

Identifikasi Polimorfisme Titik -1082 Promoter Gen IL-10 pada Penderita Kusta

Desi Oktariana^{1*}, Fifa Argentina², Evi Lusiana³, Nia Savitri Tamzil³

¹ Bagian Patologi Klinik, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

² Bagian Dermatovenereologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

³ Bagian Farmakologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Sriwijaya, Palembang, Indonesia

E-mail : desioktariana@fk.unsri.ac.id

Abstrak

Kusta merupakan penyakit menahun yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium leprae*, yang mengenai kulit dan saraf, yang dapat berakibat pada kecacatan. Interleukin-10 diyakini memainkan peranan penting dalam patogenesis penyakit kusta. Polimorfisme pada promotor gen ini diduga dapat mempengaruhi produksi IL-10, yang kemudian dapat berpengaruh terhadap proses eliminasi mikroba dalam perkembangan penyakit kusta. Salah satu polimorfisme terkait gen IL-10 yang paling sering terjadi adalah polimorfisme titik -1082 pada promotor gen tersebut. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengidentifikasi polimorfisme titik -1082 promotor gen interleukin-10 pada penderita kusta yang dirawat di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif observasional dengan rancangan *cross sectional*. Polimorfisme titik -1082 promotor gen interleukin-10 diukur dengan metode PCR-RFLP, elektroforesis, dan divisualisasi pada sinar UV. Dari penelitian ini didapatkan distribusi frekuensi genotipe AA sebesar 80%, AG sebesar 14%, dan GG sebesar 6%. Distribusi frekuensi alel A sebesar 87% dan alel G sebesar 13%. Gambaran genotip *wild type* lebih banyak ditemukan pada penderita kusta (80%).

Kata kunci: Interleukin-10, Kusta, Polimorfisme

Abstract

Identification of -1082 Interleukin-10 Gene Promoter In Leprosy Patient. Leprosy is a chronic disease caused by *Mycobacterium leprae* infection, which affects skin and nerves, then can result in disability. Interleukin-10 have an important role in the pathogenesis of leprosy. Polymorphism in this gene promoter is thought to affect IL-10 production, which can then influence the process of microbial elimination in the development of leprosy. One of the most common polymorphisms associated with IL-10 is the polymorphism of the -1082 on the gene promoter. The purpose of this study was to identify the polymorphism of the -1082 interleukin-10 gene promoter in leprosy patients treated at RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. This research is an observational descriptive study with cross sectional design. Polymorphism of -1082 interleukin-10 gene promoter was measured by PCR-RFLP method, electrophoresis, and visualized in UV light. From this study it was found that the frequency distribution of genotype AA was 80%, AG was 14%, and GG was 6%. The frequency distribution of allele A is 87% and allele G is 13%. Wild type genotype is more common in leprosy sufferers (80%).

Keywords: Interleukin-10, Leprosy, Polymorphism

1. Pendahuluan

Kusta merupakan penyakit menahun yang disebabkan oleh infeksi *Mycobacterium leprae*, yang mengenai lesi kulit dan saraf, yang dapat berakibat pada kecacatan. Prevalensi penyakit kusta terus meningkat,

terutama di Indonesia, yang termasuk salah satu daerah endemik kusta.¹

Respon imun yang unik pada masing-masing individu tidak hanya menentukan kerentanan individu untuk terkena penyakit kusta, tapi juga menentukan tipe kusta yang akan bermanifestasi.² Salah satu respon imun

yang memainkan peranan penting dalam patogenesis penyakit kusta adalah interleukin-10 (IL-10). Interleukin-10 memiliki efek anti-inflamasi, dengan bekerja pada makrofag yang aktif untuk mengakhiri respons terhadap mikroba dan mengembalikan sistem ke keadaan istirahat setelah mikroba dihancurkan. Peningkatan regulasi IL-10 dapat berpengaruh pada penurunan aktivitas makrofag dalam membunuh bakteri.³

Produksi IL-10 diatur oleh gen yang menyandi sitokin tersebut. Adanya mutasi pada gen tersebut diduga dapat menyebabkan perubahan pada ekspresi gen IL-10 yang dihasilkan. Gen IL-10 terletak pada kromosom 1q32. Polimorfisme pada gen ini dapat menyebabkan variasi fungsi protein IL-10, yang kemudian dapat berpengaruh terhadap proses eliminasi mikroba dalam perkembangan penyakit kusta.⁴

2. Metode

Penelitian ini merupakan penelitian laboratorium deskriptif observasional dengan pendekatan studi *cross sectional*, untuk mengamati dan memaparkan hasil dari pengamatan terhadap gen IL-10 dengan menggunakan PCR-RFLP pada penderita kusta. Pengambilan sampel dilakukan di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang. Pengolahan sampel meliputi ekstraksi DNA dan PCR-RFLP, dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK Unsri.

Sampel darah diambil melalui punksi vena antecubiti sebanyak 3 ml dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung antikoagulan *ethylene diamine tetra acid* (EDTA) untuk ekstraksi DNA dan PCR. Proses PCR berlangsung dalam tiga tahap reaksi yang berulang sebanyak 35 siklus pada suhu berbeda yaitu reaksi *denaturasi* pada suhu 95°C selama 2 menit untuk memisahkan rantai ganda menjadi dua rantai tunggal, reaksi *annealing* yaitu menyatunya kembali kedua rantai DNA tersebut yang berlangsung

pada suhu 95°C selama 30 detik, 60°C selama 45 detik, 72°C selama 60 detik dan *ekstensi* yaitu sintesis DNA melalui perpanjangan suatu primer mengikuti urutan nukleotida DNA rantai tunggal pasangannya yang umumnya berlangsung pada suhu 72°C selama 10 menit.

Deteksi polimorfisme gen IL-10 dilakukan dengan memotong DNA produk PCR dengan enzim restriksi *MnII*. Adanya mutasi akan menyebabkan terbentuknya situs restriksi baru yang dapat dikenali oleh enzim restriksi. Sebanyak 0,25 µL enzim ditambahkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 15,5 µL produk PCR, lalu divorteks beberapa detik dan diinkubasi dalam waterbath pada suhu 37°C selama 1 jam. Setelah digesti, produk PCR dielektroforesis pada 3% agarose gel dan dilihat dengan pewarnaan ethidium bromide.

3. Hasil

Sebanyak 50 orang penderita kusta berpartisipasi dalam penelitian ini. Frekuensi subjek yang berjenis kelamin laki-laki adalah sebesar 33 orang, sedangkan wanita adalah sebesar 17 orang. Rerata usia adalah 42,08 ± 14,65 tahun. Frekuensi ras melayu adalah sebesar 49 orang, sedangkan frekuensi ras non-melayu adalah sebesar 1 orang. Frekuensi jenis kusta (klasifikasi WHO) yang paling banyak adalah tipe multibasiler (MB), yaitu sebesar 46 orang (92%). Frekuensi tipe pausibasiler (PB) adalah sebesar 4 orang (8%).

Genotipe AA, AG, dan GG gen IL-10 -1082 pada subjek penelitian berturut-turut adalah 40 (80%), 7 (14%), dan 3 (6%). Alel A dan alel G pada subjek penelitian berturut-turut adalah 87 (87%) dan 13 (13%).

Berdasarkan usia, genotipe AA, AG, GG gen IL-10 -1082 pada subjek penelitian adalah 29 (58%), 7 (14%), 2 (4%) untuk yang berusia di bawah 50 tahun, dan 11 (22%), 0 (0%), 1 (2%) untuk yang berusia di atas 50 tahun. Alel A dan G gen IL-10 -1082 pada subjek penelitian adalah 65 (65%) dan 11 (11%) untuk yang berusia di bawah 50 tahun, serta

22 (22%) dan 2 (2%) untuk yang berusia di atas 50 tahun. Berdasarkan jenis kelamin, genotipe AA, AG, GG gen IL-10 -1082 pada subjek penelitian adalah 28 (56%), 4 (8%), 1 (2%) pada laki-laki, dan 12 (24%), 3 (6%), 2 (4%) pada perempuan. Alel A dan G gen IL-10 -1082 adalah 60 (60 %) dan 6 (6%) pada laki-laki, serta 27 (27%) dan 7 (7%) pada perempuan. Berdasarkan klasifikasi penyakit, genotipe AA, AG, GG gen IL-10 -1082 berdasarkan pada subjek penelitian adalah 36 (72%), 7 (14%), 3 (6%) untuk multibasiler, dan 4 (8%), 0 (0%), 0 (0%) untuk pausibasiler. Alel A dan G gen IL-10 -1082 ini adalah 79 (79%) dan 13 (13%) untuk multibasiler, serta 8 (8%) dan 0 (0%) untuk pausibasiler.

4. Pembahasan

Beberapa studi epidemiologi melaporkan bahwa penderita kusta lebih banyak berjenis kelamin laki-laki dibandingkan dengan wanita, seperti studi di Etiopia yang menyatakan bahwa 64,5% dari total penderita kusta merupakan laki-laki.⁵ Studi lain di Brazil juga melaporkan hal serupa yaitu terdapat insiden yang lebih tinggi pada penderita kusta berjenis kelamin laki, dan angka kejadian reaksi kusta lebih banyak terjadi pada laki-laki dibandingkan dengan wanita.⁶ Penelitian lain juga menunjukkan bahwa laki-laki memiliki risiko 22 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan wanita.⁷

Usia merupakan salah satu faktor risiko potensial bagi orang yang memiliki kontak dengan penderita kusta, untuk berkembang menjadi kusta. Doull dkk melaporkan pada tahun 1945 di Filipina bahwa ada hubungan antara risiko terkena kusta secara klinis dengan usia pajanan awal, risiko menurun sesuai usia pajanan. Noordeen, di sisi lain, menyatakan bahwa di daerah endemik tinggi seperti India Selatan (studi Vijayakumaran juga dilakukan di India Selatan) insiden yang khusus terkait usia menunjukkan distribusi bimodal dengan puncak pada usia 10-14

tahun, yang diikuti oleh depresi, dan kemudian diikuti oleh kenaikan dan puncak pada usia 30-60 tahun, yang lebih tinggi dari puncak pertama.⁸

Beberapa studi epidemiologi menyatakan bahwa insiden kusta jenis multibasiler/MB lebih banyak dibandingkan dengan kusta jenis pausibasiler/PB, di Etiopia misalnya, insiden kusta MB lebih tinggi 90% dibanding PB yang hanya 10% (Ramos, dkk, 2012). Penelitian lain juga menyatakan bahwa terdapat peningkatan kasus baru kusta jenis MB dibandingkan dengan kusta jenis PB (Basel, dkk, 2014). Kontak "Cutaneous" dengan pasien MB memiliki risiko 8 kali lipat untuk terkena kusta pada orang sehat, dibandingkan kontak "neural" pada pasien PB yang hanya memiliki risiko 4 kali lipat.⁸

Polimorfisme yang terjadi pada gen IL-10 yang dipotong dengan enzim *MnII* adalah berupa perubahan basa A (adenin) menjadi basa G (guanin) pada basa ke-1082. Genotipe *wild type* (AA) saat divisualisasi akan memperlihatkan 1 pita, genotipe heterozigot (AG) saat divisualisasi akan memperlihatkan 3 pita, dan genotipe homozigot mutan (GG) saat divisualisasi akan memperlihatkan 2 pita pada daerah marker.

Perubahan A→G pada basa ke-1082 gen IL-10 ini dapat memengaruhi regulasi transkripsi. Gen IL-10 terletak pada kromosom 1 pada 1q31-32, membentang dengan panjang sekitar 4,7 kb dan berisi empat intron dan lima ekson. Regio 5' flanking merupakan regio DNA yang melekat pada ujung 5' dari gen, yang mengandung promotor dan mungkin mengandung *enhancers* atau *protein binding sites* lainnya. Regio ini terutama berfungsi dalam regulasi transkripsi gen. Polimorfisme pada regio ini dapat memicu perubahan pada regulasi transkripsi. Regio 3' flanking merupakan regio DNA yang melekat pada ujung 3' dari gen, yang tidak dikopi menjadi mRNA matang. Regio ini mengandung sekuen yang mempengaruhi

formasi ujung 3' dari DNA, yang juga mungkin mengandung *enhancers* atau *protein binding sites* lainnya.

Distribusi genotipe AA, AG, dan GG gen IL-10 -1082 pada subjek penelitian ini masing-masing adalah 40 (80%), 7 (14%), dan 3 (6%). Dalam penelitian ini, sebagian besar pasien kusta bergenotipe gen IL-10 normal atau *wild type* (AA).

Beberapa penelitian menyimpulkan bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme titik -1082 promotor gen IL-10 dengan kerentanan penyakit kusta, namun beberapa penelitian lainnya mendapatkan hasil yang sebaliknya.

Fakta membuktikan bahwa beberapa polimorfisme regio proksimal promotor IL-10 dapat digabungkan untuk membentuk haplotipe, yang paling sering diamati terkait dengan produksi IL-10 yang tinggi adalah haplotipe -3575T/-2849G/-2763C/-819T/-592A. Oleh karena itu, ada kemungkinan bahwa haplotipe IL-10 ini dikaitkan dengan kerentanan pasien terhadap perkembangan kusta.

Penelitian Moraes pada tahun 2004 menemukan pola haplotipe protektif dan haplotipe yang rentan terhadap kusta. Haplotipe protektif adalah -3575A/-2849G/-2763C/-1082G/-819C, sedangkan -3575T/-2849A/-2763C/-1082G/-819T adalah haplotipe yang rentan.⁹

Penelitian yang dilakukan oleh Malhotra (2005) pada populasi India juga mengungkapkan bahwa haplotipe promotor gen IL-10 -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C berhubungan dengan resistensi terhadap kusta. Sementara itu, haplotipe IL-10 -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A terkait dengan risiko berkembangnya keparahan kusta.¹⁰

Penelitian ini mengkonfirmasi penemuan yang menyatakan bahwa regio promotor IL-10 memiliki peran dalam mengendalikan kerentanan dan keparahan kusta dan hasilnya

mengimplikasikan bahwa haplotipe -3575T/-2849A/-2763C/-1082G/-819T berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta.

Penelitian yang dilakukan oleh Franceschi¹¹ pada tahun 2009 menemukan bahwa analisis genotipe IL-10 tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara penderita kusta dan kontrol. Frekuensi haplotipe polimorfisme promotor gen IL-10 -1082G/-819C/-592C ditemukan lebih rendah pada pasien kusta LL dibandingkan kontrol, namun setelah statistik diolah lebih lanjut, hasil tersebut tidak lagi signifikan. Selanjutnya, penelitian lanjutan oleh Garcia pada tahun 2013 mengkonfirmasi hal serupa, bahwa genotipe ACC/ACC dan ACC/GCC (A1082G, C819T, C592A) menunjukkan hasil yang signifikan terhadap proteksi melawan perkembangan penyakit kusta, dalam profil produksi IL-10 rendah dan sedang. Oleh karena itu, genotipe A1082G, C819T, C592A yang dibentuk oleh polimorfisme IL-10 sangat terkait dengan proteksi terhadap perkembangan penyakit kusta pada populasi Brazil Utara, khususnya genotipe ACC/ACC dan ACC/GCC.

Di Cina, penelitian yang dilakukan oleh Chen pada tahun 2013 menyatakan bahwa polimorfisme titik -1082 promotor gen IL-10 tidak berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta. Haplotipe -3575A/-2849G/-2763A/-1082G/-819C/-592C berhubungan dengan kerentanan kusta dan subtype PB di Barat Daya Cina.¹²

Pada kulit yang sehat, up-regulasi dari IL-10 endogen adalah mekanisme kunci dalam supresi respon imun yang dimediasi sel-T dan peningkatan produksi IL-10 pada pasien kusta LL yang tidak respon terhadap pengobatan. Sitokin IL-10 memiliki banyak efek dalam pengaturan sistem kekebalan tubuh, termasuk penghambatan sekresi sitokin Th1 dan proliferasi sel T.

Polimorfisme interleukin-10 pada regio distal dan proksimal membentuk haplotipe

dalam promotor gen, dan kombinasi ini telah dikaitkan dengan sekresi sitokin in vitro. Beberapa polimorfisme di daerah promotor gen IL-10 diduga berpengaruh terhadap produksi IL-10. Beberapa varian genetik dari promotor gen IL-10, seperti A1082G, C819T dan C592A, sendiri atau dalam haplotype telah banyak dipelajari pada pasien kusta.

Sitokin IL-10 memiliki efek pleiotropik dalam imunoregulasi dan peradangan, termasuk penghambatan sekresi sitokin TH1 dan proliferasi sel T. Polimorfisme dalam promotor mempengaruhi jumlah produksi IL10. Produksi IL-10 yang tinggi dapat meningkatkan kerentanan mikobakteri dengan cara menekan peradangan. Tiga polimorfisme di bagian proksimal promotor gen IL-10 yang paling sering diteliti adalah polimorfisme di titik A1082G, C819T dan C592A.

Selain polimorfisme titik (SNP), berbagai haplotype juga dapat memengaruhi sekresi IL-10. Eskdale et al. (1999) telah melaporkan sebuah studi SNP promotor IL-10 dari 56 keluarga Eropa Belanda di mana SNP-1082G/-819C/-892C/-592C promotor IL-10 menunjukkan sekresi yang relatif rendah, sedangkan 1082A/-819C/-592C adalah haplotype dengan sekresi relatif tinggi. Gibson et al. (2001) telah melakukan studi lupus erythematosus sistemik di mana SNP haplotype promotor IL-10 distal -3575T/-2849G/-2763C terbukti berhubungan dengan hipersekresi IL-10, dan haplotype -3575A/-2849G/-2763A terkait dengan sekresi IL-10 yang rendah. Selain itu, SNP distal memiliki efek yang lebih besar pada sekresi IL-10 daripada SNP proksimal. SNP promotor IL-10 dan haplotype dapat dikaitkan dengan sekresi IL-10 dan kerentanan kusta yang tinggi, tetapi berbagai kelompok populasi dengan hubungan tipe penyakit dan kusta serta studi fungsional belum sepenuhnya dieksplorasi.

Penelitian dari Moraes menunjukkan bahwa IL-10 penting selama fase imunitas

awal dan akhir terhadap *M. leprae*, tetapi mungkin memainkan peran yang berbeda dalam tahap yang berbeda ini.⁹ Seperti disebutkan sebelumnya, hanya sebagian kecil pasien kusta memiliki haplotype IL-10 yang terkait dengan penyakit atau keparahan penyakit, dan beberapa pasien masih membawa haplotype terkait resistensi kusta, yang menunjukkan bahwa hasil penyakit mikobakteri disebabkan oleh interaksi yang kompleks antara beberapa gen inang, kemungkinan termasuk gen sitokin dan reseptor lainnya, gen yang dikodekan HLA (termasuk TNF- α) dan lainnya. Selain itu, tidak dapat dikecualikan bahwa kontrol genetik kerentanan terhadap kusta adalah heterogen sehingga lokus yang berbeda dapat mengendalikan fenotipe yang sama.

5. Kesimpulan

Gambaran genotip *wild type* lebih banyak ditemukan pada penderita kusta.

Daftar Pustaka

1. Depkes RI. Buku pedoman nasional pemberantasan penyakit kusta. Jakarta Direktorat Jenderal Pengendali Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. 2006;
2. Alter A, Grant A, Abel L, Alcaïs A, Schurr E. Leprosy as a genetic disease. *Mamm genome*. 2011;22(1–2):19–31.
3. Sari N, Amiruddin MD, Amin S, Adam AM, Djameluddin W, Vitayani S. Peran Interleukin--2 (IL-2), Interleukin-10 (IL-10) dan Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) pada Penyakit Kusta. *MDVI*. 2013;40(1):35–40.
4. Cardoso CC, Pereira AC, de Sales Marques C, Moraes MO. Leprosy susceptibility: genetic variations regulate innate and adaptive immunity, and disease outcome. *Future Microbiol*. 2011;6(5):533–49.
5. Ramos JM, Martínez-Martín M, Reyes

- F, Lemma D, Belinchón I, Gutiérrez F. Gender differential on characteristics and outcome of leprosy patients admitted to a long-term care rural hospital in South-Eastern Ethiopia. *Int J Equity Health*. 2012;11(1):56.
6. Mastrangelo G, Silva Neto J da, Silva GV da, Scoizzato L, Fadda E, Dallapicola M, et al. Leprosy reactions: the effect of gender and household contacts. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(1):92–6.
 7. Bakker MI, Hatta M, Kwenang A, Van Mosseveld P, Faber WR, Klatser PR, et al. Risk factors for developing leprosy-a population-based cohort study in Indonesia. *Lepr Rev*. 2006;77(1):48–61.
 8. Moet FJ, Meima A, Oskam L, Richardus JH. Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Lepr rev*. 2004;75:310–26.
 9. Moraes MO, Pacheco AG, Schonkeren JJM, Vanderborght PR, Nery JAC, Santos AR, et al. Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes Immun*. 2004;5(7):592–5.
 10. Malhotra D, Darvishi K, Sood S, Sharma S, Grover C, Relhan V, et al. IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Hum Genet*. 2005;118(2):295–300.
 11. Franceschi DSA, Mazini PS, Rudnick CCC, Sell AM, Tsuneto LT, Ribas ML, et al. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *Int J Infect Dis*. 2009;13(4):493–8.
 12. Chen XH, Xiong JH, Ning Y, Wen Y, Liu J, Mao C, et al. IL-10 promoter SNPs and susceptibility to leprosy in ethnic groups from southwest China. *Genet Mol Res*. 2013;12(3):2876–85.