



ASOSIASI POLIMORFISME GEN PROMOTER IL-10 -592A/C DAN TNF-ALFA -308G/A DENGAN KERENTANAN DAN KEPARAHAN INFEKSI VIRUS HEPATITIS KRONIS PADA POPULASI MAKASSAR DAN JAKARTA

Turyadi,^{1, 2} B. Witanto,² M.R. Rasyak,² D.P. Wibowo,² K.E. El-Khobar,² N. Daud,³ L. Parewangi,³ M.D. Thedja,² I. Yusuf,³ M.N. Massi,³ I. Patellongi,³ Syafruddin,^{2,3} D.H. Muljono^{2,3,4*}

¹Sekolah Pascasarjana, Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

²Lembaga Biologi Molekuler Eijkman, Jakarta, Indonesia

³Fakultas Kedokteran, Universitas Hasanuddin, Makassar, Indonesia

⁴Faculty of Medicine and Health, University of Sydney, Sydney, Australia

*Corresponding author: davidhm@eijkman.go.id

LATAR BELAKANG

- Infeksi **virus hepatitis B** (VHB) merupakan permasalahan kesehatan dunia. Infeksi VHB dapat menyebabkan beragam manifestasi yang meliputi **asimtomatik** hingga infeksi **VHB kronis** (CHB) dengan kemungkinan untuk berkembang menjadi **sirosis** dan **kanker hati**. Pada tahun 2015, setidaknya 257 juta orang di seluruh dunia terinfeksi dengan VHB kronis dengan jumlah kematian mencapai 887 ribu, yang mayoritas disebabkan oleh sirosis dan kanker hati^[1].
- VHB merupakan virus **non-sitopatik**^[2] sehingga manifestasi penyakit muncul sebagai akibat respon imun pejamu. Interaksi sitokin menjadi sangat krusial terutama sitokin pro-inflamasi dan anti-inflamasi yang memungkinkan terjadinya interaksi kompleks dan kontinyu antara virus dan pejamu selama infeksi berlangsung. Dengan begitu, **respon pejamu** diduga berperan sebagai salah satu faktor utama dalam menentukan hasil akhir infeksi VHB, disamping faktor dari virus dan dari lingkungan.
- Sebelumnya, substitusi pada gen promoter **interleukin-10 -592A/C** dan **faktor tumor nekrosis-alfa -308G/A** dilaporkan dapat mempengaruhi ekspresi kedua sitokin tersebut^[3, 4], yang dapat juga mempengaruhi status imunitas pasien terhadap infeksi. Selain itu, polimorfisme ini juga telah dilaporkan dapat mempengaruhi patogenesis infeksi VHB^[5, 6, 7, 8].
- Data mengenai asosiasi faktor polimorfisme sitokin terhadap patogenesis infeksi VHB di **Indonesia** masih **sangat terbatas**.

TUJUAN PENELITIAN

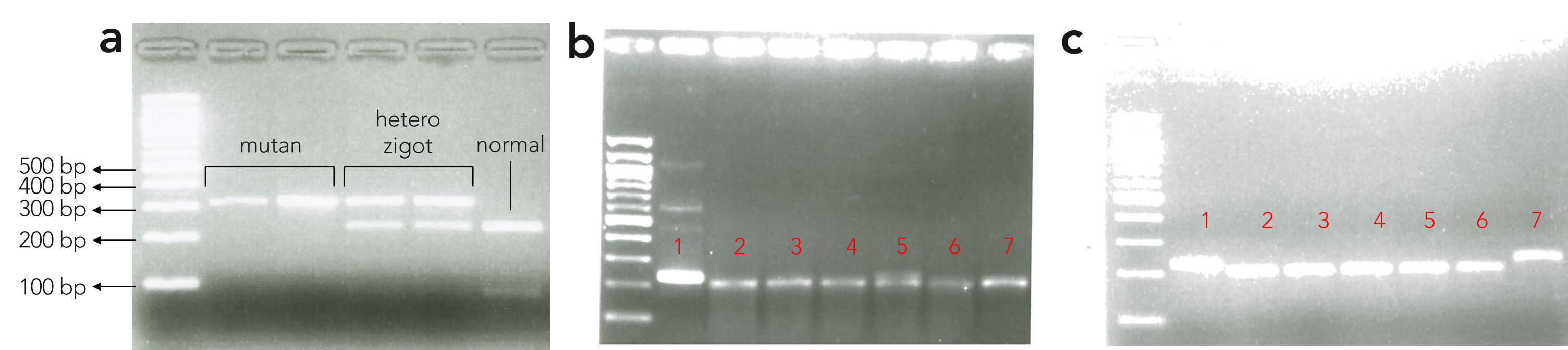
Penelitian ini bertujuan untuk menentukan **asosiasi single nucleotide polymorphism (SNP)** pada gen promoter interleukin-10 (IL-10) -592A/C dan tumor faktor nekrosis-alfa (TNF-alfa) -308G/A terhadap **kerentanan** dan **keparahan** infeksi hepatitis B kronis khusus pada populasi Makassar dan Jakarta.

METODE PENELITIAN

- Sebanyak **192 sampel** plasma dari pasien penderita hepatitis B (24 subyek asimtomatik, 142 hepatitis B kronis, 16 sirosis hati, dan 34 hepatoma) dan 87 sampel plasma kontrol sehat dikumpulkan untuk penelitian ini.
- SNP pada gen promoter IL-10 -592 dan TNF-alfa -308 diidentifikasi menggunakan teknik *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)*. Untuk verifikasi hasil PCR-RFLP, dilakukan **Sanger sequencing** pada masing-masing genotipe SNP yang diperoleh.
- Kesesuaian persebaran populasi dengan Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) diuji dengan tes **Chi-Square** (χ^2) atau tes **Fisher's Exact**. Asosiasi SNP terhadap kerentanan dan keparahan infeksi VHB kronis dianalisis menggunakan perhitungan **odds ratio** dengan tingkat kepercayaan 95% (**CI 95%**).

HASIL & PEMBAHASAN

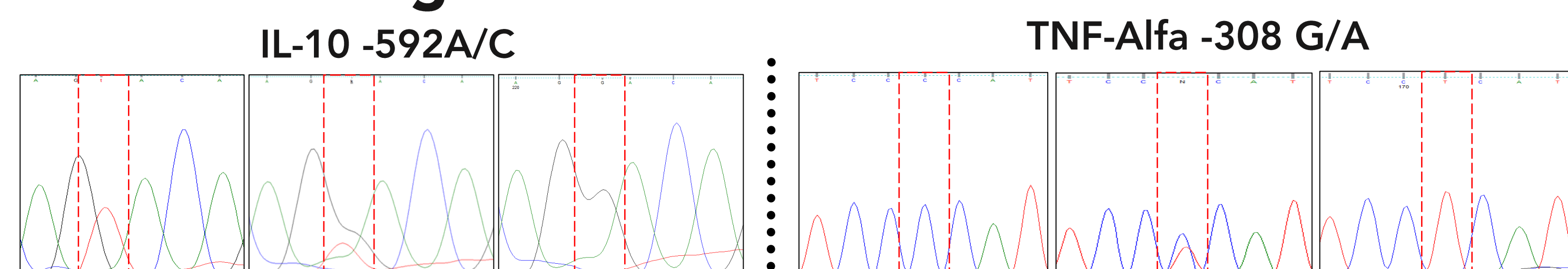
PCR-RFLP



Gambar 1.

- Hasil pemotongan hasil PCR IL-10 -592 dengan enzim restriksi *RsaI*, menghasilkan 3 jenis pemotongan, yakni terpotong ialah genotipe normal (AA); memiliki 2 pita ialah heterozigot (AC); tidak terpotong ialah genotipe mutan (CC).
- Hasil pemotongan hasil PCR TNF-alfa -308 dengan enzim restriksi *NcoI*, dengan kontrol hasil PCR pada lajur 1. Hasil terpotong pada lajur 2, 3, 4, 6 dan 7 menunjukkan genotipe normal (GG); dan pada lajur 5 dengan 2 pita menunjukkan genotipe heterozigot (GA).
- Pada lajur 7 menunjukkan hasil tidak terpotong yang ialah genotipe mutan (AA) dari TNF-alfa -308.

Sekuensing



Gambar 2. Verifikasi hasil PCR-RFLP menggunakan metode sekuensing Sanger dapat mengurangi kemungkinan *genotyping error*. Urutan gambar yaitu kiri: genotipe normal, tengah: genotipe heterozigot, kanan: genotipe mutan.

Frekuensi Genotipe & Analisa Statistik

Sitokin	Genotipe	Frekuensi	Persen (%)	HWE
IL-10 -592	Normal A/A	154	55,2	Chi Square: Nilai: 19,7 df: 2 p-value: <0,005
	Heterozigot A/C	83	29,7	
	Mutan C/C	42	15,1	
	Total	279	100,0	
TNF-alfa -308	Normal G/G	265	95,0	Fisher Exact: Nilai: 0,617 df: 2 p-value: 1
	Heterozigot G/A	12	4,3	
	Mutan A/A	2	0,7	
	Total	279	100,0	

Tabel 1. Frekuensi genotipe IL-10 -592 dan TNF-alfa -308 beserta hasil perhitungan Hardy-Weinberg menggunakan metode Chi-Square dan Fisher's Exact.

IL-10 -592	Pasien	Kontrol	OR	95% CI	p
Mutan C/C	17	25	0,274	0,125 - 0,585	0,0004
Hetero A/C	65	18	1,442	0,743 - 2,885	0,2806
Pembawa alel C	82	43	0,363	0,445 - 1,31	0,3021
Normal AA	110	44	1	REF	REF

TNF- α -308	Pasien	Kontrol	OR	95% CI	p
Mutan A/A	2	0	N/A	N/A	N/A
Hetero G/A	8	4	0,91	0,236 - 4,258	1
Pembawa Alel A	10	4	1,14	0,317 - 5,124	1
Normal G/G	182	83	1	REF	REF

IL-10 -592	Sirosis + Hepatoma	Asimtomatik + CHB	OR	95% CI	p
Mutan C/C	0	17	N/A	N/A	N/A
Hetero A/C	6	59	0,4595	0,1424 - 1,2767	0,127
Pembawa alel C	6	76	0,357	0,1111 - 0,9821	0,033
Normal AA	20	90	1	REF	REF

TNF- α -308	Sirosis + Hepatoma	Asimtomatik + CHB	OR	95% CI	p
Mutan A/A	0	2	N/A	N/A	N/A
Hetero G/A	0	8	N/A	N/A	N/A
Pembawa Alel A	0	10	N/A	N/A	N/A
Normal G/G	26	156	1	REF	REF

Tabel 2. Hasil perhitungan *odds ratio* (OD) untuk menentukan asosiasi SNP terhadap kerentanan dan keparahan infeksi virus hepatitis B kronis, dengan genotipe normal sebagai referensi perbandingan.

KESIMPULAN

Efek protektif alel mutan IL-10 -592C terhadap kerentanan dan keparahan infeksi VHB kronis dapat digunakan dalam manajemen penanganan, pengobatan dan monitoring hepatitis B di Indonesia. Begitupula, dapat menjadi langkah awal penelitian marker pejamu yang lain yang berperan dalam patogenesis infeksi VHB kronis.

REFERENSI

- [1] World Health Organization. 2017. *Global hepatitis report*. Geneva: WHO.
- [2] Dandri, M. & Petersen, J. *HBV virology* dalam Mauss, S., Berg, T., Rockstroh, J., Sarrazin, C. & Wedemeyer, H. 2018. *Hepatology: A clinical textbook*. 9th edition. Diperoleh dari www.hepatologytextbook.com.
- [3] Zhao, N., Chen, H. L., Chen, Z. Z., Li, J. & Chen, Z. B. 2018. IL-10-592 polymorphism is associated with IL-10 expression and severity of enterovirus 71 infection in Chinese children. *J. Clin. Virol.* 95: 42-46.
- [4] Elahi, M. M., Asotra, K., Matata, B. M. & Mastana S. S. 2009. Tumor necrosis factor alpha-308 gene locus promoter polymorphism: An analysis of association with health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease*. 1792(3): 163-172.
- [5] Cheong, J. Y., Cho, S. W., Hwang, I. L., Yoon, S. K., Lee, J. H., Park, C. S., Lee, J. E., Hahn, K. B. & Kim, J. H. 2006. Association between chronic hepatitis B infection and interleukin-10, tumor factor necrosis-alfa gene promoter polymorphisms. *Hepatology*. 21: 1163-1169.
- [6] Baghi, S. G., Alavian, S. M., Mehroush, L. & Salimi, S. 2015. Impact of the IL-10 Promoter Gene Polymorphisms in the Severity of Chronic Hepatitis B Infection. *Hepat. Mon.* 15(7): e28287.
- [7] Gao, Q. J., Liu, D. W., Zhang, S. Y., Jia, M., Wang, L. M., Wu, L. H., Wang, S. Y. & Tong, L. X. 2009. Polymorphisms of some cytokines and chronic hepatitis B and C virus infection. *World J. Gastroenterol.* 15(44): 5610-5619.
- [8] Tayebi, S. & Mohamadkhani, A. 2012. The TNF-Alpha-308 Promoter Gene Polymorphism and Chronic HBV Infection. *Hepatitis Research and Treatment*. DOI: 10.1155/2012/493219.