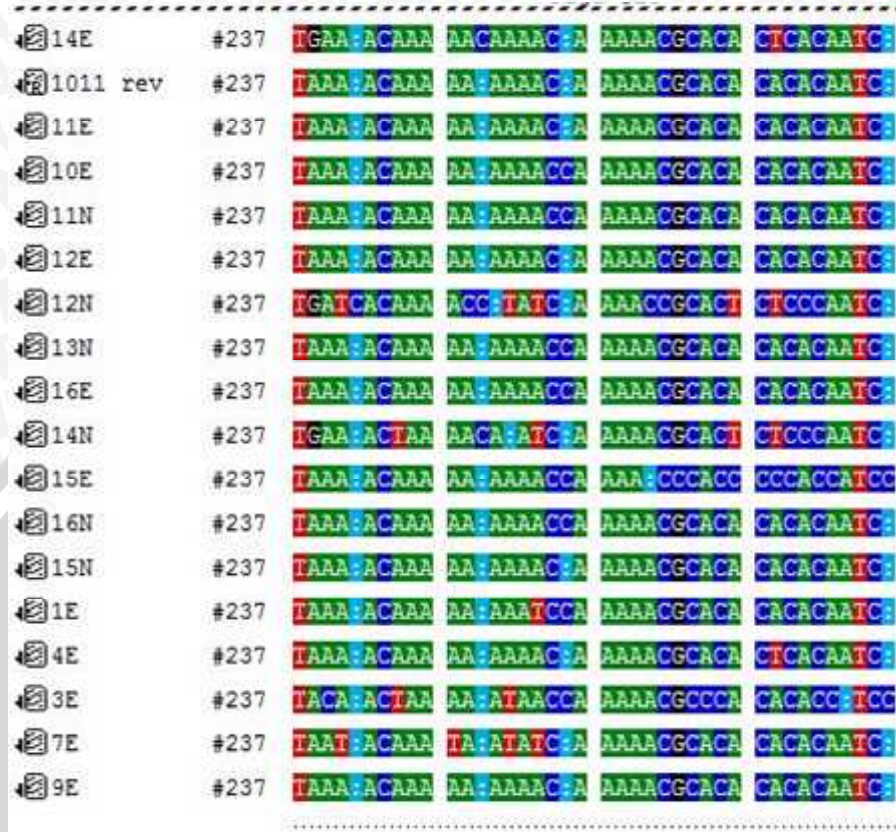
No	Forward	reverse	Kelompok
1	1 E	1 E	Kontrol
2	16 E	3 E	Kasus
3	2 N	5 E	Kasus
4	10 E	5 N	Kontrol
5	15 E	6 E	Kontrol
6	13 N	10 E	Kontrol
7	15 E	11 N	Kasus
8	2 E	13 N	Kontrol
9		15 E	Kontrol
10		16 E	Kasus
11		16 N	kasus

Diantara sampel 11 sampel (34,37% dari total sampel) yang mengalami penyisipan basa guanine, terdapat terdapat 6 sampel (54,5%) yang mempunyai kesamaan antara hasil sekuensing primer forward dan reverse.

Dilakukan pula analisa dengan menggunakan program analisis sequencher yang dapat memberikan informasi kemiripan pada masing-masing hasil sekuensing yang yang dianalisis. Dalam penelitian ini, dicoba persen kemiripan sebesar 80 persen, yang dengan sendirinya akan mengeluarkan kelompok hasil sekuensing yang tidak memenuhi syarat. Berikut adalah hasil analisisnya:

12N	#306	TG:A:TTTT	TTTTGTTT	AAC::TA:C	AAATC:C:AT
6N	#306	TG:T:TTTT	TTTCATTTA	AAC::CA::	AAAAC:C:N
1N	#306	TG:TGTTTT	CTTAGGA		
9N	#306	TG:A:TTTT	TTTTGTATTA	AAC::CA:A	TAACTC:AT
14E	#306	TG:T:TTTT	TTTTGTTTA	AAC::CA:C	AAAAC:C:AA
16N	#306	C:CA:TATAG	ATAATGCTT	AACGTATAGC	TAAAG:C:AC
6E	#306	TG:T:GTTT	TTTTGGTTA	AAC::CA:C	CAAAC:C:AC
13N	#306	TGGT:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:TG
13E	#306	TG:T:TTTT	TTTTG:TTT	AAC::CG:C	ACACC:GAA
4E	#306	TG:T:TTTT	CCTCAGAAA	AAC::TT:C	TCTCCTC:AT
2N	#306	TG:G:TTTT	TTTTGGAAC	AAC::TC:C	ACACC:C:AA
5N	#306	TG:A:ATTA	TTATGGTTTC	AAC::CA:C	AAAACCT::AA
12E	#306	TG:T:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
11N	#306	TGGT:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
Wt	#306	TG:T:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
15E	#306	TG:G:TTTT	TTTTGGTTT	AAC::CACC	AAAAC:C:AA
9E	#306	TG:T:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
14N	#306	TG:T:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
16E	#306	TGGT:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
2E	#306	TGGT:TTTT	TTTTGGTTT	ACC::CC:C	AAAAC:C:AA
10E	#306	TGGT:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
15N	#306	TG:T:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAAAC:C:AG
10N	#306	TG:TTTTT	TTTTGTTT	ACC::CC:C	AAAAC:C:AA
1E	#306	TGGT:TTTT	TTTTGTTT	AAC::CA:C	AAATAC:C:AA

Gambar 5.11 Analisis mutasi basa nomor -156 pada hasil PCR dengan primer forward (minimal persen kemiripan 80%)



Gambar 5.12 Analisis mutasi basa no -156 pada hasil sekuensing dengan primer reverse (minimal persen kemiripan 80%)

Dari program analisis Sequencher diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 5.12 deskripsi hasil sekuensing dengan analisis Sequencher

No	Forward	Reverse	Kelompok
1	1 E	1 E	Kontrol
2	10 E	10 E	Kontrol
3	11 N	11 N	Kasus
4	13 N	13 N	Kontrol
5	15 E	15 E	Kontrol
6	16 E	16 E	Kasus
7		3E	kasus
8		16 N	Kasus

Diantara 8 sampel (25% dari total sampel) yang mengalami penyisipan basa guanine, terdapat 6 sampel (75%) yang mempunyai kesamaan antara hasil sekuensing primer forward dan reverse.

Jika melihat hasil dari kedua program analisis diatas, program sequencher memiliki ketelitian yang tinggi dalam menganalisa kemiripan masing-masing hasil sekuensing. Beberapa sampel yang dianalisis sebagai mutasi pada program CLC Workbench tidak dikategorikan mutasi pada program Sequencher. Namun, baik analisis CLC workbench dan sequencher, sampel yang dinyatakan sebagai mutasi karena terjadi pada primer forward dan reverse memberikan hasil yang sama.

Setelah itu dilakukan pula penghitungan risiko polimorfisme terhadap ketebalan intima-media karotis yang dinyatakan dengan odd ratio (OR), sebagai berikut:

Count		combine_CCA		Total
		>=0.05 mm	<0.05 mm	
variasi_genetik	mutasi	2	4	6
	normal	5	21	26
Total		7	25	32

Sebelumnya, dilakukan uji chi square, namun karena ada nilai ekspektasi yang kurang dari 5 sebanyak 25,0% maka digunakan uji Fisher exact. Uji ini menyatakan bahwa tidak ada hubungan bermakna antara terjadinya mutasi genetik dengan ketebalan intima media arteri karotis ($p=0.590>0.05$). Adapun nilai odd ratio variasi genetik terhadap ketebalan intima media arteri karotis

kanan dan kiri adalah 2.100 (CI 0.297- 14.875), artinya bahwa polimorfisme tidak bermakna sebagai faktor risiko.

Dilakukan pula penghitungan risiko polimorfisme terhadap profil lipid yang dinyatakan dengan odd ratio (OR), sebagai berikut:

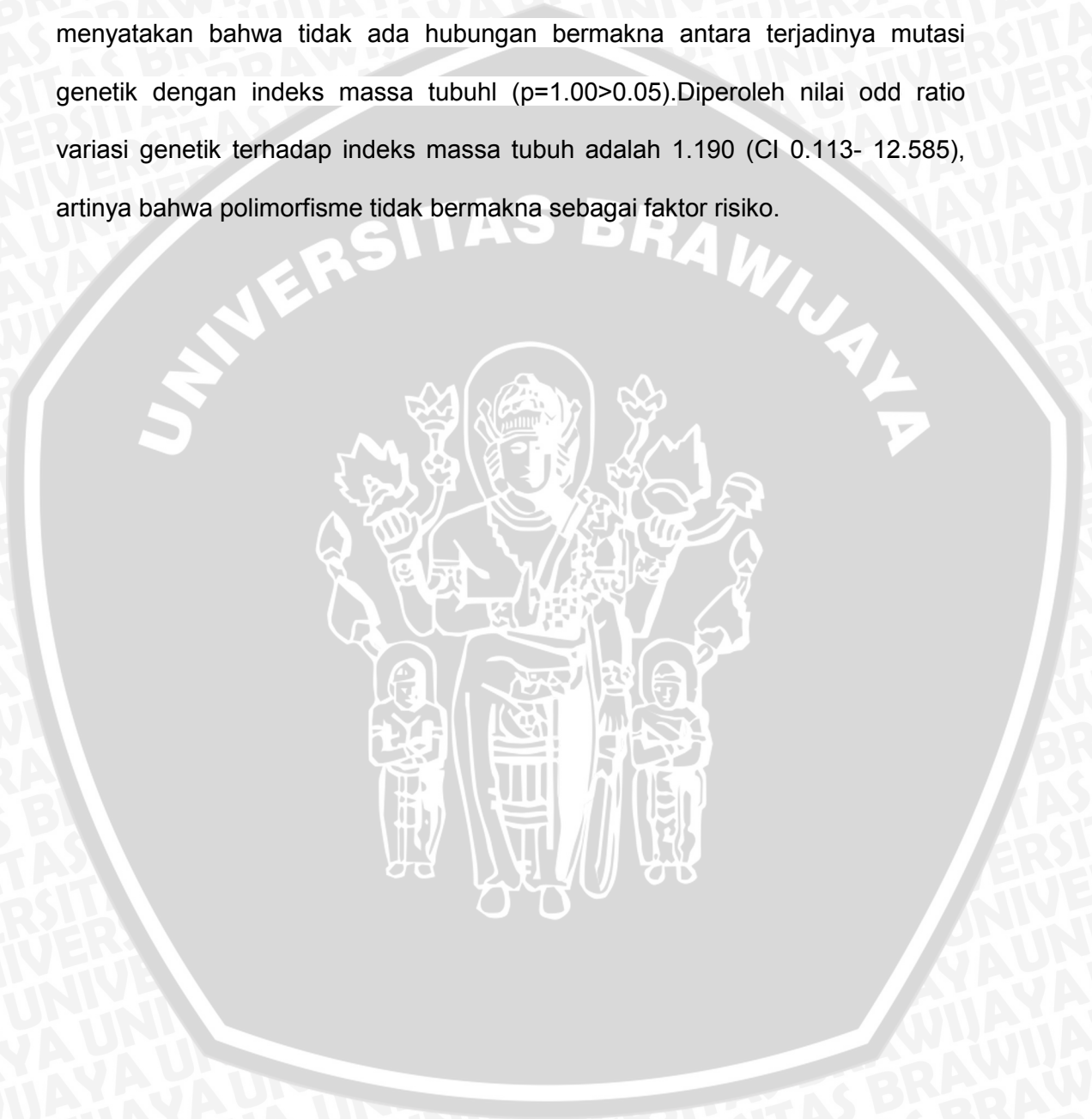
variasi_genetik * kolesterol_total Crosstabulation				
Count		kolesterol_total		
		normal <200 mg/dl	dislipid >= 200 mg/dl	Total
variasi_genetik	Mutasi	5	1	6
	normal	20	6	26
Total		25	7	32

Sebelumnya, dilakukan uji chi square, namun karena ada nilai ekspektasi yang kurang dari 5 sebanyak 25,0% maka digunakan uji Fisher exact. Uji ini menyatakan bahwa tidak ada hubungan bermakna antara terjadinya mutasi genetik dengan total kolesterol ($p=1.00>0.05$). Diperoleh nilai odd ratio variasi genetik terhadap profil lipid adalah 1.500 (CI 0.146- 15.461), artinya bahwa polimorfisme tidak bermakna sebagai faktor risiko.

Dilakukan pula penghitungan risiko polimorfisme terhadap indeks massa tubuh yang dinyatakan dengan odd ratio (OR), sebagai berikut:

variasi_genetik * body_mass_indeks Crosstabulation				
Count		body_mass_indeks		
		normal <25	obes >=25	Total
variasi_genetik	mutasi	5	1	6
	normal	21	5	26
Total		26	6	32

Sebelumnya, dilakukan uji chi square, namun karena ada nilai ekspektasi yang kurang dari 5 sebanyak 25,0% maka digunakan uji Fisher exact. Uji ini menyatakan bahwa tidak ada hubungan bermakna antara terjadinya mutasi genetik dengan indeks massa tubuh ($p=1.00>0.05$). Diperoleh nilai odd ratio variasi genetik terhadap indeks massa tubuh adalah 1.190 (CI 0.113- 12.585), artinya bahwa polimorfisme tidak bermakna sebagai faktor risiko.



BAB 6

PEMBAHASAN

Bab ini akan membahas mengenai analisis hasil yang telah dilakukan dibab sebelumnya sekaligus menjawab rumusan masalah dan hipotesis penelitian. Jawaban hipotesis ini akan menjelaskan pengaruh variasi genetik pada promotor OPN dengan ketebalan intima-media arteri karotis pada anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik. Hubungan antara variasi genetik dan ketebalan intima media arteri karotis dijelaskan dengan nilai Odd Ratio (OR). Odd Ratio menjelaskan besar risiko terjadinya stroke pada anak dengan orang tua stroke iskemik.

Sampel dalam penelitian ini adalah anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik sebagai kelompok kasus dan orang tua sehat tanpa riwayat penyakit degeneratif sebagai kelompok kontrol. Rentang umur sampel yang diambil berkisar 10-21 tahun, dimana 21 tahun dinilai telah mengemban tanggung jawab secara hukum (UNICEF, 2008). Umur termuda yakni 10 tahun diambil sesuai dengan penelitian terdahulu yang dilakukan di Rumah Sakit dr Saiful Anwar Malang yang menyatakan tidak ada penderita stroke iskemik yang sedang dirawat ataupun berobat di bagian Neurologi RSUD dr Saiful Anwar Malang yang mempunyai anak berumur kurang dari 10 tahun (Yueniwati, 2009, Siswinarti 2011). Pada kelompok kasus terdapat 10 orang laki-laki (52,63%) dan 9 orang perempuan (47,37%), sedangkan pada sampel kontrol terdapat 9 orang laki-laki (69,23%) dan 4 orang perempuan (30,77 %). Semua orang tua yang termasuk di dalam kelompok kasus mengalami serangan stroke iskemik pada umur ≤ 50 tahun, usia termuda yang mengalami serangan stroke adalah 29

tahun, ada 76% kasus ayah yang menderita stroke iskemia dan 30% orang tua mengalami serangan stroke lebih dari satu kali.

Semua sampel baik kelompok kontrol maupun kelompok kasus mendapatkan perlakuan yang sama yakni pengukuran berat badan, tinggi badan, indeks massa tubuh dan tekanan darah. Dilakukan pula pemeriksaan laboratorium yang terdiri dari pengukuran kadar gula darah puasa, kadar kolesterol total, trigliserida, LDL, dan HDL. Diperiksa pula ketebalan intima media arteri karotis kanan, intima media arteri karotis kiri, intima media arteri karotis kanan dan kiri serta diameternya dengan menggunakan ultrasonografi. Setelah itu dilakukan analisa *genotyping* yang sebelumnya diawali dengan optimasi dan perbanyak DNA target dengan PCR kemudian dilakukan sekuensing.

Sebelum memulai analisa dilakukan uji normalitas data yang akan menyatakan normalitas distribusi data dan uji homogenitas. Kemudian dilanjutkan dengan uji komparasi dengan *t Test independent* dan uji korelasi bivariate.

6.1 Hasil Analisis Migrasi

Hasil analisis migrasi sampel DNA memperlihatkan beberapa sampel mempunyai pita yang tebal. Pita tebal ini menunjukkan kuantitas DNA. Semakin tebal pita maka semakin banyak molekul DNA pada sampel tersebut. Adapun posisi pita menunjukkan besar molekul DNA, semakin dekat pita dengan sumuran, semakin besar molekul DNA sampel tersebut. Dalam penelitian ini, terdapat sampel dengan pita yang tebal, hal ini baik karena menandakan bahwa sampel masih mengandung molekul DNA dan bisa digunakan pada tahapan selanjutnya yaitu amplifikasi DNA. Sampel dengan pita yang tipis menandakan

kondisi DNA kemungkinan tidak cukup stabil karena telah disimpan dalam waktu lama atau terjadi degradasi molekul DNA saat proses isolasi. Posisi semua sampel dekat dengan sumuran yang menandakan molekul DNA yang panjang.

6.2 Hasil Sekuensing

Hasil sekuensing promotor OPN menunjukkan adanya variasi genetik pada lokasi -156 yang terjadi pada enam sampel dilihat dari terjadinya insersi basa guanine (G) kedalam urutan nukleotida nomor -156 baik pada hasil sekuensing primer forward maupun primer reverse. Sampel tersebut terdiri dari kelompok kontrol maupun kasus. Terdapat empat sampel dari kelompok kontrol dan dua sampel dari kelompok kasus.

Beberapa sampel yang disekuensing dengan menggunakan primer forward menunjukkan adanya variasi genetik, namun hal yang sama tidak terjadi pada sampel yang disekuensing menggunakan primer reverse, begitu pula sebaliknya. Hal ini disebabkan beberapa hasil sekuensing baik dari primer forward maupun reverse tidak mempunyai hasil sekuensing yang panjangnya sama dengan *wildtype*. Ada banyak hal yang dapat menyebabkan hal ini, dapat kita analisa dengan melihat gambar hasil sekuensing.

Dibeberapa bagian terdapat *peak* (puncak) yang teratur yang menunjukkan urutan basa nukleotida yang baik. Sedangkan dibagian lain terdapat *peak* yang saling tindih yang kemungkinan dapat disebabkan kualitas DNA yang rendah, dapat pula disebabkan primer sekuensing menempel pada dua atau lebih situs penempelan pada template atau saat proses PCR primer menempel pada dua situs penempelan dan membentuk produk. Selain itu, jika kemungkinan saat proses PCR salah satu *strand* tidak mengalami pemanjangan yang sempurna

maka salah satu *strand* tersebut akan lebih pendek. Inilah juga yang menyebabkan hasil sekuensing antara primer forward dan reverse bisa berbeda.

6.3 Variasi genetik pada lokasi -156

Terdapat enam sampel yang memperlihatkan variasi genetik berupa insersi guanine pada urutan basa nukleotida -156. Insersi merupakan bagian dari *frameshift mutation* (mutasi pergeseran kerangka) yang dapat berupa insersi atau delesi. Insersi merupakan penambahan basa pada rangkaian nukleotida. Jika insersi ini terjadi akan menyebabkan perubahan kelompok kodon. Perubahan kelompok kodon akan menyebabkan perubahan stop kodon sehingga translasi akan terus berlanjut hingga stop kodon selanjutnya. Namun, insersi ini tidak berpengaruh pada perubahan penterjemahan asam amino, sebab promotor bukanlah bagian dari gen yang ditranskripsikan.

Mutasi pada lokasi basa nukleotida -156 sudah pernah ditemukan pada penelitian terdahulu yang juga meneliti pengaruh terjadinya variasi genetik terhadap peningkatan ekspresi gen promotor osteopontin (Zhao, 2012), (Alvarez, 2012) (Giacopelli, 2004). Penelitian tersebut menyatakan bahwa variasi genetik pada titik ini berpengaruh secara signifikan dengan peningkatan aktivitas transkripsi OPN. Selain variasi genetik terdapat kemungkinan lain penyebab menebalnya intima media arteri karotis, diantaranya adalah diabetes mellitus tipe 2, dyslipidemia dan obesitas. Dalam penelitian dijelaskan bahwa pasien dengan gangguan toleransi glukosa mempunyai intima media arteri karotisa yang tebal secara signifikan dibandingkan sampel kontrol dengan perbedaan ketebalan 0.04 (95% CI: 0.014-0.071) mm (Brohall *et al*, 2006). Selain itu, intima media arteri karotis juga ditemukan meningkat secara signifikan pada orang dengan riwayat

hiperkolesterolemia dan berhubungan dengan peningkatan kolesterol LDL (Khan *et al.*, 2011). Pada penelitian lain dijelaskan mengenai hubungan antara peningkatan kadar OPN dengan peningkatan sintesis kolesterol dengan nilai signifikansi $p=0.001$ (Luomala, 2007). Adapun obesitas dapat menjadi faktor penting pada proses aterosklerosis pada intima media arteri karotis. (Kotsis *et al.*, 2006) sedangkan indeks massa tubuh juga diketahui berkorelasi dengan peningkatan kadar protein OPN. Penelitian tersebut menjelaskan bahwa kelompok obesitas mempunyai kadar OPN dalam plasma yang lebih tinggi dari kelompok kontrol (Gursoy, 2010), sedangkan nilai rata-rata ketebalan intima media arteri karotis lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol $p < 0.001$ (Sharma *et al.*, 2009).

Berdasarkan penelitian ini, diketahui hubungan variasi genetik yang terjadi dengan penebalan intima media arteri karotis yang ditunjukkan dengan nilai Odd Ratio yaitu 2.100 (CI 0.297- 14.875), artinya bahwa variasi genetik tidak bermakna sebagai faktor risiko. Penelitian ini memberikan kesimpulan bahwa tidak ada pengaruh variasi genetik terhadap penebalan intima media arteri karotis. Begitu pula dengan variabel lain yaitu besarnya profil lipid dan indeks massa tubuh yang berturut-turut memiliki nilai Odd Ratio 1.500 (CI 0.146- 15.461) dan 1.190 (CI 0.113- 12.585). Besarnya Odd Ratio tersebut menunjukkan variasi genetik tidak berpengaruh secara signifikan terhadap profil lipid maupun indeks massa tubuh.

Terdapat enam sampel yang dinyatakan mengalami variasi genetik dinilai dari analisis menggunakan CLC Main Workbench 5 dan program Sequencher. Dua diantaranya adalah kelompok kasus (10.52% dari seluruh sampel kasus) dan empat adalah sampel kontrol (30.76% dari seluruh sampel kontrol). Berikut

adalah penjabaran masing-masing karakteristik sampel yang positif terjadi variasi genetik:

1. Terdapat dua sampel kontrol yang mengalami variasi genetik dan mempunyai ketebalan intima media arteri karotis kanan dan kiri lebih dari 0.05 mm, sedangkan profil lipid dan indeks massa tubuh normal.
2. Terdapat dua sampel kontrol yang mengalami variasi genetik, sedangkan ketebalan intima media arteri karotisnya dibawah 0.05 mm, salah satu sampel mempunyai total kolesterol diatas 200 mg/dl dan indeks massa tubuhnya normal, sedangkan sampel lainnya mempunyai total kolesterol normal dan indeks massa tubuh diatas 25 kg/m² yang masuk dalam kategori obesitas.
3. Terdapat dua sampel kasus yang mengalami variasi genetik dan keduanya mempunyai ketebalan intima media arteri karotis diatas 0.05mm, sedangkan total kolesterol dan indeks massa tubuhnya normal.

Dari deskripsi diatas diketahui bahwa beberapa sampel menunjukkan adanya kecenderungan hubungan antara variasi genetik dengan ketebalan intima media arteri karotis. Poin 1 dijelaskan bahwa terdapat dua sampel kontrol yang mengalami penebalan intima media arteri karotis dari empat sampel kelompok kontrol yang mengalami variasi genetik (50%). Padahal, kelompok kontrol merupakan kelompok dengan orang tua tanpa penyakit kardiovaskular yang tidak diharapkan mengalami variasi genetik. Jika dikaji lebih lanjut, terdapat kemungkinan lain penyebab terjadinya penebalan intima media artrei karotis selain *confounding factor* yang telah dianalisis. Meningkatnya kadar osteopontin dalam tubuh karena overekspresi dapat menyebabkan peningkatan potensi

invasi sel kanker dan juga berpengaruh dalam progresivitas kanker (Pan *et al.*, 2003). Selain itu, OPN juga dapat meregulasi infiltrasi makrofag selama proses inflamasi dan jumlah OPN plasma ditemukan berhubungan dengan beberapa penyakit inflamasi seperti Osteoarthritis (Sudhir *et al.*, 2012). Dalam penelitian ini, orang tua sampel tidak menjalani pemeriksaan terkait dengan segala penyakit yang pernah diderita oleh orang tua diluar penyakit kardiovaskular. Kemungkinan sampel kontrol yang mengalami variasi genetik dengan penebalan intima media arteri karotis memiliki orang tua dengan penyakit-penyakit lain semisal kanker atau penyakit-penyakit inflamasi.

Pada poin 2 terdapat dua sampel kontrol yang mengalami variasi genetik namun tidak mengalami penebalan intima media arteri karotis dari empat sampel kelompok kontrol yang mengalami variasi genetik (50%). Penebalan intima media merupakan salah satu marker yang menandai meningkatnya jumlah osteopontin plasma. Secara umum, OPN memiliki beberapa fungsi yang akan mempengaruhi fisiologis tubuh, salah satunya adalah ketebalan intima media arteri karotis. Selain itu, overekspresi OPN juga dapat meningkatkan jumlah sel-sel proinflamasi yang berkorelasi dengan terjadinya penyakit-penyakit inflamasi. OPN juga dapat meningkatkan jumlah osteoclast dan sel-sel yang berperan dalam mekanisme *bond remodeling* lainnya. Fungsi-fungsi diatas kemungkinan tidak berjalan sama pada masing-masing individu. Bisa jadi, satu individu dengan variasi genetik SNP -156 mengalami penebalan intima media arteri karotis, sementara pada individu lain yang juga mengalami variasi genetik di titik yang sama mengalami gejala lain misalnya peningkatan jumlah sel-sel proinflamasi yang menyebabkan penyakit-penyakit inflamasi seperti lupus atau osteoarthritis (Farouk *et al.*, 2009). Oleh karena itu, dalam kasus poin dua terdapat

kemungkinan bahwa sampel kelompok ini tidak mengalami penebalan intima media arteri karotis, namun mengalami bentuk fisiologis lain akibat terjadinya variasi genetik. Sayangnya bentuk fisiologis lain itu tidak diteliti dalam penelitian ini atau belum diketahui secara pasti.

Pada poin 3, terdapat dua sampel kasus yang kedua-duanya mengalami penebalan intima media arteri karotis (100% dari sampel kasus yang mengalami variasi genetik). Hal ini telah senada dengan berbagai literature yang menjelaskan hubungan antara variasi genetik pada titik G-156GG dengan penebalan intima media arteri karotis. Poin 3 kembali menguatkan penelitian-penelitian sebelumnya bahwa terdapat kecenderungan variasi genetik pada titik G-156GG berhubungan dengan penebalan intima media arteri karotis. Secara teori kecenderungan diatas dapat dijelaskan sebagai berikut:

Dalam sebuah penelitian (Giacopelli, 2004) dijelaskan bahwa kehadiran dua basa guanine dalam urutan DNA di lokasi -156 menyebabkan terbentuknya *binding site* untuk faktor RUNT. RUNX2 yaitu salah satu faktor transkripsi dapat berikatan dengan *binding site* yang terbentuk karena adanya insersi G pada urutan basa. Ikatan ini memiliki afinitas yang besar sehingga dapat meningkatkan aktivitas transkripsi promotor OPN. Kemudian, Aktivitas transkripsi promotor OPN ini menyebabkan peningkatan konsentrasi OPN dalam plasma. OPN banyak diekspresikan pada sel makrofag di jaringan adiposa manusia. Banyaknya jaringan adiposa juga berhubungan dengan terjadinya obesitas. Peningkatan aktivitas transkripsi OPN juga menyebabkan terjadinya peningkatan rekrutmen lokal monosit pada tempat injuri di dinding arteri, sehingga akan meningkatkan risiko terjadinya aterosklerosis.

Pengukuran OPN plasma sangat dibutuhkan untuk melihat akibat langsung dari terjadinya variasi genetik pada titik G-156GG. Sebab peningkatan OPN plasma tidak hanya berhubungan dengan ketebalan intima media arteri karotis, tapi juga dengan parameter lain seperti jumlah sel proinflamasi atau peningkatan jumlah osteoclast dan sel yang berperan dalam *bond remodeling*. Selain titik -156, terdapat dua titik lain yang sering dilaporkan berhubungan dengan penebalan intima media arteri karotis. Titik-titik itu adalah C-443T dan T-66G. kedua titik ini telah banyak dilaporkan dapat memprediksi risiko seseorang mengalami penyakit kardiovaskular, terutama pada titik T-66C. Sedangkan titik C-44T, belum diketahui dengan tepat konsekuensi terjadinya mutasi pada titik ini terhadap regulasi transkripsi protein OPN.

6.4 OPN sebagai terapi

OPN terbukti dapat digunakan dalam terapi penyakit stroke karena fungsinya sebagai neuroprotektor. OPN terbukti meningkatkan sel yang hidup setelah terjadinya iskemia. Mekanisme OPN dalam mencegah kematian sel antara lain: mensintesis nitrit oxide, meningkatkan aktivitas NF- κ B, dan meningkatkan aktivitas PI3K. Fungsi-fungsi di atas meningkatkan ekspresi OPN dan meningkatkan fungsi neuroprotektifnya (Meller *et al.*, 2005).

OPN dapat meningkatkan sintesis nitrit oxide yang sangat berguna dalam keadaan stroke, yakni dengan mekanisme vasodilatasi vaskular yang akan meningkatkan pasokan oksigen ke otak. Adapun aktivitas NF- κ B dapat meningkatkan aktivitas transkripsi dari protein antiapoptosis. Hal ini dapat mencegah banyaknya neuron di otak yang mati karena terjadinya stroke. Sebagai neuroprotektor, OPN juga bekerja melalui aktivasi P42/P44 MAPK/ Akt/

PI3K dan interaksi pada reseptor integrin. Aktivasi P42/P44 MAPK/ Akt/PI3K menyebabkan peningkatan fosforilasi dari Akt yang memiliki fungsi neuroprotektif dengan meningkatkan ekspresi OPN. Aktivasi reseptor integrin oleh OPN membuat neuron dapat mentoleransi toksisitas glutamate, sehingga aktivasi ini memberikan dampak penurunan protein pro apoptosis dan proliferasi sel yang akan menjaga *cell survival*.

Meskipun penelitian ini tidak menunjukkan adanya hubungan yang signifikan antara variasi genetik penebalan intima media arteri karotis, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengingat masih terbatasnya penelitian mengenai hal ini. Hasil penelitian ini hendaknya dilanjutkan pada penelitian selanjutnya berupa bagaimana membentuk sediaan yang tepat. Sejauh ini OPN telah dicoba untuk diberikan melalui intranasal (Meller *et al.*, 2005). Hasil pemberian OPN intranasal terbukti efisien untuk diberikan pada mencit dengan target kerja di otak (Doyle *et al.*, 2008).

Adapun keterbatasan penelitian antara lain jumlah sampel yang kurang representatif untuk menjelaskan hasil penelitian. Diperlunya penelitian lebih lanjut dengan sampel yang representatif sehingga dapat diperoleh hasil analisis yang signifikan. Selain itu, tidak semua hasil sekuensing dapat dianalisa keberadaan mutasinya, sehingga tidak bisa ditentukan apakah semua sampel yang tidak dapat dianalisa tersebut tidak mengalami variasi genetik. Perlu dipertimbangkan pemilihan master mix dan bahan-bahan yang dapat mempengaruhi proses amplifikasi sehingga dapat meningkatkan homologi hasil sekuensing.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh variasi genetik pada SNP T-156GG terhadap ketebalan intima media arteri carotis pada anak populasi Jawa, maka dapat disimpulkan bahwa:

- Terdapat variasi genetik pada titik G-156GG pada anak populasi Jawa. Ditemukan enam kasus yang mengalami variasi genetik pada titik G-156GG
- Terdapat kecenderungan penebalan intima media arteri carotis pada anak populasi Jawa dengan orang tua stroke iskemik. Hal ini menguatkan teori bahwa variasi genetik berpengaruh sebagai faktor risiko.

7.2 Saran

Saran terkait penelitian lanjutan antara lain:

1. Perlu dilakukan optimasi kondisi yang lebih mendalam agar diperoleh hasil sekuensing dengan homologi tinggi sesuai dengan target gen OPN yang diinginkan
2. Perlu dilakukan pengukuran jumlah OPN plasma sebagai akibat langsung dari terjadinya variasi genetik di titik G-156 GG pada sampel, sehingga dapat dikorelasikan antara terjadinya variasi genetik dengan peningkatan jumlah OPN dalam plasma
3. Perlu dilakukan pemeriksaan menyeluruh terkait riwayat penyakit orang tua sampel terutama penyakit yang berhubungan dengan peningkatan jumlah OPN plasma, sehingga dapat diketahui faktor lain yang mungkin berpengaruh pada terjadinya overekspresi OPN
4. Perlu dikaji lebih dalam terkait fungsi fisiologis OPN yang berhubungan dengan patologis penyakit tertentu, sehingga dapat dipertimbangkan apakah OPN dapat digunakan sebagai terapi atau sebaliknya.

DAFTAR PUSTAKA

- Amarenco P, Bogousslavsky J, Caplan L.R, Donnan, Hennerici. Classification of Stroke Subtypes. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27:493–501
- Barra S, Gaeta G, Cuomo S, Guarini P, Foglia Mc, Capozzi G, Materazzi C, Trevisan M. Early Increase Of Carotid Intima-Media Thickness In Children With Parental History Of Premature Myocardial Infarction. *Heart*, 2009;95:642–645.
- Brohall G, Odén A, Fagerberg B. Carotid artery intima-media thickness in patients with Type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance: a systematic review. *Diabet Med.* 2006 Jun;23(6):609-16.
- Coll B, Feinstein Sb. Carotid Intima-Media Thickness Measurements: Techniques And Clinical Relevance. *Current Atherosclerosis Reports*, 2008, 10:XX–XX
- Deb P, Sharma S, Hassan Km. Pathophysiologic Mechanisms Of Acute Ischemic Stroke: An Overview With Emphasis On Therapeutic Significance Beyond Thrombolysis. *Elsevier*. 2010 (17) 197–218
- Depkes. 2012. Riset Kesehatan Dasar Riskesdas 2007. Epi., Info. Badan Penelitian Dan Pengembangan Kesehatan. *Kementerian Kesehatan RI*. Hal 122-124
- Easton Jd, Saver JI, Albers Gw, Alberts Mj, Chaturvedi S, Feldmann E, Hatsukami Ts, Higashida Rt, Johnston Sc, Kidwell Cs, Lutsep Ht, Miller E, Sacco RI. Definition And Evaluation Of Transient Ischemic Attack : A Scientific Statement For Healthcare Professionals From The American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council On Cardiovascular Surgery And Anesthesia; Council On Cardiovascular

Radiology And Intervention; Council On Cardiovascular Nursing; And Vascular Disease: The American Academy Of Neurology Affirms The Value Of This Statement As An Educational Tool For Neurologists. *The Interdisciplinary Council On Peripheral*. 2009;40:2276-2293.

Farouk A, Gamal B. M, Abd El-Maboud, Esmat AL. Plasma Concentration of Osteopontin (OPN) in Children with Systemic Lupus Erythematosus: Relationship with Disease Activity. *The Open Autoimmunity Journal*, 2009, 1, 59-63 [Open Access](#)

Fauci As, Kasper DI, Longo DI, Braunwald E, Hauser SI, Jameson JI, Loscalzo J. 2008. *Harrison's Principles Of Internal Medicine*, 17th Ed., *The McGraw-Hill Companies, Inc, Chapter 364*.

Giacopelli F, Marciano R, Pistorio A, Catarsi P, Canini S, Karsenty G, Ravazzolo R. Polymorphisms In The Osteopontin Promoter Affect Its Transcriptional Activity. *Physiol Genomics*.2004, 20:87-96.

Grau Aj, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener Hc. Risk Factors, Outcome, And Treatment In Subtypes Of Ischemic Stroke. The German Stroke Data Bank. *Stroke*, 2001; 32; 2559-2566

Khan SP, Ahmed KZ, Yaqub Z, Ghani R. Carotid intima-media thickness correlation with lipid profile in patients with familial hypercholesterolemia versus controls. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2011 Jan;21(1):30-3.

Koda-Kimble Ma, Lloyd Yy, Alldredge Bk, Corelli RI, Guglielmo Bj, Kradjan Wa, Williams Br. *Applied Therapeutics: The Clinical Use Of Drugs*, 9th Ed. Lippincott Williams & Wilkins. 2009. Chapter 55

Kotsis VT, Stabouli SV, Papamichael CM, Zakopoulos NA. Impact of obesity in intima media thickness of carotid arteries. *Obesity (Silver Spring)*. 2006 Oct;14(10):1708-15.

Liviakis L, Pogue B, Paramsothy P, Bourne A, Gill Ea. Carotid Intima-Media Thickness For The Practicing Lipidologist. *Journal Of Clinical Lipidology* (2010) 4, 24–35

Lloyd JD, Robert A, Mercedes C, Wayne R, Ralph S, Paul, Randall S, Julia S, Thomas T, Sylvia W, James M, Dariush M, Graham N, Christopher O, Veronique R, Steven K, Daniel L, Lynda L, Ariane M, Mary M, Kurt G, Nancy H, Susan H, Michael, Virginia H, Brett K, Giovanni De Simone, T. Bruce Ferguson, Katherine Flegal, Earl Ford, Karen Furie, Alan Go, Nathan W, Judith W, Yuling H. Heart Disease and Stroke Statistics--2009 Update : A Report From the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*, 2009;119:e21-e181

Magyar Mt, Szikszai Z, Balla J, Valikovics A, Kappelmayer J, Imre S, Balla G, Jeney V, Csiba L, Bereczki D. Early-Onset Carotid Atherosclerosis Is Associated With Increased Intima-Media Thickness And Elevated Serum Levels Of Inflammatory Marker. *Stroke*, 2003;34:58-63

Meller R, Stevan SI, Minami M, Cameron Ja, King S, Rosenzweig H, Doyle K, Lessov Ns, Simon Rp, Poore Mps. Neuroprotection By Osteopontin In Stroke. *Journal Of Cerebral Blood Flow And Metabolism*. 2005. 25, 217-225.

Munshi, Anjana. 2012. DNA Sequencing – Methods and Applications. InTech: Croatia

Mutu C, Minea N, Poreanu M Comparative Study Of Carotid Intima Media Thickness In Ischemic Stroke Subtypes. *Romanian Journal Of Neurology* – Volume Xi, No. 2, 2012

O'leary Dh, Polak Jf, Kronmal Ra, Manolio Ta, Burke Gl, Wolfson Sk, Jr. Carotid-Artery Intima And Media Thickness As A Risk Factor For Myocardial Infarction And Stroke In Older Adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med*,1999; 340(1):14-22.

Pan HW, Ou YH, Peng SY, Liu SH, Lai PL, Lee PH, Sheu JC, et al. Overexpression of osteopontin is associated with intrahepatic metastasis, early recurrence, and poorer prognosis of surgically resected hepatocellular carcinoma. *Cancer*, 2003 98:119–127.

Roquer J, Segura T, Joaquin S, Cuadrado-Godia E, Blanco M, Garcia-Garcia J, Castillo J. Value Of Carotid Intima-Media Thickness And Significant Carotid Stenosis As Markers Of Stroke Recurrence. *Stroke*, 2011;42:3099-3104

Scarborough P, Peto V, Bhatnagar P, Kaur A, Leal J, Luengo-Fernandes R, Gray A, Rayner M, Allender S. Stroke Statistics. *British Heart Foundation Statistics Database*.2009, P 44-45.

Scatena M, Liaw L, Giachelli Cm. Osteopontin : A Multifunctional Molecule Regulating Chronic Inflammation And Vascular Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2302-2309

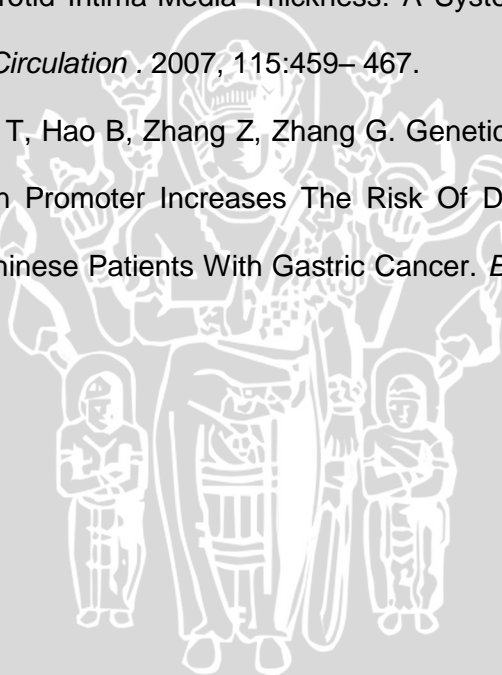
Shah S . *Stroke Pathophysiology.Foundation For Education And Research In Neurological Emergencies. 1997, p. 3*

Sharma P, LohaniB, SP Chataut . Ultrasonographic evaluation of carotid intima-media thickness in hypertensive and normotensive individuals. *Original Article Nepal Med Coll J. 2009; 11(2): 133-135*

Sudhir PS, Jayashree VG, Nitin N. Osteopontin: A Novel Protein Molecule. *Indian Medical Gazette. 2012. Ed 62*

Lorenz Mw, Markus Hs, Bots MI, Et Al.: Prediction Of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Circulation . 2007, 115:459– 467.*

Zhao F, Chen X, Meng T, Hao B, Zhang Z, Zhang G. Genetic Polymorphisms In The Osteopontin Promoter Increases The Risk Of Distance Metastasis And Death In Chinese Patients With Gastric Cancer. *Bmc Cancer, 2012, 12:477*





**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")**

No. 118 / EC / KEPK - S1 / 03 / 2013

Setelah Tim Etik Penelitian Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan :

Judul : Uji Keberadaan Mutasi Genetik Insersi G-156GG Promoter Osteopontin Pada Anak Populasi Jawa Dengan Orang Tua Penderita Stroke Iskemik

Peneliti : Endang Rahayu Tri Purwandhany

NIM : 0910753017

Unit / Lembaga : Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Tempat Penelitian : Laboratorium Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Malang, 15 MAR 2013

An. Ketua
Koordinator Divisi I



Prof. Dr. dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpParK
NIP. 19520410 198002 1 001

Lampiran 2 Data Dasar

a. Kelompok E

rut	Gender	Umur	Kelompok	Glukosa Puasa	Cholesterol Total	Cholesterol LDL Direk	Cholesterol HDL	Trigliserida	Rasio Chol.Total/Chol.HDL	Tekanan Darah Diastolik	R CCA IMT	L CCA IMT	Combined CCA	diameter R CCA	diameter LCCA	Berat Badan	BMI	Tekanan Darah Sistolik	Tinggi Badan
1 E	1	20	2	78	135	83	45	40	3.0	80	0.06	0.05	0.055	0.7	0.66	50	19.90	120	158.5
2 E	1	19	2	89	114	50	64	42	1.8	80	0.06	0.06	0.06	0.66	0.63	79	24.9	120	178
3 E	1	15	1	66	139	75	55	49	2.5	70	0.05	0.06	0.055	0.7	0.72	44	15.0	120	171
4 E	2	11	1	82	155	72	65	170	2.4	70	0.06	0.06	0.06	0.55	0.6	42	17.26	100	156
5 E	2	20	1	73	140	63	62	107	2.2	70	0.06	0.06	0.06	0.6	0.55	50	19.53	110	160
6 E	1	15	2	74	152	76	70	67	2.2	60	0.11	0.07	0.09	0.68	0.77	50	17.51	95	169
7 E	1	20	1	89	166	111	43	55	3.8	80	0.05	0.06	0.055	0.57	0.64	76	28.43	130	163.5
8 E	2	20	1	129	262	171	54	213	4.9	90	0.08	0.07	0.075	0.73	0.67	63.5	26.8	130	154
9 E	2	20	1	74	258	169	61	231	4.2	70	0.07	0.04	0.055	0.62	0.6	58	23.8	120	156
10 E	2	10	2	82	204	101	89	63	2.3	60	0.03	0.05	0.04	0.61	0.66	27.5	13.5	90	142.5
11 E	1	20	1	89	171	110	37	138	4.6	90	0.06	0.06	0.06	0.62	0.64	87	29.2	130	172.5
12 E	1	15	2	81	189	128	50	49	3.8	70	0.07	0.13	0.1	0.69	0.63	51	16.6	120	175.5
13 E	1	15	2	74	152	82	59	71	2.6	80	0.05	0.05	0.05	0.7	0.71	47	18.4	110	160
14 E	1	19	1	82	154	86	50	141	3.1	80	0.06	0.06	0.06	0.67	0.62	59	22.2	130	163
15 E	1	15	2	70	134	74	53	35	2.5	80	0.04	0.04	0.04	0.65	0.66	70	26.5	120	162.5
16 E	1	15	1	78	173	112	41	101	4.2	80	0.05	0.05	0.05	0.6	0.65	56	23.0	110	156

b. Kelompok N

rut	Gender	Umur	Kelompok	Glukosa Puasa	Cholesterol Total	Cholesterol LDL Direk	Cholesterol HDL	Trigliserida	Rasio Chol.Total/Chol.HDL	Tekanan Darah Diastolik	R CCA IMT	L CCA IMT	Combined CCA	diameter R CCA	diameter LCCA	Berat Badan	BMI	Tekanan Darah Sistolik	Tinggi Badan
1 N	2	20	2	85	156	79	65	78	2.4	70	0.05	0.03	0.04	0.63	0.68	44	17.9	120	157
2 N	2	14	1	77	167	93	51	157	3.3	80	0.08	0.07	0.075	0.62	0.62	44	18.3	120	155
3 N	1	15	1	81	188	117	46	185	4.1	80	0.05	0.04	0.045	0.65	0.65	89	30.8	130	170
4 N	2	20	1	77	180	103	59	84	3.1	80	0.07	0.08	0.075	0.75	0.68	50.5	22.1	110	151
5 N	1	15	2	83	167	95	52	98	3.2	80	0.07	0.05	0.06	0.69	0.7	89	25.7	120	186
6 N	2	20	1	78	223	142	58	145	3.8	70	0.05	0.04	0.045	0.6	0.58	50	21.2	110	153.5
7 N	1	20	2	78	163	84	72	46	2.3	70	0.06	0.06	0.06	0.64	0.59	54.65	20.07	110	165
8 N	1	19	1	82	240	169	50	58	4.8	70	0.05	0.07	0.06	0.63	0.63	64	23.9	100	163.5
9 N	1	20	1	82	132	76	43	57	3.1	70	0.05	0.05	0.05	0.64	0.62	52	16.88	110	175.5
10 N	2	20	1	69	208	136	54	48	3.8	70	0.04	0.04	0.04	0.59	0.68	58	21.83	110	163
11 N	1	20	1	85	159	101	46	46	3.5	80	0.06	0.05	0.055	0.73	0.67	60	21.8	140	166
12 N	2	20	1	77	164	101	53	47	3.1	80	0.05	0.04	0.045	0.54	0.55	44.5	19.01	110	153
13 N	2	13	2	74	156	88	52	91	3.0	70	0.06	0.06	0.06	0.56	0.62	37	16.3	120	150.5
14 N	2	17	2	80	177	112	50	87	3.6	80	0.07	0.05	0.06	0.57	0.62	43.5	18.6	120	153
15 N	1	18	2	83	157	98	44	73	3.6	80	0.06	0.05	0.055	0.69	0.67	49	16.8	130	171
16 N	1	20	1	86	200	132	39	167	5.2	80	0.04	0.06	0.05	0.71	0.74	70	23.94	140	171

Human osteopontin mRNA, complete cds

GenBank: J04765.1

LOCUS HUMOSTRO 1447 bp mRNA linear PRI
07-JAN-1995

DEFINITION Human osteopontin mRNA, complete cds.

ACCESSION J04765

VERSION J04765.1 GI:189404

KEYWORDS osteopontin; phosphoprotein.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1447)

AUTHORS Young,M.F., Kerr,J.M., Termine,J.D., Wewer,U.M.,
Wang,M.G.,
McBride,O.W. and Fisher,L.W.

TITLE cDNA cloning, mRNA distribution and heterogeneity,
chromosomal
location, and RFLP analysis of human osteopontin (OPN)

JOURNAL Genomics 7 (4), 491-502 (1990)

PUBMED [1974876](#)

COMMENT Original source text: Human adult osteoblast, cDNA to
mRNA, clone
HOP-10.
Draft entry and computer-readable sequence for [1]
kindly submitted
by M.F.Young, 04-MAY-1990.

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1447
/organism="Homo sapiens"
/mol_type="mRNA"
/db_xref="taxon:[9606](#)"
/map="4q11-q21"
/cell_type="osteoblast"
/dev_stage="adult"
/tissue_lib="lambda-ZAP"

gene 1..1447
/gene="SPP1"

CDS 109..1011
/gene="SPP1"

```

/note="osteopontin precursor"
/codon_start=1
/product="osteopontin"
/protein_id="AAA59974.1"
/db_xref="GI:189405"
/db_xref="GDB:G00-118-889"

```

```

/translation="MRIAVICFLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQLYNKYPDAVATWL
NPDPSQKQNL LAPQTLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSNDSDDVDDTDD
SHQSDESHHSDESDELVTFPTDLPATEVFTPVVPTVDTYDGRGDSVVYGLRSKSKKF
RRPDIQYPDATDEDITSHMESEELNGAYKAI PVAQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDD
QSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHS DVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVDPK
SKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN"

```

```

sig_peptide      109..156
                  /gene="SPP1"
                  /note="G00-118-889"
mat_peptide      217..1008
                  /gene="SPP1"
                  /product="osteopontin"
                  /note="G00-118-889"
polyA_site       1447
                  /gene="SPP1"
                  /note="G00-118-889"

```

```

ORIGIN           Chromosome 4q11-21.
1 gaggcagcag cagcaggagg aggcagacac agcatcgtcg ggaccagact cgtctcaggc
61 cagttgcagc cttctcagcc aaacgccgac caaggaaaac tcactaccat gagaattgca
121 gtgatttgct tttgcctcct aggcatacc tgtgccatac cagttaaaca ggctgattct
181 ggaagtcttg aggaaaagca gctttacaac aaatacccag atgctgtggc cacatggcta
241 aaccctgacc catctcagaa gcagaatctc ctagcccac agacccttc aagtaagtcc
301 aacgaaagcc atgaccacat ggatgatatg gatgatgaag atgatgatga ccatgtggac
361 agccaggact ccattgactc gaacgactct gatgatgtag atgacactga tgattctcac
421 cagtctgatg agtctcacca ttctgatgaa tctgatgaac tggtcactga ttttcccacg
481 gacctgccag caaccgaagt tttcactcca gttgtcccca cagtagacac atatgatggc
541 cgaggtgata gtgtggttta tggactgagg tcaaaatcta agaagtttcg cagacctgac
601 atccagtacc ctgatgctac agacgaggac atcacctcac acatggaaaag cgaggagttg
661 aatggtgcat acaaggccat ccccgttgcc caggacctga acgcgccttc tgattgggac
721 agccgtggga aggacagtta tgaacgagt cagctggatg accagagtgc tgaaccacc
781 agccacaagc agtccagatt atataagcgg aaagccaatg atgagagcaa tgagcattcc
841 gatgtgattg atagtcagga actttccaaa gtcagccgtg aattccacag ccatgaattt
901 cacagccatg aagatatgct ggtttagtag cccaaaagta aggaagaaga taaacacctg
961 aaatttcgta tttctcatga attagatagt gcatcttctg aggtcaatta aaaggagaaa
1021 aaatacaatt tctcactttg catttagtca aaagaaaaaa tgctttatag caaaatgaaa

```

```

1081 gagaacatga aatgcttctt tctcagttta ttggttgaat gtgtatctat ttgagctctgg
1141 aaataactaa tgtgtttgat aattagttta gtttgtggct tcatggaaac tcctgtaaa
1201 ctaaaagctt cagggttatg tctatgttca ttctatagaa gaaatgcaaa ctatcactgt
1261 attttaatat ttgttatctc ctcatgaata gaaatttatg tagaagcaaa caaaatactt
1321 ttaccactt aaaaagagaa tataacattt tatgtcacta taatcttttg tttttaagt
1381 tagtgtatat ttgttttga ttatctttt gtggtgtgaa taatctttt atcttgaatg
1441 taataag
//

```

Human osteopontin gene, complete cds

GenBank: U20758.1

LOCUS HSU20758 3143 bp DNA linear PRI
07-FEB-1996

DEFINITION Human osteopontin gene, complete cds.

ACCESSION U20758

VERSION U20758.1 GI:1001962

KEYWORDS .

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates;
Haplorrhini;
Catarrhini; Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 3143)

AUTHORS Crosby,A.H., Edwards,S.J., Murray,J.C. and Dixon,M.J.

TITLE Genomic organization of the human osteopontin gene:
exclusion of
the locus from a causative role in the pathogenesis of
dentinogenesis imperfecta type II

JOURNAL Genomics 27 (1), 155-160 (1995)

PUBMED [7665163](#)

REFERENCE 2 (bases 1 to 3143)

AUTHORS Dixon,M.J.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-FEB-1995) Michael J. Dixon, School of
Biological

Sciences, University of Manchester, Stopford Building,
Manchester

UK M13 9PT

FEATURES	Location/Qualifiers
source	1..3143 /organism="Homo sapiens" /mol_type="genomic DNA" /db_xref="taxon: 9606 " /chromosome="4" /map="4q13"
mRNA	join(126..212,360..427,537..575,884..964,1232..1273, 1597..1920,2305..3143) /product="osteopontin"
5'UTR	join(126..212,360..373)
exon	126..212 /note="exon 1 is not translated" /number=1
intron	213..359 /number=1
exon	360..427 /number=2
CDS	join(374..427,537..575,884..964,1232..1273,1597..1920, 2305..2709) /codon_start=1 /product="osteopontin" /protein_id=" AAA86886.1 " /db_xref="GI:1001963" /translation="MRIAVICFCLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQLYNKYPDAVATWL NPDPSQKQNLAPQNAVSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDDEDDDDHVDSDS IDSNDSDDVDDTDDSHQSDESHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPTVDTYDGRG DSVVYGLRSKSKKFRPDIQYPDATDEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWD SRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSH EFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHIELDSASSEVN"
intron	428..536

	/number=2
<u>exon</u>	537..575
	/number=3
<u>intron</u>	576..883
	/number=3
<u>exon</u>	884..964
	/number=4
<u>intron</u>	965..1231
	/number=4
<u>exon</u>	1232..1273
	/number=5
<u>intron</u>	1274..1596
	/number=5
<u>exon</u>	1597..1920
	/number=6
<u>intron</u>	1921..2304
	/number=6
<u>exon</u>	2305..3143
	/number=7
<u>3'UTR</u>	2710..3143

ORIGIN

```

1 ggggaagtgt gggagcaggt gggctgggca gtggcagaaa cctgatgaca caatctcgcc
61 gcctccctgt gttggtggag gatgtctgca gcagcattta aattctggga gggcttggtt
121 gtcagcagca gcaggaggag gcagagacag catcgctcggg accagactcg tctcaggcca
181 gttgcagcct tctcagccaa acgccgacca aggtacagct tcagtttgc actgggttgt
241 gcattcagct gaatttcatg gggaagtcca aattctaagg aaaaaaatgt ggtagtataa
301 aaaggtatca ctgttgtaac ctatgaagat gtcagctatt ctttgaat attttcagc
361 aaaactcact accatgagaa ttgcagtgat ttgcttttgc ctctaggca tcacctgtgc
421 cataccagtg agtacagttg catcttaaag aaaattcctg aaaataactg aattgtgtgc
481 ttccatgtgc taggaggaca ttcttgtaat ctttcttcat cttttctggt tctaaggtta
541 aacaggctga ttctggaagt tctgaggaaa agcaggttaag catcttttat gtttttatat
601 agttaaataca tttactcaat tatggcgaga ggtgcaagaa acgtatttgc tgcgatcaaa
661 tgagttcata tttgtaaagc aatttgaaag agtgcctagc ccacagtaag tgctacataa
721 gagtttgta ataatctg caaaaaaaaa aaaaattaca aaaaggtacc taagggtcg
781 ggtgactata tgcttccatc aagactagtg aagaatggtt gttttttcca ttcatcccta
841 catttctttt ttaataatg ataacatgc aacttttttg tagctttaca acaaatacc
901 agatgctgtg gccacatggc taaaccctga cccatctcag aagcagaatc tctagcccc
961 acaggtatth taaacttct cataattaa ctacagtgat gaaagatagc cacactcagg

```



1021 ccatttgggc tgctcagatg aatcctgccc tgctgctgctg caaacatgtg cttaggacat
 1081 tgactgatct gccatgttgg cttctctctg tgттаagcca tccacagatg aggctgaaaa
 1141 ataaaaactg ctttggatta aaaaggttaa cttttgaata aaaaagctag gcatgtgtga
 1201 tgcgcactaa cacgtgccat tccttcttca gaatgctgtg tcctctgaag aaaccaatga
 1261 ctttaaacaa gaggtaagtt ctcattttca atcagaggcc catcatgcct tgaagagatg
 1321 aaagaaggca ttgcttggat tctcttctga tgaaatttca ttagcaagtt ttccagctaa
 1381 ttggcagtct aaaacttgct cataaataaa acatgtatth actaaatc agaaatacta
 1441 ggtttctctg gataacctaa aagccatggt atgtactgtg aatgcaaaga ttctgaaact
 1501 aaataaaaag aaagatagta aaagactaat gtgctataaa ggctaaggga aaataaaaac
 1561 ccatatatta attttcccgg ccatcttaat tttcagaccc ttccaagtaa gtccaacgaa
 1621 agccatgacc acatggatga tatggatgat gaagatgatg atgaccatgt ggacagccag
 1681 gactccattg actcgaacga ctctgatgat gtgatgaca ctgatgatc tcaccagtct
 1741 gatgagtctc accattctga tgaatctgat gaactggtca ctgattttcc cacggacctg
 1801 ccagcaaccg aagttttcac tcagttgtc cccacagtag acacatatga tggccgaggt
 1861 gatagtgtgg tttatggact gaggtcaaaa tctaagaagt ttgcgagacc tgacatccag
 1921 gtaaatcctt taacagacac acctgatggt tctgactagc gctcaagtct aggaaaccac
 1981 agtttgcata ttcattcatt cattcatcca ttcattcacc cattcagcaa gaattcattc
 2041 atattctact ttatgacat tgaatacaaa tctttttctg cttggcggtt tttgtaagtc
 2101 tacataatth ctctctagat ttgattctca aacacaatth tactttttga aatcctggat
 2161 caaagtaaca tgctagtatt atttcagcca gatttagaca atttttagta taagatgacc
 2221 taaaagctag agagtggaaa aggattacca tattcccacc cctagccgtt catataatta
 2281 ttcttcattt gtgccgtgat tcagttacct gatgctacag acgaggacat cacctcacac
 2341 atggaaagcg aggagttgaa tgggtgcatac aaggccatcc ccgttgcca ggacctgaac
 2401 gcgccttctg attgggacag ccgtgggaag gacagttatg aaacgagtca gctggatgac
 2461 cagagtgtct aaaccacag ccacaagcag tccagattat ataagcggaa agccaatgat
 2521 gagagcaatg agcattccga tgtgattgat agtcaggaac tttccaaagt cagccgtgaa
 2581 ttccacagcc atgaatttca cagccatgaa gatatgctgg ttgtagaccc caaaagtaag
 2641 gaagaagata aacacctgaa atttcgtatt tctcatgaa tagatagtgc atcttctgag
 2701 gtcaatthaa aggagaaaa atacaatthc tcactttgca tttagtcaaa agaaaaaatg
 2761 ctttatagca aatgaaaga gaacatgaaa tgcttcttth tcagtttatt ggttgaatgt
 2821 gtatctatth gagtctgaa ataactaatg tgtttgataa ttagtttagt ttgtggctth
 2881 atggaaactc cctgthaaaa aaagcttcag ggttatgtct atgttcattc tatagaagaa
 2941 atgcaaaacta tctctgtatt ttaatatttg ttattctctc atgaaatgaa atttatgtag
 3001 aagcaaacaa aatactthta ccactthaaa aagagaatat aacattthtat gtcactataa
 3061 tcttttgtht thtaagttag tgtatattth gttgtgatta tcttttgthg tgtgaataaa
 3121 tcttttatct tgaatgthaa aag

//



Lampiran 4 Uji Normalitas

1. Distribusi data berdasarkan kelompok sampel

Tests of Normality							
	kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
umur	kasus	.359	19	.000	.660	19	.000
	kontrol	.205	13	.139	.905	13	.157
fastglucosa	kasus	.239	19	.006	.706	19	.000
	kontrol	.149	13	.200 [*]	.972	13	.919
totkolesterol	kasus	.181	19	.101	.911	19	.076
	kontrol	.166	13	.200 [*]	.971	13	.909
LDL	kasus	.139	19	.200 [*]	.936	19	.222
	kontrol	.149	13	.200 [*]	.965	13	.827
HDL	kasus	.098	19	.200 [*]	.973	19	.835
	kontrol	.214	13	.104	.904	13	.151
trigliserida	kasus	.196	19	.053	.903	19	.056
	kontrol	.158	13	.200 [*]	.946	13	.539
rasio	kasus	.113	19	.200 [*]	.968	19	.730
	kontrol	.160	13	.200 [*]	.942	13	.484
height	kasus	.197	19	.051	.927	19	.155
	kontrol	.083	13	.200 [*]	.994	13	1.000
weight	kasus	.150	19	.200 [*]	.905	19	.059
	kontrol	.244	13	.033	.906	13	.162
BMI	kasus	.146	19	.200 [*]	.969	19	.754
	kontrol	.206	13	.137	.895	13	.112
sistole	kasus	.238	19	.006	.900	19	.049
	kontrol	.365	13	.000	.765	13	.003
diastole	kasus	.267	19	.001	.781	19	.001
	kontrol	.327	13	.000	.756	13	.002
RCCA	kasus	.249	19	.003	.884	19	.025
	kontrol	.236	13	.046	.869	13	.051
LCCA	kasus	.214	19	.022	.897	19	.043
	kontrol	.308	13	.001	.693	13	.000
combineCCA	kasus	.202	19	.040	.908	19	.067
	kontrol	.329	13	.000	.820	13	.012
diameter.RC CA	kasus	.140	19	.200 [*]	.948	19	.360
	kontrol	.186	13	.200 [*]	.877	13	.064
diameter.LC CA	kasus	.102	19	.200 [*]	.974	19	.859
	kontrol	.133	13	.200 [*]	.947	13	.550
a. Lilliefors Significance Correction							
*. This is a lower bound of the true significance.							

2. Uji Normalitas Data Keseluruhan Sampel

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		height	weight	BMI	sistole	diastole	RCCA	LCCA	Combin e CCA	diameter RCCA	diameter LCCA	umur	Fast glucosa	TK	LDL	HDL	TG	rasio	
N		32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32
Normal Parameters ^a	Mean	1.6256E 2	56.5359	21.1 7	1.1734E2	75.625 0	.0584	.0566	.0575	.6434	.6472	17.5	80.8438	172.968 8	1.0278E2	54.1250	94.9688	3.312 5	
	Std. Deviation	9.53495	1.50707E 1	4.33	1.19126E 1	7.1560 9	.0148 3	.0175 3	.01368	.05626	.04979	3.016 7	10.4730 4	35.4104 8	3.04946E 1	1.08412E 1	54.6481 3	.8797 9	
Most Extreme Differences	Absolute	.098	.150	.101	.182	.292	.208	.235	.271	.109	.105	.265	.200	.161	.131	.130	.156	.103	
	Positive	.098	.150	.101	.162	.222	.208	.235	.271	.068	.099	.204	.200	.161	.131	.130	.156	.103	
	Negative	-.072	-.105	-.068	-.182	-.292	-.160	-.141	-.100	-.109	-.105	-.265	-.133	-.092	-.094	-.071	-.136	-.072	
Kolmogorov-Smirnov Z		.555	.846	.569	1.029	1.652	1.177	1.328	1.534	.614	.594	1.500	1.130	.909	.742	.733	.883	.585	
Asymp. Sig. (2-tailed)		.918	.472	.902	.240	.009	.125	.059	.018	.845	.872	.022	.156	.381	.640	.656	.416	.883	

Terdapat tiga data yang tidak terdistribusi normal, yaitu data umur, tekanan darah diastole dan intima media carotis kanan dan kiri. Setelah dilakukan transformasi data maka ditemukan data intima media carotis kanan dan kiri terdistribusi normal dengan melihat nilai $p > \alpha = 0.05$, sedangkan data umur dan tekanan darah diastole tidak memenuhi uji normalitas data.

Berikut adalah data ketebalan intima media kanan dan kiri setelah dilakukan transformasi data:

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test		
		combine_trans
N		32
Normal Parameters ^a	Mean	-2.8806
	Std. Deviation	.22103
Most Extreme Differences	Absolute	.224
	Positive	.224
	Negative	-.121
Kolmogorov-Smirnov Z		1.269
Asymp. Sig. (2-tailed)		.080
a. Test distribution is Normal.		

Lampiran 5 Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
umur	.146	1	30	.705
fastglucosa	.971	1	30	.332
totkolesterol	4.121	1	30	.051
LDL	3.781	1	30	.061
HDL	2.899	1	30	.099
trigliserida	20.213	1	30	.000
rasio	1.470	1	30	.235
height	2.746	1	30	.108
weight	.319	1	30	.576
BMI	.046	1	30	.832
sistole	.853	1	30	.363
diastole	.548	1	30	.465
RCCA	.457	1	30	.504
LCCA	.726	1	30	.401
diameter.RCCA	1.095	1	30	.304
diameter.LCCA	.152	1	30	.699
Combine_trans	1.212	1	30	.280

Lampiran 6 Uji Komparasi

- Uji Komparasi antara kelompok kasus dan kontrol

1. Umur

Ranks				
	kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
umur	kasus	19	19.13	363.50
	kontrol	13	12.65	164.50
	Total	32		

Test Statistics ^b	
	umur
Mann-Whitney U	73.500
Wilcoxon W	164.500
Z	-2.044
Asymp. Sig. (2-tailed)	.041
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.054 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

2. Glukosa puasa

Group Statistics					
	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
fastglucosa	Kasus	19	81.8947	12.93099	2.96657
	Control	13	79.3077	5.31326	1.47363

Independent Samples Test									
	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper



Lampiran 6 Uji Komparasi

Fast glucosa	Equal variances assumed	.971	.332	.680	30	.502	2.58704	3.80272	-5.17915	10.35324
	Equal variances not assumed			.781	25.638	.442	2.58704	3.31242	-4.22643	9.40052

3. Total Kolesterol

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
totkolesterol Kasus	19	1.8311E2	39.01552	8.95077
Control	13	1.5815E2	23.56850	6.53673

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2- tailed)	Mean Difference	Std. Error Differenc e	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Tot kolesterol	4.121	.051	2.057	30	.048	24.95142	12.12895	.18080	49.722 03	
			2.251	29.66 4	.032	24.95142	11.08355	2.3050 1	47.597 82	

4. Kolesterol LDL

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
LDL kasus	19	1.1258E2	33.25376	7.62894
kontrol	13	88.4615	19.22072	5.33087

Lampiran 6 Uji Komparasi

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
LDL	Equal variances assumed	3.781	.061	2.352	30	.025	24.11741	10.25196	3.18010	45.05471
	Equal variances not assumed			2.591	29.367	.015	24.11741	9.30692	5.09294	43.14187

5. Kolesterol HDL

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
HDL	kasus	19	50.8947	8.12332	1.86362
	kontrol	13	58.8462	12.80525	3.55154

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
HDL	Equal variances assumed	2.899	.099	-2.154	30	.039	-7.95142	3.69146	-15.49039	-.41244
	Equal variances not assumed			-1.983	18.579	.062	-7.95142	4.01080	-16.35900	.45617

Lampiran 6 Uji Komparasi

6. Trigliserida

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
trigliserida kasus	19	1.1574E2	61.10632	14.01875
trigliserida kontrol	13	64.6154	20.80680	5.77077

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
trigliserida Equal variances assumed	20.213	.000	2.891	30	.007	51.12146	17.68298	15.00800	87.23492	
trigliserida Equal variances not assumed			3.372	23.601	.003	51.12146	15.16005	19.80461	82.43831	

7. Ratio LDL/Trigliserida

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
rasio kasus	19	3.6684	.86285	.19795
rasio kontrol	13	2.7923	.62378	.17301

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means



Lampiran 6 Uji Komparasi

	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
rasio Equal variances assumed	1.470	.235	3.136	30	.004	.87611	.27935	.30560	1.44662
Equal variances not assumed			3.333	29.864	.002	.87611	.26290	.33910	1.41313

8. Tinggi badan

Group Statistics					
	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
height	kasus	19	1.6176E2	7.59819	1.74314
	kontrol	13	1.6373E2	12.07376	3.34866

Independent Samples Test										
		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
height	Equal variances assumed	2.746	.108	-.567	30	.575	-1.96761	3.47017	-9.05464	5.11942
	Equal variances not assumed			-.521	18.480	.608	-1.96761	3.77519	-9.88426	5.94903

9. Berat badan



Lampiran 6 Uji Komparasi

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
weight kasus	19	58.8158	13.70950	3.14517
kontrol	13	53.2038	16.86881	4.67857

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
weight	Equal variances assumed	.319	.576	1.036	30	.309	5.61194	5.41813	-5.45336	16.67725
	Equal variances not assumed			.995	22.265	.330	5.61194	5.63747	-6.07139	17.29527

10. *Body Mass Indeks*

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
BMI kasus	19	22.3674	4.28101	.98213
kontrol	13	19.4369	3.95299	1.09636

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper

Lampiran 6 Uji Komparasi

BMI	Equal variances assumed	.046	.832	1.960	30	.059	2.93045	1.49479	-.12231	5.98320
	Equal variances not assumed			1.991	27.277	.057	2.93045	1.47193	-.08828	5.94917

11. Sistole

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
sistole kasus	19	1.1895E2	12.42521	2.85054
sistole kontrol	13	1.1500E2	11.18034	3.10087

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
sistole	Equal variances assumed	.853	.363	.918	30	.366	3.94737	4.29867	4.83169	12.72643
	Equal variances not assumed			.937	27.675	.357	3.94737	4.21200	4.68509	12.57983

12. Diastole

Ranks

kelompok	N	Mean Rank	Sum of Ranks
diastole kasus	19	17.55	333.50
diastole kontrol	13	14.96	194.50
Total	32		

Lampiran 6 Uji Komparasi

Test Statistics^b

	diastole
Mann-Whitney U	103.500
Wilcoxon W	194.500
Z	-.846
Asymp. Sig. (2-tailed)	.397
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.448 ^a

a. Not corrected for ties.

b. Grouping Variable: kelompok

13. RCCA

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
RCCA	kasus	19	.0568	.01157	.00265
	kontrol	13	.0608	.01891	.00525

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
RCCA	Equal variances assumed	.457	.504	-.730	30	.471	-.00393	.00538	-.01491	.00706
	Equal variances not assumed			-.668	18.142	.513	-.00393	.00588	-.01627	.00842

14. LCCA

Group Statistics

Lampiran 6 Uji Komparasi

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
LCCA kasus	19	.0558	.01216	.00279
kontrol	13	.0577	.02386	.00662

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
LCCA Equal variances assumed	.726	.401	-.297	30	.768	-.00190	.00640	-.01498	.01117
Equal variances not assumed			-.265	16.304	.794	-.00190	.00718	-.01710	.01330

15. Combina CCA

Group Statistics

kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Combine_trans kasus	19	-2.8920	.17867	.04099
kontrol	13	-2.8639	.27895	.07737

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper



Lampiran 6 Uji Komparasi

Combine	Equal	1.212	.280	-.349	30	.730	-.02814	.08071	-.19297	.13669
_trans	variances									
	assumed									
	Equal			-.321	18.69	.751	-.02814	.08755	-.21159	.15531
	variances not				9					
	assumed									

16. Diameter RCCA

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
diameter.RCCA	Kasus	19	.6379	.06206	.01424
	kontrol	13	.6515	.04776	.01325

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances	t-test for Equality of Means								
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
diameter. RCCA	Equal variances assumed	1.095	.304	-.668	30	.509	-.01364	.02043	-.05537	.02809
	Equal variances not assumed			-.702	29.497	.488	-.01364	.01945	-.05338	.02610

17. Diameter LCCA

Group Statistics

	kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
diameter.LCCA	Kasus	19	.6374	.05043	.01157
	kontrol	13	.6615	.04705	.01305

Lampiran 6 Uji Komparasi

Independent Samples Test

	Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
								Lower	Upper
diameter. LCCA	.152	.699	-1.368	30	.182	-.02417	.01767	-.06027	.01193
Equal variances assumed									
Equal variances not assumed			-1.386	27.109	.177	-.02417	.01744	-.05995	.01161

- Uji Komparasi ketebalan intima media carotis dengan *confounding factor*

Group Statistics

	combine_CCA	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	P value
umur	>=0.05 mm	7	17.1429	3.93398	1.48690	
	<0.05 mm	25	17.6000	2.79881	.55976	.781
height	>=0.05 mm	7	1.5736E2	8.87747	3.35537	
	<0.05 mm	25	1.6402E2	9.36024	1.87205	.113
weight	>=0.05 mm	7	54.7143	20.00803	7.56233	
	<0.05 mm	25	57.0460	13.85824	2.77165	.780
BMI	>=0.05 mm	7	21.5343	5.69855	2.15385	
	<0.05 mm	25	21.0768	4.01922	.80384	.847
sistole	>=0.05 mm	7	1.1286E2	12.53566	4.73804	
	<0.05 mm	25	1.1860E2	11.68332	2.33666	.305
diastole	>=0.05 mm	7	72.8571	7.55929	2.85714	
	<0.05 mm	25	76.4000	7.00000	1.40000	.294

Lampiran 6 Uji Komparasi

Group Statistics						
	combine_CCA	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	P value
umur	>=0.05 mm	7	17.1429	3.93398	1.48690	
	<0.05 mm	25	17.6000	2.79881	.55976	.781
height	>=0.05 mm	7	1.5736E2	8.87747	3.35537	
	<0.05 mm	25	1.6402E2	9.36024	1.87205	.113
weight	>=0.05 mm	7	54.7143	20.00803	7.56233	
	<0.05 mm	25	57.0460	13.85824	2.77165	.780
BMI	>=0.05 mm	7	21.5343	5.69855	2.15385	
	<0.05 mm	25	21.0768	4.01922	.80384	.847
sistole	>=0.05 mm	7	1.1286E2	12.53566	4.73804	
	<0.05 mm	25	1.1860E2	11.68332	2.33666	.305
diastole	>=0.05 mm	7	72.8571	7.55929	2.85714	
	<0.05 mm	25	77.4286	6.02376	2.27677	
fastglucosa	>=0.05 mm	7	77.4286	6.02376	2.27677	
	<0.05 mm	25	81.8000	11.32475	2.26495	.189
totkolesterol	>=0.05 mm	7	1.8243E2	32.09287	12.12997	
	<0.05 mm	25	1.7032E2	36.45170	7.29034	.411
LDL	>=0.05 mm	7	1.0714E2	26.17523	9.89331	
	<0.05 mm	25	1.0156E2	31.98057	6.39611	.644
HDL	>=0.05 mm	7	59.7143	14.13877	5.34395	
	<0.05 mm	25	52.5600	9.49596	1.89919	.245
trigliserida	>=0.05 mm	7	85.8571	56.92225	21.51459	
	<0.05 mm	25	97.5200	54.92201	10.98440	.640

- Uji Mann Whitney untuk data *confonding factor* yang tidak normal

Ranks



Lampiran 6 Uji Komparasi

	combine_CCA	N	Mean Rank	Sum of Ranks	P Value
diastole	>=0.05 mm	7	13.50	94.50	0.291
	<0.05 mm	25	17.34	433.50	
	Total	32			
umur	>=0.05 mm	7	16.86	118.00	0.903
	<0.05 mm	25	16.40	410.00	
	Total	32			



Lampiran 7 Uji Korelasi

		Correlations						
		umur	Fast glucosa	Tot kolesterol	LDL	HDL	trigliserida	Combine trans
umur	Pearson Correlation	1	.240	.147	.266	-.342	-.013	-.065
	Sig. (2-tailed)		.185	.423	.141	.055	.945	.724
	N	32	32	32	32	32	32	32
Fast glucosa	Pearson Correlation	.240	1	.377*	.365*	-.129	.380*	.233
	Sig. (2-tailed)	.185		.033	.040	.482	.032	.199
	N	32	32	32	32	32	32	32
Total kolesterol	Pearson Correlation	.147	.377*	1	.952**	.043	.553**	.033
	Sig. (2-tailed)	.423	.033		.000	.815	.001	.858
	N	32	32	32	32	32	32	32
LDL	Pearson Correlation	.266	.365*	.952**	1	-.231	.462**	.042
	Sig. (2-tailed)	.141	.040	.000		.204	.008	.821
	N	32	32	32	32	32	32	32
HDL	Pearson Correlation	-.342	-.129	.043	-.231	1	-.101	-.038
	Sig. (2-tailed)	.055	.482	.815	.204		.582	.835
	N	32	32	32	32	32	32	32
trigliserida	Pearson Correlation	-.013	.380*	.553**	.462**	-.101	1	.116
	Sig. (2-tailed)	.945	.032	.001	.008	.582		.529
	N	32	32	32	32	32	32	32
Combine_tr ans	Pearson Correlation	-.065	.233	.033	.042	-.038	.116	1
	Sig. (2-tailed)	.724	.199	.858	.821	.835	.529	
	N	32	32	32	32	32	32	32

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations					
	Combine_trans	height	weight	BMI	sistole
Combine_trans	1				
height		1			
weight			1		
BMI				1	
sistole					1



Lampiran 7 Uji Korelasi

Combine trans	Pearson Correlation	1	.204	-.008	-.086	.019
	Sig. (2-tailed)		.262	.964	.638	.916
	N	32	32	32	32	32
height	Pearson Correlation	.204	1	.652**	.290	.352*
	Sig. (2-tailed)	.262		.000	.107	.049
	N	32	32	32	32	32
weight	Pearson Correlation	-.008	.652**	1	.907**	.507**
	Sig. (2-tailed)	.964	.000		.000	.003
	N	32	32	32	32	32
BMI	Pearson Correlation	-.086	.290	.907**	1	.481**
	Sig. (2-tailed)	.638	.107	.000		.005
	N	32	32	32	32	32
sistole	Pearson Correlation	.019	.352*	.507**	.481**	1
	Sig. (2-tailed)	.916	.049	.003	.005	
	N	32	32	32	32	32

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* . Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Correlations

		umur	diastole	Total kolesterol	BMI	sistole	Combine trans
Spearman's rho	Correlation Coefficient	1.000	.188	.141	.382*	.222	-.133
	Sig. (2-tailed)		.303	.440	.031	.222	.467
	N	32	32	32	32	32	32
diastole	Correlation Coefficient	.188	1.000	.022	.607**	.646**	.088
	Sig. (2-tailed)	.303		.903	.000	.000	.634
	N	32	32	32	32	32	32
Total kolesterol	Correlation Coefficient	.141	.022	1.000	.293	.034	.004

Lampiran 7 Uji Korelasi

	Sig. (2-tailed)	.440	.903	.	.103	.854	.981
	N	32	32	32	32	32	32
BMI	Correlation Coefficient	.382*	.607**	.293	1.000	.418*	-.031
	Sig. (2-tailed)	.031	.000	.103	.	.017	.868
	N	32	32	32	32	32	32
	Correlation Coefficient	.222	.646**	.034	.418*	1.000	.042
sistole	Sig. (2-tailed)	.222	.000	.854	.017	.	.821
	N	32	32	32	32	32	32
	Correlation Coefficient	-.133	.088	.004	-.031	.042	1.000
	Sig. (2-tailed)	.467	.634	.981	.868	.821	.
combine_trans	N	32	32	32	32	32	32

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

** . Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).



Lampiran 8 Uji Non Parametrik Analisa Kualitatif

1. Variasi Genetik vs Ketebalan intima media arteri carotis

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.567 ^a	1	.451		
Continuity Correction ^b	.042	1	.837		
Likelihood Ratio	.526	1	.468		
Fisher's Exact Test				.590	.394
Linear-by-Linear Association	.550	1	.458		
N of Valid Cases ^b	32				

a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.31.

b. Computed only for a 2x2 table

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate			2.100
ln(Estimate)			.742
Std. Error of ln(Estimate)			.999
Asymp. Sig. (2-sided)			.458
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	.297
		Upper Bound	14.873
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound	-1.216
		Upper Bound	2.700

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

1. Variasi Genetik vs Total kolesterol

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.117 ^a	1	.732		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.123	1	.726		

Lampiran 8 Uji Non Parametrik Analisa Kualitatif

Fisher's Exact Test				1.000	.606
Linear-by-Linear Association	.114	1	.736		
N of Valid Cases ^b	32				

a. 2 cells (50.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.31.

b. Computed only for a 2x2 table

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate			1.500
ln(Estimate)			.405
Std. Error of ln(Estimate)			1.190
Asymp. Sig. (2-sided)			.733
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	.146
		Upper Bound	15.461
	ln(Common Odds Ratio)	Lower Bound	-1.927
		Upper Bound	2.738

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

2. Variasi Genetik vs Indeks massa tubuh

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	.021 ^a	1	.885		
Continuity Correction ^b	.000	1	1.000		
Likelihood Ratio	.022	1	.883		
Fisher's Exact Test				1.000	.690
Linear-by-Linear Association	.020	1	.886		
N of Valid Cases ^b	32				

a. 3 cells (75.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1.13.

b. Computed only for a 2x2 table

Mantel-Haenszel Common Odds Ratio Estimate

Estimate	1.190
----------	-------



Lampiran 8 Uji Non Parametrik Analisa Kualitatif

In(Estimate)			.174
Std. Error of In(Estimate)			1.203
Asymp. Sig. (2-sided)			.885
Asymp. 95% Confidence Interval	Common Odds Ratio	Lower Bound	.113
		Upper Bound	12.585
	In(Common Odds Ratio)	Lower Bound	-2.184
		Upper Bound	2.533

The Mantel-Haenszel common odds ratio estimate is asymptotically normally distributed under the common odds ratio of 1.000 assumption. So is the natural log of the estimate.

