

SNP G-1082A GEN IL-10: DISTRIBUSI ALEL DAN GENOTIP PADA PASIEN PERIODONTITIS DI YOGYAKARTA

(SNP G-1082A IL-10 GENE: ALLELE AND GENOTYPE DISTRIBUTION OF PERIODONTITIS PATIENT IN YOGYAKARTA)

Rezmelia Sari*, Prayitno*, Alya Nur Fadhilah**

*Departemen Periodonsia Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Indonesia

**Program Studi Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Gadjah Mada Yogyakarta Indonesia
Email: rezmelia_sari@mail.ugm.ac.id

Abstract

Periodontitis is multifactorial inflammation process and related to disproportion of cytokine. IL-10 is a dominant noninflammatory cytokines that related to gene polymorphism. Polymorphism G-1082A IL-10 genes has been reported to increase the risk of periodontitis occurs in Italian populations, apart from different result found in Brazilian. The purpose of this research was to determine the polymorphism G-1082A IL-10 in periodontitis patients in Indonesia, especially among Yogyakarta's Javanese. This is a case-control research with subjects according to the inclusion criteria. DNA was taken by cotton swab from the epithelial cells of buccal mucosa, and was isolated using a Presto™ (GeneAid) kit. Genotyping analysis by using the PCR RFLP technique and descriptive results were presented. The result showed that A allele frequency is 100% and no G allele was found. AA genotype in case group has lower frequency than in control group and vice versa. From this research, it was concluded that A allele was dominant in Yogyakarta's Javanese, and AA genotype frequency is lower in individual with periodontitis.

Key Words: periodontitis, Javanese, SNP G-1082A IL-10, Yogyakarta, polymorphism

Abstrak

Periodontitis adalah proses inflamasi multifaktorial dan terkait dengan ketidakseimbangan sitokin. IL-10 merupakan sitokin antiinflamasi yang dominan dan dihubungkan dengan polimorfisme gen. Polimorfisme G-1082A gen IL-10 diketahui meningkatkan risiko terjadinya periodontitis di populasi Italia namun memberikan hasil yang berbeda pada populasi Brazil. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui polimorfisme G-1082A gen IL-10 pada pasien periodontitis di Indonesia khususnya suku Jawa di Yogyakarta. Jenis penelitian ini adalah kasus kontrol dengan subjek sesuai kriteria inklusi. DNA diambil dari sel epitel mukosa bukal dengan cotton swab dan diisolasi dengan kit Presto™ (GeneAid). Analisis genotip menggunakan teknik PCR RFLP dan hasil disajikan secara deskriptif. Hasil menunjukkan bahwa frekuensi alel A pada kelompok kasus dan kontrol adalah 100% dan tidak ditemukan alel G. Genotip AA pada kelompok kasus lebih rendah daripada kelompok kontrol dan sebaliknya. Dari penelitian ini disimpulkan bahwa alel A dominan pada suku Jawa di Yogyakarta dan frekuensi genotip AA lebih rendah pada individu dengan periodontitis.

Kata Kunci: periodontitis, suku Jawa, SNP G-1082A gen IL-10, Yogyakarta, polimorfisme

PENDAHULUAN

Periodontitis merupakan penyakit infeksi di jaringan periodontal yang dipengaruhi oleh faktor lingkungan, gaya hidup dan faktor genetik. Faktor individual pasien ini sangat menentukan respon *host* terhadap bakteri (faktorinisasi) dan manifestasi

klinis di rongga mulut. Dengan kata lain, faktor genetik akan mempengaruhi kerentanan, keparahan dan prognosis perawatan¹ sehingga penelitian di bidang genetika terutama tentang variasi gen sitokin inflamasi penting untuk dilakukan. Telah dilakukan beberapa penelitian tentang hubungan an-

tara variasi genetic sitokin proinflamasi tersebut dengan periodontitis, namun hasil yang didapatkan tidak konsisten. Hal ini dipengaruhi oleh heterogenitas etnik dan kriteria subjek penelitian².

Sitokin antiinflamasi yang berperan penting dalam pertahanan tubuh adalah IL-10². IL-10 berperan sebagai inhibitor osteoklastogenesis³ dan regulator osteoblas.⁴ Pada proses inflamasi, sitokin ini mempengaruhi responsel B. Polimorfisme G-1082A gen IL-10 diketahui meningkatkan resiko terjadinya periodontitis di populasi Italia¹, namun memberikan hasil yang berbeda pada populasi Brazil.² Belum ditemukan data mengenai polimorfisme G-1082A gen IL-10 pada pasien periodontitis di Indonesia khususnya di Yogyakarta.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui keterkaitan antara faktor epidemiologi klinis, genetika dan molekuler perkembangan penyakit periodontitis, khususnya mengkaji bagaimana distribusi alel dan genotip pada pasien periodontitis di Yogyakarta.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian ini adalah kasus-kontrol. Kelompok kasus adalah subjek sebanyak 29 orang dengan periodontitis dan kelompok kontrol adalah subjek yang tampak sehat secara sistemik dan tidak menderita periodontitis. Penelitian telah mendapat ijin dari komisi etik dan masing-masing subjek telah menandatangani *informed consent*. Penelitian ini mengamati polimorfisme G-1082A gen IL-10 yaitu variasi yang terjadi pada gen IL-10 dimana basa guanin urutan ke-1082 berubah menjadi adenin.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah alat diagnostik, probe periodontal, *cotton swab*, mikropipet, alat sentrifugasi, vortex, mesin PCR, mesin elektroforesis, inkubator, dan kulkas. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah masker, sarung tangan, agarose serbuk, etidium bromide, primer, kit isolasi DNA, kit PCR, enzim restriksi (XagI) dan box sampel.

Subjek diseleksi berdasarkan kriteria yang telah ditentukan yaitu usia di atas 30 tahun, CAL (jarak antara CEJ hingga dasar sulkus gingiva) ≥ 3 mm pada lebih dari satu gigi, PD (jarak antara margin gingiva hingga dasar sulkus gingiva) ≥ 4 mm, dan memiliki BOP (adanya darah setelah dilakukan probing pada sulkus gingiva). Subjek diinstruksikan berkumur terlebih dahulu untuk menghilangkan debris di rongga mulut. Sampel diambil dari usapan sel epitel di mukosa bukal. *Cotton swab* digosokkan dengan gerakan memutar di mukosa pipi sebanyak 15-20 kali atau selama 1 menit. Selanjut-

nya dilakukan isolasi DNA menggunakan kit PrestoTM (GeneAid).

Analisis genotip menggunakan PCR-RFLP dengan primer yaitu 5'-CCA AGA CAA CAC TAC TAA GGC TCC TTT-3' dan 5'-GCT TCT TAT ATG CTA GTC AGG TA-3'. Siklus PCR yaitu denaturasi awal pada suhu 95°C selama 2 menit, dilanjutkan dengan 35 siklus PCR yaitu denaturasi pada suhu 95°C selama 40 detik, *annealing* pada 56°C selama 40 detik, *extension* pada suhu 72°C selama 40 detik, *final extension* pada suhu 72°C selama 7 menit dan *cooling* pada suhu 4°C.

Langkah kedua dilakukan pemotongan produk PCR dengan enzim spesifik. Sebanyak 0,5 μ L enzim XagI + 1 μ L H₂O + 1 μ L *buffertango* + 4 μ L DNA dimasukkan kedalam *tube*. Genotip AA akan terpotong menjadi 280bp+97bp dan GG menjadi 253bp+27bp. Distribusi frekuensi alel dan genotip disajikan secara deskriptif.

HASIL

Telah dilakukan penelitian tentang distribusi alel dan genotip pada SNP G-1082A gen IL-10 pada pasien periodontitis di Yogyakarta. Karakteristik subjek penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian

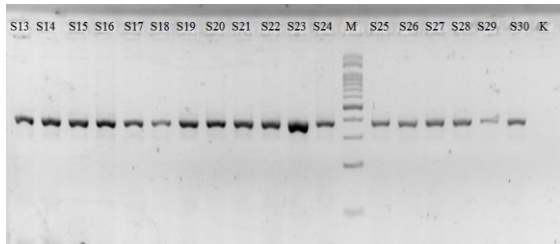
	Kasus (n=29)	Kontrol (n=29)	<i>p</i> <i>value</i>
Usia (rata-rata \pm SD)	44,66 \pm 5,50	40,79 \pm 5,45	0,01*
Jeniskelamin	96,6	93,1	
Wanita (%)	3,4	6,9	
Laki-laki (%)	Jawa	Jawa	
Suku	4,8 (3,1-7,5)	0 (0-3,5)	0,00*
CAL (mm)	1,1 (0,9-5,5)	1 (0,5-2)	0,00*
PD (mm)			

SD=Standar Deviasi; mm=milimeter; *Berbeda makna apabila dibandingkan dengan control ($p < 0,05$)

Tabel 1 menunjukkan bahwa rerata usia kelompok kasus lebih tinggi daripada kontrol ($p < 0,05$) namun masih berada dalam rentang usia sesuai kriteria subjek. Distribusi frekuensi jenis kelamin hampir sama untuk tiap kelompok ($p > 0,05$). Rerata *clinical attachment loss* pada kelompok kasus adalah 4,8 mm dan poket 1,1 mm.

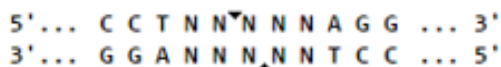
Setelah subjek diseleksi sesuai kriteria, dilakukan usap mukosa dengan *cotton swab* dilanjutkan dengan isolasi DNA. Tahap selanjutnya adalah PCR dengan primer yang telah ditentukan. Diketahui bahwa masing-masing DNA memiliki ketebalan

yang tidak sama. Hasil polimerisasi tampak pada Gambar 3. Band yang dihasilkan berada pada 377 bp.

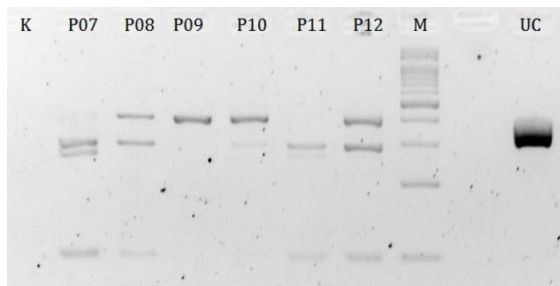


Gambar 1. Hasil polimerisasi DNA dengan primer spesifik.

Enzim yang digunakan adalah XagI yang memotong pada sisi seperti Gambar 2 dan hasil restriksi dapat dilihat pada Gambar 3. Data hasil restriksi dikumpulkan dan disajikan pada Tabel 2.



Gambar 2. Daerah pemotongan enzim XagI. Tampak enzim memotong dan menghasilkan daerah pemotongan tidak simetris.



Gambar 3. Hasil restriksi dengan enzim XagI. Genotip AA (alel A homozigot terpotong menjadi 280bp+97bp, Genotip AG (alel A heterozigot) terpotong menjadi 280bp+253bp+97bp+27bp sedangkan genotip GG(alel G) akan terpotong menjadi 253bp+27bp.

Tabel 2. Distribusi frekuensi genotip subjek

Genotip	Kasus (n=28)	Kontrol (n=29)
AA (%)	24 (85,7)	27 (93,1)
AG (%)	4 (14,3)	2 (6,9)
GG (%)	0	0

Tabel 2 menunjukkan bahwa jumlah sampel pada kelompok kasus adalah 28 sampel sedangkan kelompok kontrol 29 sampel. Frekuensi alel A pada kelompok kasus dan kelompok kontrol adalah 100% sedangkan alel G tidak ditemukan. Alel A ho-

mozigot (AA) pada kelompok kasus lebih rendah daripada kelompok kontrol sebaliknya ditemukan frekuensi alel A heterozigot (AG) yang lebih tinggi.

PEMBAHASAN

Periodontitis merupakan inflamasi yang dipengaruhi oleh multifaktor salah satunya faktor genetik. Keseimbangan sitokin inflamasi dan antiinflamasi mempengaruhi risiko terjadinya periodontitis. Kadar sitokin ini dapat dipengaruhi oleh polimorfisme pada gen.

Salah satu sitokin antiinflamasi yang dominan dan dihubungkan dengan polimorfisme gen adalah IL-10. Penelitian tentang hubungan antara polimorfisme G-1082A gen IL-10A menunjukkan bahwa polimorfisme ini berhubungan dengan risiko periodontitis pada populasi di Italia¹, namun hasil pada populasi lain tidak konsisten.

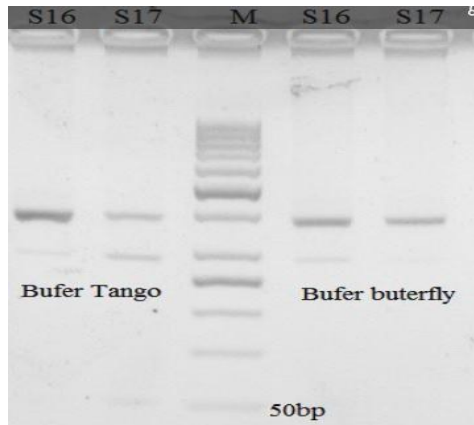
Uji dengan metode PCR RFLP di spot -1082 (daerah promoter) menunjukkan bahwa terjadi perubahan basa guanin menjadi adenin. Perubahan basa ini disebutkan akan mempengaruhi kadar protein IL-10 karena terjadi pada *ETS-like recognition site* dan mempengaruhi ikatan faktor transkripsi⁵. Hal ini mungkin disebabkan oleh mekanisme lain yang mengatur pola ekspresi protein IL-10.

Pola distribusi frekuensi alel A ditemukan lebih tinggi daripada alel G. Bahkan, pada suku Jawa di Yogyakarta tidak ditemukan individu dengan alel G (Tabel 2). Hal yang hampir sama ditemukan pada populasi China. Alel G hanya ditemukan 0,04 dari 213 subjek sedangkan alel A ditemukan dominan (0,96)⁵. Heterogenitas etnik dan perbedaan subjek penelitian, baik jumlah sampel maupun kriteria periodontitis yang diteliti akan mempengaruhi hasil penelitian². Variasi individual sangat mempengaruhi produksi protein IL-10 sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terkait dengan kadar IL-10 pada masing-masing individu⁵.

Pada penelitian ini, terdapat beberapa kesulitan dan keterbatasan. Tebal band DNA hasil isolasi DNA dari usap mukosa sel bukal maupun hasil polimerisasi dengan PCR tidak sama untuk semua sampel. Hal ini dapat terjadi karena sulit untuk menghitung jumlah sel epitel yang didapatkan dari mukosa bukal sehingga kuantitas DNA sangat bervariasi. Dampaknya, harus dilakukan optimasi beberapa kali baik suhu, waktu maupun jumlah DNA yang digunakan untuk menghasilkan produk PCR yang diharapkan.

Tahap RFLP juga mengalami beberapa kendala antara lain beberapa sampel tidak dapat terpotong secara sempurna. Bahkan terdapat 1 sampel yang ti-

dak terestriksi walaupun telah dilakukan beberapa kali optimasi baik waktu restriksi, jumlah produk pcr hingga jenis buffer yang digunakan (Gambar 4). Kendala ini menyebabkan waktu penelitian relatif lama dan 1 sampel tidak dapat dilaporkan.



Gambar 4. Perbandingan hasil restriksi menggunakan buffer tango dan buffer butterfly.

Dari penelitian pendahuluan ini dapat disimpulkan bahwa alel A dominan pada suku Jawa di Yogyakarta. Frekuensi genotip AA lebih rendah pada individu dengan periodontitis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Lanni M, Bruzzesi G, Pugliese D, Porcellini E, *et al.* Variations in inflammatory genes are associated with periodontitis. *Immunity and Ageing* 2013; 10(39): 1-8.
2. Moreira PR, Costa JE, Gomez RS, Gollob KJ, Dutra W. TNFA and IL-10 gene polymorphisms are not associated with periodontitis in Brazilians. *The Open Dentistry J.* 2009; 3: 184-190.
3. Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, *et al.* Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss disea-ses. *Biomed Res Intern* 2014; 2014: 1-5.
4. Rees LEN, Wood NAP, Gillespie KM, Lai KN, Gaston K, Mathieson PW. The Interleukin-10-108 2G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functions; significance. *Cell.Mol. Life.Sci* 2002; 59: 560-9
5. Turner DM, Williams DM, Sankaran D, Lazarus M, Sinnott PJ, Hutchinson IV. An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter. *Eur J Immunogenet* 1997; 24: 1-8.