

Polimorfisme Gen Timidilat Sintase-5'UTR 3R/3R (TS-5'UTR 3R/3R) dan Metilentetrahidrofolat Reduktase C677T (MTHFR C677T) pada Anak dengan Leukemia Limfoblastik Akut yang Resisten dengan Metotreksat

(Gene Polymorphism of MTHFR C677T and TS 5'-UTR 3R/3R, on Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Resistance to Methotrexate)

I Dewa Gede Ugrasena*, Subijanto MS*, Ketut Sudiana**, Djajadiman Gatot***

ABSTRACT

Childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children. In Indonesia, it can now be cured in approximately 30–60% of patients. Drug resistance is the major cause of the treatment failure in childhood ALL. Despite the extensive studies, the mechanism of methotrexate (MTX) in the resistance of ALL is still not clear. The purpose of this study were to measure the *in vivo* antileukemic effect of MTX and to identify the related responsible gene polymorphism of MTHFR C677T and TS 5'-UTR 3R/3R in folate metabolism. This study prospectively evaluated the association of the MTHFR C677T and TS 5'-UTR 3R/3R gene polymorphisms by genotyping 155 pediatric ALL patients treated by the National 1994 ALL protocol and WK-ALL 2000 at Dr. Soetomo Hospital Surabaya. There was a significant correlation between MTHFR C677T and TS 5'-UTR 3R/3R gene polymorphism with MTX resistance. Children with MTHFR C677T polymorphism were 4 times more resistant than patients without MTHFR C677T polymorphism ($p = 0.007$). Patients with TS 5'-UTR 3R/3R polymorphism were 6.4 times more resistant than patients without TS 5'-UTR 3R/3R polymorphism ($p = 0.001$). Patients with a combination of 2 gene polymorphisms were 2.3 times more resistant to MTX than those with a single polymorphism. This study suggests that TS 5'-UTR 3R/3R is a dominant gene polymorphism related with MTX resistance in childhood ALL. The MTX resistance correlated with a combination of gene polymorphisms. In addition, there was no correlation between age, sex, and morphologic diagnosis with MTX resistance.

Key words: polymorphism, folate metabolism, acute lymphoblastic

PENDAHULUAN

Leukemia limfoblastik akut (LLA) merupakan penyakit keganasan yang paling sering dijumpai pada anak. Laporan beberapa penelitian menunjukkan bahwa 1/3 penderita LLA mengalami kegagalan terapi (Kanerva, 2001; Carroll *et al.*, 2003; Pui, 2004; Poplack, 2005). Di Indonesia diberbagai tempat dilaporkan bahwa angka kegagalan terapi penderita LLA tinggi. Di Surabaya dilaporkan oleh Theresia, 2002 terdapat *event free survival* 50,91%, Ugrasena, 2007 terdapat *event free survival* 33%, di Yogyakarta oleh Sri Mulatsih dan Sutaryo (2004) mendapatkan 31%, di Jakarta oleh Gatot (1991) mendapatkan 65,9% yang risiko standar dan 40,4% pada kelompok risiko tinggi. Salah satu penyebab kegagalan terapi pada LLA adalah terjadinya resistensi terhadap kemoterapi metotreksat (MTX) yang

digunakan pada pengobatan LLA (Pieters *et al.*, 1997). Resistensi terhadap MTX terjadi karena ada polimorfisme pada gen yang menyandi berbagai enzim yang terlibat dalam metabolisme folat yaitu enzim Metilentetrahidrofolat reduktase (MTHFR) dan Timidilat Sintase (TS). Dari beberapa laporan penelitian ternyata polimorfisme ini ada variasi etnik (Marsh, *et al.*, 1999; Chiusolo *et al.*, 2004; Kauffman, *et al.*, 2004; Schnakenberg, *et al.*, 2005; Konstantinos, *et al.*, 2006). Di Indonesia ditemukan polimorfisme TS-5'UTR 3R/3R 76,3%, dua kali lebih banyak dibanding populasi Kaukasia (76,3%: 33,1%) (Ugrasena, *et al.*, 2006), demikian juga polimorfisme MTHFR C677T pada anak yang tidak menderita leukemia cukup tinggi (Giovanetti, *et al.*, 2008). Namun sejauh ini mekanisme kegagalan terapi MTX pada LLA yang didasari kejadian polimorfisme belum jelas.

* Departemen Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Soetomo, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

** Departemen Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

*** Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

Bila mekanisme resistensi yang berdasarkan polimorfisme ini tidak segera mendapat penjelasan, maka akan menyulitkan penderita dan keluarga pada kemudian hari.

Bila terjadi polimorfisme gen penyandi enzim MTHFR C677T serta TS 5'-UTR 3R/3R akan mengganggu aktivitas enzim. Gangguan ini menyebabkan MTX tidak mampu menekan kerja enzim diatas. Selanjutnya sintesis DNA limfoblast tetap berlangsung, dan akhirnya menimbulkan resistensi terhadap MTX.

Berdasarkan fakta tersebut, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah ada hubungan antara polimorfisme MTHFR C677T dan TS 5'-UTR 3R/3R dengan resistensi metotreksat pada anak dengan leukemia limfoblastik akut.

MATERI DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan rancangan prospektif. Populasi penelitian adalah anak yang menderita leukemia limfoblastik akut, yang di rawat di Departemen/SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Soetomo. Penelitian ini dilakukan bekerja sama dengan *National University Hospital of Singapor*, dimulai Januari 2005 hingga Juli 2008.

Terhadap subyek yang memenuhi kriteria inklusi diberikan terapi menggunakan protokol LLA Nasional 1994, dan WK-ALL 2000.

Yang dimasukkan dalam penelitian ini adalah penderita dengan kriteria: jenis kelamin laki-laki atau perempuan, umur saat diagnosis ditetapkan 0-16 tahun, diagnosis LLA dengan klasifikasi FAB tipe L1, L2, belum pernah mendapat pengobatan leukemia dengan menggunakan kemoterapi sitostatika, penderita yang menjalani protokol kemoterapi dengan teratur dan telah menandatangani persetujuan untuk kemoterapi. Penderita yang tidak dimasukkan dalam penelitian ini adalah: penderita putus obat, penderita menolak dilakukan evaluasi.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah polimorfisme gen MTHFR C677T (transisi pada nukleotida 677 pada ekson 4 pergantian alanin ke valin) dan TS 5'-UTR 3R/3R (timidilat sintase, daerah ujung 5 yang tidak mentranslasi dengan 3 pengulangan setiap 28 pasang basa (basepair). Variabel dependen pada penelitian ini adalah: resistensi metotreksat (MTX). Variabel kendali adalah jenis kelamin, usia, dan tipe morfologi LLA.

Bahan yang akan dianalisis pada penelitian ini adalah darah tepi. Untuk melihat hubungan resistensi kemoterapi MTX dengan jenis polimorfisme gen MTHFR C677T, TS5'-

UTR 3R/3R digunakan uji χ^2 (kai-kuadrat) dan uji mutlak Fisher, dengan α 5% dan $p < 0,05$. Untuk melihat pengaruh setiap jenis polimorfisme gen terhadap resistensi MTX digunakan uji regresi logistik ganda. Untuk mengetahui pengaruh baik tunggal maupun kombinasi polimorfisme terhadap resistensi kemoterapi MTX digunakan uji regresi logistik.

Data klinis dan laboratorik penderita LLA selama dirawat atau menjalani pengobatan di bangsal hematologi anak RSUD Dr. Soetomo dicatat dalam buku catatan medis khusus/Status Penderita Hematologi-Onkologi Dept./SMF Ilmu Kesehatan Anak RSUD Dr. Soetomo.

Penderita LLA anak yang telah memenuhi kriteria inklusi dan seperti biasanya menandatangani persetujuan untuk pengobatan kemoterapi diambil darah tepi dari vena cubiti, pengambilan ini bersamaan dengan pemeriksaan darah rutin penderita yang akan dimulai pengobatan kemoterapi. Kemudian darah tadi diteteskan pada keempat lingkaran yang ada kertas filter hingga memenuhi bagian dalam tepi lingkaran. Kertas filter yang sudah ditetesi darah ini disimpan pada suhu kamar atau dimasukkan lemari pendingin. Bila keadaan umum dan hasil laboratorium baik kemudian penderita dipersiapkan untuk memulai terapi dengan menggunakan protokol seperti yang disebutkan diatas. Secara periodik kertas filter yang sudah ditetesi darah dikirim ke *National University Hospital* di Singapura untuk dilakukan ekstraksi DNA dan pemeriksaan polimorfisme MTHFR C677T dan TS-5'UTR 3R/3R dengan metode PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*).

Dengan menggunakan *punch* aparatus *Harris Micro-Punch*, 1.2 mm and 2 mm sample diambil dari tengah lingkaran pada kertas filter. Hasil pencoblosan (*punch*) tadi langsung di analisis dengan PCR atau kandungan DNANYa di encerkan dengan 50 μ L Tris-EDTA buffer at 95° C selama 15 minutes. Untuk mengetahui genotip polimorfism nukleotida tunggal (*single nucleotide polymorphism*) dan *tandem repeats* enzim TS digunakan tehnik PCR-RFLP. Produk PCR dapat dilihat dengan 3% agarose gel electrophoresis dan penambahan ethidium bromide, diikuti dengan dokumentasi dengan menggunakan *Gel Doc system (Bio-Rad Laboratories)*. Sekuens dari primer yang digunakan untuk MTHFR C677T: 5'-CAG TCC CTG TGG TCT CTT CAT-3' (*forward*), 5'-AGG ACG GTG CGG TGA GAG TG-3' (*reverse*), sementara untuk TS 5-UTR 3R/3R 28 bp repeat: 5'-GTG GCT CCT GCG TTT CCC CC-3' (*forward*), 5'-GGC TCC GAG CCG GCC ACA GGC ATG GCG CGG-3' (*reverse*). Enzim restriksi

yang digunakan untuk MTHFR C677T adalah Hin F1, dan untuk TS 5-UTR 3R/3R 28 bp menggunakan enzim restriksi Hae III.

Evaluasi penderita dilakukan pada minggu ke-6 (sesuai dengan pedoman protokol LLA) dengan melakukan pemeriksaan aspirasi sumsum tulang. Digolongkan resisten bila ditemukan limfoblast > 5%. Atau sewaktu-waktu selama masa pengobatan, bila dilakukan pemeriksaan aspirasi sumsum tulang, ditemukan limfoblast > 5% dikatakan resisten terhadap pengobatan kemoterapi.

HASIL DAN DISKUSI

Penelitian ini dilakukan adalah untuk menjawab permasalahan tingginya kegagalan terapi karena resistensi terapi MTX pada LLA anak yang melibatkan polimorfisme MTHFR C677T, dan TS 5-UTR 3R/3R. Pada prakteknya banyak ditemukan leukemia yang seharusnya merespon baik terhadap sitostatika, ternyata penderita gagal mencapai respon terapi (remisi atau remisi komplit). Keadaan ini dapat disebut sebagai leukemia yang resisten terhadap obat anti leukemia (*clinical drug resistance*) (Giaccone & Pinedo, 2008; Holleman, 2004). Dalam penelitian ini yang dimaksud 'resisten terhadap MTX' adalah resistensi klinik terhadap kemoterapi metotreksat.

Leukemia limfoblastik akut merupakan penyakit keganasan yang paling sering diidap anak. Obat yang esensial digunakan pada LLA adalah MTX yang berkerja sebagai antagonis folat menghambat sintesis DNA.

Berdasarkan studi literatur dan penelitian awal yang dilakukan peneliti bahwa polimorfisme gen yang paling sering dan banyak pengaruhnya terhadap resistensi MTX adalah MTHFR C677T dan TS 5'-UTR 3R/3R 28 bp.

Penelitian LLA terhadap resistensi kemoterapi sebagian besar dilakukan pada penelitian laboratorium yaitu menggunakan sel kultur (*cultured cell*) (Kaufman, 2004) dan hewan coba (Gorlick et al., 1996; Zhao, 1998). Penelitian yang berorientasi LLA dengan MTX yang diterapkan melalui sel kultur dan hewan coba belum mampu menyelesaikan masalah resistensi yang terjadi pada anak.

Pada periode penelitian ini didapatkan 167 sampel/penderita LLA anak yang memenuhi kriteria inklusi dan persyaratan untuk dilakukan analisis. Enam penderita putus uji, dan 4 penderita menolak untuk terapi. Ada 2 anak penderita LLA yang dikeluarkan dari penelitian ini karena catatan medik tidak lengkap. Sehingga data yang memenuhi syarat untuk dianalisis sebanyak 155 penderita.

Umur rerata 155 penderita adalah 5,67 tahun dengan median 5,0. Usia termuda berumur 8 bulan dan tertua berusia 14 tahun.

Tabel 1. Hubungan karakteristik dasar subjek penelitian dengan resistensi MTX pada LLA anak di RSU Dr. Soetomo

Karakteristik	Sampel		Harga P
	Sensitif	Resisten	
Umur			
< 1 tahun (%)	0 (0)	1 (100)	0,721
1–10 tahun (%)	48 (34,8)	90 (65,2)	
> 10 tahun (5%)	4 (25)	12 (75)	
Jenis kelamin			
Laki-laki (%)	32 (36,8)	55 (63,2)	0,428
Perempuan (%)	20 (29,4)	48 (70,6)	
Jenis diagnosis morfologis			
L1 (%)	50 (34,7)	94 (65,3)	0,337
L2 (%)	2 (18,2)	9 (81,8)	

Berdasarkan kriteria LLA terhadap resistensi terapi menurut umur ada 3 kelompok yaitu, kelompok 1: kurang dari 1 tahun, kelompok 2: 1–10 tahun, dan kelompok 3: lebih dari 10 tahun. Dari tabel 1, setelah dilakukan uji statistik terhadap resistensi MTX, dari ketiga kelompok diperoleh hasil yang menunjukkan tidak ada hubungan resistensi dengan penggolongan kelompok umur di atas ($p > 0,05$).

Kegagalan terapi/resistensi terhadap kemoterapi sering ditemukan terutama pada kelompok LLA anak yang mempunyai faktor prognostik jelek/buruk yaitu: umur kurang dari 1 tahun dan lebih dari 10 tahun (Pieters, 1993; Rots et al., 1999, Kanerva J, 2001). Pada penelitian ini tidak terbukti bahwa anak umur < 1 tahun dan > 10 tahun ada hubungannya dengan kegagalan terapi/resistensi terhadap MTX.

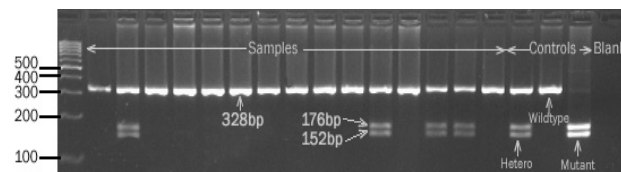
Berdasarkan kriteria LLA terhadap resistensi terapi menurut jenis kelamin, dari tabel 1, setelah dilakukan uji statistik terhadap resistensi MTX, antara jenis kelamin laki dan perempuan diperoleh hasil menunjukkan tidak ada hubungan antara jenis kelamin dengan resistensi MTX pada LLA anak ($p > 0,05$).

Resistensi terhadap kemoterapi sering ditemukan terutama pada kelompok LLA anak yang mempunyai faktor

prognostik jelek/buruk yaitu: jenis kelamin laki mempunyai prognosis lebih buruk dari pada perempuan. (Pieters, 1993; Kaspers, 1993; Rots *et al.*, 1999; Kanerva J, 2001; Chessel, 2005). Pada penelitian ini tidak terbukti bahwa jenis kelamin berhubungan dengan resistensi MTX.

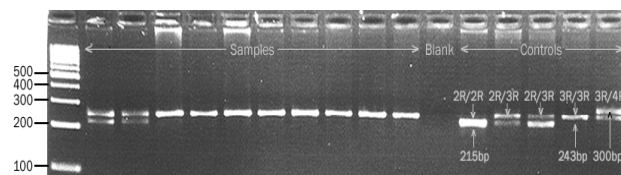
Berdasarkan morfologi sel limfoblast, LLA dibagi dalam jenis yaitu L1 dan L2. Dalam pengamatan dari kedua jenis ini tampak resistensi yang sama terhadap MTX, Tabel 3, setelah dilakukan uji statistik terhadap resistensi MTX, ternyata diperoleh hasil L1 dan L2 yang menunjukkan tidak ada hubungan antara jenis diagnosis morfologis dengan resistensi MTX ($p > 0,05$). Hasil telitian ini sesuai dengan telitian beberapa peneliti yang menyatakan tidak ada hubungan antara leukemia berdasarkan klasifikasi FAB dengan resistensi (Kaspers, 1995; Pui and Evan 1998; Carroll, 2003).

Hasil PCR dan RFLP polimorfisme MTHFR C677T, dan TS 5'-UTR 3R/3R dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil PCR-RFLP polimorfisme gen MTHFR C677T

Wildtype menghasilkan fragmen 328 bp. Heterozigot menghasilkan fragmen 328 bp, 176 bp, dan 152 bp. Sedangkan mutan homozigot menghasilkan 176 bp dan 152 bp. Pemeriksaan ini menggunakan marker DNA ladder 100 bp.



Gambar 2. Hasil PCR polimorfisme TSER 5'-UTR 28bp 2R/2R menghasilkan fragmen 215 bp, varian 2R/3R menghasilkan fragmen 215 bp dan 243 bp, yang 3R/3R menghasilkan fragmen 243 bp, sedangkan yang 3R/4R menghasilkan fragmen 243 bp dan 300 bp. Pemeriksaan ini menggunakan marker DNA ladder 100 bp.

Tabel 2. Tabulasi silang resistensi MTX dan polimorfisme gen MTHFR C677T pada LLA anak di RSU Dr.

Poli- morfisme	Resistensi			Total
		Sensitif	Resisten	
MTHFR				
C677T	Negatif	46 (39,3%)	71 (60,7%)	117 (75,5%)
	Positif	6 (15,8%)	32 (84,2%)	38 (24,5%)
	Total	52 (33,5%)	103 (66,5%)	155 (100%)

Uji $\chi^2 = 6,105$ dengan $p = 0,013$

Berdasarkan Tabel 2 dengan uji kai-kuadrat diperoleh nilai $\chi^2 = 6,105$ dan $p = 0,013$ menunjukkan bahwa ada hubungan resistensi MTX dengan keberadaan polimorfisme gen MTHFR C677T. Dengan uji regresi logistik ganda berdasarkan tabel 4 dengan nilai kepercayaan (*confident interval*) 95%, menunjukkan bahwa penderita LLA yang memiliki polimorfisme MTHFR C677T kemungkinan menjadi resisten terhadap MTX 4,055 kali lebih besar dibanding penderita yang tidak memiliki polimorfisme gen MTHFR C677T.

MTHFR berperan dalam homeostasis folat intraseluler. Peran penting enzim MTHFR pada leukemia karena keterlibatan pada dua jalur metabolisme flat, yaitu: 1) terlibat dalam sintesis metionin dan S-adenosyl methionin (SAM). 2) melalui timidilat sintase yang diperlukan untuk sintesis DNA.

Polimorfisme pada gen yang menyandi MTHFR paling sering terjadi pada posisi nukleotida 677 yaitu alanin diganti dengan valin (C677T) dan telah terbukti bahwa polimorfisme gen MTHFR C677T akan menyebabkan aktivitas enzim akan menurun secara signifikan (Frosst, 1995; Weisberg, 1998; van der Put, 1998; Ueland, 2001).

Bila terjadi polimorfisme gen MTHFR, maka aktivitas enzim MTHFR akan menurun. Penurunan aktivitas MTHFR akan menyebabkan penurunan jumlah 5-metil THF dengan akibat meningkatnya jumlah homosistein dalam darah (hiperhomosisteinemia) yang selanjutnya akan menyebabkan meningkatnya toksisitas/kegagalan terapi (Ulrich *et al.*, 2001; Taub *et al.*, 2002; Toffoli *et al.*, 2003; Chiusolo *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*, 2003; Wiemels *et al.*, 2001; Richard *et al.*, 2005; Krajcinovic *et al.*, 2004).

Di samping penurunan jumlah 5-metil THF, penurunan aktivitas enzim MTHFR juga akan menyebabkan

peningkatan jumlah 5–10 metilen THF yang selanjutnya akan memberikan gugusan metil dalam pembentukan timidilat, yang merupakan prekursor yang diperlukan bagi sintesis DNA. Akibatnya sintesis DNA terus berlangsung, selanjutnya akan menyebabkan terjadi resistensi. Berdasarkan *tabel 2* diperoleh hasil bahwa 84% penderita LLA yang mempunyai polimorfisme MTHFR C677T adalah resisten terhadap MTX. Pada penelitian ini memang terbukti bahwa polimorfisme gen ini mempunyai pengaruh terhadap resistensi MTX.

Tabel 3. Tabulasi silang resistensi MTX dan polimorfisme gen TS5'-UTR 3R/3R pada LLA anak di RSU Dr. Soetomo

Poli-morfisme	Sampel		Total
	Sensitif	Resisten	
TS			
5'-UTR 3R/3R	Negatif 13 (68,4%)	6 (31,6%)	19 (12,3%)
	Positif 39 (28,7%)	97 (71,3%)	136 (87,7%)
	Total 52 (33,5%)	103 (66,5%)	155 (100%)

Uji $\chi^2 = 10,097$ dengan $p = 0,001$

Pada *tabel 3*, dapat dilihat penderita yang tidak mempunyai polimorfisme TS 5'-UTR 3R/3R yang resisten sebesar 31,6%, sementara yang mempunyai polimorfisme TS 5'-UTR 3R/3R yang resisten sebesar 71,3%. Dengan uji kai-kuadrat, diperoleh nilai $\chi^2 = 10,097$, dan $p = 0,013$. Dengan $\alpha = 5\%$. Berdasarkan hasil analisis diperoleh bahwa ada hubungan antara resistensi MTX dengan keberadaan polimorfisme gen TS 5'-UTR 3R/3R.

Untuk melihat pengaruh masing-masing jenis polimorfisme gen terhadap resistensi MTX digunakan uji regresi logistik ganda dengan interval kepercayaan 95% dan diperoleh hasil bahwa variabel jenis polimorfisme TS 5'-UTR 3R/3R dan MTHFR C677T secara signifikan mempengaruhi resistensi terhadap MTX artinya bahwa penderita LLA dengan polimorfisme TS 5'-UTR 3R/3R kemungkinan menjadi resisten terhadap kemoterapi MTX 6,4 kali lebih besar dibandingkan dengan yang

tidak memiliki polimorfisme gen jenis TS5'-UTR 3R/3R ($p = 0,001$) (*Tabel 4*).

Penderita LLA dengan polimorfisme gen MTHFR C677T kemungkinan menjadi resisten terhadap kemoterapi MTX 4 kali lebih besar dibanding penderita yang tidak memiliki jenis polimorfisme gen MTHFR C677T ($p = 0,007$) (*Tabel 4*).

Enzim TS merupakan enzim penting dalam sintesis DNA karena mengkatalisis perubahan deoksiuridin monofosfat (dUMP) menjadi deoksitimidin monofosfat (dTMP) yang merupakan prekursor yang diperlukan bagi sintesis DNA (*gambar 2.9*). Polimorfisme enzim timidilat sintase merupakan sekuen berulang (*repeat = R*) setiap 28 pasang basa (*tandem repeat sequence*) pada daerah 5' *untranslated region* (UTR) dan telah dikenal mengalami polimorfisme (*Cole et al.*, 2005).

Bila terjadi polimorfisme gen yang menyandi enzim TS, maka akan menyebabkan meningkatnya ekspresi gen pada TS (*Horie*, 1995; *Kawakami*, 1999). Peningkatan ekspresi ini menyebabkan peningkatan konversi dari deoksiuridin monofosfat (dUMP) menjadi deoksitimidin monofosfat (dTMP), sehingga terjadi peningkatan sintesis DNA, kemudian akan timbul resistensi terhadap MTX (*Krajinovic*, 2002; *Wiemels*, 2001; *Ugrasena*, 2006). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini bahwa polimorfisme TS5'-UTR 3R/3R berpengaruh besar akan timbulnya resistensi MTX pada LLA. Artinya bahwa apabila nanti ada seorang anak yang menderita LLA dan diketahui memiliki polimorfisme MTHFR C677T atau TS5'-UTR 3R/3R kemungkinan besar akan mengalami kegagalan terapi. Oleh karena itu perlu dicari alternatif mengatasi masalah resistensi terhadap metotreksat ini.

Dalam penelitian ini juga ditemukan 31,6% penderita LLA yang resisten terhadap MTX tanpa memiliki polimorfisme TS5'-UTR 3R/3R. Resistensi terhadap MTX dapat disebabkan oleh polimorfisme gen lainnya seperti: transporter reduced folate carrier (RFC), dihidrofolat reduktase (DHFR), folipoliglutamat hidrolase (FPGH), dan folipoliglutamat sintetase (FPGS).

Tabel 4. Jenis polimorfisme yang berpengaruh terhadap resistensi MTX pada LLA anak di RSU Dr. Soetomo

	B	S.E.	Wald	Df	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
							Lower	Upper
Positif TS 5'-UTR 3R/3R	1,851	,563	10,802	1	,001	6,364	2,111	19,190
Positif MTHFR C677T	1,400	,517	7,321	1	,007	4,055	1,471	11,178
Constant	-1,197	,545	4,819	1	,028	,302		

Keterangan: kelompok pembanding adalah negatif TS 5'-UTR 3R/3R dan negatif MTHFR C677T

SIMPULAN DAN SARAN

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Gen yang paling dominan sebagai penyebab resistensi MTX adalah TS 5'-UTR 3R/3R
2. Umur, jenis kelamin, diagnosis morfologis tidak dapat dipakai sebagai dasar menentukan resistensi terhadap MTX.

Perlu diteliti terhadap polimorfisme gen enzim yang lain yang terlibat di dalam metabolisme folat seperti transporter reduced folate carrier (RFC), dihidrofolat reduktase (DHFR), folipoliglutamat hidrolase (FPGH), dan folipoliglutamat sintetase (FPGS), serta melihat pengaruh kombinasi dari beberapa polimorfisme gen yang terlibat dalam metabolisme folat.

DAFTAR PUSTAKA

- Carroll WL, Bhojwani D, Joon-Min D, et al.**, 2003. Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. Hematology: 102–131.
- Chessel JM, Richards SM, Bailey CC, Lilleyman JS, and Eden OB**, 2005. Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukemia: report from the MRC UKALL trials. *British J Haematol* 99: 364–372.
- Chiusolo P, Reddiconto G, Casorelli I, et al.**, 2003. Preponderance of Methylenetetrahydrofolate Reductase C667T Homozygosity Among Leukemia Patients Intolerant to Methotrexate. *Annals of Oncology* 13: 1915–1918.
- Chiusolo P, Reddiconto G, Cimino G, et al.**, 2004. Methylenetetrahydrofolate reductase genotypes do not play a role in acute lymphoblastic leukemia pathogenesis in Italian population. *Haematologica* 89: 139–144.
- Cole PD, Drachtman RA, Smith AK, Cate S, Larson RA, Hawkins DS**, 2005. Phase II trial of oral aminopterin for adults and children with refractory acute leukemia. *Clin Cancer Res* 11: 8089–8096.
- Frosst P, Blom HJ, Millos R, et al.**, 1995. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 10: 111–113.
- Gatot D**, 1991. Nature of Leukemia. Dalam: PTB IKA FKUI XXIV. Jakarta: Bagian Ilmu Kesehatan Anak FKUI hlm: 43–57.
- Giaccone G, Pinedo HM**, 2008. Drug Resistance. Free University Hospital, Departement of Oncology, the Netherlands.
- Giaccone E, Pinedo HM**, 2008. Drug Resistance. Free University Hospital, Departement of Oncology, the Netherlands.
- Giovannetti E, Ugrasena IDG, Supriyadi E, et al.**, 2008. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T and thymidylate synthase promoter (TSER) polymorphisms in Indonesian children with and without leukaemia. *Leukemia Res* 32: 19–24.
- Gorlick R, Goker E, Trippet T, Waltham M, Banerjee D, and Bertino J**, 1996. Intrinsic and acquired resistance to methotrexate in acute leukemia. *Drug Therapy*, 335: 1041–1046.
- Horie N, Aiba H, Oguro K, Takeishi K**, 1995. Functional analysis and DNA polymorphism of the tandemly repeated sequences in the 5' terminal regulatory region of the human gene for thymidylate synthase. *Cell Struct Funct* 20: 191–197.
- Kanerva Jukka**, 2001. Prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). Dissertation, Hospital for Children and Adolescents University of Helsinki Finland. Helsinki pp. 9–59.
- Kaspers GJL, Pieters R, Van Zantwijk CH, Van Wering ER, and Veerman AJP**, 1995. Clinical and cell biological features related to cellular drug resistance of childhood acute lymphoblastic leukemia cells. *Leukemia Lymphoma* 19: 407–416.
- Kaspers GJL**, 1993. Drug resistance in newly diagnosed childhood leukemia, A prospective in vitro study. Dissertation, Vrije Universiteit the Netherlands.
- Kaufman Y, Drori S, Cole PD**, 2004. Reduced Folate Carrier mutation are not the mechanism underlying methotrexate resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 100: 773–782.
- Kawakami K, Omura K, Kanehira E, Watanabe Y**, 1999. Polymorphic tandem repeats in the thymidylate synthase gene is associated with its protein expression in human gastrointestinal cancers. *Cancer Res* 19: 3249–3252.

- Konstantinos Chatzidaki, Antonis Goulas, Fani Athanassiadou-Piperopoulou**, 2006. Methylenetetrahydrofolate Reductase C667T Polymorphism: Association with risk for childhood acute lymphoblastic leukemia and response during the initial phase of chemotherapy in Greek patients, *Pediatr Blood Cancer* 47: 147–151.
- Krajinovic M, Costea I, Chiasson S**, 2002. Polymorphism of thymidylate synthase gene and outcome of acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 359: 1033–1034.
- Krajinovic M, Lemieux-Blanchard, Chiasson S, Primeau M, Coste I, Moghrabi**, 2004. Role of polymorphism in MTHFR and MTHFD1 genes in the outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *The Pharmacogenomic J* 4: 66–72.
- Marsh S, Collie-Duguid ES, Li T, Liu X, McLeod HL**, 1999. Ethnic variation in the thymidylate synthase enhancer region polymorphism among Caucasian and Asian populations. *Genomics* 58: 310–12.
- Pieters R, Klumper E, Kaspers GJL, Veerman AJP**, 1997. Everything you always wanted to know about cellular drug resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Critical Rev in Oncol-Hematol* 25: 11–26.
- Pieters, Kaspers GJL, Van Wering ER, et al.**, 1993. Cellular Drug Resistance Profile That Might Explain The Prognostic Value of Immunophenotype and Age In Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia* 3: 392–397.
- Poplack DG**, 2005. Acute lymphoblastic leukemia. In Pizzo PA, Poplack DG eds. *Principles and practice of pediatric oncology*. Philadelphia. JB Lippincott company, pp. 323–366.
- Pui CH, Evan WE**, 1998. Acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 339: 605–615.
- Pui CH, Campana D**, 2004. New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 14: 783.
- Richard Aplenc, Jennifer T, Peggy H, et al.**, 2005. Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism and Therapy Response in Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res*; 65: 2482–2497.
- Rots M**, 1999. Classification and Circumvention of Methotrexate Resistance in Childhood Leukemia; A Clinical Directed Laboratory Study, pp: 10–189.
- Schnakenberg E, Mehles A, Cario G, et al.**, 2005. Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and susceptibility to pediatric acute lymphoblastic leukemia in a German study population. *BMC Med Genet* 6: 1–5.
- Sri Mulatsih, dan Sutaryo**, 2004. The results of WK–ALL protocol for acute lymphoblastic leukemia in Dr. Sradjito Hospital, Yogyakarta. Presented in Kongres Perhimpunan Hematologi dan Transfusi Darah Indonesia, Bali.
- Taub JW, Matherly LH, Ravindranath**, 2002. Polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase and methotrexate sensitivity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 16: 764–765.
- Theresia Bonang**, 2002. Hubungan antara kesintasan dengan faktor prognostik leukemia limfoblastik akut pada anak yang mendapatkan pengobatan protokol Nasional 1994 di RSUD Dr. Soetomo, Surabaya. Penelitian karya akhir PPDS Ilmu Kesehatan Anak FK Unair-RSU Dr. Soetomo, pp. 6–56.
- Toffoli G, Russo A, Innocenti F**, 2003. Effect of methylenetetrahydrofolate reductase 677C-T polymorphism on toxicity and homocystein plasma level after chronic methotrexate treatment of ovarian cancer patients. *Int J Cancer* 103: 294–299.
- Ueland PM, Hustad S, Schneede J, Refsum H, Vollset SE**, 2001. Biological and clinical implication of the MTHFR C677T polymorphism. *Trends Pharmacol Sci* 22: 195–201.
- Ugrasena IDG, Sutaryo, Edy Supriadi**, 2006. High frequency of the 3R/3R polymorphism in the thymidilate synthase enhancer region in Indonesian childhood acute lymphoblastic leukemia. *Paediatr Indones* 46: 103–112.
- Ugrasena IDG**, 2007. Late effect of treatment in Pediatric department of Dr. Soetomo hospital in Dutch Foundation for post graduate medical course in Indonesia Dr. Soetomo hospital, Hematologic malignancies, pp. 125–127.
- Ulrich CM, Yasui Y, Storb R**, 2001. Pharmacogenetics of methotrexate: toxicity among marrow transplantation patients varies with the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, *Blood* 45: 231–234.
- Ulrich CM, Robien K, and McLeod H**, 2003. Cancer Pharmacogenetics, Polymorphism pathway and beyond. *Natur Review*. 3: 34–56.
- Van der Put NM, Gabreel F, Stevens EM**, 1998. A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate

reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defect?. *Am J Hum Genet* 62: 1044–1051.

Weisberg I, Tran P, Christensen B, Sibani S, Rozen R, 1998. A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity. *Mol Genet Metab* 64: 169–172.

Wiemels JL, Smith RN, Taylor GM, et al., 2001. Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR)

polymorphism and risk of molecularly defined subtypes of childhood acute leukemia. *PNAS* early edition, 1–6.

Zhao R, Assaraf YG, and Goldman D, 1998. A Reduced folate carrier mutation produces substrate-dependent alteration in carrier mobility in Murine leukemic cells and methotrexate resistance with conservation of growth in 5-formyltetrahydrofolate. *J. Biol. Chem* 273: 7873–7879.