POLIMORFISME TITIK -819 T/C PROMOTOR GEN INTERLEUKIN -10 DAN PERBANDINGAN KADAR INTERLEUKIN -10 PADA PENYAKIT KUSTA

Desi Oktariana
Zen Hafy
Irsan Saleh
Iche Andriyani Liberty

Unsri Press

BUKU REFERENSI

POLIMORFISME TITIK -819 T/C PROMOTOR GEN INTERLEUKIN-10 DAN PERBANDINGAN KADAR INTERLEUKIN-10 PADA PENYAKIT KUSTA

DESI OKTARIANA

IRSAN SALEH

ZEN HAFY

ICHE ANDRIYANI LIBERTY

Unsri Press

POLIMORFISME TITIK -819 T/C PROMOTOR GEN INTERLEUKIN-10 DAN PERBANDINGAN KADAR INTERLEUKIN-10 PADA PENYAKIT KUSTA

Desi Oktariana, Irsan Saleh, Zen Hafy, Iche Andriyani Liberty

UPT. Penerbit dan Percetakan
Universitas Sriwijaya 2023
Kampus Unsri Palembang
Jalan Srijaya Negara, Bukit Besar Palembang 30139
Telp. 0711-360969
Email: unsri.press@yahoo.com, penerbitunsri@gmail.com
Website: www.unsri.unsripress.ac.id

Anggota APPTI No. 026/KTA/APPTI/X/2015
Anggota IKAPI No. 001/SMS/2009

Cetakan Pertama, Januari 2023
178 hal

Hak cipta dilindungi undang-undang.
Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanik,termasuk memfoto, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

Hak terbit pada Unsri Press

ISBN : 978-623-399-104-9

KATA PENGANTAR

Penyakit kusta masih menjadi masalah global karena prevalensinya yang terus meningkat, terutama di negara endemik. Sulitnya mengeliminasi penyakit ini merupakan tantangan tersendiri bagi para klinisi dan akademisi. Penyakit kusta yang tidak terdeteksi dan tidak diobati dapat menyebabkan kecacatan. Selain itu, penyandang kusta juga dihadapkan pada stigma di masyarakat yang menyebabkan penderita kusta dijauhi dan dikucilkan.

Selain aspek klinis, pemahaman mengenai aspek biomolekuler memainkan peran yang penting dalam menelusuri faktor risiko dan patogenesis kusta. Penyakit ini tentu dapat berkembang karena ketidakmampuan respon imun dalam mengeliminasi bakteri utama yang menjadi etiologinya, yaitu *Mycobacterium leprae*. Respon imun dihasilkan dari interaksi berbagai sitokin. Salah satu sitokin yang menjadi perhatian para peneliti adalah interleukin-10 (IL-10), yang memiliki efek dominan anti-inflamasi. Interleukin-10 dikaitkan dengan kerentanan dan

ketahanan individu terhadap penyakit kusta. Salah satu faktor utama yang mempengaruhi sekresi sitokin ini adalah faktor genetik. Perubahan di tingkat genetik, salah satunya adalah polimorfisme di titik tertentu, berpengaruh pada produksi IL-10.

Karena kajian mengenai aspek biomolekuler penyakit kusta masih terbatas, terutama terkait polimorfisme dan kadar IL-10, maka dibutuhkan literatur tambahan yang dapat menjelaskan bahasan ini dengan lebih sistematis dan komprehensif. Oleh karena itu, penulis melaksanakan penulisan buku yang berjudul "Polimorfisme Titik -819 T/C Promotor Gen Interleukin-10 dan Perbandingan Kadar Interleukin-10 pada Penyakit Kusta". Penulis berharap buku referensi ini dapat memberikan manfaat dan menjadi sumber bacaan, baik bagi para akademisi maupun klinisi yang langsung berhubungan dengan penyakit kusta.

Palembang, 13 November 2022

TTD

Penulis

DAFTAR ISI

Judul i
Kata pengantar iii
Daftar isi v
Daftar tabel viii
Daftar gambar ix
BAB 1. PENDAHULUAN 1
BAB 2. PENYAKIT KUSTA 8
Definisi 8
Epidemiologi.....9
Etiologi 10
Diagnosis 11
Klasifikasi 12
BAB 3. RESPON IMUN PADA KUSTA 14
Struktur dan morfologi *M. leprae* 17
Aktivasi sistem imun pada penyakit kusta.....22
BAB 4. INTERLEUKIN-10.....30
Struktur, produksi, dan fungsi 30
Peran interleukin-10 terhadap infeksi 36
Kerentanan terhadap infeksi primer.....38

Ketahanan mikroba dan evolusi penyakit infeksi 44
Proteksi pada cedera jaringan infeksi 49
BAB 5. POLIMORFISME 52
Mutasi 52
Single nucleotide polymorphism 54
Faktor risiko suatu penyakit.....56
Aspek genetika penyakit kusta 58
Polimorfisme gen IL-10 pada penderita kusta.....64
BAB 6. SKEMA RISET.....73
Desain 73
Batasan kusta dan interleukin-10.....77
Pengambilan darah.....82
Isolasi DNA 83
Desain primer yang spesifik 86
Polymerase chain reaction 87
Elektroforesis gel agarose.....90
Restriction fragment length polymorphism 91
Enzyme-Link Imunosorbent Assay 93
BAB 7. PCR dan RFLP.....98
Realibilitas dan relevansi.....98
Karakteristik dasar 100

Gambaran elektroforesis PCR 104
RFLP menggunakan enzim.....106
BAB 8. GENOTIPE dan ALEL 110
Distribusi frekuensi genotipe dan alel 110
Distribusi berdasarkan karakteristik subjek.....112
BAB 9. POLIMORFISME TITIK -819 119
Hubungan polimorfisme dan kerentanan kusta 119
Hubungan polimorfisme dan kusta multibasiler.....121
Hubungan polimorfisme dan kusta pausibasiler.....124
Mekanisme dan perbandingan antar populasi 127
BAB 10. PERBANDINGAN KADAR IL-10.....148
Perbandingan kadar interleukin-10.....148
Mekanisme.....150
BAB 11. PENUTUP.....152
DAFTAR PUSTAKA.....154

DAFTAR TABEL

1. Klasifikasi/tipe penyakit kusta menurut WHO 14
2. Tanda lain dalam penentuan klasifikasi kusta.....15
3. Peran IL-10 terhadap infeksi primer 41
4. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen IL-10.....89
5. Karakteristik dasar.....100
6. Distribusi frekuensi genotipe.....110
7. Distribusi frekuensi alel.....111
8. Distribusi berdasarkan kelompok usia 112
9. Distribusi berdasarkan jenis kelamin 114
10. Distribusi berdasarkan kelompok ras 115
11. Distribusi berdasarkan klasifikasi kusta WHO 117
12. Hubungan polimorfisme dan kerentanan kusta.....119
13. Hubungan alel dan kerentanan kusta.....120
14. Hubungan polimorfisme dengan kusta MB.....122
15. Hubungan polimorfisme alel dengan kusta MB.....123
16. Hubungan polimorfisme dengan kusta PB.....125
17. Hubungan polimorfisme alel dengan kusta PB 126
18. Berbagai penelitian tentang polimorfisme IL-10 129
19. Distribusi kadar interleukin-10.....148
20. Perbandingan kadar interleukin-10 149

DAFTAR GAMBAR

1. Efek Immunoregulator dan stimulasi IL-10 33
2. Struktur dari gen IL-10 pada manusia.....66
3. Struktur gen dan lokasi dari polimorfisme.....68
4. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen IL-10.....90
5. Visualisasi elektroforesis hasil PCR 106
6. Hasil elektroforesis menggunakan enzim *MslI* 109

BAB 1

PENDAHULUAN

Kusta masih menjadi masalah global yang sulit diatasi. Pada individu, kusta tidak hanya menimbulkan masalah pada segi medis, tapi juga segi sosial, ekonomi, dan budaya. Stigma yang timbul pada penderita kusta seringkali menyebabkan masalah psikososial karena penderita kusta kerapkali dijauhi dan dikucilkan oleh masyarakat. Kusta merupakan penyakit infeksi kronik yang penyebab utamanya adalah infeksi *Mycobacterium lepra*e (*M. leprae*) pada kulit dan saraf (Lowe, 2021).

Indonesia merupakan salah satu daerah endemik kusta dengan prevalensi yang terus meningkat. *World Health Assembly* (WHA) membuat suatu resolusi mengenai eliminasi kusta pada tahun 2000 dengan menurunkan prevalensi kusta menjadi dibawah 1 kasus per 10.000 penduduk. Resolusi ini di Indonesia dikenal sebagai Eliminasi Kusta Tahun 2000 (EKT 2000). Meski Indonesia telah mencapai target eliminasi nasional, 14 wilayah Indonesia terutama bagian timur masih

merupakan daerah dengan beban kusta tinggi dengan angka penemuan kasus baru ≥10 per 100.000 (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Dahulu, faktor paling utama yang dianggap menyebabkan timbulnya penyakit kusta adalah sumber penularan. Pendapat ini tidak sepenuhnya benar karena paparan *M. leprae* pada beberapa individu tidak secara langsung menyebabkan terjadinya kusta. Hal ini kemudian menyebabkan beberapa peneliti tertarik untuk mengkaji peranan respon imun dalam penyakit kusta. Respon imun yang berbeda antar individu dipengaruhi oleh stimulasi antigen asing yang kemudian dapat menyebabkan proses inflamasi. Proses ini terjadi akibat adanya interaksi yang unik dari berbagai produk sitokin dalam tubuh, salah satunya adalah Interleukin-10 (IL-10) (Abbas et al., 2019).

Interleukin-10 merupakan sitokin dengan efek dominan anti-inflamasi, yang dihasilkan oleh sel Th2, sel Th3, monosit, sel dendritik, eosinofil, sel mast, dan keratinosit. Interleukin-10 bekerja pada makrofag yang aktif sehingga dapat mengakhiri respons terhadap mikroba dan mengembalikan sistem ke keadaan istirahat setelah mikroba dihancurkan. *Mycobacterium leprae* merupakan

obligat intraseluler sehingga fagositosis oleh makrofag merupakan respon imun utama terhadap eliminasi *M. leprae*. Peningkatan regulasi interleukin-10 dapat berpengaruh pada penurunan aktivitas makrofag dalam membunuh bakteri (Mege et al., 2006).

Polimorfisme adalah perubahan atau mutasi pada satu titik spesifik nukleotida tertentu. Polimorfisme dapat menyebabkan perbedaan urutan DNA yang tejadi pada ≥ 1% populasi. Polimorfisme tidak bermanifestasi klinis, tapi bisa menentukan kerentanan terhadap penyakit. Produksi interleukin-10 diatur oleh gen yang menyandi sitokin tersebut. Adanya mutasi pada gen tersebut diduga dapat menyebabkan perubahan pada ekspresi gen interleukin-10 yang dihasilkan (Franceschi et al., 2009).

Gen interleukin-10 terletak pada kromosom 1q32. Polimorfisme terkait gen interleukin-10 yang sering terjadi, salah satunya, adalah polimorfisme titik -819C/T pada promotor gen tersebut. Polimorfisme pada promotor gen ini diduga dapat menyebabkan perubahan pada kadar interleukin-10 yang diproduksi, yang kemudian dapat berpengaruh terhadap proses eliminasi mikroba dalam

perkembangan penyakit kusta (Alvarado-Arnez et al., 2015).

Berbagai penelitian telah dilakukan terkait hubungan polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 pada penderita kusta di berbagai populasi. Penelitian pada populasi Brazil dan Kolombia melaporkan bahwa polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 dapat meningkatkan risiko kusta (Santos et al., 2002)(Moraes et al., 2004)(Pereira et al., 2009)(Cardona-Castro et al., 2012). Di sisi lain, penelitian pada populasi Malawi, Meksiko, dan Cina melaporkan bahwa polimorfisme titik -819 C/T promotor gen interleukin-10 tidak berhubungan dengan risiko kusta (Fitness et al., 2004)(Félix et al., 2012)(Chen et al., 2013).

Di Indonesia, yang menduduki peringkat ketiga negara dengan kasus kusta terbanyak di dunia, studi mengenai aspek genetika terkait penyakit kusta, terutama mengenai polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 dan perbandingan kadar serum interleukin-10 pada penyakit kusta menjadi hal penting.

Sebelumnya, telah dilakukan studi pendahuluan mengenai identifikasi distribusi polimorfisme titik -819

T/C pada penderita kusta (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, & Ya'kub R, 2021). Studi lanjutan kemudian dilakukan untuk mengetahui apakah polimorfisme titik -819 T/C berhubungan dengan kejadian infeksi kusta (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021). Terakhir, perlu dilakukan kajian mendalam terkait studi mengenai polimorfisme titik -819 T/C dan kadar serum interleukin-10 dengan kejadian infeksi kusta di Indonesia, khususnya Sumatera Selatan (Oktariana et al., 2022).

Berdasarkan latar belakang diatas, maka tujuan utama dalam penulisan buku ini adalah menganalisis hubungan polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 dan kadar interleukin-10 pada penyakit kusta agar didapatkan kajian yang sistematis dan komprehensif sesuai bahasan tersebut. Dalam menyampaikan tujuan utama tersebut, tentunya penulis perlu menguraikan beberapa aspek agar lebih mudah dipahami oleh para pembaca.

Beberapa aspek tersebut kemudian tertuang dalam tujuan khusus, yang meliputi beberapa segmen, yaitu menganalisis teori penyakit kusta secara mendalam

dimulai dari aspek yang umum hingga aspek yang lebih spesifik, menganalisis respon imun dalam penyakit kusta yang merupakan pilar utama dalam mengeliminasi bakteri penyebab penyakit ini, menganalisis teori terkait interleukin-10 dimulai dari aspek yang umum hingga aspek yang lebih spesifik, menganalisis teori terkait polimorfisme terutama pengaruhnya terhadap produksi IL-10 yang dihasilkan dan terhadap penyakit kusta.

Selain itu, buku ini juga akan menganalisis berbagai skema riset terkait polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 dan kadar interleukin-10 pada penyakit kusta, menganalisis genotipe dan alel polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 pada penyakit kusta dan non-kusta, menganalisis hubungan polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 pada penyakit kusta dan non-kusta, menganalisis perbandingan kadar serum interleukin-10 pada penyakit kusta dan non-kusta. Dalam buku ini juga terdapat analisis perbandingan terhadap penelitian yang berhubungan dengan polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10 dan kadar interleukin-10 pada penyakit kusta.

Buku ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah yang sistematis, holistik, dan komprehensif mengenai berbagai teori dan studi terkait polimorfisme titik -819 T/C promotor gen interleukin-10, kadar serum interleukin-10, dan hubungannya pada penderita kusta dan non-kusta.

BAB 2

PENYAKIT KUSTA

Definisi

Penyakit kusta adalah suatu penyakit infeksi menahun akibat bakteri tahan asam yaitu *M. leprae* yang secara primer menyerang saraf tepi dan secara sekunder menyerang kulit serta organ lainnya. Pada kebanyakan orang yang terinfeksi dapat asimtomatik, namun sebagian kecil memperlihatkan gejala dan mempunyai kecenderungan untuk menjadi cacat, khususnya pada tangan dan kaki.

Penyakit kusta adalah penyakit kronis yang dapat menimbulkan masalah kecacatan. Masalah yang timbul tidak hanya pada masalah kesehatan fisik saja, tetapi juga masalah psikologis, ekonomi dan sosial bagi penderitanya. Oleh karena itu, pemahaman mengenai penyakit kusta menjadi penting agar dapat dilakukan penatalaksanaan dan pencegahan yang optimal, terutama di negara endemik seperti Indonesia. (Djuanda et al., 2010).

Epidemiologi

Sampai saat ini epidemiologi penyakit kusta belum sepenuhnya diketahui secara pasti. Penyakit kusta tersebar di seluruh dunia terutama di daerah tropis dan subtropis. Dapat menyerang semua umur, frekuensi tertinggi pada kelompok umur antara 30-50 tahun dan lebih sering mengenai laki-laki daripada wanita (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Di Indonesia, distribusi penderita kusta tersebar hampir pada seluruh provinsi, meskipun pola penyebarannya tidak merata. Pada tahun 2000, Indonesia telah berhasil mencapai target eliminasi kusta nasional, namun terjadi peningkatan kasus kusta baru pada tahun 2002 hingga tahun 2006.

Jumlah penderita kusta baru di Indonesia mencapai 17.921 orang dengan prevalensi lebih besar dari 20 per 100.000 penduduk pada tahun 2006, terbanyak dilaporkan pada provinsi Papua, Maluku, Sulawesi Selatan, dan Sulawesi Utara.

Pada tahun 2010, jumlah penderita kusta baru di Indonesia adalah 17.012 orang dengan angka prevalensi

7,22 per 100.000 penduduk. Satu tahun kemudian, yaitu tahun 2011, jumlah penderita kusta baru di Indonesia meningkat tajam sebesar 19.371 kasus baru dengan angka prevalensi 8,03 per 100.000 penduduk (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, 2020).

Etiologi

Kusta disebabkan oleh *Mycobacterium leprae* (M. leprae) yang ditemukan pertama kali pada tahun 1873 oleh seorang sarjana dari Norwegia Bernama GH Armauer Hansen. *Mycobacterium leprae* merupakan organisme unik yang berbentuk batang (ukuran 1-8 mikron lebar 0,2-0,5 mikron), bersifat tahan asam, biasanya berkelompok, namun ada juga yang tersebar satu-satu. Kuman ini hidup dalam sel terutama jaringan yang bersuhu dingin (obligat intraseluler). Hingga saat ini, kuman *M. leprae* tidak dapat dikultur dalam media buatan. Namun, kuman ini dapat berkembang dan menyebabkan infeksi sistemik pada binatang armadillo. Hingga saat ini peneliti masih mempelajari *Mycobacterium leprae* secara spesifik (Brennan & Spencer, 2019).

Diagnosis

Diagnosis penyakit kusta dapat ditegakkan berdasarkan bukti adanya tanda-tanda kardinal yang khas dan menjadi acuan dalam penyakit tersebut.

Terdapat tanda-tanda kardinal yang digunakan dalam penetapan diagnosis penyakit kusta, antara lain: (Djuanda et al., 2010)

A. Lesi (kelainan) kulit yang mati rasa, dapat berbentuk bercak keputihan (hipopigmentasi) atau kemerahan (eritema) yang mati rasa (anestesi).

B. Penebalan saraf tepi yang disertai dengan gangguan fungsi saraf, biasanya akibat dari peradangan kronis pada saraf tepi (neuritis perifer). Gangguan-gangguan fungsi saraf tepi berupa gangguan fungsi sensoris yaitu mati rasa, dan gangguan fungsi motorik yaitu kelemahan otot (paresis) atau kelumpuhan (paralisis).

C. Pada pemeriksaan bakteriologis ditemukan *Mycobacterium leprae*

Klasifikasi

Klasifikasi bertujuan untuk menentukan rejimen pengobatan, prognosis dan komplikasi. Kemudian untuk perencanaan operasional, seperti menemukan pasien-pasien yang menularkan dan memiliki nilai epidemiologi yang tinggi sebagai target utama pengobatan. Selanjutnya, terakhir untuk identifikasi pasien yang kemungkinan besar akan menderita cacat. Terdapat banyak jenis klasifikasi penyakit kusta diantaranya adalah klasifikasi Madrid, klasifikasi Ridley-Jopling, klasifikasi India dan klasifikasi menurut WHO (Depkes, 2005).

Pada klasifikasi Madrid, penyakit kusta dibagi atas Indeterminate (I), Tuberculoid (T), Borderline-Dimorphous (B), Lepromatous (L). Klasifikasi ini merupakan klasifikasi paling sederhana berdasarkan manifestasi klinis, pemeriksaan bakteriologis, dan pemeriksaan histopatologi, sesuai rekomendasi dari *International Leprosy Association* di Madrid tahun 1953 (Goldsmith et al., 2012).

Pada klasifikasi Ridley-Jopling, penyakit kusta dibagi berdasarkan spektrum klinis kekebalan tubuh,

dimulai dari spektrum kekebalan tubuh yang rendah pada satu sisi hingga spektrum kekebalan tubuh yang tinggi pada sisi lainnya. Karena *M. leprae* adalah obligat intraseluler, maka kekebalan seluler (*cell mediated imunity*/CMI) memegang peranan penting dan menentukan perkembangan penyakit kusta pada individu setelah terpapar *M. leprae* serta menentukan jenis kusta apa yang akan berkembang pada spektrum penyakit kusta.

Sistem klasifikasi ini dapat menjelaskan hubungan interaksi kuman dengan respon imunologi seseorang, terutama respon imun seluler spesifik, sehingga sistem ini paling banyak digunakan untuk penentuan tipe kusta (Goldsmith et al., 2012). Kelima tipe kusta tersebut adalah tipe lepromatous (LL), borderline lepromatous (BL), mid-borderline (BB), borderline tuberculoid (BT), dan tuberculoid (T).

Pada tahun 1982, WHO mengembangkan klasifikasi untuk memudahkan pengobatan di lapangan. Dalam klasifikasi ini, seluruh penderita kusta hanya dibagi menjadi 2 tipe yaitu tipe Pausibasiler (PB) dan tipe Multibasiler (MB). Sampai saat ini, Depkes RI menerapkan klasifikasi menurut WHO sebagai pedoman

pengobatan penderita kusta. Dasar dari klasifikasi ini berdasarkan manifestasi klinis dan hasil pemeriksaan bakteriologi (Depkes, 2005).

Tabel 1. Klasifikasi/tipe penyakit kusta menurut WHO

Tanda utama	Pausibasiler (PB)	Multibasiler (MB)
Bercak kusta	Jumlah 1 sampai dengan 5	Jumlah lebih dari 5
Penebalan Saraf tepi yang disertai dengan gangguan fungsi (gangguan fungsi bisa berupa kurang/mati rasa atau kelemahan otot yang dipersarafi Oleh saraf yang bersangkutan.	Hanya satu saraf	Lebih dari satu saraf
Pemeriksaan bakteriologi	Tidak dijumpai basil tahan asam (BTA negatif)	Dijumpai basil tahan asam (BTA positif)

Tabel 2. Tanda lain yang dapat dipertimbangkan dalam penentuan klasifikasi kusta menurut WHO

Kelainan kulit dan hasil pemeriksaan	Pausibasiler (PB)	Multibasiler (MB)
1. Bercak (makula) mati rasa		
a. Ukuran	Kecil dan besar	Kecil-kecil
b. Distribusi	Unilateral atau Bilateral asimetris	Bilateral simetris
c. Konsistensi	Kering dan kasar	Halus, berkilat
d. Batas	Tegas	Kurang tegas
e. Kehilangan rasa pada bercak	Selalu ada dan tegas	Biasanya tidak jelas, jika ada, terjadi pada yang sudah lanjut
f. Kehilangan Kemampuan berkeringat, rambut rontok pada bercak	Selalu ada dan jelas	Biasanya tidak jelas, jika ada, terjadi pada yang sudah lanjut

2. Infiltrat		
a. Kulit	Tidak ada	Ada, kadang-kadang tidak ada
b. Membran mukosa	Tidak pernah ada	Ada, kadang-kadang tidak ada
c. Ciri-ciri	*Central healing*	- *Punched out lession* - *Madarosis* - *Ginekomasti* - Hidung pelana - Suara sengau
d. Nodulus	Tidak ada	Kadang-kadang ada
e. Deformitas	Terjadi dini	Biasanya asimetris

BAB 3

RESPON IMUN DALAM PENYAKIT KUSTA

Struktur dan Morfologi *Mycobacterium leprae*

Secara skematik struktur *M. leprae* terdiri dari kapsul, dinding, membran, dan sitoplasma. Terdapat suatu zona transparan elektron berbahan busa atau vesicular yang mengelilingi organisme tersebut. Bahan dari zona ini diproduksi sendiri oleh *M. leprae* dan membentuk struktur yang khas. Zona ini terdiri dari dua lipid, yaitu *phthioceroldimycoserosate* dan *phenolic glycolipid.* Lipid *phthioceroldimycoserosate* memiliki peran proteksi pasif, sedangkan *phenolic glycolipid* memberikan sifat kimia yang unik dan sifat antigenik yang spesifik terhadap *M. Leprae*. *Phenolic glycolipid* tersusun atas trisakarida (tiga molekul gula hasil metilasi) yang dihubungkan melalui molekul fenol pada lemak atau disebut juga *phthiocerol* (Brennan & Spencer, 2019).

Dinding sel *M. leprae* terdiri dari dua lapis, yaitu dinding lapisan luar dan dinding dalam. Dinding lapisan

luar mengandung lipopolisakarida yang terdiri dari rantai cabang arabinogalactan yang diesterifikasi dengan rantai panjang asam mikolat, mirip dengan yang ditemukan pada Mycobacteria lainnya. Dinding ini bersifat transparan elektron. Dinding lapisan dalam terdiri dari peptidoglycan, karbohidrat yang dihubungkan melalui peptida-peptida yang memiliki rangkaian asam-amino yang mungkin spesifik untuk *M. leprae* walaupun peptida ini terlalu sedikit untuk digunakan sebagai antigen diagnostik.

Tepat di bawah dinding sel, melekat suatu membran yang khusus, terdiri dari lipid dan protein, yang berfungsi untuk transport molekul-molekul kedalam dan keluar organisme. Struktur protein ini dapat membentuk antigen permukaan, yang dapat diekstraksi dari dinding sel *M. leprae* serta dapat dipelajari dan dianalisis secara luas. Protein ini sebagian besar berupa enzim dan secara teori merupakan target yang baik untuk kemoterapi (Goulart & Goulart, 2009).

Bagian dalam sel terdiri atas nukleus dan granul penyimpanan, dimana terdapat material genetik *deoxyribonucleic acid* (DNA). Proses translasi dan multiplikasi melibatkan protein penting, yang disebut

dengan ribosom. Suatu analisis DNA dari Mycobacteria yang diisolasi dari armadillo liar, menunjukan bahwa *M. leprae* terkait erat dengan *M. tuberculosis* dan *M. Scrofulaceum*, walaupun berbeda secara genetik. (Singh & Cole, 2011).

Mycobacterium leprae memiliki unsur kimia utama yang bersifat antigenik. Meskipun demikian, Sebagian besar bersifat antigenik lemah dan *M. leprae* mengandung antigen yang relatif lebih sedikit dalam serum (sekitar 20) dibandingkan dengan BCG (sekitar 100). Struktur antigen *M. leprae* tersusun atas phenolic glikolipid, bersifat spesifik pada *M. leprae*. Hingga saat ini, semua antigen yang diidentifikasi umumnya bereaksi-silang dengan Mycobacteria lainnya, meskipun ada sebagian kecil molekul yang spesifik pada *M. leprae*, disebut juga dengan epitope. Spesifisitas epitope memungkinkan tes antibodi spesifik bisa ditetapkan dengan menggunakan serum yang telah diabsorbsi dengan spesies Mycobacteria lainnya.

Sifat antigen dari *M. leprae* dipengaruhi secara dominan oleh molekul yang menyusun antigen tersebut,

dalam hal ini karbohidrat, yang stabil secara fisik-kimia (Brennan & Spencer, 2019).

A. Phenolic Glicolipid (PGL)

Phenolic glicolipid (PGL) terdiri dari beberapa varian, yaitu varian I, II dan III. Varian ini dibedakan berdasarkan struktur PGL. Phenolic glicolipid-1 mengandung suatu kelompok glikosilasi fenol, yang berbeda dengan PGL-2 dan PGL-3 dalam pola residu gula, dengan karakteristik trisakarida yang hanya dijumpai pada *M.leprae*. Trisakarida terminal pada PGL-1, yang telah berhasil disintesis dan dapat berikatan dengan sampel protein pembawa yang digunakan pada seroepidemiologik beberapa penelitian, memberikan spesifisitas antigenik pada *M. leprae* (Mahapatra et al., 2008).

Antigen PGL-1 dapat menstimulasi produksi antibodi IgM. Antigen ini ditemukan pada semua jaringan yang terinfeksi dengan *M. leprae* dan tetap bertahan dalam waktu yang lama bahkan setelah organisme mati. Individu dengan indeks bakteri yang tinggi umumnya menunjukkan titer antibodi IgM anti PGL-1 yang tinggi. Kecenderungan

kadar antibodi IgM anti PGL-1 yang rendah untuk tetap positif mungkin berhubungan dengan persistensi basiler. Antigen PGL-1 itu sendiri tidak larut dalam air dan dapat menetap di jaringan dalam jangka waktu yang lama, menstimulasi respon antibodi yang rendah tanpa adanya basil yang hidup. Respon antibodi anti PGL-1 terutama pada kelas IgM mengindikasikan bahwa sifat IgM tidak tergantung oleh respon sel T terhadap antigen glikolipid ini, berbeda dengan respon IgG yang predominan terhadap antigen karbohidrat utama lipoarabinomannan (LAM).

B. Lipoarabinomannan (LAM)

Lipoarabinomannan (LAM) merupakan salah satu komponen utama dari dinding sel *M. leprae*. Komponen ini bersifat stabil dan tidak bisa dicerna, serta dapat bereaksi-silang dengan Mycobacteria lainnya. Meskipun demikian, LAM mengandung epitope spesifik yang dikenali oleh serum yang terabsorbsi dan dapat memicu antibodi IgG (Mahapatra et al., 2008).

C. Antigen protein

Mycobacterium leprae terdiri dari banyak antigen protein, dimana diantaranya mengandung epitope spesifik *M. leprae* pada percobaan antibodi monoklonal tikus. Studi antigen menunjukkan bahwa protein yang bisa larut, yang diekstraksi dari *M. leprae*, terbukti bermanfaat meskipun bukan merupakan antigen yang sangat spesifik untuk uji kulit. Beberapa antigen protein berhasil diperbanyak dan diekspresikan pada *E. coli*, yang sangat membantu dalam analisis antigen (Kaur & Kaur, 2017).

Aktivasi Sistem Imun pada Penyakit Kusta

Pada penyakit kusta, respon imun yang terjadi sangat kompleks, terdiri dari respon imun seluler dan humoral. Antigen yang dimiliki *M. leprae* dapat menimbulkan reaksi imunologi sehingga menyebabkan timbulnya gejala dan komplikasi dari penyakit ini. Apabila respon imun cukup baik, maka pada stadium awal multiplikasi bakteri dapat dihambat sehingga mencegah timbulnya gejala klinis dan perkembangan selanjutnya (Goldsmith et al., 2012).

Mycobacterium leprae merupakan bakteri obligat intraseluler, artinya bakteri ini mampu bertahan hidup di dalam sel atau jaringan. Oleh karena itu, respon imun yang berperan penting dalam mencegah multiplikasi lebih lanjut dari bakteri ini sehingga tubuh tahan terhadap infeksi adalah respon imun seluler. Respon imun seluler merupakan hasil dari aktivasi makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan meningkat kemampuannya dalam menghancurkan bakteri atau menekan multiplikasi (Djuanda et al., 2010).

Mycobacterium leprae juga dapat menginduksi respon imun humoral, hasil dari aktivitas sel limfosit B yang berada dalam jaringan limfosit dan aliran darah. Komponen antigen dari *M. leprae* dapat merangsang dan mengubah sel limfosit B menjadi sel plasma, yang kemudian menghasilkan antibodi yang akan membantu proses opsonisasi. Namun, karena *M. leprae* adalah bakteri obligat intraseluler, fungsi respon imun humoral ini tidak efektif. Respon imun humoral yang diproduksi berlebihan bahkan dapat menyebabkan timbulnya beberapa reaksi kusta, contohnya yang tampak pada kusta lepromatosa (Goulart & Goulart, 2009).

Mycobacterium leprae diduga masuk ke dalam tubuh melalui hidung, kemudian menyebar ke kulit dan saraf melalui sirkulasi. Tiga target utama invasi *M. leprae* yaitu jaringan saraf perifer (sel-sel Schwann), pembuluh-pembuluh darah kecil (sel-sel endothelial dan perisit) dan sistem monosit-makrofag. Pada tahap proteksi awal, mekanisme non spesifik terutama oleh peran monosit yang berperan sebagai sel fagosit. Selain monosit, respons terhadap infeksi juga meningkatkan produksi neutrofil dari sumsum tulang. Sitokin yang menguinduksi produksi neutrofil ini adalah sitokin CSF (Sari et al., 2013).

Neutrofil memfagosit mikroba yang ada di dalam sirkulasi maupun mikroba di dalam jaringan ekstravaskular. Neutrofil ini hanya dapat bertahan beberapa jam, dan menghasilkan lisis parsial. Monosit dalam sirkulasi bertahan hingga lima hari, namun sel-sel monosit dapat bermigrasi ke jaringan konektif dan bertahan selama beberapa bulan sebagai histiosit (Goulart & Goulart, 2009).

Sebagian basil yang lolos akan ikut bersama monosit di dalam aliran darah. Selama berada dalam monosit, kuman tersebut bahkan dapat bereplikasi

(*Troyan horse phenomenon*), dan masuk ke berbagai organ. Monosit yang terstimulasi ini berdiferensiasi menjadi makrofag dengan aktifitas energetik yang tinggi, mampu membentuk sel-sel epiteloid pada kusta TT dan sel-sel lepra atau virchowcytes pada LL. Makrofag-makrofag teraktifasi pada kusta TT juga mampu memfagositosis basil intraneural. Makrofag juga berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC) baik pada respons imunitas selular dan humoral (Sutedja et al., 2016).

Basil-basil yang keluar dari monosit yang mati dan pecah, akan menginvasi sel-sel Schwann dan masuk ke dalam vakuola-vakuola fagositik (fagosom), sehingga dapat bermultiplikasi dan terlindungi dari antibodi maupun makrofag. Namun, *M. leprae* juga dapat meninggalkan tempat persembunyiannya dan masuk ke jaringan perineural, sehingga akhirnya terbentuk granuloma epiteloid atau lepromatosa. Sel-sel Schwann tidak memiliki enzim lisosomal untuk menghancurkan bakteri, sehingga basil *M. leprae* dapat bertahan untuk waktu yang lama (Sari et al., 2013).

Makrofag-makrofag fagositik pada kusta tipe TT (Mitsuda-positif) dapat menghancurkan semua basil,

sehingga memberikan informasi antigen yang dieks-presikan pada permukaan (*mayor histocompatibility*) MHC kelas II, yang dipresentasikan oleh *antigen presenting cell* (APC), dan menginduksi imunitas selular. Proses ini terjadi dengan melibatkan sel Th-1 yang mensekresi interleukin-2 dan IFN- γ. Makrofag yang mengandung basil *M. leprae* akan menginduksi perkembangan sel-sel epiteloid.

Pada pasien kusta tipe LL (Mitsuda-negatif), makrofag-makrofag fagositik menghasilkan lisis bakteri parsial. Fosfolipid bakteri ditelan masuk dalam vakuola sitoplasmik, menghasilkan sel-sel lepra atau virchowcytes. Selama fase awal terjadi, tidak ada stimulasi imun yang berperan. Dugaan bahwa disfungsi mitokondria dari makrofag "Mitsuda-negatif" menyebabkan produksi radikal bebas berlebihan dan depresi fosfolipase lisosomal. Pada fase lanjut kusta lepromatosa, makrofag-makrofag lain dapat memfagosit virchowcytes, sehingga memberikan informasi neo-antigenik yang terekspresikan pada MHC kelas II, merangsang APC baru, mensekresi interleukin-4 dan menstimulasi imunitas humoral (Sutedja et al., 2016).

Mycobacterium leprae difagositosis oleh "makrofag mitsuda-positif" dapat dihancurkan secara sempurna; informasi antigenik normal dapat diperolah dan diekspresikan oleh permukaan sel. Adanya MHC kelas II, sel-sel APC dapat mensekresikan IL-12 dan menstimulasi sel Th-1 (CD4+) yang akhirnya akan memproduksi IL-2 dan IFN- γ. Makrofag-makrofag baru lalu teraktifasi dan menjadi sel-sel epitheloid. Namun, saat MHC kelas I terlibat, sel-sel limfosit T-sitotoksik (CD8+) dapat beraksi pada makrofag-makrofag lain untuk mengeliminasi organisme dengan cara apoptosis (Sari et al., 2013).

Pasien-pasien mitsuda-negatif hanya dapat terjadi lisis parsial dan fosfolipid bakteri tetap ada. Sel-sel lepra atau virchowcytes muncul dan difagositosis oleh makrofag lainnya; pada jalur ini, *new antigen presenting cells* (NAPCs) dengan modifikasi informasi antigenik dapat terlihat, dan menstimulasi imunitas humoral. Mekanisme ini dapat menjelaskan reaksi eritema nodosum (ENL)/ reaksi tipe 2 dan tipe 3 (fenomena Lucio) pada kusta LL (Sutedja et al., 2016).

Mycobacterium leprae yang sama dapat mengekspresikan antigen "normal" dan "predigesti".

Antigen presenting cells normal dapat terbentuk, imunitas selular dapat berkembang dan berakhir menjadi kusta TT pada pasien-pasien mitsuda-positif. Sedangkan pada pasien-pasien mitsuda-negatif, NAPCs muncul, imunitas humoral terstimulasi, reaksi tipe 2 (ENL) dan tipe 3 (fenomena Lucio) dapat terjadi. Kedua mekanisme tersebut meli-batkan sitokin-sitokin yang berbeda (Sari et al., 2013).

Respons imun seluler merupakan aspek penting dalam resistensi pejamu terhadap infeksi mikobakterial. Hipotesis mengatakan bahwa spektrum klinis kusta menunjukkan keseimbangan antara Th-1 dan Th-2. Terdapat regulasi silang antara kedua subset sel Th, yaitu sitokin-sitokin Th-1 akan menekan sel-sel Th-2 dan sebaliknya. Respons sel T terhadap mikobakteria akan mengaktivasi dan menyebabkan proliferasi sel-sel Th-1 dan melepaskan IL-2. Interleukin-2 menstimulasi ekspansi sel-sel Th-2 dan sel-sel NK pada lesi, sehingga menghasilkan peningkatan produksi IFN-γ. IFN-γ akan mengaktivasi makrofag, sehingga mensekresi IL-2. Keberadaan IL-2 dapat memacu SIS terhadap patogen intraselular pada kusta tuberkuloid. Pada kusta

lepromatous selama progresi penyakit terjadi yang sebaliknya (Sutedja et al., 2016).

Awalnya IL-10 dianggap sebagai faktor yang disekresi oleh sel-sel Th-2 dan akan menghambat sintesis sitokin dan proliferasi sel-sel Th-1, disamping monosit. Keseimbangan antara monosit penghasil IL -12 dan IL-10 penting untuk hasil akhir respons sitokin sel T. Beberapa sel Th-1 manusia juga ada yang menghasilkan IL-10, yang merupakan sitokin anti-inflamasi. Fungsi sel-sel Th-1 manusia bersifat heterogen, beberapa berfungsi sebagai pro-inflamasi dan yang lain sebagai anti-inflamasi. Kekuatan ekspresi IL-12 dan lemahnya ekspresi IL-10 pada lesi-lesi TT terjadi akibat lepasnya IFN- γ lokal (Trifunović et al., 2015).

Sekresi IL-12 oleh monosit akan memperkuat jalur sitokin Th-1, terlihat dari kemampuan IFN-memproduksi IL-12 lebih rendah pada pasien-pasien kusta LL. Berdasarkan penemuan-penemuan tersebut maka lesi-lesi LL menunjukkan ekspresi IL-10 yang kuat tetapi ekspresi IL-12 dan IFN- γ yang lemah,17 sehingga IL-10 berperan untuk induksi dan/atau mempertahankan keadaan anergi pasien kusta tipe lepromatosa (Mege et al., 2006).

BAB 4

INTERLEUKIN-10

Struktur, Produksi, dan Fungsi

Interleukin-10 termasuk ke dalam famili kelas II dari sitokin α-heliks yang tersusun dari interferon tipe I, interferon γ, dan interleukin-10. Fitur struktural utama adalah *left-handed anti-parallel four-helix bundle*. Subfamili seluler dari molekul tersebut termasuk interleukin-10, yang awalnya digambarkan sebagai faktor penghambatan sintesis sitokin, dan lima paralog bernama interleukin 19, 20, 22 (interleukin-10-related T cell derived inducible factor), 24 (melanoma differentiation-associated antigen 7), dan 26 (AK155). Subfamili Interleukin-10 viral yaitu interleukin-10 yang ditemukan di genom virus Epstein-Barr, dan tujuh anggota lain terdapat dalam DNA virus yang besar (herpesvirus dan poxvirus).

Klasifikasi famili interleukin-10 didasarkan pada analisis urutan dan struktur tiga dimensi *human interleukin-10* dan *Epstein-Barr virus interleukin-10*.

Anggota famili ini memiliki identitas urutan dengan human interleukin-10 berkisar dari 80% yang homolog dengan virus Epstein-Barr, equine herpesvirus, dan parapoxvirus ovine, hingga 20% yang homolog dengan virus cytomegalovirus, virus penyakit Yaba-like, dan paralog seluler manusia (Trivella et al., 2010).

Human interleukin-10 adalah protein yang tersusun dari 160 asam amino dengan berat molekul 18,5 kDa yang ada sebagai homodimer 37 kDa. Molekul ini diproduksi oleh makrofag yang teraktivasi, sel dendritik, dan limfosit B. Secara natural sel T CD4+ regulator (Tregs), yang mengekspresikan membran CD25 dan represor transkrip FOXP3 (forkhead box P3), dan antigen-specific inducible Tregs, yang tidak mengekspresikan CD25 sampai diaktifkan melalui reseptor sel-T, merupakan sumber penting interleukin-10. Produksi interleukin-10 diatur pada tingkat translasi dan transkripsinya (Wolk et al., 2005).

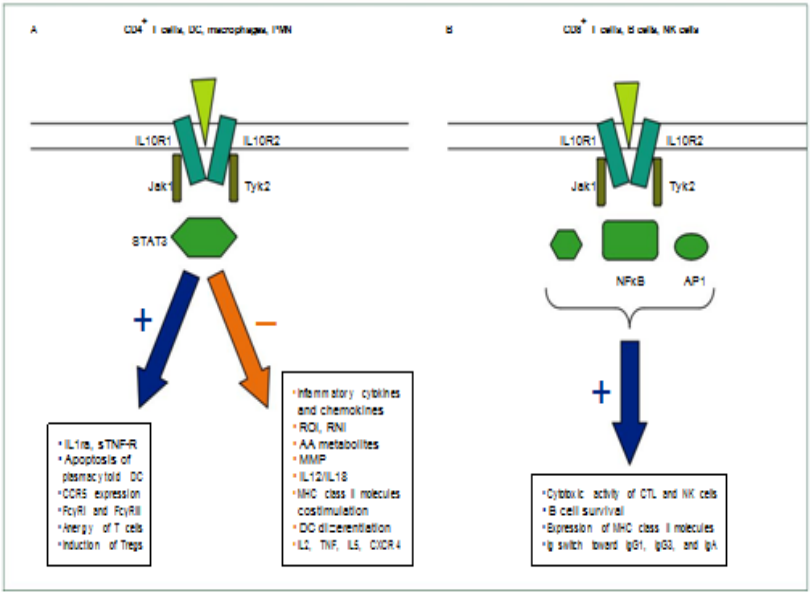
Polimorfisme yang berbeda telah ditemukan di wilayah 5´ dari gen *human interleukin-10*, termasuk dua polimorfisme mikrosatelit berulang (1,2 kb dan 4 kb upstream dari situs awal transkripsi) dan tiga titik mutasi

(pada –1082 [G/A], –819 [C/T], dan –592 [C/A]). Genotipe interleukin-10 dan respon fungsional terkait satu sama lain. Memang, mutasi titik -1082 [G] dikaitkan dengan peningkatan produksi interleukin-10 dalam sel T dan monosit.

Reseptor sitokin α-heliks terdiri dari modul pengikat ekstraseluler, selaput heliks yang membentang, dan domain intraseluler. Dua subunit diperlukan untuk menghasilkan kompleks reseptor fungsional. Sangat menarik untuk dicatat bahwa kompleks interleukin-10 receptor (10R) secara struktural analog dengan kompleks interferon-γ-receptor. Selain itu, kompleks reseptor dan ligan interleukin-10 dan interferon γ, masing-masing memiliki struktur kuartener yang sama (Opdal, 2004).

Molekul dari famili interleukin-10 berinteraksi dengan interleukin-10R, yang terdiri dari interleukin-10R1 (subunit pengikatan ligan) dan interleukin-10R2 (subunit aksesori untuk pensinyalan). Interaksi interleukin-10 dengan reseptornya melibatkan Jak1 dan Tyk2, yang terutama mengaktifkan STAT3, faktor transkripsi umum hilir interleukin-10 – interleukin-10R

yang memediasi sebagian besar aksi penghambatan interleukin-10 pada respon imun bawaan dan adaptif.



Gambar 1: efek Immunoregulator dan stimulasi interleukin-10 (A) Interleukin-10 viral dan mamalia berinteraksi dengan interleukin-10R (IL10R) yang diekspresikan pada monosit, makrofag, sel dendritik, sel T CD4+, dan neutrofil polimorfonuklear (PMN). STAT3 adalah faktor transkripsi yang sebagian besar terlibat dalam aksi penghambatan interleukin-10 termasuk

penghambatan NFkB. Interleukin-10 menghambat berbagai fungsi inflamasi, presentasi antigen, dan menstimulasi respon lain dalam sel-sel kekebalan tubuh. (B) Interleukin-10 viral dan mamalia berinteraksi dengan sel T CD8+, sel B dan sel NK, di mana mereka menstimulasi NFkB dan AP-1. Hal ini menyebabkan aktivitas sitotoksik sel T CD8+ dan sel NK, dan aktivasi sel B. AA = asam arakidonat. DC = sel dendritik. MMP = matriks metalloproteinase. RNI = intermediet nitrogen reaktif. ROI = intermediet oksigen reaktif.

Interleukin-10 adalah regulator utama imunitas bawaan (gambar 1). Hal tersebut terinterferensi dengan produksi mediator inflamasi oleh neutrofil polimorfonuklear, monosit, dan makrofag sebagaimana peningkatan ekspresi molekul yang memperkuat efek anti-inflamasi interleukin-10. Peran anti-inflamasi ini diilustrasikan pada tikus percobaan dengan defisiensi interleukin-10 yang kemudian menderita penyakit radang usus kronis karena respon imun bawaan yang tidak tepat terhadap antigen bakteri usus (Commins et al., 2008).

Interleukin-10 mengatur respon imun adaptif melalui efeknya pada sel-sel yang menyajikan antigen dan sel T. Dalam sel yang menyajikan antigen, interleukin-10 menghambat produksi interleukin 12 dan interleukin 18, serta mengurangi ekspresi molekul MHC kelas II dan molekul ko-stimulasi. Selain itu, interleukin-10 merusak diferensiasi monocyte-derived dendritic cells, induksi apoptosis dalam sel dendritik plasmacytoid, dan mengubah migrasi sel dendritik dengan memodulasi ekspresi permukaan reseptor kemokin. Interleukin-10 langsung mempengaruhi fungsi sel T CD4+ dengan menghambat ekspresi interleukin 2, tumor necrosis factor (TNF), interleukin 5, chemokine reseptor CXCR4, dan respon terhadap stromal cell-derived factor-1.

Aktivasi sel T dalam keberadaan interleukin-10 dapat menginduksi non-responsif atau anergi yang tidak dapat dibalikkan oleh stimulasi interleukin 2. Percobaan microarray menunjukkan bahwa interleukin-10 adalah stimulator poten dari sel natural killer (NK) serta CD8 + sitotoksik T sel (CTL). Sangat menarik untuk dicatat bahwa interleukin-10 mengaktifkan NFkB dan AP-1 dalam sel T CD8+ tetapi menghambat mereka dalam

monosit dan sel T CD4+. Interleukin-10 juga menstimulasi sel B murine dan manusia dengan meningkatkan ekspresi MHC molekul kelas II dan meningkatkan kelangsungan hidup (Wolk et al., 2005).

Interleukin-10 adalah switch factor untuk IgG1 dan IgG3, sedangkan transformasi faktor pertumbuhan β adalah switch factor untuk IgA1 dan IgA2. Interleukin-10 mengembalikan produksi IgA oleh sel B dari pasien dengan defisiensi IgA yang diaktifkan oleh antibodi anti-CD40. Pengaruh interleukin-10 mungkin dimediasi oleh sel dendritik dan makrofag melalui ekspresi CXCL-13, yang merekrut dan mengaktifkan sel B, dan SLAM (*signalling lymphocytic activation molecule*), pengaktif sel B. Pengaruh ini pada sel B dapat menjelaskan adanya tingkat sirkulasi antibodi yang tinggi termasuk IgA yang terkait dengan kelebihan produksi interleukin-10 dalam situasi klinis (Brightbill et al., 2000).

Peran Interleukin-10 terhadap Infeksi

Resolusi infeksi tergantung pada kemampuan inang untuk mengaktifkan respons imun protektif

terutama berdasarkan perekrutan efektor imunokompeten dan pembentukan memori imun. Ketika respon imun terganggu, seperti pada keadaan imunodefisiensi primer dan sekunder, infeksi tidak lagi terkontrol. Namun, respon imun yang berlebihan terhadap suatu infeksi sehingga menimbulkan kerusakan jaringan atau lesi sistemik yang berat juga dapat mengganggu pasien. Dengan kata lain, mekanisme imunoregulator diperlukan untuk membentuk amplitudo respon imun dan untuk mencegah lesi terkait infeksi (Mege et al., 2006).

Interleukin-10 adalah molekul imunoregulasi yang krusial, yang merupakan anggota famili yang terdiri dari sitokin seluler dan sitokin viral. Versi selulernya diproduksi oleh sel-sel myeloid, sel B, dan seperti yang baru-baru ini dilaporkan, oleh sel-sel regulator. Banyak bakteri, virus, atau parasit mampu merangsang produksi interleukin-10 oleh sel inang. Versi virus dari molekul ini diyakini bertindak sebagai umpan molekuler yang mengarah pada penghindaran kekebalan tubuh (Couper et al., 2008).

Interleukin-10 bertindak sebagai sitokin multifungsi pada penyakit menular. Keberadaan yang

tinggi dari Interleukin-10 dapat menciptakan kondisi yang menguntungkan bagi persistensi mikroba dan penyakit infeksi kronis. Namun, peran Interleukin-10 dalam mengendalikan respon imun juga penting untuk mencegah reaktivitas terhadap self-antigen dan melemahkan respon imun yang berlebihan yang dapat menyebabkan lesi jaringan yang merusak (Mege et al., 2006).

Kerentanan terhadap infeksi Primer

Interleukin-10 meningkatkan kerentanan pejamu untuk berbagai mikroorganisme intraseluler seperti *Mycobacterium bovis* (*Calmette-Guérin bacillus*) dan *environmental mycobacteria* (*Mycobacterium avium*) pada model hewan karena dengan mengurangi jumlah interleukin-10 maka akan meningkatkan ketahanan terhadap infeksi dan dengan meningkatkannya maka akan merusak ketahanan terhadap infeksi. Temuan ini telah ditinjau secara mendalam (tabel 3).

Interleukin-10 meningkatkan kerentanan pejamu terhadap bakteri ekstraseluler seperti *Streptococcus pneumonia*e, *Klebsiella pneumoniae*, dan *Pseudomonas*

aeruginosa dalam model infeksi primer. Interleukin-10 memiliki peran pelengkap untuk interleukin 4, macrophage-deactivating cytokine yang lain, dalam peningkatan kerentanan tikus untuk murine leishmaniasis. Sebaliknya, interleukin-10 mengurangi kerentanan terhadap penyakit prion mungkin melalui downmodulation sitokin inflamasi yang tampaknya penting untuk memulai penyakit (Mege et al., 2006).

Selain penyederhanaan studi pada hewan, peran interleukin-10 dalam kerentanan terhadap penyakit infeksi dipertanyakan, terutama pada infeksi mikobakteri (tabel 3). Interleukin-10 tampaknya dikaitkan dengan peningkatan kerentanan terhadap infeksi yang disebabkan oleh mikobakteri yang tumbuh cepat. Produksi interleukin-10 meningkat pada monosit yang dirangsang oleh *M. avium* dari pasien yang terinfeksi HIV dan produksi tertinggi pada pasien dengan AIDS lanjut. Pada penyakit ulkus Buruli, yang disebabkan oleh *M. ulcerans*, produksi interleukin-10 meningkat dan tingkatnya lebih tinggi pada pasien dengan ulkus dibandingkan pada pasien dengan nodul.

	Infectious disease	Human beings (with key approach)	Mouse model (with key approach)
M bovis	Mycobacterial infection	..	KO mice[15,17,18] mAb to interleukin 10R[16]
M avium	Opportunistic infections	Circulating interleukin 10, interleukin 10 production[19]	mAb to interleukin 10[20,21] Human interleukin 10 overexpression[22]
Mycobacterium tuberculosis	Tuberculosis	Interleukin 10 production in lesions[23] Interleukin 10 production and SLC11A1 gene polymorphism[25] Polymorphism of interleukin 10 gene[27-29] Interleukin 10 production[30,32] Circulating interleukin 10[33]	*KO mice[24,26]
Mycobacterium leprae	Leprosy	Interleukin 10 production in lesions[13] Interleukin 10 production[34] Polymorphism of interleukin 10 gene[35,36]	..
Mycobacterium ulcerans	Buruli ulcer disease	Interleukin 10 production in lesions[37]	
Klebsiella pneumoniae, *Streptococcis pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*	Pneumonia	..	mAb to interleukin 10[38] mAb to interleukin 10[39] mAb to interleukin 10[40]
Neisseria meningitidis	Meningococcal disease	Polymorphism of interleukin 10 gene[41,42]	
Listeria monocytogenes	Listeriosis	..	mAb to interleukin 10[43] Interleukin 10 administration[44] KO mice[45,46]
Chlamydia trachomatis	Venereal lymphogranulomatis, trachoma	Polymorphism of interleukin 10 gene[47]	KO mice[48]

Leishmania major, *Leishmania mexicana* *Leishmania aethipica*	Cutaneous leishmaniasis	Interleukin 10 production[49] Interleukin 10 production in lesions[51]	KO mice[50] KO mice[52] Treg transfer[53] Tregs[54] KO mice, anti-interleukin 10 mAb[55] KO mice[56] Tregs (review)[57] KO mice[58]
Leishmania donovani	Visceral leishmaniasis	Interleukin 10 production[59,60]	Treg cells (review)[57]
Toxoplasma gondii	Toxoplasmosis	..	KO mice[61]
Aspergillus fumigatus	Aspergillosis	..	KO mice[62]
Cryptococcus neoformans	Cryptococcosis	..	KO mice[63]
Candida albicans	Candidosis	..	KO mice[62]
Epstein-Barr virus	Infectious mononucleosis, lymphoma	Polymorphism of interleukin 10 gene[64]	..
Prion	Prion disease	..	KO mice[65]

*Susceptibility of mice to *M tuberculosis* does not depend on interleukin 10. mAb=monoclonal antibodies. KO=knockout.

Tabel 3. Peran Interleukin-10 dalam Kerentanan terhadap Infeksi Primer

Pada infeksi yang disebabkan oleh mikobakteri yang tumbuh lambat, interleukin-10 merupakan salah satu faktor dalam peningkatan kerentanan terhadap penyakit. Produksi interleukin-10 lebih tinggi pada pasien dengan tuberkulosis aktif dibandingkan pada responden tes kulit tuberkulin. Interleukin-10 lebih tinggi di jaringan dari pasien dengan kusta lepromatosa dibandingkan pada pasien dengan kusta tuberkuloid, mencerminkan polarisasi

Th2. Namun, produksi interleukin-10 juga meningkat pada sel-sel cairan pleura dari pasien dengan pleuritis TB di mana prognosis menguntungkan dan respon imun condong ke arah respon Th1 (Prasse et al., 2007).

Studi genetik menunjukkan bahwa pada populasi umum, tuberkulosis dan lepra berhubungan dengan polimorfisme genetik (HLA-DR2; SLC11A.1, sebelumnya NRAMP-1) dan dengan lokus yang rentan. Pada pasien dengan tuberkulosis paru yang membawa alel 2 dari SLC11A.1, produksi interleukin-10 meningkat. Hubungan antara kerentanan tuberkulosis dan polimorfisme pada posisi –1082 pada gen interleukin-10 telah dilaporkan pada pasien di Negara Kamboja, tetapi tidak pada pasien di Negara Spanyol atau Gambian.

Interleukin-10 adalah satu kandidat untuk meningkatkan kerentanan terhadap leishmania. Interleukin-10 tidak diekspresikan pada kulit pasien dengan leishmaniasis kulit yang menunjukkan lesi penyembuhan diri, tetapi dinyatakan dalam dermis dan epidermis dari pasien dengan leishmaniasis tanpa penyembuhan. Visceral leishmaniasis, bentuk klinis yang paling parah dari penyakit ini, dikaitkan dengan replikasi

parasit di jaringan perifer, hipersensitivitas tipe lambat yang rusak, dan peningkatan jumlah transkripsi interleukin-10 di sumsum tulang (Jarduli et al., 2013).

Berbeda dengan infeksi mikobakteri dan leishmanial, peran interleukin-10 pada penyakit meningokokus, di mana respon inflamasi sangat penting untuk prognosis, tidak ambigu. Prognosis yang buruk dikaitkan dengan jumlah interleukin-10 yang tinggi. Keluarga dengan produksi interleukin-10 tinggi memiliki peningkatan risiko untuk penyakit meningokokal fatal, yang diperkuat oleh produksi TNF yang rendah. Hasil penyakit meningokokus dikaitkan dengan polimorfisme gen interleukin-10 pada posisi -1082. Kesimpulannya, jika peran interleukin-10 tampaknya sangat penting dalam kerentanan atau resistensi pada model hewan dari infeksi, analisis situasi klinis mengungkapkan peran molekul yang tidak dapat dikesampingkan. Sangat mungkin bahwa polarisasi respon imun lebih penting daripada imunomodulasi dari efektor imun (Tu, 2006).

Ketahanan Mikroba dan Evolusi Penyakit Infeksi

Interleukin-10 jelas terlibat dalam persistensi bakteri pada pejamu melalui induksi keadaan anergi dan, akibatnya, dalam evolusi penyakit menular. Berbeda dengan perannya dalam kerentanan, banyak laporan klinis mendukung peran interleukin-10 dalam evolusi penyakit infeksi. Salah satu contohnya adalah *Q fever*, penyakit infeksi karena *Coxiella burnetii*. Demam Q ditandai oleh infeksi primer yang sering asimtomatik dan dapat menjadi kronis pada pasien dengan *valvulopathy* atau gangguan kekebalan (Trifunović et al., 2015).

Beberapa penelitian telah memberikan bukti bahwa perkembangan penyakit tergantung pada interleukin-10. Sebagai contoh, interleukin-10 diproduksi berlebihan oleh monosit dari pasien dengan endokarditis demam Q dan mereka yang berasal dari pasien dengan demam Q akut dan *valvulopathy*. Risiko yang terkait dengan pengembangan endokarditis demam Q, manifestasi utama demam Q kronis, terkait dengan produksi berlebihan dari interleukin-10.

Interleukin-10 mengganggu aktivasi makrofag dengan merangsang secara khusus replikasi *Coxiella burnetii* dengan menurunkan produksi TNF74 dan memblokir pematangan fagosomal. Fagosom yang mengandung *Coxiella burnetii* berfusi dengan lisosom dalam monosit dari pasien dengan demam Q akut. Namun, fagosom ini tidak dapat berfusi dengan lisosom dalam monosit dari pasien dengan endokarditis demam Q. Dengan menetralkan interleukin-10 dapat mengoreksi cacat fagosom-lisosom.

Selanjutnya, interleukin-10 mungkin mengganggu pembentukan granuloma, yang penting untuk perlindungan terhadap *Coxiella burnetii* dengan mengubah *trafficking* leukosit. Kemudian, migrasi transendotelial leukosit rusak pada endokarditis demam Q dan terkait dengan kelebihan produksi interleukin-10 (Mege et al., 2006).

Interleukin-10 terlibat dalam persistensi *M. tuberculosis*. Dalam kebanyakan kasus setelah infeksi primer, sistem kekebalan tubuh dapat mengandung infeksi, tetapi perkembangan latensi dapat dipecah, menghasilkan reaktivasi tuberkulosis. Reaktivasi

dikaitkan dengan produksi interleukin-10 yang berlebihan dan munculnya interleukin-10 yang menghasilkan Tregs, yang diilustrasikan oleh model hewan *overexpressing* interleukin-10.

Contoh ketiga dari infeksi bakteri yang melibatkan interleukin-10 adalah *Bartonella quintana*, yang menyebabkan bakteremia asimtomatik kronis yang merupakan model persistensi bakteri pada orang-orang tunawisma. Sebaliknya, pada orang-orang tunawisma tanpa infeksi ini yang memiliki profil peradangan, mereka dengan *B. quintana* bakteremia memiliki profil inflamasi yang dilemahkan dan peningkatan yang ditandai dalam sekresi interleukin-10 oleh sel-sel mononuklear. Interleukin-10 dikaitkan dengan persistensi *Bartonella henselae*, agen penyebab penyakit goresan kucing (Trifunović et al., 2015).

Persistensi virus mungkin hasil dari eksploitasi properti *viral interleukin-10*. *Viral interleukin-10* mungkin terlibat dalam *viral immunosuppression*. Namun, sifat-sifat cytomegalovirus interleukin-10 berbeda dari virus Epstein-Barr interleukin-10, yang menunjukkan bahwa virus telah mengembangkan metode independen

tetapi konvergen untuk keluar dari sistem kekebalan tubuh. Memang, virus Epstein-Barr interleukin-10 diekspresikan selama fase litik infeksi dan memfasilitasi infeksi laten dengan menekan respon imun antivirus.

Virus Epstein-Barr interleukin-10 telah kehilangan banyak sifat imunostimulan dari mamalia interleukin-10 tetapi mengganggu perkembangan respon Th1 spesifik. Sebaliknya, cytomegalovirus interleukin-10 diproduksi selama infeksi sitomegalovirus produktif dan laten dari sel permisif. Persistensi virus seperti HIV dan virus hepatitis B dan C dapat terjadi akibat imunosupresi sekunder akibat produksi interleukin-10 yang tidak sesuai oleh sel mamalia (Trivella et al., 2010).

Pasien dengan perkembangan AIDS memiliki lebih banyak interleukin-10 dibandingkan pasien yang tidak berkembang. Individu yang membawa alel -592 [A/A] dari gen interleukin-10 berada pada risiko tinggi infeksi HIV-1 dan, sekali terinfeksi, cepat berkembang menjadi AIDS. Sebaliknya, alel -592 [C/C] dikaitkan dengan non-progresif jangka panjang. Interleukin-10 dan persistensi HIV diyakini terkait karena terapi antiretroviral yang sangat aktif yang menginduksi pembersihan parsial

HIV, dapat menginduksi penurunan parsial dalam produksi interleukin-10. Sangat mungkin bahwa interleukin-10 juga terlibat dalam persistensi virus hepatitis pada manusia.

Polimorfisme spesifik Interleukin-10, haplotipe, dan mikrosatelit tampaknya terkait dengan hasil infeksi, tetapi hal ini masih diperdebatkan. Ekspansi *interleukin-10-producing Tregs* mungkin penting untuk persistensi virus seperti yang dilaporkan untuk pasien yang terinfeksi dengan virus hepatitis C, pasien hepatitis B kronis, dan HIV dengan perkembangan penyakit atau replikasi virus. Konsekuensi fungsional dari perluasan *interleukin-10-producing Tregs* dalam infeksi HIV mungkin merupakan kerusakan produksi interferon oleh sel T CD8+ (Eskdale et al., 1999).

Persistensi virus yang dimediasi oleh interleukin-10 juga dapat mendukung penyakit yang dipicu oleh infeksi. Konsentrasi interleukin-10 lebih tinggi pada pasien HIV dengan *hypergammaglobulinaemia* dibandingkan dengan yang tidak. Peningkatan produksi interleukin-10 dan IgG pada pasien yang menerima bolus tunggal imunoglobulin intravena menunjukkan

kemungkinan adanya loop amplifikasi. Interleukin-10 mungkin juga terlibat dalam pengembangan limfoma sel B non-Hodgkin. Serum interleukin-10 lebih tinggi pada pasien terinfeksi HIV dengan limfoma daripada mereka yang tidak. Selain itu, waktu produksi interleukin-10 terkait dengan terjadinya limfoma. Penyakit *Multicentric Castelman* dikaitkan dengan virus herpes manusia, viral load, dan konsentrasi interleukin-10 dalam plasma sehubungan dengan infeksi HIV (Mege et al., 2006).

Proteksi pada Cedera Jaringan Infeksi

Telah dijelaskan bahwa interleukin-10 terlibat dalam evolusi penyakit infeksi dan akibatnya membahayakan kesehatan melalui imunosupresi pejamu. Namun, interleukin-10 juga memiliki peran lain yang dapat melindungi pejamu dari reaksi inflamasi, respon imun berlebihan, dan cedera jaringan sekunder akibat infeksi akut atau kronis. Hal ini diilustrasikan oleh tikus dengan defisiensi interleukin-10 yang mengembangkan kolitis yang dipicu oleh flora komensal.

Interleukin-10 membatasi perkembangan lesi yang disebabkan oleh respon inflamasi eksaserbasi yang diinduksi selama infeksi akut. Efek perlindungannya diilustrasikan dalam model hewan yang berbeda dari infeksi akut. Interleukin-10 adalah pelindung pada sepsis manusia dan efeknya mungkin secara genetis ditentukan. Genotipe -592 [C/C] interleukin-10 dikaitkan dengan produksi molekul yang tinggi dan tingkat kelangsungan hidup yang tinggi, sedangkan genotipe [A/A] atau [A/C] terkait dengan produksi yang rendah dan kematian pasien yang tinggi.

Namun, efek interleukin-10 pada pasien dengan sepsis adalah kompleks. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa terjadi peningkatan jumlah interleukin yang terus-menerus 10 pada pasien yang tidak selamat. Interleukin-10 diperlukan untuk mengatasi reaksi peradangan berlebihan tetapi jumlah yang lebih tinggi justru merusak karena dapat menghapuskan reaksi peradangan (Opdal, 2004).

Interleukin-10 juga mencegah komplikasi infeksi parasit akut seperti malaria. Jumlah interleukin-10 dalam plasma tinggi pada pasien dengan malaria tanpa

komplikasi, menurun pada pasien dengan anemia berat, dan terendah pada pasien dengan malaria serebral. Sebuah rasio interleukin-10/TNF lebih rendah dari 1 merupakan faktor risiko untuk malaria serebral dan anemia berat, sedangkan rasio lebih tinggi dari 1 adalah umum pada pasien hiperparasitemik tanpa komplikasi.

Namun, jaringan sitokin dapat dimodulasi pada malaria, yang mencerminkan hubungan yang rumit antara produksi sitokin dan manifestasi penyakit. Dalam kelompok besar pasien dari Mali, jumlah interleukin-10 dan sitokin inflamasi lebih tinggi pada pasien dengan malaria komplikasi daripada mereka yang tanpa komplikasi (Mege et al., 2006).

BAB 5

POLIMORFISME

Mutasi

Bahan genetik, baik DNA maupun RNA, dapat mengalami perubahan. Perubahan tersebut dapat terjadi di tingkat urutan gen (mutasi titik) hingga tingkat kromosom (aberasi). Mutasi titik dapat menyebabkan variasi alel hingga dapat mengarah pada munculnya alel baru. Hal ini dapat menyebabkan munculnya variasi-variasi baru pada berbagai spesies. Variasi ini biasanya muncul dengan frekuensi kecil di alam, yaitu kurang dari 1:10.000 individu. Mutasi ini dapat menyebabkan perubahan sifat (fenotipe) pada individu, yang disebut juga mutan. Individu yang tidak mengalami perubahan sifat disebut dengan *wild type*. Dalam bidang genetik, mutan seringkali dibandingkan dengan *wild type*.

Terdapat macam-macam mutasi berdasarkan bagian yang bermutasi, yaitu: (Campbell et al., 2016)

A. Mutasi titik. Mutasi titik merupakan perubahan pada basa N dari DNA atau RNA. Mutasi titik relatif sering terjadi namun efeknya dapat dikurangi oleh mekanisme pemulihan gen. Mutasi titik dapat berakibat berubahnya urutan asam amino pada protein, dan dapat mengakibatkan berkurangnya, berubahnya atau hilangnya fungsi enzim tertentu. Teknologi saat ini menggunakan mutasi titik sebagai marker (disebut *single nucleotide polymorphisms*/SNPs) untuk mengkaji perubahan yang terjadi pada gen dan dikaitkan dengan perubahan fenotip yang terjadi.

B. Aberasi. Mutasi kromosom, sering juga disebut dengan mutasi besar/gross mutation atau aberasi kromosom, adalah perubahan jumlah kromosom dan susunan atau urutan gen dalam kromosom. Mutasi kromosom sering terjadi karena kesalahan meiosis dan sedikit dalam mitosis.

C. Delesi. Sebuah fragmen kromosom yang patah dan hilang pada saat pembelahan sel dapat menyebabkan delesi. Kromosom tempat fragmen tersebut berasal kemudian akan kehilangan gen-gen tertentu. Namun,

dalam beberapa kasus, fragmen patahan tersebut dapat berikatan dengan kromosom homolog, menghasilkan duplikasi. Fragmen tersebut juga dapat melekat kembali pada kromosom asalnya dengan arah terbalik, menghasilkan Inversi (Campbell et al., 2016).

Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs)

Single nucleotide polymorphism atau SNP adalah variasi sekuens DNA yang terjadi ketika satu nukleotida (A, T, C, atau G) dalam urutan genom diubah. Sebagai contoh, SNP mungkin mengubah urutan DNA AAGGCTAA untuk ATGGCTAA. Untuk menyatakannya sebagai suatu variasi, SNP harus terjadi pada setidaknya 1% dari populasi. SNPs, yang membentuk sekitar 90% dari semua variasi genetik manusia, terjadi setiap 100-300 basa di sepanjang tiga milyar dasar genom manusia. Dua dari setiap tiga SNPs melibatkan penggantian sitosin (C) dengan timin (T). SNPs dapat terjadi dalam daerah *coding* dan *noncoding* genom. Banyak SNPs tidak berpengaruh pada fungsi sel, namun para saintis yakin bahwa SNP dapat menjadi predisposisi

suatu penyakit atau memengaruhi respon terhadap suatu obat (Campbell et al., 2016).

Meskipun lebih dari 99% dari urutan DNA manusia sama, variasi sekuens DNA dapat memiliki dampak yang besar pada bagaimana manusia menanggapi penyakit; faktor lingkungan seperti bakteri, virus, racun, dan bahan kimia, serta obat-obatan dan terapi lain. Oleh karena itu, SNPs penting untuk penelitian biomedis dan untuk mengembangkan produk farmasi atau menegakkan diagnosis medis. SNPs juga stabil secara evolusi, tidak berubah banyak dari generasi ke generasi, membuat mereka lebih mudah untuk diikuti dalam studi populasi. Para ilmuwan percaya bahwa peta SNPs akan membantu mereka mengidentifikasi beberapa gen yang terkait dengan penyakit kompleks seperti kanker, diabetes, penyakit jantung dan pembuluh darah, serta beberapa bentuk penyakit mental. Asosiasi ini sulit untuk ditentukan dengan metode penelusuran gen konvensional karena perubahan pada satu gen hanya memberikan kontribusi yang kecil pada penyakit. Beberapa kelompok peneliti bekerja untuk menemukan SNPs dan pada akhirnya membuat peta SNPs genom manusia, diantaranya adalah

US Human Genome Project (HGP) dan kelompok besar perusahaan farmasi seperti proyek SNP TSC Konsorsium. Kemungkinan duplikasi di antara kelompok-kelompok ini kecil karena terdapat lebih kurang 3 juta SNPs, dan potensi *payoff* dari sebuah peta SNP tinggi (Gray et al., 2000).

Selain untuk farmakogenomik, diagnostik, dan implikasi penelitian biomedis, peta SNP dapat digunakan untuk membantu pengidentifikasian ribuan marker tambahan di dalam genom, sehingga penyederhanaan arah dari peta genom yang jauh lebih besar dapat dihasilkan oleh peneliti HGP.

Faktor Risiko Suatu Penyakit

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) tidak menyebabkan penyakit, tetapi dapat membantu menentukan kerentanan seseorang terkena penyakit tertentu. Sebagai contoh yang baik tentang bagaimana SNPs mempengaruhi perkembangan penyakit adalah salah satu gen yang terkait dengan penyakit Alzheimer, yaitu apolipoprotein E atau ApoE. ApoE berisi dua SNPs yang menghasilkan tiga kemungkinan alel untuk gen ini,

yaitu E2, E3, dan E4. Setiap alel berbeda oleh satu basis DNA, dan produk protein setiap gen berbeda dengan satu asam amino.

Setiap individu mewarisi satu salinan ApoE dari ibu dan satu salinan ApoE dari pihak ayah. Sebagai contoh, penelitian telah menunjukkan bahwa orang yang mewarisi setidaknya satu alel E4 akan memiliki kesempatan lebih besar untuk berkembang menjadi penyakit Alzheimer. Rupanya, perubahan satu asam amino dalam protein E4 dapat mengubah struktur dan fungsinya, dan perubahan ini sudah cukup untuk memungkinkan perkembangan suatu penyakit. Sebaliknya, pewarisan dalam alel E2, mengindikasikan bahwa seseorang lebih kecil kemungkinannya untuk menderita Alzheimer (Goodin & Khankhanian, 2014).

Tentu saja, SNPs buka indikator yang mutlak bagi perkembangan suatu penyakit. Seseorang yang telah mewarisi dua alel E4 mungkin tidak akan pernah menderita penyakit Alzheimer, sementara yang lain yang telah mewarisi dua alel E2 mungkin terkena penyakit tersebut. ApoE hanyalah salah satu gen yang telah dikaitkan dengan Alzheimer. Seperti hal nya penyakit-

penyakit kronis seperti penyakit jantung, diabetes, atau kanker, Alzheimer adalah penyakit yang dapat disebabkan oleh variasi dalam beberapa gen. Sifat poligenik dari penyakit-penyakit tersebut membuat tes genetik bagi mereka begitu rumit (Fareed & Afzal, 2013).

Aspek Genetika Penyakit Kusta

Penyebab kusta pertama kali diperkenalkan oleh seorang dokter Norwegia bernama Gerhard Henrik Armauer Hansen. Hansen mempertanyakan hipotesis Daniel Cornelius Danielssen dan Carl Wilhelm Boeck yang menyatakan bahwa kusta merupakan penyakit herediter (*hereditary discrasia*).

Alasan utama dari pertentangan mengenai hipotesis ini adalah ditemukannya basil dalam nodul kusta yang menggiring hipotesis Hansen bahwa kusta adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri. Perjuangan Hansen untuk membuktikan kausabilitas dan transmisibilitas dari penyakit kusta berakhir pada percobaan kriminal yang dilakukannya pada tahun 1879. Hansen menginokulasi mata dari seorang wanita dengan

material dari nodul kusta. Hasilnya, wanita tersebut tidak terkena penyakit kusta (Alter et al., 2008).

Usaha Hansen untuk membuktikan kausabilitas kusta dengan mengabaikan peran hereditas tentu merupakan salah satu kekurangannya. Chaudhury dkk (1994) mengatakan bahwa 90% mayoritas individu yang terekspos dengan *M. lepra* sebenarnya asimptomatik sehingga progresi dari eksposure untuk menjadi penyakit memerlukan faktor risiko tambahan. Subjek Hansen mungkin secara sukses telah diinokulasi dengan M. leprae tapi kekurangan faktor tambahan –kemungkinan faktor risiko genetik– untuk terjadinya penyakit kusta.

Kusta, sebagaimana penyakit menular lainnya, menyajikan situasi di mana faktor etiologis (yaitu agen infeksi) diperlukan tetapi seringkali tidak cukup untuk menyebabkan timbulnya manifestasi klinis penyakit. Timbulnya suatu penyakit seringkali membutuhkan faktor risiko tambahan seperti lingkungan dan / atau genetik, yang terlihat tidak terlalu penting namun memiliki kontribusi yang cukup besar dalam terjadinya suatu penyakit.

Satu abad setelah penemuan *M. leprae* — dan lama setelah kematian Hansen, Danielssen dan Boeck — muncul data untuk merekonsiliasi perbedaan ilmiah mereka. Charles C. Shepard mampu secara reproduktif menginduksi granuloma yang mengandung basil tahan asam di telapak kaki tikus setelah injeksi dengan bakteri dari saluran hidung atau lesi kulit kasus kusta manusia. Selanjutnya, histopatologi yang sama diamati setelah injeksi material dari telapak kaki tikus tersebut menunjukkan transmisibilitas fenotipe granulomatosa (Shepard, 1960).

Segera setelah itu, Chakravartti dan Vogel menunjukkan bahwa konkordansi kusta dan bentuk klinis yang dihasilkan lebih tinggi di antara kembar monozigot yang identik secara genetik (60-85%) dibandingkan dengan kembar dizigot (5-20%) (Chakravartti et al., 1973). Studi lain menunjukkan pengelompokan keluarga berdasarkan penyakit (Shields et al., 1987) dan analisis segregasi mendukung model poligenik pewarisan yang mencakup gen-gen kerentanan utama (Abel & Demenais, 1988). Secara kolektif, publikasi tersebut menekankan

pentingnya patogen dan genetika pejamu terhadap patogenesis kusta.

Upaya berkelanjutan untuk mengidentifikasi faktor risiko genetik kusta meliputi studi asosiasi gen kandidat dan analisis hubungan genomik dalam sampel dari negara-negara endemik. Salah satu hal yang mungkin memfasilitasi upaya ini adalah penelitian yang menunjukkan bahwa perbedaan kerentanan terkena penyakit kusta tidak dipengaruhi oleh berbagai jenis *M. leprae*. Di antara tujuh sampel bakteri dari geografis yang berbeda, hanya lima single nucleotide polymorphism (SNP) yang ditemukan dalam 142 kilo-basa (kb) dari urutan genom — frekuensi SNP yang sangat rendah (SNP per 28 kb). Selain itu, hanya empat kombinasi SNP yang diamati, masing-masing dengan distribusi global terbatas (misalnya SNP-tipe 1 dibatasi untuk Asia, wilayah Paciffic dan Afrika Timur) (Monot et al., 2009).

Oleh karena mutasi pada *M. leprae* sangat sedikit terjadi dan tidak mempengaruhi kerentanan terhadap kusta, maka studi mengenai genetik pejamu sangat memungkinkan untuk dianalisis. Berbagai gen dan daerah genomik manusia telah dikaitkan dengan kerentanan

terhadap kusta atau bentuk klinis tertentu dari kusta. Banyak dari hubungan ini, bagaimanapun, mungkin tidak dapat dihasilkan dari populasi yang berbeda, mungkin karena banyak faktor perancu seperti kurangnya stratifikasi populasi, ukuran sampel kecil, faktor etnis campuran, dan banyak lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa kerentanan terhadap kusta bersifat multigenik, dengan tingkat heterogenitas yang tinggi di antara populasi yang berbeda. Dalam pengertian ini, model genetik yang kompleks tentang kerentanan terhadap kusta bisa membuat deteksi tautan menjadi sulit (Abel et al., 1995).

Kelangsungan hidup *M. leprae*, respon imun innate dan adaptif, serta interaksi antara protein pejamu dan antigen bakteri yang mencegah invasi dan infeksi oleh basil, telah dikaitkan dengan banyak faktor genetik. Kompleksitas yang tinggi dari semua peristiwa molekuler ini dapat menjelaskan spektrum luas dari bentuk klinis kusta. Beberapa penelitian telah melaporkan bahwa gen tertentu dan polimorfisme dari gen tersebut mungkin terlibat dalam kerentanan genetik terhadap penyakit

mikobakteri pada manusia (Lio et al., 2002)(Kube et al., 2001)(Malhotra et al., 2005)(Félix et al., 2012).

Penjelasan kontrol genetik terhadap kerentanan kusta diharapkan dapat menyediakan alat yang baru dan lebih efektif untuk pencegahan dan pengendalian penyakit. Perkembangan penyakit akibat paparan *M. leprae* dan pola manifestasi klinis yang ditampilkan oleh pasien kusta sangat tergantung pada gen manusia yang mungkin terkait dengan beberapa daerah kromosom, seperti kromosom 6q25, 10p13, 17q11-q21, 20p12.

Genomic scan untuk kerentanan kusta memberikan data bahwa terdapat keterkaitan antara penyakit kusta dengan sembilan wilayah pada kromosom 6, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 17, dan 20, menguatkan laporan sebelumnya dan menyediakan wilayah kromosom baru, yang mendemonstrasikan kompleksitas yang tinggi dari penyakit ini (Moraes et al., 2004)(Mörmann et al., 2004).

Berbagai penelitian (Scollard, 2000) telah melaporkan gen-gen spesifik yang mungkin terlibat dalam respon imun innate dan adaptif pada kusta. Beberapa gen memiliki interaksi dan keterlibatan potensial dalam pengembangan penyakit kusta. Gen tersebut adalah:

Parkin and Parkin co-regulated gene (PARK2 / PACRG), *toll-like reseptor* 1 dan 2 (TLR2 / 1), *solute carrier protein* 11A1, *iron transporter* (SLC11A1), *tumor necrosis factor alpha* (TNFA), *interferon gamma* (INFG), *interferon-gamma receptor* (INFGR), interleukin-10 (IL-10), *human leukocyte antigen* (HLA kelas I dan II), *transporter associated with antigen processing* (TAP), interleukin 12 (IL12) dan reseptornya (IL12RB1), *heat shock protein* 70 kDa 1A (HSPA1A), dan *vitamin D reseptor* (VDR).

Polimorfisme Gen IL-10 pada Penderita Kusta

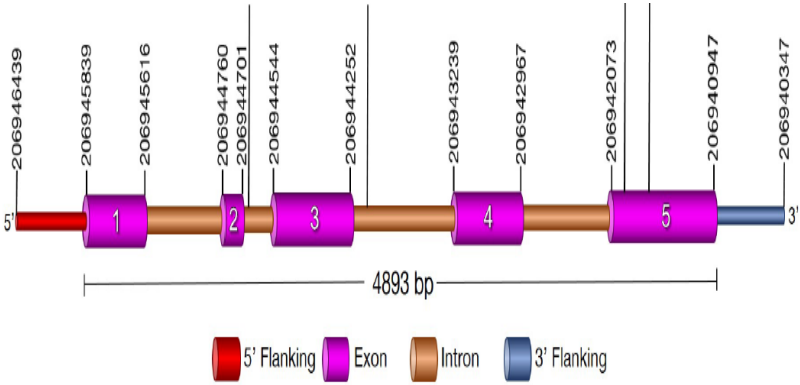
Interleukin-10 adalah sitokin regulasi yang terutama diproduksi oleh makrofag, monosit, T-sel, sel-B dan eosinofil. Sitokin bertindak dalam hubungan yang sangat rumit dan terkoordinasi, dan peran utama interleukin-10 in vivo adalah membatasi respons inflamasi. Antara 50% dan 75% dari variabilitas interleukin-10 yang diamati dijelaskan oleh faktor genetik.

Faktor-faktor lain yang mempengaruhi produksi interleukin-10, selain infeksi itu sendiri, adalah merokok, indeks massa tubuh dan jenis kelamin. Peran pleiotropik

interleukin-10 dalam regulasi sistem kekebalan tubuh ditambah dengan regulasi polimorfik ekspresinya, menyajikan tantangan tambahan untuk interpretasi, terutama dalam konteks patofisiologi penyakit (Reuss et al., 2002).

Gen interleukin-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 (Kubo & Motomura, 2012).

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 (Trifunović et al., 2015).



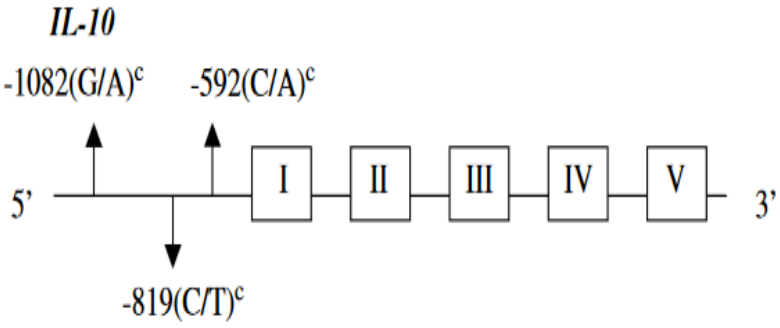
Gambar 2. Struktur dari gen IL-10 pada manusia. Ekson pada gen ditunjukkan dalam warna pink, intron dalam warna cokelat, 5' flanking dalam warna merah, dan 3' flanking dalam warna biru (Mishra et al., 2015)

Ada banyak varian genetik gen interleukin-10. Namun, yang paling sering dipelajari adalah tiga *single nucleotide polymorphism* (SNPs) -1082 (G/A), -819 (C/T) dan -592 (C/A) yang membentuk tiga haplotipe dominan (GCC, ACC, ATA). Polimorfisme -819 berada dalam linkage disequilibrium dengan polimorfisme -592; -819C

dan -592C diwariskan bersama, dan hal yang sama berlaku untuk -819T dan -592A.

Selain *single nucleotide polymorphism*, promotor juga mengandung dua ulangan dinukleotida (mikrosatelit), yaitu IL-10R dan IL-10G, yang terletak pada 1,2 kb dan 4 kb upstream dari situs awal transkripsi. Lima alel IL-10R yang membentang dari 12 hingga 16 CA yang berulang dan 13 alel IL-10G yang membentang dari 16 hingga 28 CA yang berulang telah dijelaskan.

Alel IL-10R dan IL-10G tidak terdistribusi secara acak diantara *single nucleotide polymorphism*, tetapi bergabung membentuk keluarga haplotipe. Meskipun faktor endogen dan eksogen merangsang sel untuk menghasilkan interleukin-10, sekresinya juga tergantung pada IL-10R, IL-10G dan *single nucleotide polymorphism* di wilayah promotor (Opdal, 2004).



Gambar 3. Struktur gen dan lokasi dari polimorfisme pada gen interleukin-10 manusia. Kotak, garis horizontal, dan panah menunjukkan ekson, intron, dan posisi polimorfisme.

Polimorfisme adalah perubahan atau mutasi pada gen yang tidak menimbulkan perubahan struktur protein, melainkan hanya mengakibatkan variasi pada fungsi protein. Polimorfisme tidak bermanifestasi klinis tetapi bisa menentukan kerentanan terhadap penyakit (Alter et al., 2008). Polimorfisme pada gen interleukin-10 tidak menyebabkan perubahan struktur tetapi dapat menyebabkan perubahan pada jumlah interleukin-10 yang

diproduksi. Perubahan jumlah interleukin-10 yang di produksi ini, khususnya peningkatan interleukin-10, dapat berpengaruh pada respon imun dalam perkembangan penyakit kusta (Kube et al., 2001).

Peningkatan kadar interleukin-10 berinteraksi dengan interleukin-10R, yang terdiri dari interleukin-10R1 (subunit pengikatan ligan) dan interleukin-10R2 (subunit aksesori untuk pensinyalan). Interaksi interleukin-10 dengan reseptornya melibatkan Jak1 dan Tyk2, yang terutama mengaktifkan STAT3, faktor transkripsi umum interleukin-10 – interleukin-10R yang memediasi sebagian besar aksi penghambatan interleukin-10 pada respon imun bawaan dan adaptif.

Pengaktifan pada STAT 3 dapat menghambat sitokin dan kemokin inflamasi, ROI, RNI, AA metabolit, MMP, IL12/IL18, molekul MHC kelas II, molekul kostimulasi, diferensiasi DC, IL2, TNF, IL5, CXCR4. Selain itu, peningkatan interleukin-10 juga dapat memicu IL1ra, sTNF-R, Apoptosis plasmacytoid DC, ekspresi CCR5, FcγRl and FcγRIII, Anergi sel T, Induksi Tregs. Mekanisme ini dapat menghambat respon inflamasi dan respon imun seluler terhadap *M. leprae* sehingga terjadi

kegagalan eliminasi *M. leprae* dan individu yang bersangkutan rentan terkena penyakit kusta (Mege et al., 2006)

Polimorfisme gen interleukin-10 yang paling frekuen, salah satunya, terjadi pada alel polimorfisme gen interleukin-10 -819C/T. Polimorfisme gen -819 C/T dianggap positif jika gen yang mengkode asam amino pada urutan -819 berubah, yang dilihat pada elektrophoregram. *Retriction Fragmen Length Polymorphism* (RFLP) berfungsi untuk melihat polimorfisme gen interleukin-10 -819C/T.

Sequencing DNA dilakukan untuk mengetahui titik nukleotida yang mengalami polimorfisme dan dibandingkan dengan database gen interleukin-10 pada manusia. Disebut homozigot *wild type* jika terlihat 1 pita (TT), heterozigot (CT) jika terlihat 3 pita, dan homozigot mutan (CC) jika terlihat 2 pita pada visualisasi dengan menggunakan sinar ultraviolet.

Ada perbedaan etnis dalam distribusi polimorfisme gen interleukin-10 yang beragam. Populasi Eropa dan Asia sangat berbeda. Sebagian besar penelitian yang menyelidiki populasi Eropa menemukan frekuensi

GCC sekitar 50%, sedangkan di populasi Asia frekuensi GCC di bawah 5%. Asal etnis merupakan komponen penting untuk beberapa penyakit menular, dan studi asosiasi gen-penyakit mungkin membingungkan jika kasus dan kontrol diambil dari populasi dengan latar belakang etnis yang berbeda.

Berbagai penelitian telah dilakukan terkait hubungan polimorfisme titik -819 C/T promotor gen interleukin-10 pada penderita kusta di berbagai populasi, antara lain penelitian yang dilakukan oleh Santos, dkk. (2002), Moraes, dkk. (2004), Pereira, dkk. (2009), dan Alvarado-Arnez, dkk. (2015) pada populasi Brazil, dan Cardona-Castro, dkk. (2012) pada populasi Kolombia, yang menyatakan bahwa polimorfisme titik -819 C/T promotor gen interleukin-10 dapat meningkatkan risiko kusta.

Sementara itu, penelitian Malhotra, dkk. (2005) pada populasi India menyatakan bahwa polimorfisme titik -819, yang membentuk pola haplotipe tertentu bersama dengan polimorfisme di titik lainnya, berhubungan dengan penurunan risiko kejadian penyakit kusta.

Di sisi lain, Franceschi, dkk. (2009) dan Garcia, dkk. (2013) pada populasi Brazil, Fitness, dkk. (2004) pada populasi Malawi, Felix, dkk. (2011) pada populasi Meksiko, dan Chen, dkk. (2013) pada populasi Cina melaporkan bahwa polimorfisme titik -819 C/T promotor gen interleukin-10 tidak berhubungan dengan risiko kusta.

BAB 6
SKEMA RISET

Desain

Beberapa studi yang dilakukan terkait tema dalam buku ini adalah merupakan studi literatur, studi deskriftif observasional, dan studi analitik observasional *case control*, yang menganalisis dan memaparkan kajian teoritis dan hasil studi dari pengamatan terhadap polimorfisme titik di tingkat promotor gen dan juga kadar IL-10 pada penderita kusta dan bukan penderita kusta. (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, & Ya'kub R, 2021)(Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021)(Oktariana et al., 2022)

Dalam studi yang dilakukan oleh Oktariana et al., 2021, pengambilan sampel kasus dan kontrol dilakukan di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang, kemudian pemeriksaan polimorfisme titik -819 C/T promotor gen IL-10 dan kadar IL-10 dilakukan di Laboratorium Bioteknologi FK Unsri (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021).

Populasi kasus pada studi tersebut adalah seluruh pasien kusta yang dirawat inap dan rawat jalan di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang pada tahun 2019. Populasi kontrol adalah keluarga pasien dan tenaga medis/paramedis yang bekerja di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021).

Sampel dikumpulkan dari populasi penelitian yang memenuhi kriteria inklusi. Sampel kasus yang digunakan dalam studi tersebut adalah sampel darah seluruh pasien yang didiagnosis kusta oleh dokter dan berobat di instansi pelayanan kesehatan RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang pada tahun 2019. Sampel kontrol adalah darah dari narakontak seperti tenaga medis/paramedis yang bekerja di RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang dan keluarga untuk penderita yang berobat.

Kriteria inklusi untuk kasus adalah:

1. Pasien yang telah didiagnosis kusta oleh dokter pada instansi pelayanan kesehatan RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang.

2. Bersedia mengikuti penelitian yang dinyatakan dengan menandatangani surat persetujuan atas dasar kesadaran (*informed consent*).

Kriteria inklusi untuk kontrol adalah:

1. Tidak menderita kusta.
2. Memiliki kontak dengan penderita kusta
3. Bersedia mengikuti penelitian yang dinyatakan dengan menandatangani surat persetujuan atas dasar kesadaran (*informed consent*).

Kriteria eksklusi untuk kasus dan kontrol dalam studi tersebut adalah:

1. Ibu hamil dan menyusui, diketahui berdasarkan diagnosa dokter.
2. Individu dengan riwayat penyakit seperti :
   - Tuberkulosis (TB), diketahui berdasarkan rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
   - HIV, diketahui berdasarkan rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
   - Diabetes Mellitus (DM), deketahui dari rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.

- Lupus, diketahui dari rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
- Rheumatoid Arthritis (RA), diketahui dari rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
- Asma bronkhial, diketahui dari rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
- Psoriasis vulgaris, diketahui berdasarkan diagnosa dokter.
- Hepatitis B dan hepatitis C, diketahui dari rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
- Dermatitis Atopik diketahui dari rekam medik atau berdasarkan diagnosa dokter.
- Individu yang mendapat terapi imunomodulator atau kortikosteroid sistemik adalah subjek yang sedang atau pernah mengkonsumsi imunomodulator atau kortikosteroid dalam waktu $\leq$ 4 minggu sebelum diikutsertakan dalam penelitian, yang didapatkan melalui teknik anamnesis.

Variabel dalam beberapa studi tersebut adalah:

- penyakit kusta
- polimorfisme titik -819 C/T promotor gen IL-10
- kadar interleukin-10
- klasifikasi penyakit

Batasan Kusta dan Interleukin-10

1. Penyakit Kusta (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, & Ya'kub R, 2021)

Definisi : Penyakit kusta adalah suatu penyakit infeksi menahun akibat bakteri tahan asam yaitu *Mycobacterium leprae* yang secara primer menyerang saraf tepi dan secara sekunder menyerang kulit serta organ lainnya.

Alat Ukur : Pada studi tersebut, penyakit kusta didiagnosis pasti oleh dokter spesialis kulit dan kelamin RSUP dr. Mohammad Hoesin Palembang dengan

melihat hasil pemeriksaan klinis dan bakteriologis.

Cara Ukur : Pemeriksaan klinis dilakukan melalui anamnesis dan pemeriksaan fisik pada pasien. Pemeriksaan bakteriologis dilakukan melalui pemeriksaan indeks bakteri pada kerokan lesi pasien kusta.

Hasil Ukur : Diagnosis penyakit kusta ditegakkan dengan pemeriksaan klinis dan bakteriologis. Pemeriksaan klinis dan bakteriologis merupakan data sekunder yang diambil dari rekam medik.

2. Polimorfisme titik -819 C/T promotor gen IL-10 (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021)

Definisi : Polimorfisme gen IL-10 adalah bentuk yang berbeda dari struktur dasar yang sama pada gen IL-10. Polimorfisme gen IL-10 yang diamati pada penelitian ini

adalah pada regio promotor pada titik -819 C/T.

Alat Ukur : Polimorfisme titik -819 C/T promotor gen interleukin-10 diukur dengan metode PCR-RFLP.

Cara Ukur : Genom diisolasi dari limfosit. Selanjutnya gen IL 10 (-819 C/T) diperbanyak melalui PCR. Primer (rantai RNA yang telah ada yang terikat dengan cetakan DNA ke mana nukleotida ditambahkan selama sintesis DNA) yang digunakan adalah 5'-AGACAACACTACTAAGGCTTCTT GAGGA-3' untuk primer IL 10 *forward* (IL 10 F*)* dan 5'-AGGTAGTGCTCACCATGACC-3' untuk primer IL 10 *reverse* (IL 10 R). Produk PCR dideteksi dengan elektroforesis dan divisualisasi dengan sinar UV. Langkah selanjutnya yaitu deteksi polimorfisme gen IL 10 (-819

C/T) dengan teknik RFLP menggunakan enzim restriksi endonuklease (enzim yang dapat dengan spesifik memotong DNA) *MsII*; produk PCR ditambahkan enzim *MsII*, lalu dielektroforesis dan divisualisasi.

Hasil Ukur : Pada visualisasi dengan UV pada posisi -819 tampil dalam bentuk dua pita (*band*) dengan panjang 294 dan 65 pasangan basa pada gel agarose. Hasil merupakan data primer.

3. Kadar Interleukin-10 (Oktariana et al., 2022)

Definisi : Interleukin-10 (IL-10) adalah sitokin imunoregulator yang krusial, dengan sifat dominan anti-inflamasi. Sitokin ini diproduksi oleh sel imun yang diaktifkan, khususnya monosit/ makrofag dan subset sel T termasuk sel Tr1, Treg, dan Th1. Interleukin-10 bekerja melalui kompleks reseptor

transmembran, yang terdiri dari IL-10R1 dan IL-10R2, dan mengatur fungsi banyak sel imun yang berbeda.

Alat Ukur : Kadar serum IL-10 diukur dengan metode ELISA.

Cara Ukur : Pemeriksaan ELISA dilakukan sesuai dengan prosedur yang tertera pada kit.

Hasil Ukur : Kadar IL-10 dihitung berdasarkan nilai *optical density* menggunakan rumus persamaan garis. Hasil merupakan data primer. Hasil berupa data numerik.

4. Klasifikasi Penyakit (World Health Organization (WHO), 2020)

Definisi : Klasifikasi penyakit adalah pembagian penyakit kusta berdasarkan kriteria tertentu. Penyakit kusta dapat diklasifikasikan berdasarkan manifestasi klinis (jumlah lesi, jumlah saraf yang terganggu) dan hasil pemeriksaan bakteriologi.

Alat Ukur	:	Klasifikasi kusta menggunakan kriteria dari WHO. Dalam klasifikasi ini seluruh penderita kusta hanya dibagi menjadi 2 tipe yaitu tipe Pausibasiler (PB) dan tipe Multibasiler (MB).
Cara Ukur	:	Klasifikasi diambil berdasarkan manifestasi klinis dan hasil pemeriksaan bakteriologi.
Hasil Ukur	:	Klasifikasi penyakit diketahui dari data sekunder berupa rekam medik.

Pengambilan Darah

Alat-alat yang diperlukan untuk pengambilan darah adalah:

- Jarum vacutainer
- Tabung vacutainer berisi kalium EDTA dengan volume 3 ml.
- Holder
- Tourniquet
- Alcohol swabs

- Tabung Eppendorf
- Sarung tangan

Sampel darah diambil melalui punksi vena antecubiti sebanyak 3 ml dimasukkan kedalam tabung yang mengandung antikolagen *ethylene diamine tetra acid* (EDTA) untuk ekstraksi DNA dan PCR.

Isolasi DNA

Alat-alat yang diperlukan untuk isolasi DNA darah adalah:

- tabung sentrifugasi 15 ml steril,
- rak tabung,
- pipettor (Biohit *Proline*® PIPETTE) dengan berbagai ukuran (10-100 µl dan 100-1000 µl),
- pipet tip (Genfollower) untuk volume 1000 µl, 200 µl, dan 100 µl,
- *freezer* -20° C,
- alat vorteks (*Stuart Scientific Autovortex* SA6),
- *waterbath* (Neslab RTE III),

- mesin inkubator,
- *ice bath*,
- mesin sentrifugasi (*eppendorf centrifuge* 5702 R),
- tabung eppendorf 1,5 ml (Genfollower)

Bahan-bahan yang diperlukan untuk isolasi DNA dari darah adalah:

- DNA extraction kit (Qiagen)

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan Qiagen DNA extraction kit, dengan prosedur:

- Qiagen protease (atau proteinase K) sebanyak 20 µl dimasukkan ke dasar tabung eppendorf 1,5 ml.
- Darah sebanyak 200 µl ditambahkan pada tabung eppendorf.
- Buffer AL sebanyak 200 µl ditambahkan pada sampel, kemudian divortex selama 15 detik.
- Sampel diinkubasi pada suhu 56°C selama 10 menit, kemudian disentrifugasi.

- Ethanol (96-100%) sebanyak 200 µl ditambahkan pada sampel, dan dicampur dengan menggunakan vortex selama 15 detik, kemudian disentrifugasi.
- Campuran dimasukkan ke dalam QIAmp mini spin column (dalam tabung 2 ml), kemudian ditutup, dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit. QIAmp mini spin column lalu ditempatkan pada tabung 2 ml yang bersih, sementara tabung yang mengandung filtrate dibuang.
- QIAmp mini spin column dibuka dengan hati-hati dan sebanyak 500 µl buffer AW 2 ditambahkan, kemudian ditutup, dan disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 3 menit.
- QIAmp mini spin column ditempatkan pada tabung 2 ml yang baru, sementara sementara tabung yang mengandung filtrate dibuang, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit.
- QIAmp mini spin column ditempatkan pada tabung eppendorf 1,5 ml dan sebanyak 200 µl buffer AE ditambahkan.

- Campuran diinkubasi pada suhu ruang (15-25°C) selama 1 menit, dan disentrifugasi dengan kecepatan 8000 rpm selama 1 menit.
- Untuk penyimpanan jangka panjang, DNA disimpan pada suhu -20° C.

Desain Primer yang Spesifik

Gen IL-10 (-819 C/T) akan diamplifikasi pada bank gen (*GeneBank National Center for Biotechnology*/NCBI dapat diakses dengan kode akses melalui website http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

Pemilihan primer dengan memperhitungkan syarat suatu primer dengan memperhatikan letak polimorfisme alel IL 10 -819C/T yang dapat dikenali oleh enzim restriksi endonuklease *MslI*. Pasangan primer terpilih mempunyai sekuen 5'-AGACAACACTACTAAGGCTTCTTGAGGA-3' untuk primer IL 10 F (*forward) dan* 5'-AGGTAGTGCTCACCATGACC-3' untuk primer IL 10 R (*reverse*). Spesifisitas kedua primer dikonfirmasi

dengan melakukan ’BLAST’ melalui website http://www.ncbi.nlm.nih.gov .Hasil konfirmasi menunjukkan kedua primer spesifik untuk amplifikasi gen IL-10 (-819 C/T).

***Polymerase Chain Reaction* (PCR)**

Alat-alat yang diperlukan untuk PCR dan elektroforesis adalah:

- pipette tip 10 µl (Genfollower)
- tabung eppendorf 0,2 ml (Genfollower)
- mesin *i-cycler* (Biorad)
- mesin elektroforesis
- UV transiluminator (Biorad)

Bahan-bahan yang diperlukan untuk PCR dan elektroforesis adalah:

- primer forward dan reverse,
- PCR Master mix (Promega),
- DNA ladder 100 bp (Promega),
- agarose LE (Promega),

- ethidium Bromide (Promega),
- TAE buffer (Promega)

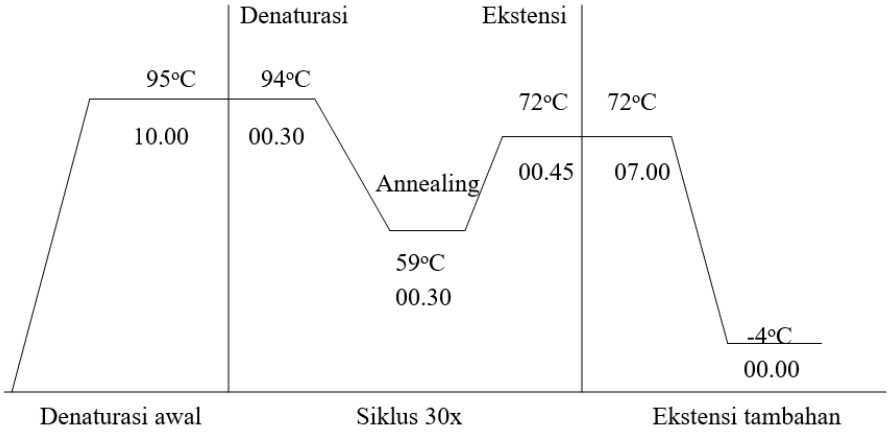
DNA genom diperoleh dari hasil isolasi. Dengan menggunakan teknik PCR, fragmen-fragmen DNA genom yang ingin dianalisis dapat ditingkatkan kuantitasnya dengan cara diamplifikasi secara *in vitro* dalam waktu singkat dengan menggunakan pasangan primer oligonukleotida sintetik yang membatasi daerah yang akan diperbanyak. Pada penelitian ini digunakan sepasang primer oligonukleotida untuk deteksi polimorfisme titik. Komposisi campuran dengan volume total 25 µl yang digunakan saat melakukan PCR adalah 10 µl PCR *mix Go Taq* (Promega, USA) yang terdiri dari dNTPs (campuran dATP, dCTP, dGTP, dTTP), $MgCl_2$ dan *Taq Polymerase,* 12 µl ddH_2O, dan 2 µl DNA cetakan (*template),* serta primer oligonukleotida *reverse* (R) dan *forward* (F) masing-masing 0,5 µl.

PCR dilakukan pada mesin *i-cycler (Biorad)*. Prinsip dasar amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR adalah sintesis DNA *in vitro* secara bireksional berulang melalui ekstensi sepasang primer

oliogonukleotida yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida dari kedua rantai DNA yang diamplifikasi. Proses sintesis ini berlangsung dalam tiga tahap reaksi yang berulang sebanyak 35 siklus pada suhu berbeda yaitu reaksi *denaturasi* pada suhu 95^0C selama 10 menit untuk memisahkan rantai ganda menjadi dua rantai tunggal, reaksi *annealing* yaitu menyatunya kembali kedua rantai DNA tersebut yang berlangsung pada suhu 94^0C selama 30 detik, 59^0C selama 30 detik, 72^0C selama 45 detik dan *ekstensi* yaitu sintesis DNA melalui perpanjangan suatu primer mengikuti urutan nukleotida DNA rantai tunggal pasangannya yang umumnya berlangsung pada suhu 72^0C selama 7 menit.

Tabel 4. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen IL-10

Tahap Denaturasi Awal	95^0C (10 menit)
Siklus PCR:	35 siklus
Tahap Denaturasi	94^0C (30 detik)
Tahap Annealing	59^0C (30 detik)
Tahap Ekstensi	72^0C (45 detik)
Tahap ekstensi tambahan	72^0C (7 menit)



Gambar 4. Kondisi PCR untuk amplifikasi gen IL10

Elektroforesis Gel Agarose

Kualitas DNA hasil amplifikasi dengan teknik PCR dilihat dengan menggunakan teknik elektroforesis gel agarose (konsentrasi 2%). Elektroforesis dilakukan di dalam aparatus elektroforesis (*Horizontal MiniSubDNA Biorad)* yang berisi TAE 1x (Tris-Acetate-EDTA, 10.8g/L, 20 Mm tris asetat pH 8.0 dan 1 mM EDTA pH 8.0) dan ditambahkan zat interkalator Ethidium Bromide 0,1%. DNA hasil PCR sebanyak 5µl kemudian

dimasukkan dalam sumuran yang terdapat pada gel. Sebagai penanda ukuran pita-pita DNA hasil elektroforesis pada gel digunakan DNA marker (100bp DNA Ladder Cat no: 15628-019 Lot no. 1289697 sebanyak 3ug/ul: *Promega)*. Gel dielektroforesis pada tegangan listrik 100 volt selama 30 menit. Selanjutnya dideteksi dengan menggunakan Gel Doc 1000 (*BioRad*, USA) untuk divisualisasi dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 300 nm dan direkam.

***Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP)**

Alat-alat yang diperlukan untuk RFLP dan elektroforesis adalah:

- pipette tip 10 µl (Genfollower)
- tabung eppendorf 0,2 ml (Genfollower)
- mesin *i-cycler* (Biorad)
- mesin elektroforesis
- UV transiluminator (Biorad)

Bahan-bahan yang diperlukan untuk RFLP dan elektroforesis adalah:

- enzim restriksi,
- DNA ladder 100 bp (Promega),
- agarose LE (Promega),
- ethidium Bromide (Promega),
- TAE buffer (Promega)

Polimorfisme gen IL-10 ditentukan dengan analisis PCR-RFLP. Deteksi polimorfisme gen IL-10 dilakukan dengan memotong DNA produk PCR dengan enzim restriksi *MsII*. Adanya akan menyebabkan terbentuknya situs restriksi baru yang dapat dikenali oleh enzim restriksi. Sebanyak 0,25 µL enzim, 0,5 µL buffer, dan 5 µL ddH2O ditambahkan ke dalam tabung eppendorf yang berisi 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 4% agarose gel dan dilihat dengan pewarnaan ethidium bromide. Pada visualisasi dengan UV, polimorfisme titik -819 C/T promotor gen IL-10 tampil dalam bentuk dua pita (*band*) dengan panjang 294 dan 65 bp pada gel agarose untuk alel C, dan dalam bentuk satu pita (*band*) dengan panjang 359 bp untuk alel T.

***Enzyme-Link Imunosorbent Assay* (ELISA)**

Alat-alat yang diperlukan untuk ELISA adalah:

- Elisa Reader
- Elisa Washing
- Mikrowell plate
- Mikropipet
- Seal Plate

Bahan-bahan yang diperlukan untuk ELISA adalah:

- Human IL-10 Standar
- Human IL-10 Standar diluent
- HRP Conjugate Reagen
- Sampel Diluent
- Chromogen Solution A
- Chromogen Solution B
- Wash Solution
- Stop Solution

Pengolahan darah untuk ELISA:

- Darah dibiarkan pada suhu kamar selama 10 menit.

- Darah disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 20 menit.
- Serum dipindahkan ke tabung eppendorf (RNA Nuclease Free).
- Serum disimpan -20^{0}C, sampai akan diperiksa di laboratorium Biomolekuler Universitas Sriwijaya.

Pemeriksaan Kadar Serum IL-10 dengan Metode ELISA:

a. Semua reagen dan sampel didiamkan dalam suhu kamar (18 - 25ºC) sebelum digunakan.
b. Sketsa/peta kerja mikroplate dibuat dalam kertas kerja

	Standar		Sumur sampel									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73
B	2	2	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74
C	3	3	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75
D	4	4	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76
E	5	5	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77
F	6	6	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78
G	7	7	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79
H	8	8	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80

c. Standar IL-10 dibuat serial pengenceran di dalam sumur standar dengan prosedur sebagai berikut :

Volume Std	100 ul	100 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	
	Std	Std 1	Std 2	Std 3	Std 4	Std 5	Std 6	Std 7	Std 8 (Blanko)
Volume standar diluen		50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul	50 ul
Konsentrasi (pg/ml)	270	180	120	60	30	15	7,5	3,75	0

d. Sisa larutan pada sumur 2 (standar 2) dibuang sebanyak 50 ul.

e. Sumur yang berisi serial standar 1 sampai dengan 8 dihomogenkan.

f. Sampel diluent ditambahkan sebanyak 40 ul ke dalam masing-masing sumur sampel.

g. Masing-masing sampel ditambahkan ke dalam sumur sampel sesuai peta kerja sebanyak 10 ul. Campuran tersebut dihomogenkan.

h. Sumur ditutup dengan seal plate dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37^0C.

i. Larutan dibuang dan dicuci 5 kali dengan wash solution. Cuci dengan mengisi setiap sumur dengan *wash solution* menggunakan *autowasher*. Setelah pencucian terakhir, bersihkan sisa wash solution yang tersisa dengan aspirasi atau decanting. Balikkan piring dan bersihkan dengan tissu yang bersih.

j. HRP *conjugate reagent* ditambahkan 50 ul ke masing-masing sumur kecuali sumur blanko kemudian dihomogenkan.

k. Sumur ditutup dengan *seal plate* yang baru dan diinkubasi selama 30 menit pada suhu 37^0C.

l. Larutan dibuang. Pencucian diulang seperti pada langkah i.

m. Larutan *Chromogen solution* A dan B ditambahkan masing-masing sebanyak 50 ul ke masing-masing sumur, kemudian dihomogenkan.

n. Sumur ditutup dengan seal plate yang baru dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu 37^0C dan gelap (lindungi dari cahaya).
o. Stop Solution ditambahkan sebanyak 50 ul ke setiap sumur (warna berubah dari biru ke kuning).
p. Optical density standar dan sampel dibaca dengan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.
q. Kadar IL-10 dihitung berdasarkan nilai *optical density* menggunakan rumus persamaan garis.

BAB 7
PCR DAN RFLP

Realibilitas dan Relevansi

Isolasi DNA dari darah vena subjek yang telah dicampur dengan antikoagulan EDTA dilakukan dengan QIAamp® DNA Mini Kit, produksi Qiagen Germany. Isolasi dilakukan sesuai prosedur yang tertera pada kit. Isolat yang diperoleh disimpan di dalam kulkas pendingin dengan suhu -20° C yang dapat bertahan hingga beberapa tahun. Proses sterilisasi dilakukan pada semua alat sebelum isolasi DNA.

Pemeriksaan PCR merupakan metode yang dipakai untuk amplifikasi dan analisis gen. Penentuan mutasi titik dilakukan dengan pemeriksaan RFLP dengan menggunakan enzim restriksi. Penentuan polimorfisme titik -819 promoter gen interleukin-10 dilakukan dengan RFLP menggunakan enzim *MslI*.

Alat PCR yang digunakan adalah DNA *Thermal Cycler* merk I-cycle, nomor seri 582BR017182, produksi

BioRad® USA tahun 2006 yang mulai dipakai secara operasional awal tahun 2007 di Laboratorium Bioteknologi FK Unsri Palembang. Perangkat lain berupa kit elektroforesis merk *Power Pac Basic*, nomor seri 041BR4357, produksi BioRad® USA. Alat sentrifugasi yang dipakai merk Tomy, model Kitman-T24, nomor seri 40649777, produksi tahun 2007. Kemudian, alat visualisasi hasil PCR-RFLP, Geldoc nomor seri 76S/06121, produksi BioRad® USA yang dihubungkan dengan kamera digital dan perangkat computer yang berisi software Uvitec Cambridge.

Berbagai reagensia yang digunakan diproduksi oleh produsen yang terjamin mutunya. Gotaq diproduksi oleh Promega® USA, primer diproduksi oleh Macrogen® South Korea, enzim diproduksi oleh BioLabs® New England. Reagensia didatangkan oleh perusahaan ekspedisi melalui GeneCraft Company dan Indolab. Reagensia kemudian disimpan dalam suhu yang direkomendasikan oleh produsen.

Karakteristik Dasar

Karakteristik dasar tampak pada tabel berikut: (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, & Ya'kub R, 2021)(Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021)

Tabel 5. Karakteristik dasar

Karakteristik	Kelompok		*p*
	Kasus (50) n (%)	Kontrol (50) n (%)	
Jenis Kelamin			
Laki-laki	33 (66)	19 (38)	
Wanita	17 (34)	31 (62)	0,009)*
Usia (tahun)	42,08± 14,65	37,78 ± 9,17	0,082)**
Ras			
Melayu	49(98)	46 (92)	
Non-melayu	1(2)	4 (8)	0,169)*
Klasifikasi kusta (WHO)			
Multibasiler (MB)	46 (92)	-	
Pausibasiler (PB)	4 (8)	-	

)*= *Chi square test*,)**= *independent t-test*, p<0,05

Pada tabel 5 terlihat frekuensi laki-laki pada kelompok kasus lebih banyak (66%) dibanding pada kelompok kontrol (38%). Frekuensi wanita pada kelompok kontrol lebih banyak (62%) dibanding pada kelompok kasus (34%). Rerata usia pada kelompok kasus adalah 42,08± 14,65 tahun dan pada kelompok kontrol sebesar 37,78 ± 9,17 tahun. Frekuensi ras melayu pada kelompok kasus lebih banyak (98%) dibanding pada kelompok kontrol (92%). Frekuensi ras non-melayu pada kelompok kontrol lebih banyak (8%) dibanding pada kelompok kasus (2%). Frekuensi jenis kusta (klasifikasi WHO) yang paling banyak adalah tipe multibasiler (92%) dibanding tipe pausibasiler (8%). Setelah dianalisis menggunakan uji *Chi square* terdapat perbedaan bermakna proporsi jenis kelamin antara kelompok kasus dan kelompok kontrol (p=0,009).

Penelitian Felix dkk (2011) di Meksiko melaporkan hal yang sama yaitu frekuensi laki-laki pada kelompok kasus 69% lebih banyak dibandingkan wanita 31%. Malhotra dkk (2005) di India juga melaporkan bahwa frekuensi laki-laki 84% lebih banyak dibandingkan wanita 16%. Hasil sebaliknya dilaporkan oleh Alvarado-

Arnez dkk (2015) di Brazil yang menyatakan bahwa frekuensi laki-laki pada kelompok kasus lebih sedikit yaitu 46% dibandingkan wanita 54%. Cardona-Castro dkk di Kolombia (2012) juga melaporkan bahwa frekuensi laki-laki lebih sedikit yaitu 28% dibandingkan wanita 72%.

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 (Ramos et al., 2012). Studi lain di Brazil juga melaporkan hal serupa yaitu terdapat insiden yang lebih tinggi pada penderita kusta berjenis kelamin laki (Cardona-Castro et al., 2012), dan angka kejadian reaksi kusta lebih banyak terjadi pada laki-laki dibandingkan dengan wanita (Mastrangelo et al., 2011). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa laki-laki memiliki risiko 22 kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan wanita (Bakker et al., 2006).

Rerata usia pada kelompok kasus adalah 42,08± 14,65 tahun dan pada kelompok kontrol sebesar 37,78 ± 9,17 tahun, setelah dianalisis menggunakan *independent t-test* tidak ada perbedaan bermakna rerata usia antara

kedua kelompok (*p*=0,082). Penelitian Garcia, dkk (2015) melaporkan hasil rerata umur pada yang sedikit lebih tinggi pada kelompok kasus yaitu sebesar 43,35 ± 1,83 dibandingkan dengan kelompok kontrol yaitu sebesar 38,39 ± 1,64. Penelitian Santos, dkk (2002) melaporkan hasil rerata umur pada kelompok kasus sebesar 49,3 ± 7,3 dan pada kelompok kontrol sebesar 47,4 ± 4,1.

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 (Moet et al., 2004).

Pada kelompok kasus, 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%).

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 et al., 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 (Moet et al., 2004).

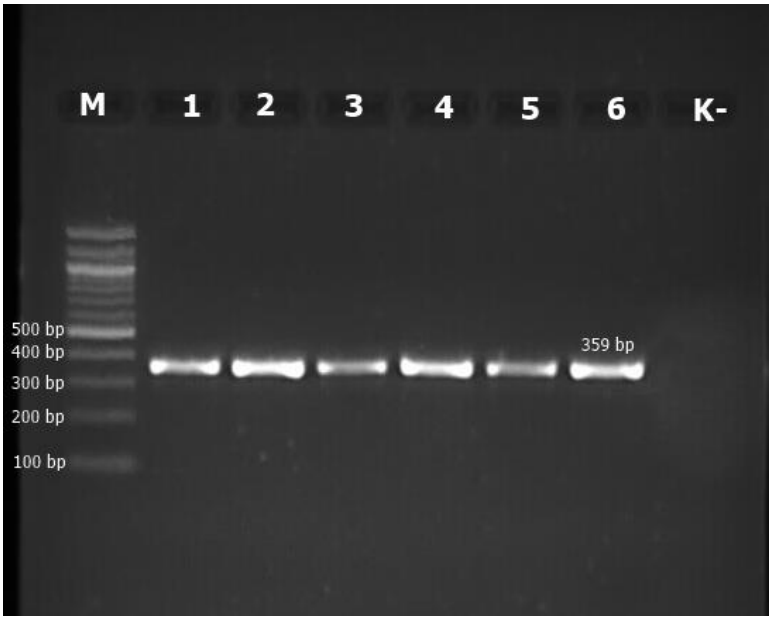
Gambaran Elektroforesis PCR Titik -819 Promoter Gen Interleukin-10

Tahap awal pengolahan sampel dimulai dari ekstraksi DNA dengan menggunakan kit, kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan *polymerase chain*

reaction (PCR) titik -819 promoter gen Interleukin-10 menggunakan primer *forward* 5'-AGACAACACTACTAAGGCTTCTTGAGGA-3' dan primer *reverse* 5'-AGGTAGTGCTCACCATGACC-3' pada mesin *i-cycler (Biorad)*. Prinsip dasar amplifikasi DNA dengan menggunakan mesin PCR adalah sintesis DNA *in vitro* secara bireksional berulang melalui ekstensi sepasang primer oliogonukleotida yang dirancang berdasarkan urutan nukleotida dari kedua rantai DNA yang diamplifikasi.

Produk hasil PCR, berupa amplikon, dievaluasi untuk membuktikan keberhasilan ekstraksi DNA yang telah dilakukan. Proses evaluasi dilakukan dengan cara elektroforesis melalui media gel agarose konsentrasi 2% yang mengandung ethidium bromide selama 30 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasi dengan menggunakan sinar ultra violet (UV) dan dibaca pada monitor computer (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, & Ya'kub R, 2021).

Hasil PCR titik -819 promoter gen Interleukin-10 terlihat pada posisi 359 bp seperti pada gambar berikut:



Gambar 5. Visualisasi elektroforesis hasil PCR titik -819 promoter gen IL-10 yang terlihat pada posisi 359 bp pada media gel agarose 2% yang mengandung EtBr.

RFLP Menggunakan Enzim *MslI* terhadap Gen Interleukin-10

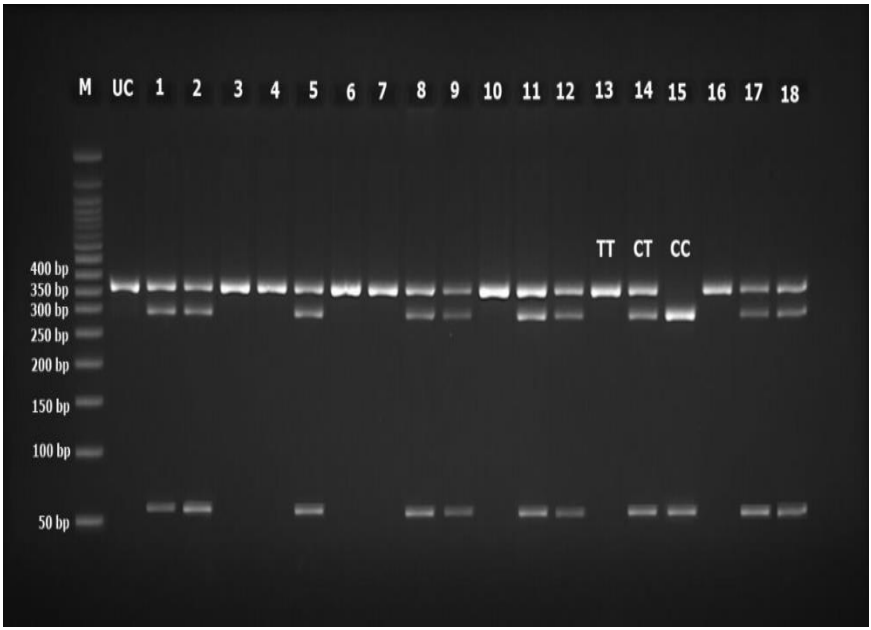
Setelah tahapan PCR selesai, penelitian dilanjutkan dengan *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), yaitu tahap restriksi dengan menggunakan enzim *MslI*, yang dilakukan dengan cara

mencampur produk hasil PCR (amplikon) dengan enzim *MslI* dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 1 jam. Kemudian, setelah proses restriksi selesai, tahapan selanjutnya adalah elektroforesis dengan menggunakan gel agarose 4% yang mengandung ethidium bromide (EtBr), yang kemudian divisualisasi dengan menggunakan sinar ultra violet (UV) dan dibaca pada monitor komputer.

Terdapat 3 jenis genotipe yang dapat diidentifikasi dari polimorfisme gen, yaitu genotipe *wild type*, genotipe heterozigot polimorfik, dan genotipe homozigot polimorfik. Genotipe *wild type* merupakan genotipe umum yang seringkali dijumpai pada gen tanpa polimorfisme. Genotipe jenis ini memiliki basa TT. Genotipe heterozigot polimorfik merupakan genotipe yang dihasilkan apabila terjadi perubahan dari satu basa T menjadi C sehingga genotipe yang dihasilkan adalah CT. Genotipe homozigot polimorfik merupakan genotipe yang dihasilkan apabila terjadi perubahan kedua basa T menjadi C sehingga genotipe yang dihasilkan adalah CC. Polimorfisme titik -819 promoter gen Interleukin-10 ditandai dengan adanya variasi gambaran alel hasil pemotongan (*digestion*) fragmen DNA oleh enzim

restriksi *MslI* yang terlihat seperti berikut (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021):

1. Gambaran 1 pita, yaitu pada 359 bp menunjukkan bahwa tidak terjadi pemotongan fragmen DNA amplikon oleh enzim *MslI* pada kedua alel, yang berarti amplikon tersebut mengandung genotipe *homozygote wild type* TT.
2. Gambaran 2 pita, yaitu pada 65 bp dan 294 bp menunjukkan bahwa terjadi pemotongan fragmen DNA amplikon oleh enzim *MslI* pada kedua alel, yang berarti amplikon tersebut mengandung genotipe *homozygote polymorphic type* CC.
3. Gambaran 3 pita, yaitu pada 65 bp, 294 bp, dan 359 bp menunjukkan bahwa terjadi pemotongan fragmen DNA amplikon oleh enzim *MslI* pada salah satu alel, yang berarti amplikon tersebut mengandung genotipe *heterozygote polymorphic type* CT .



Gambar 6. Hasil elektroforesis gen Interleukin-10 setelah direstriksi menggunakan enzim *MslI*. M=marker DNA penanda, UC=uncut (amplikon yang tidak dipotong dengan enzim *MslI*). Genotipe TT pada 359 bp di jalur 3,4,6,7,10,13,dan 16. Genotipe CT pada 65 bp, 294 bp, dan 359 bp di jalur 1,2,5,8,9,11,12,14,17,18. Genotipe CC pada 65 bp dan 294 bp di jalur 15.

BAB 8
GENOTIPE DAN ALEL

Distribusi Frekuensi Genotipe dan Alel

Pada studi yang dilakukan oleh Oktariana et al., 2021, distribusi frekuensi genotipe gen ditampilkan sebagaimana pada tabel berikut:

Tabel 6. Distribusi Frekuensi Genotipe

Genotipe	Kelompok		Total n (%)
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	
TT	21 (21)	28 (28)	49 (49)
CT	22 (22)	18 (18)	40 (40)
CC	7 (7)	4 (4)	11 (11)
Jumlah	50 (50)	50 (50)	100 (100)

Distribusi frekuensi genotipe TT, CT, dan CC pada kelompok kasus masing-masing 21 (21%), 22 (22%), dan 7 (7%). Distribusi frekuensi genotipe TT, CT, dan CC

pada kelompok kontrol masing-masing 28 (28%), 18 (18%), dan 4 (4%). Distribusi frekuensi genotipe TT, CT, dan CC pada seluruh subjek penelitian adalah 49 (49%), 40 (40%), dan 11 (11%).

Distribusi frekuensi alel T dan alel C titik -819 promoter gen Interleukin-10 pada subjek dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 7. Distribusi Frekuensi Alel

Alel	Kelompok		Total
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	n (%)
T	64 (32)	74 (37)	138 (69)
C	36 (18)	26 (13)	62 (31)
Jumlah	100 (50)	100 (50)	200 (100)

Distribusi frekuensi alel T pada kelompok kasus dan kontrol masing-masing 64 (32%) dan 74 (37%) dengan total 138 (69%). Distribusi frekuensi alel C pada kelompok kasus dan kontrol masing-masing 36 (18%) dan 26 (13%) dengan total 62 (31%).

Distribusi Frekuensi Genotipe dan Alel berdasarkan Karakteristik Subjek

Pada studi yang dilakukan oleh Oktariana et al., 2021, distribusi genotipe TT, CT, dan CC serta distribusi alel T dan alel C berdasarkan kelompok usia subjek dapat dilihat pada tabel 8:

Tabel 8. Distribusi Frekuensi Genotipe dan alel berdasarkan kelompok usia

Genotipe	Kelompok Usia		Total
	Usia < 50	Usia ≥ 50	n (%)
	n (%)	n (%)	
TT	36 (36)	13 (13)	49 (49)
CT	34 (34)	6 (6)	40 (40)
CC	10 (10)	1 (1)	11 (11)
Jumlah	80 (80)	20 (20)	100 (100)
Alel			
T	106 (53)	32 (16)	138 (69)
C	54 (27)	8 (4)	62 (31)
Jumlah	160 (80)	40 (20)	200 (100)

Subjek dengan genotipe TT, CT, dan CC yang berusia di bawah 50 tahun masing-masing adalah 36 (36%), 34 (34%), dan 10 (10%), sedangkan distribusi genotipe subjek yang berusia 50 tahun ke atas masing-masing adalah 13 (13%), 6 (6%), dan 1 (1%). Jumlah total subjek yang berusia di bawah 50 tahun adalah 80 subjek, sedangkan yang berusia di atas 50 tahun adalah 20 subjek.

Adapun subjek dengan alel T dan C yang berusia di bawah 50 tahun masing-masing adalah 106 (53%) dan 54 (27%), sedangkan distribusi alel T dan C pada subjek yang berusia 50 tahun ke atas masing-masing adalah 32 (16%) dan 8 (4%). Jumlah total alel subjek yang berusia di bawah 50 tahun adalah 160 subjek, sedangkan yang berusia di atas 50 tahun adalah 40 subjek.

Distribusi genotipe TT, CT, dan CC serta distribusi alel T dan alel C berdasarkan kelompok jenis kelamin subjek dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 9. Distribusi Frekuensi Genotipe dan alel berdasarkan jenis kelamin

Genotipe	Jenis Kelamin		Total
	Laki-laki	Perempuan	
	n (%)	n (%)	n (%)
TT	29 (29)	20 (20)	49 (49)
CT	17 (17)	23 (23)	40 (40)
CC	6 (6)	5 (5)	11 (11)
Jumlah	52 (52)	48 (48)	100 (100)
Alel			
T	75 (37,5)	63 (31,5)	138 (69)
C	29 (14,5)	33 (16,5)	62 (31)
Jumlah	104 (52)	96 (48)	200 (100)

Subjek dengan genotipe TT, CT, dan CC berjenis kelamin laki-laki masing-masing adalah 29 (29%), 17 (17%), dan 6 (6%), sedangkan distribusi genotipe subjek yang berjenis kelamin perempuan masing-masing adalah 20 (20%), 23 (23%), dan 5 (5%).

Adapun subjek dengan alel T dan C yang berjenis kelamin laki-laki masing-masing adalah 75 (37,5%) dan 29 (14,5%), sedangkan distribusi alel T dan C pada subjek yang berjenis kelamin perempuan masing-masing adalah 63 (31,5%) dan 33 (16,5%).

Distribusi genotipe dan alel berdasarkan kelompok ras dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 10. Distribusi Frekuensi Genotipe dan alel berdasarkan kelompok ras

Genotipe	Ras		Total
	Melayu n (%)	Non-melayu n (%)	n (%)
TT	47 (47)	2 (2)	49 (49)
CT	38 (38)	2 (2)	40 (40)
CC	10 (10)	1 (1)	11 (11)
Jumlah	95 (95)	5 (5)	100 (100)
Alel			
T	132 (66)	6 (3)	138 (69)
C	58 (29)	4 (2)	62 (31)
Jumlah	190 (95)	10 (5)	200 (100)

Subjek dengan genotipe TT, CT, dan CC pada kelompok ras melayu masing-masing adalah 47 (47%), 38 (38%), dan 10 (10%), sedangkan distribusi genotipe subjek yang memiliki ras non-melayu masing-masing masing-masing adalah 2 (2%), 2 (2%), dan 1 (1%). Genotipe TT, CT, dan TT lebih banyak pada ras melayu dibanding ras non-melayu. Pada subjek penelitian, populasi ras melayu lebih banyak dibanding ras non-melayu.

Adapun subjek penelitian dengan alel T dan C pada kelompok ras melayu masing-masing adalah 132 (66%) dan 58 (29%), sedangkan distribusi alel T dan C pada subjek yang memiliki ras non-melayu masing-masing adalah 6 (3%) dan 4 (2%). Alel T dan C lebih banyak pada ras melayu dibanding ras non-melayu. Pada subjek penelitian, populasi ras melayu lebih banyak dibanding ras non-melayu.

Distribusi Genotipe TT, CT, dan CC serta distribusi alel T dan alel C berdasarkan kategori klasifikasi kusta menurut WHO pada subjek penelitian dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 11. Distribusi frekuensi genotipe dan alel berdasarkan klasifikasi kusta WHO

Genotipe	Klasifikasi kusta menurut WHO		Total
	MB	PB	n (%)
	n (%)	n (%)	
TT	18 (36)	3 (6)	21 (42)
CT	21 (42)	1 (2)	22 (44)
CC	7 (14)	0 (0)	7 (14)
Jumlah	46 (92)	4 (8)	50 (100)
Alel			
T	57 (57)	7 (7)	64 (64)
C	35 (35)	1 (1)	36 (36)
Jumlah	92 (92)	8 (8)	100 (100)

Penderita dengan genotipe TT, CT, dan CC pada kelompok kusta MB masing-masing adalah 18 (36%), 21 (42%), dan 7 (14%), sedangkan distribusi genotipe penderita kusta dengan klasifikasi PB masing-masing adalah 3 (6%), 1 (2%), dan 0 (0%).

Adapun subjek dengan alel T dan C pada kelompok kusta MB masing-masing adalah 57 (57%) dan 35 (35%), sedangkan distribusi alel T dan C pada penderita kusta dengan klasifikasi PB masing-masing adalah 7 (7%) dan 1 (1%).

BAB 9
POLIMORFISME TITIK -819 IL-10

Hubungan Polimorfisme Titik -819 Promoter Gen Interleukin-10 dengan Kerentanan Kusta

Pada populasi studi yang dilakukan oleh Oktariana et al., 2021, hubungan polimorfisme titik -819 promoter gen interleukin-10 dengan kerentanan penyakit kusta dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 12. Hubungan polimorfisme dengan kerentanan kusta

Polimorfisme	Kelompok			*p*	Risiko kerentanan terhadap kusta	
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	Total n (%)		OR	95% CI
Genotipe:						
CT+CC	29 (58)	22 (44)	51 (51)	0,230*	1,758	0,796-3,880
TT	21 (42)	28 (56)	49 (49)			
Total	50 (100)	50 (100)	100 (100)			

*Chi-Square test with continuity correction, *OR = Odds ratio, CI = Confidence interval*

Dari hasil analisis data di tabel 12, pada kelompok kasus tampak genotipe mutan CT dan CC lebih banyak

muncul yaitu sebesar 58% dibanding genotipe *wild type* yang hanya 42%. Pada kelompok kontrol, genotipe *wild type* lebih banyak muncul yaitu sebesar 56% dibanding genotipe mutan yang hanya 44%. Analisis hubungan polimorfisme dengan menggunakan *Chi-square test with continuity correction* didapatkan p 0,230 > α 0,05 dengan *Odds Ratio* (OR) 1,758 dan 95% *Confidence Interval* (CI) 0,796-3,880.

Dari analisis diatas, polimorfisme genotipe (CC+CT) secara statistik tidak berhubungan secara bermakna dengan kerentanan penyakit kusta.

Tabel 13. Hubungan alel dengan kerentanan kusta

Polimorfisme	Kelompok			*p*	Risiko kerentanan terhadap kusta	
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	Total n (%)		OR	95% CI
Alel:						
C	36 (36)	26 (26)	62 (31)	0,169*	1,601	0,874-2,933
T	64 (64)	74 (74)	138 (69)			
Total	100 (100)	100 (100)	200 (100)			

*Chi-Square test with continuity correction, *OR = Odds ratio, CI = Confidence interval*

Dari tabel diatas didapatkan distribusi alel C dan T pada kelompok kasus masing-masing adalah 36% dan

64%. Distribusi alel C dan T pada kelompok kontrol masing-masing adalah 26% dan 74%. Analisis hubungan polimorfisme alel dengan menggunakan *Chi-square test with continuity correction* didapatkan p 0,169 > α 0,05 dengan *Odds Ratio* (OR) 1,601 dan 95% *Confidence Interval* (CI) 0,874-2,933.

Tampak alel T (*wild type*) lebih banyak dijumpai pada kelompok kasus dan kelompok kontrol. Dari perhitungan statistik, tidak ada perbedaan bermakna antara alel C dan alel T dengan kerentanan penyakit kusta.

Hubungan Polimorfisme Titik -819 dengan Kusta Jenis Multibasiler

Untuk mencari hubungan polimorfisme titik -819 promoter gen interleukin-10 dengan kerentanan penyakit kusta jenis multibasiler (MB) dilakukan kalkulasi menggunakan *chi-square test* antara genotipe *mutant type* (CC dan CT) dengan genotipe *wild type* (TT), juga antara alel *mutant* (C) dengan alel *wild type* (T).

Tabel 14. Hubungan polimorfisme promoter gen IL-10 dengan kerentanan kusta MB

Polimorfisme	Kelompok			*p*	Risiko kerentanan terhadap kusta	
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	Total n (%)		OR	95% CI
Genotipe:						
CT+CC	28 (60,9)	22 (44)	50 (52,1)	0,148*	1,980	0,877-4,468
TT	18 (39,1)	28 (56)	46 (47,9)			
Total	46 (100)	50 (100)	96 (100)			

*Chi-Square test with continuity correction, *OR = Odds ratio, CI = Confidence interval*

Dari tabel 14 di atas, pada kelompok kusta jenis multibasiler, tampak genotipe *mutant* CT dan CC lebih banyak muncul yaitu sebesar 60,9% dibanding genotipe *wild type* yang hanya 39,1%. Pada kelompok kontrol, genotipe *wild type* lebih banyak muncul yaitu sebesar 56% dibanding genotipe *mutant* yang hanya 44%. Analisis hubungan polimorfisme dengan menggunakan *Chi-square test with continuity correction* didapatkan p 0,148 > α 0,05 dengan *Odds Ratio* (OR) 1,980 dan 95% *Confidence Interval* (CI) 0,877-4,468.

Dari analisis diatas, polimorfisme genotipe (CC+CT) secara statistik tidak berhubungan secara bermakna dengan kerentanan penyakit kusta jenis multibasiler.

Tabel 15. Hubungan polimorfisme alel C pada titik -819 promoter gen IL-10 dengan kerentanan kusta jenis multibasiler.

Polimorfisme	Kelompok			*p*	Risiko kerentanan terhadap kusta	
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	Total n (%)		OR	95% CI
Alel:						
C	35 (38)	26 (26)	61 (31,8)	0,102*	1,748	0,946-3,229
T	57 (62)	74 (74)	131 (68,2)			
Total	92 (100)	100 (100)	192 (100)			

*Chi-Square test with continuity correction, *OR = Odds ratio, CI = Confidence interval*

Dari tabel diatas didapatkan distribusi alel C dan T pada kelompok kasus masing-masing adalah 38% dan 62%. Distribusi alel C dan T pada kelompok kontrol masing-masing adalah 26% dan 74%. Analisis hubungan

polimorfisme alel dengan menggunakan *Chi-square test with continuity correction* didapatkan p 0,102 > α 0,05 dengan *Odds Ratio* (OR) 1,748 dan 95% *Confidence Interval* (CI) 0,946-3,229.

Tampak alel T (*wild type*) lebih banyak dijumpai pada kelompok kasus dan kelompok kontrol. Dari perhitungan statistik, tidak ada perbedaan bermakna antara alel C dan alel T dengan kerentanan penyakit kusta jenis multibasiler.

Hubungan Polimorfisme Titik -819 Promoter Gen Interleukin-10 dengan Kerentanan Kusta Jenis Pausibasiler

Untuk mencari hubungan polimorfisme titik -819 promoter gen interleukin-10 dengan kerentanan penyakit kusta jenis pausibasiler (PB) dilakukan kalkulasi menggunakan *chi-square test* antara genotipe *mutant type* (CC dan CT) dengan genotip *wild type* (TT), juga antara alel *mutant* (C) dengan alel *wild type* (T).

Tabel 16. Hubungan polimorfisme promoter gen IL-10 dengan kerentanan kusta jenis PB

Polimorfisme	Kelompok			*p*	Risiko kerentanan terhadap kusta	
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	Total n (%)		OR	95% CI
Genotipe:						
CT+CC	1 (25)	22 (44)	23 (42,6)	0,426*	0,424	0,041-4,365
TT	3 (75)	28 (56)	31 (57,4)			
Total	4 (100)	50 (100)	54 (100)			

*Fisher's exact test, *OR = Odds ratio, CI = Confidence interval*, α 0,05

Dari tabel 16 di atas, pada kelompok kusta jenis pausibasiler, tampak genotipe *wild type* lebih banyak muncul yaitu sebesar 75% dibanding genotipe *mutant* CT dan CC yang hanya 25%. Pada kelompok kontrol, genotipe *wild type* lebih banyak muncul yaitu sebesar 56% dibanding genotipe *mutant* yang hanya 44%. Analisis hubungan polimorfisme dengan menggunakan *Fisher's exact test* didapatkan p 0,426 > α 0,05 dengan *Odds Ratio* (OR) 0,424 dan 95% *Confidence Interval* (CI) 0,041-4,365.

Dari analisis diatas, polimorfisme genotipe (CC+CT) secara statistik tidak berhubungan secara bermakna dengan kerentanan penyakit kusta jenis pausibasiler.

Tabel 17. Hubungan polimorfisme alel pada titik -819 promoter gen IL-10 dengan kerentanan kusta jenis pausibasiler

Polimorfisme	Kelompok			*p*	Risiko kerentanan terhadap kusta	
	Kasus n (%)	Kontrol n (%)	Total n (%)		OR	95% CI
Alel:						
C	1 (12,5)	26 (26)	27 (25)	0,358*	1,748	0,946-3,229
T	7 (87,5)	74 (74)	81 (75)			
Total	8 (100)	100 (100)	108 (100)			

* Fisher's exact test, *OR = Odds ratio, CI = Confidence interval*, α 0,05

Dari tabel diatas didapatkan distribusi alel C dan T pada kelompok kasus masing-masing adalah 38% dan 62%. Distribusi alel C dan T pada kelompok kontrol masing-masing adalah 26% dan 74%. Analisis hubungan

polimorfisme alel dengan menggunakan *Fisher's exact test* didapatkan p 0,358 > α 0,05 dengan *Odds Ratio* (OR) 1,748 dan 95% *Confidence Interval* (CI) 0,946-3,229.

Tampak alel T (*wild type*) lebih banyak dijumpai pada kelompok kasus dan kelompok kontrol. Dari perhitungan statistik, tidak ada perbedaan bermakna antara alel C dan alel T dengan kerentanan penyakit kusta jenis pausibasiler.

Mekanisme dan Perbandingan Antar Populasi

Polimorfisme yang terjadi pada promoter gen Interleukin-10 yang dipotong dengan enzim *MslI* adalah berupa perubahan basa *common allele*, dalam hal ini T (timin) menjadi basa C (sitosin) pada basa ke-819. Rujukan genotipe *wild type* diambil dari perbandingan model yang dominan dan kodominan, sedangkan rujukan genotipe mutan diambil dari perbandingan model yang resesif (Madeshiya et al., 2017). Dalam penelitian ini, alel yang paling banyak ditemukan adalah alel T sehingga genotipe *wild type* nya adalah TT. *Wild type* (TT) saat divisualisasi akan memperlihatkan 1 pita, genotipe

heterozigot (CT) saat divisualisasi akan memperlihatkan 3 pita, dan genotipe homozigot mutan (CC) saat divisualisasi akan memperlihatkan 2 pita pada daerah marker.

Perubahan T→C pada basa ke-819 promoter gen IL-10 ini dapat mempengaruhi transkripsi dari *mRNA* dan ekspresi IL-10. Regio promotor merupakan regio yang berhubungan dengan regio 5' flanking. 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. Perubahan pada transkripsi dapat mempengaruhi jumlah protein interleukin-10 yang dihasilkan (Trifunović et al., 2015).

Seperti pada tabel 18 di bawah, hubungan polimorfisme promotor IL-10 dengan kerentanan terhadap kusta telah diteliti di banyak populasi, seperti di Brazil (Santos, et al, 2002; Moraes, et al, 2004; Franceschi, et al, 2009; Pereira, et al, 2009; Garcia, et al, 2013, Alvarado-Arnez, et al, 2015), Malawi (Fitness, et al, 2004), India

(Malhotra, et al, 2005), Meksiko (Felix, et al, 2011, Kolombia (Cardona-Castro, et al, 2012), dan populasi Cina (Chen, et al, 2013); Namun, frekuensi dan distribusi polimorfisme IL-10 bervariasi berdasarkan populasi (Lazarus et al., 2002; Torkildsen et al., 2005). Penelitian ini berusaha untuk membandingkan distribusi polimorfisme promotor IL-10, khususnya pada titik -819, pada pasien kusta dan yang sehat di Sumatera Selatan.

Tabel 20. Berbagai penelitian tentang polimorfisme promotor gen IL-10 dengan kerentanan penyakit kusta.

Peneliti	**Lokasi**	**Kesimpulan**
(Santos et al., 2002)	Rio de Janeiro, Brazil	Frekuensi genotipe 819TT lebih tinggi secara signifikan pada pasien kusta dibanding kontrol. Pada kelompok kasus, analisis distribusi frekuensi alel promoter gen IL-10 menunjukkan bahwa alel -819T secara signifikan lebih banyak ditemukan pada pasien kusta jenis

		PB, yang mana terdapat respon imun-dimediasi sel yang kuat.
(Moraes et al., 2004)	Rio de Janeiro, Brazil	Haplotipe protektif adalah -3575A/-2849G/-2763C/-1082G-819C sementara -3575T/-2849A/-2763C/-1082G/-819T adalah haplotipe yang rentan. Penelitian ini mengkonfirmasi penemuan yang menyatakan bahwa regio promoter 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.
(Francesc hi et al., 2009)	Parana, Brazil	Analisis genotype IL-10 tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara penderita kusta dan control.

		Frekuensi lebih rendah dari haplotype IL10 -1082G/-819C/-592C ditemukan pada pasien LL dibandingkan kontrol, namun setelah statistic diolah lebih lanjut, hasil tersebut tidak lagi signifikan.
(Pereira et al., 2009)	Sao Paulo, Brazil	Alel -819T berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta. Haplotipe SNP promoter yang membawa alel -819T juga menunjukan kerentanan terhadap kusta. Pembawa alel -819T menunjukkan produksi IL-10 in vitro yang lebih rendah dibandingkan dengan yang bukan pembawa. Penelitian ini menunjukkan bahwa produksi IL-10 yang rendah dapat menyebabkan respon kronik dan tak terlindungi yang berhubungan dengan penyakit kusta.

(Garcia et al., 2013)	Para, Brazil	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.
(Alvarado-Arnez et al., 2015)	Minas Gerais dan Rio de Janeiro, Brazil	Polimorfisme titik -819 promoter gen IL-10 berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta. Alel -819T berpengaruh secara signifikan terhadap kerentanan kusta dan

		dapat mernjadi marker untuk kerentanan kusta.
(Fitness et al., 2004)	Malawi	Tidak terdapat hubungan antara polimorfisme titik -819 dengan kerentanan penyakit kusta.
(Malhotra et al., 2005)	India	Frekuensi alel 819T dan genotipe TT meingkat secara signifikan pada pasien kusta. Haplotipe -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C berhubungan dengan resistensi terhadap kusta. Sementara itu, haplotype IL-10 -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A terkait dengan risiko berkembangnya keparahan kusta, berbanding terbalik dengan haplotipe risiko rendah -3575T/-2849A/-2763C pada populasi Brazil.

(Félix et al., 2012)	Meksiko	Tidak terdapat asosiasi polimorfisme C819T dengan kusta jenis lepromatosa pada populasi meksiko.
(Cardona-Castro et al., 2012)	Kolombia	Genotipe CC dan CT pada polimorfisme titik -819 memiliki asosiasi terhadap kerentanan kusta. Haplotipe yang terkait dengan kusta, yaitu -1082A-819C-592C/-1082A-819C-592C, dilaporkan sebagai penghasil IL-10 yang rendah. Secara fungsional, produksi yang rendah dari IL-10 mungkin berdampak pada respon imun dan implikasi klinis. Haplotipe IL-10 tambahan telah dilaporkan sebagai marker untuk kerentanan atau resistensi terhadap kusta dalam berbagai populasi. Hal ini menunjukkan perbedaan distribusi

		keragaman polimorfisme gen IL-10 diantara banyak grup etnis, yang mengindikasikan pentingnya asosiasi penyakit dan gen.
(Chen et al., 2013)	China	Polimorfisme titik -819 promoter gen IL-10 tidak berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta. Hapoltipe 3575A/2849G/2763A/1082G/819C /592C berhubungan dengan kerentanan kusta dan subtype PB di Barat Daya Cina.

Pada studi yang dilakukan Oktariana et al., 2021, distribusi frekuensi genotipe TT, CT, dan CC pada kelompok kasus masing-masing 21%, 22%, dan 7%. Distribusi frekuensi genotipe TT, CT, dan CC pada kelompok kontrol masing-masing 28%, 18%, dan 4%. Distribusi frekuensi alel T pada kelompok kasus dan kontrol masing-masing 32% dan 37% dengan total 69%. Distribusi frekuensi alel C pada kelompok kasus dan

kontrol masing-masing 18% dan 13% dengan total 31%. Genotipe TT dan alel T menunjukkan frekuensi yang lebih tinggi pada kontrol. Demikian pula, frekuensi genotipe CC dan alel C lebih tinggi pada pasien kusta bila dibandingkan dengan kontrol yang sehat (Oktariana, Argentina, Hafy, Salim, Kurniati, Rahadiyanto, et al., 2021).

Beberapa penelitian yang menyimpulkan bahwa terdapat hubungan antara polimorfisme titik -819 promotor gen IL-10 dengan kerentanan penyakit kusta, diantaranya adalah penelitian pada populasi Brazil oleh Santos (2002), Moraes (2004), Pereira (2009), dan Alvarado-Arnez (2015), dan populasi Kolombia oleh Cardona-Castro (2012).

Pada penelitian yang dilakukan oleh Santos pada tahun 2002, frekuensi genotipe 819TT lebih tinggi secara signifikan pada pasien kusta dibanding kontrol pada populasi Brazil. Pada kelompok kasus penelitian tersebut, analisis distribusi frekuensi alel promoter gen IL-10 menunjukkan bahwa alel -819T secara signifikan lebih banyak ditemukan pada pasien kusta jenis PB, yang mana terdapat respon imun-dimediasi sel yang kuat. Fakta membuktikan bahwa beberapa polimorfisme regio

proksimal promoter 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. Faktanya pada penelitian Santos, pada kelompok pasien, analisis distribusi frekuensi alel dalam gen promoter IL-10 menunjukkan bahwa alel IL-10 -819T secara signifikan lebih umum di antara pasien dengan bentuk kusta PB, di mana ada respon imun yang dimediasi sel.

Penelitian Moraes pada tahun 2004 menemukan pola haplotype protektif dan haplotype yang rentan terhadap kusta. Haplotipe protektif adalah -3575A/-2849G/-2763C/-1082G/-819C, sedangkan -3575T/ -2849A/-2763C/-1082G/-819T adalah haplotipe yang rentan. Pada penelitian tesebut, alel -819C termasuk pada haplotype protektif, sedangkan alel -819T merupakan salah satu bagian dari haplotipe yang rentan terhadap kusta.

Hal senada juga disampaikan dalam penelitian Pereira (2009) dan Alvarado-Arnez (2015) yang

menyatakan bahwa alel -819T berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta. Haplotipe polimorfisme promoter yang membawa alel -819T juga menunjukan kerentanan terhadap kusta. Pembawa alel -819T menunjukkan produksi IL-10 in vitro yang lebih rendah dibandingkan dengan yang bukan pembawa. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa produksi IL-10 yang rendah dapat menyebabkan respon kronik dan tak terlindungi yang berhubungan dengan penyakit kusta.

Penelitian yang dilakukan oleh Malhotra (2005) pada populasi India juga mengungkapkan bahwa frekuensi alel 819T dan genotipe TT meingkat secara signifikan pada pasien kusta. Haplotipe promotor gen IL-10 -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819C/-592C berhubungan dengan resistensi terhadap kusta. Sementara itu, haplotype IL-10 -3575T/-2849G/-2763C/-1082A/-819T/-592A terkait dengan risiko berkembangnya keparahan kusta.

Kontras dengan pernyataan diatas, beberapa penelitian yang dilakukan di berbagai populasi menemukan hal yang berbeda. Tidak adanya hubungan antara polimorfisme titik -819 promotor gen IL-10 dengan kerentanan penyakit kusta menjadi kesimpulan pada

beberapa penelitian tersebut, diantaranya adalah penelitian yang dilakukan oleh Franceschi (2009) dan Garcia (2013) pada populasi Brazil, Fitness (2004) pada populasi Malawi, Felix (2011) pada populasi Meksiko, dan Chen (2013) pada populasi Cina.

Penelitian yang dilakukan oleh Franceschi pada tahun 2009 menemukan bahwa analisis genotipe IL-10 tidak menunjukkan perbedaan signifikan antara penderita kusta dan kontrol. Frekuensi haplotype 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. Penelitian tersebut mengungkapkan bahwa alel -819C terkait dengan haplotipe proteksi terhadap kusta. Pada populasi Meksiko, penelitian Felix pada tahun 2011 juga menyimpulkan bahwa tidak terdapat asosiasi polimorfisme C819T dengan kusta jenis lepromatosa pada populasi meksiko.

Di belahan benua Afrika, penelitian yang dilakukan oleh Fitness pada tahun 2004 menyimpulkan bahwa tidak terdapat hubungan antara polimorfisme titik -819 dengan kerentanan penyakit kusta.

Di Cina, penelitian yang dilakukan oleh Chen pada tahun 2013 menyatakan bahwa polimorfisme titik -819 promoter 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.

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 promoter 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. Di Malawi, Cina, dan Meksiko, frekuensi polimorfisme ini serupa antara kontrol dan pasien; pada populasi Brasil, bagaimanapun, varian -819T ditemukan terkait dengan kerentanan kusta. Dalam penelitian kami, kurangnya hubungan polimorfisme C819T IL-10 dengan kerentanan penyakit kusta serupa dengan penelitian di Malawi, Cina, dan Meksiko.

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.

Pada populasi Malawi ditemukan bahwa varian homozigot −592 mungkin meningkatkan kerentanan terhadap kusta (Fitness et al., 2004). Baru-baru ini, varian -819 T telah dilaporkan lemah terkait dengan kerentanan kusta di Brasil (Franceschi, 2009; Garcia, 2013). Dua varian ini menunjukkan disekuilibrium keterkaitan dan biasanya terjadi bersamaan pada haplotipe (−1082A, −819T, −592A) yang dikaitkan dengan peningkatan produksi IL-10. Di Brazil, *homozygosity* untuk varian −592A tidak secara signifikan terkait dengan kerentanan, tetapi ada kecenderungan ke arah tersebut. Dengan demikian, ada kemungkinan bahwa haplotipe ATA dapat dikaitkan dengan kerentanan kusta, tetapi studi yang lebih besar diperlukan untuk menilai hal ini.

Selain polimorfisme titik (SNP), berbagai haplotipe 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 (Gibson et al., 2001). 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. Seperti disebutkan sebelumnya, hanya sebagian kecil pasien kusta memiliki haplotipe IL-10 yang terkait dengan penyakit atau keparahan penyakit, dan beberapa pasien masih membawa haplotipe 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-a) dan lainnya. Selain itu, tidak dapat dikecualikan bahwa kontrol genetik kerentanan terhadap kusta adalah heterogen sehingga lokus yang berbeda dapat mengendalikan fenotipe yang sama.

Penelitian dari peneliti memiliki hasil yang berlawanan dari beberapa penelitian di Brazil, Kolombia, dan India yang menyatakan alel -819T dan genotype -819TT merupakan alel yang banyak ditemukan pada populasi yang sakit dibandingkan dengan yang sehat dan berhubungan dengan kerentanan penyakit kusta. Sebaliknya, alel -819C merupakan *common allele* yang sering ditemukan pada orang sehat di populasi tersebut.

Sebaliknya dalam penelitian ini, alel -819T merupakan *common allele* dengan frekuensi yang jauh lebih banyak dibandingkan alel -819C pada kedua kelompok. Alel -819T justru lebih banyak ditemukan pada populasi sehat dibandingkan dengan populasi kusta, hal sebaliknya juga terjadi pada alel -819C yang lebih banyak

ditemukan pada populasi kusta, meskipun secara statistik perbedaan tersebut tidak signifikan. Hasil pada penelitian ini hampir mirip dengan hasil penelitian di Cina yang menemukan bahwa haplotype yang membawa alel -819C memiliki risiko 5,57 kali lebih besar rentan terkena kusta.

Berdasarkan data yang terdapat dalam database SNP publik (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP), perbandingan frekuensi alel dan genotipe sebagian besar polimorfisme promotor IL-10 dalam populasi Melayu sehat kebanyakan berbeda secara signifikan dari populasi Kaukasia dan Afrika. Selain itu, frekuensi alel, genotipe, dan haplotipe IL-10 pada kelompok kasus dan kontrol berbeda secara signifikan dari populasi lainnya, menyiratkan heterogenitas genetik antara populasi. Perbedaan frekuensi genotipe dan haplotipe polimorfisme promotor IL-10 dalam berbagai populasi mungkin menjelaskan keterlibatan berbagai genotipe dan haplotipe dalam resistensi/kerentanan terhadap kusta.

Untuk cukup mewakili suatu populasi, tentu jumlah sampel yang dibutuhkan harus cukup besar. Namun, untuk mengumpulkan jumlah sampel yang cukup besar, tentu waktu yang dibutuhkan juga tidak sebentar, sumber daya

pendukung juga dibutuhkan lebih banyak. Hal tersebut menjadi salah satu keterbatasan dalam penelitian ini. Selain itu, keterbatasan mengenai studi asosiasi kasus kontrol adalah bahwa sampel harus memiliki komponen leluhur yang sama, agar pentingnya polimorfisme sebagai faktor penentu predisposisi penyakit menjadi jelas.

Sebagai contoh, untuk populasi Mestizo Amerika Latin, seperti dalam penelitian Felix, variabilitas genetik yang besar antar populasi ditunjukkan oleh genome-wide analysis karena terdapat perbedaan struktur populasi yang sebagian besar disebabkan oleh perbedaan komponen leluhur orang Amerindian dan Eropa di Meksiko, dengan distribusi geografis tertentu di seluruh negara. Dalam penelitian kami, variasi komponen leluhur dipertimbangkan selama proses pengambilan sampel, hanya merekrut individu lokal dari Sumatera Selatan.

Penelitian ini tidak menemukan hubungan polimorfisme titik -819C/T promotor gen IL-10 dengan kerentanan kusta pada populasi Sumatera Selatan. Heterogenitas antar populasi yang diamati dalam kerentanan kusta mungkin melibatkan gen pengatur imun lainnya dan faktor lingkungan. Hasil dalam penelitian ini

sesuai dengan fakta bahwa infeksi mikobakteri, untuk menmbulkan dampak, melibatkan interaksi kompleks antara beberapa gen inang lainnya dan perlu dilihat juga peran IL-10 pada fase awal dan akhir infeksi kusta. Keterlibatan polimorfisme IL-10 dengan kusta di banyak populasi etnis yang berbeda menunjukkan bahwa peran IL-10 perlu diselidiki lebih lanjut, baik dalam studi genetik dan fungsional.

BAB 10
PERBANDINGAN KADAR IL-10 PADA KUSTA

Perbandingan Kadar Interleukin-10 pada Kusta

Pada studi yang dilakukan oleh Oktariana et al., dan Kodrati et al., perbandingan kadar interleukin-10 pada penderita kusta dan bukan kusta dapat dilihat pada tabel berikut: (Kodrati et al., 2021)(Oktariana et al., 2022)

Tabel 19. Distribusi kadar interleukin-10

Status responden	**Median**	**Min**	**Max**
Penderita kusta	13,24	5,59	19,41
Bukan penderita kusta	40,15	29,41	44,71

Median kadar IL-10 pada penderita kusta adalah 13,24 pg/ml dengan nilai min 5,59 dan max 19,41. Median kadar IL-10 pada bukan penderita kusta adalah 40,15 pg/ml dengan nilai min 29,41 dan max 44,71. Dari tabel

tersebut, rata-rata kadar IL-10 pada penderita kusta lebih rendah dibanding pada yang bukan penderita kusta. Hasil uji normalitas dengan Saphiro Wilk menunjukkan bahwa data berdistribusi tidak normal ($p<0.05$).

Setelah dianalisis dengan uji Mann-Whitney, perbedaan rerata perbandingan kadar interleukin-10 pada penderita kusta dan bukan kusta dapat dilihat pada tabel berikut:

Tabel 20. Perbandingan kadar interleukin-10

Status responden	**Median**	**Min**	**Max**	**P value**
Penderita kusta	13,24	5,59	19,41	0,000*
Bukan penderita kusta	40,15	29,41	44,71	

* Uji Mann-Whitney

Untuk mengetahui perbedaan kadar interleukin-10 pada penderita kusta dan bukan penderita kusta, maka dilakukan uji Mann-Whitney. Setelah dianalisis dengan uji Mann-Whitney, didapatkan P value 0,000 yang berarti

terdapat perbedaan rerata kadar interleukin-10 yang bermakna antara kelompok kusta dan bukan kusta.

Mekanisme

Rata-rata kadar interleukin-10 pada penderita kusta lebih rendah (13,24 pg/ml) dibanding pada bukan penderita kusta (40,15 pg/ml). Hasil yang didapatkan berbeda dengan hasil pada penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa kadar interleukin-10 pada penderita kusta lebih tinggi dibandingkan dengan bukan penderita kusta. Penelitian yang dilakukan oleh Madan et al., menunjukkan bahwa kadar interleukin-10 pada penderita kusta lebih tinggi, yaitu 59,48 pg/ml, dibanding pada bukan penderita kusta, yaitu 15,90 pg/ml (Madan et al., 2011).

Pemberian *multidrug therapy* (MDT) dapat menimbulkan efek menurunkan indeks bakteri pada penderita kusta dan bisa menurunkan stimulasi antigen terhadap respon imun sehingga menyebabkan penurunan produksi sitokin pada penderita kusta, sebagaimana diketahui bahwa nilai interleukin-10 memiliki korelasi positif dengan indeks bakteri (Moubasher et al., 1998).

Penelitian lain juga menyebutkan bahwa terdapat penurunan indeks bakteri pada penderita kusta yang sudah mendapatkan pengobatan MDT selama 12-24 bulan pada kusta tipe MB (Tomioka, 2011).

BAB 12
PENUTUP

Interleukin-10 berperan dalam berbagai regulasi respon imun dalam penyakit kusta. Sitokin ini disandi oleh gen interleukin-10. Salah satu daerah yang berperan penting dalam ekspresi gen ini adalah daerah promotor, di mana terjadi pengikatan spesifik faktor transkripsi protein. Polimorfisme pada regio ini dapat memicu perubahan pada regulasi transkripsi dengan memodifikasi situs pengikatan faktor transkripsi sehingga mempengaruhi ekspresi gen. Polimorfisme pada promotor gen interleukin-10 dapat menyebabkan perubahan pada jumlah interleukin-10 yang diproduksi. Perubahan jumlah interleukin-10 yang diproduksi ini, khususnya peningkatan interleukin-10, dapat berpengaruh pada respon imun dalam perkembangan penyakit kusta. Berbagai penelitian masih menunjukkan hasil yang kontroversial, salah satunya di populasi Sumatera Selatan, yang menunjukkan tidak adanya hubungan yang bermakna antara polimorfisme titik -819 C/T dengan

kerentanan penyakit kusta, namun terdapat perbedaan rerata kadar interleukin-10 yang bermakna antara kelompok kusta dan bukan kusta.

Di masa mendatang, diperlukan kajian dan studi lebih lanjut, baik studi genetik terhadap polimorfisme gen IL-10 pada varian titik dan subjek penelitian yang berbeda serta sampel yang lebih besar, maupun studi fungsional terhadap pola haplotipe polimorfisme IL-10, agar didapatkan pengetahuan yang lebih spesifik mengenai peran gen IL-10 terhadap kerentanan penyakit kusta.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A. K., Lichtman, A., & Pillai, S. (2019). *Basic Immunology: Functions and Disorders of the Immune System, 6e: Sae-E-Book*. Elsevier India.

Abel, L., & Demenais, F. (1988). Detection of major genes for susceptibility to leprosy and its subtypes in a Caribbean island: Desirade island. *American Journal of Human Genetics*, *42*(2), 256.

Abel, L., Lap, V. D., Oberti, J., Van Thuc, N., Van Cua, V., Guilloud-Bataille, M., Schurr, E., & Lagrange, P. H. (1995). Complex segregation analysis of leprosy in southern Vietnam. *Genetic Epidemiology*, *12*(1), 63–82.

Alter, A., Alcaïs, A., Abel, L., & Schurr, E. (2008). Leprosy as a genetic model for susceptibility to common infectious diseases. *Human Genetics*, *123*(3), 227–235. https://doi.org/10.1007/s00439-008-0474-z

Alvarado-Arnez, L. E., Amaral, E. P., Sales-Marques, C., Durães, S. M. B., Cardoso, C. C., Sarno, E. N., Pacheco, A. G., Lana, F. C. F., & Moraes, M. O.

(2015). Association of IL10 polymorphisms and leprosy: A meta-analysis. *PLoS ONE*, *10*(9), 1–13. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136282

Bakker, M. I., Hatta, M., Kwenang, A., Van Mosseveld, P., Faber, W. R., Klatser, P. R., & Oskam, L. (2006). Risk factors for developing leprosy–a population-based cohort study in Indonesia. *Leprosy Review*, *77*(1), 48–61.

Basel, P., Pahan, D., Moet, F. J., Oskam, L., & Richardus, J. H. (2014). Leprosy incidence: six years follow-up of a population cohort in Bangladesh. *Leprosy Review*, *85*(3), 158–169.

Brennan, P. J., & Spencer, J. S. (2019). The Physiology of Mycobacterium leprae Morphology and Cell Wall. *The International Textbook of Leprosy*, *6*, 1–51.

Brightbill, H. D., Plevy, S. E., Modlin, R. L., & Smale, S. T. (2000). A prominent role for Sp1 during lipopolysaccharide-mediated induction of the IL-10 promoter in macrophages. *The Journal of Immunology*, *164*(4), 1940–1951.

Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V, & Jackson, R.

(2016). *Campbell biologie*. Pearson.

Cardona-Castro, N., Sánchez-Jiménez, M., Rojas, W., & Bedoya-Berrío, G. (2012). IL-10 gene promoter polymorphisms and leprosy in a Colombianpopulation sample. *Biomedica*, *32*(1), 71–76. https://doi.org/10.7705/biomedica.v32i1.386

Chakravartti, M. R., Vogel, F., Becker, P. E., Lenz, W., & Wendt, G. G. (1973). Topics in human genetics. *Becker, PE*, *1*, 1–123.

Chen, X. H., Xiong, J. H., Ning, Y., Wen, Y., Liu, J., Mao, C., Weng, X. M., & Gu, J. C. (2013). IL-10 promoter SNPs and susceptibility to leprosy in ethnic groups from southwest China. *Genetics and Molecular Research*, *12*(3), 2876–2885. https://doi.org/10.4238/2013.August.12.3

Commins, S., Steinke, J. W., & Borish, L. (2008). The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *121*(5), 1108–1111. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2008.02.026

Couper, K. N., Blount, D. G., & Riley, E. M. (2008). IL-10: The Master Regulator of Immunity to Infection.

The Journal of Immunology, *180*(9), 5771–5777. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5771

Depkes, R. I. (2005). Buku Pedoman Nasional Pemberantasan Penyakit Kusta Cetakan XVII. *Jakarta: Direktorat Jendral PPM Dan PLP*.

Djuanda, A., Hamzah, M., & Aisah, S. (2010). Ilmu penyakit kulit dan kelamin Edisi keenam. *Jakarta: Balai Penerbit FKUI*.

Eskdale, J., Keijsers, V., Huizinga, T., & Gallagher, G. (1999). Microsatellite alleles and single nucleotide polymorphisms (SNP) combine to form four major haplotype families at the human interleukin-10 (IL-10) locus. *Genes & Immunity*, *1*(2), 151–155.

Fareed, M., & Afzal, M. (2013). Single nucleotide polymorphism in genome-wide association of human population: a tool for broad spectrum service. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, *14*(2), 123–134.

Félix, J. S. V., Cázarez-Salazar, S., Ríos-Tostado, J. J., Flores-Garcia, A., Rangel-Villalobos, H., & Murillo-Llanes, J. (2012). Lack of effects of the TNF-α and IL-10 gene polymorphisms in Mexican patients with

lepromatous leprosy. *Leprosy Review*, *83*(1), 34–39. https://doi.org/10.47276/lr.83.1.34

Fitness, J., Floyd, S., Warndorff, D. K., Sichali, L., Mwaungulu, L., Crampin, A. C., Fine, P. E. M., & Hill, A. V. S. (2004). Large-scale candidate gene study of leprosy susceptibility in the Karonga district of northern Malawi. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *71*(3), 330–340. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.330

Franceschi, D. S. A., Mazini, P. S., Rudnick, C. C. C., Sell, A. M., Tsuneto, L. T., Ribas, M. L., Peixoto, P. R., & Visentainer, J. E. L. (2009). Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*, *13*(4), 493–498. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2008.08.019

Garcia, P., Alencar, D., Pinto, P., Santos, N., Salgado, C., Sortica, V. A., Hutz, M. H., Ribeiro-dos-Santos, Â., & Santos, S. (2013). Haplotypes of the IL10 gene as potential protection factors in leprosy patients. *Clinical and Vaccine Immunology*, *20*(10), 1599–

1603. https://doi.org/10.1128/CVI.00334-13

Gibson, A. W., Edberg, J. C., Wu, J., Westendorp, R. G. J., Huizinga, T. W. J., & Kimberly, R. P. (2001). Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, *166*(6), 3915–3922.

Goldsmith, L. A., Katz, S. I., Gilchrest, B. A., Paller, A. S., Leffell, D. J., & Wolff, K. (2012). Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 8e. *McGrawHill Medical*, 2421–2429.

Goodin, D. S., & Khankhanian, P. (2014). Single Nucleotide Polymorphism (SNP)-strings: an alternative method for assessing genetic associations. *PLoS One*, *9*(4), e90034.

Goulart, L. R., & Goulart, I. M. B. (2009). Leprosy pathogenetic background: A review and lessons from other mycobacterial diseases. *Archives of Dermatological Research*, *301*(2), 123–137. https://doi.org/10.1007/s00403-008-0917-3

Gray, I. C., Campbell, D. A., & Spurr, N. K. (2000). Single nucleotide polymorphisms as tools in human

genetics. *Human Molecular Genetics*, *9*(16), 2403–2408.

Jarduli, L. R., Sell, A. M., Reis, P. G., Sippert, E. Â., Ayo, C. M., Mazini, P. S., Alves, H. V., Teixeira, J. J. V., & Visentainer, J. E. L. (2013). Role of *HLA*, *KIR*, *MICA*, and Cytokines Genes in Leprosy. *BioMed Research International*, *2013*, 989837. https://doi.org/10.1155/2013/989837

Kaur, G., & Kaur, J. (2017). Multifaceted role of lipids in Mycobacterium leprae. *Future Microbiology*, *12*(4), 315–335. https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0173

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. (2020). Profil Kesehatan Indonesia 2020. In *Kementerian Kesehatan RI*.

Kodrati, A., Salim, E. M., & Hafy, Z. (2021). Comparison of Serum Interleukin 10 Levels between Leprosy and Non-Leprosy Population. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan*, *21*(1), 39–44. https://doi.org/10.18196/mmjkk.v21i1.6514

Kube, D., Rieth, H., Eskdale, J., Kremsner, P. G., & Gallagher, G. (2001). Structural characterisation of the distal 5′ flanking region of the human interleukin-

10 gene. *Genes and Immunity*, *2*(4), 181–190. https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363750

Kubo, M., & Motomura, Y. (2012). Transcriptional regulation of the anti-inflammatory cytokine IL-10 in acquired immune cells. *Frontiers in Immunology*, *3*(AUG), 1–9. https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00275

Lio, D., Scola, L., Crivello, A., Colonna-Romano, G., Candore, G., Bonafe, M., Cavallone, L., Franceschi, C., & Caruso, C. (2002). Gender-specific association between− 1082 IL-10 promoter polymorphism and longevity. *Genes & Immunity*, *3*(1), 30–33.

Lowe, C. (2021). Basic Knowledge on Leprosy: A Short Review. *Journal of Biomedical Research & Environmental Sciences*, *2*(5), 345–349. https://doi.org/10.37871/jbres1240

Madan, N. K., Agarwal, K., & Chander, R. (2011). Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Leprosy Review*, *82*(4), 371–382.

Madeshiya, A. K., Singh, S., Dwivedi, S., Konwar, R., NATU, S., & Ghatak, A. (2017). Association of IL-

10 gene (− 1082A> G,− 819C> T and− 592C> A) polymorphism and its serum level with metabolic syndrome of north Indian subjects. *Journal of Genetics*, *96*(1), 53–64.

Mahapatra, S., Crick, D. C., McNeil, M. R., & Brennan, P. J. (2008). Unique structural features of the peptidoglycan of Mycobacterium leprae. *Journal of Bacteriology*, *190*(2), 655–661.

Malhotra, D., Darvishi, K., Sood, S., Sharma, S., Grover, C., Relhan, V., Reddy, B. S., & Bamezai, R. N. (2005). IL-10 promoter single nucleotide polymorphisms are significantly associated with resistance to leprosy. *Human Genetics*, *118*(2), 295–300. https://doi.org/10.1007/s00439-005-0042-8

Mastrangelo, G., Silva Neto, J. da, Silva, G. V. da, Scoizzato, L., Fadda, E., Dallapicola, M., Folleto, A. L., & Cegolon, L. (2011). Leprosy reactions: the effect of gender and household contacts. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *106*, 92–96.

Mege, J. L., Meghari, S., Honstettre, A., Capo, C., & Raoult, D. (2006). The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infectious*

Diseases, *6*(9), 557–569. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70577-1

Mishra, A., Nizamuddin, S., Arekatla, G., Prakash, S., Dewangan, H., Dominic, A., Mishra, A., Sudhakar, D. V. S., Parine, N. R., Tupperwar, N. C., & Thangaraj, K. (2015). IL10 variant g.5311A is associated with visceral leishmaniasis in Indian population. *PLoS ONE*, *10*(5), 1–16. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124559

Moet, F. J., Meima, A., Oskam, L., & Richardus, J. H. (2004). Risk factors for the development of clinical leprosy among contacts, and their relevance for targeted interventions. *Leprosy Review*, *75*(4), 310–326.

Monot, M., Honore, N., Garnier, T., Araoz, R., Coppe, J.-Y., & Lacroix, C. (2009). The origin of leprosy. *Science*, *308*(5724), 1040–1042. https://doi.org/10.1017/cbo9780511535291.006

Moraes, M. O., Pacheco, A. G., Schonkeren, J. J. M., Vanderborght, P. R., Nery, J. A. C., Santos, A. R., Moraes, M. E., Moraes, J. R., Ottenhoff, T. H. M., Sampaio, E. P., Huizinga, T. W. J., & Sarno, E. N.

(2004). Interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms as markers for disease susceptibility and disease severity in leprosy. *Genes and Immunity*, *5*(7), 592–595. https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364122

Mörmann, M., Rieth, H., Hua, T. D., Assohou, C., Roupelieva, M., Hu, S. L., Kremsner, P. G., Luty, A. J. F., & Kube, D. (2004). Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes & Immunity*, *5*(4), 246–255.

Moubasher, A. E. A., Kamel, N. A., Zedan, H., & Raheem, D. E. A. (1998). Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *International Journal of Dermatology*, *37*(10), 733–740.

Oktariana, D., Argentina, F., Hafy, Z., Salim, E. M., Kurniati, N., Rahadiyanto, K. Y., & Lusiana, E. (2021). Association of −819 t/c il-10 gene promoter polymorphisms with susceptibility to leprosy in south sumatera indonesia. *Leprosy Review*, *92*(2), 162–169. https://doi.org/10.47276/lr.92.2.162

Oktariana, D., Argentina, F., Hafy, Z., Salim, E. M.,

Kurniati, N., & Ya'kub R, K. (2021). Distribution of -819 interleukin-10 promoter gene polymorphisms among leprosy patients. *Majalah Kedokteran Sriwijaya*, *January*, 18–23.

Oktariana, D., Saleh, I., Hafy, Z., Liberty, I. A., Salim, E. M., & Legiran, L. (2022). The Role of Interleukin-10 in Leprosy : A Review. *Indian Journal of Leprosy*, 321–334.

Opdal, S. H. (2004). IL-10 gene polymorphisms in infectious disease and SIDS. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *42*(1), 48–52. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.femsim.2004.06.006

Pereira, A. C., Brito-de-Souza, V. N., Cardoso, C. C., Dias-Baptista, I. M. F., Parelli, F. P. C., Venturini, J., Villani-Moreno, F. R., Pacheco, A. G., & Moraes, M. O. (2009). Genetic, epidemiological and biological analysis of interleukin-10 promoter single-nucleotide polymorphisms suggests a definitive role for -819C/T in leprosy susceptibility. *Genes and Immunity*, *10*(2), 174–180. https://doi.org/10.1038/gene.2008.97

Prasse, A., Germann, M., Pechkovsky, D. V, Markert, A.,

Verres, T., Stahl, M., Melchers, I., Luttmann, W., Müller-Quernheim, J., & Zissel, G. (2007). IL-10–producing monocytes differentiate to alternatively activated macrophages and are increased in atopic patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *119*(2), 464–471.

Ramos, J. M., Martínez-Martín, M., Reyes, F., Lemma, D., Belinchón, I., & Gutiérrez, F. (2012). Gender differential on characteristics and outcome of leprosy patients admitted to a long-term care rural hospital in South-Eastern Ethiopia. *International Journal for Equity in Health*, *11*(1), 1–7.

Reuss, E., Fimmers, R., Kruger, A., Becker, C., Rittner, C., & Höhler, T. (2002). Differential regulation of interleukin-10 production by genetic and environmental factors - A twin study. *Genes and Immunity*, *3*(7), 407–413. https://doi.org/10.1038/sj.gene.6363920

Santos, A. R., Suffys, P. N., Vanderborght, P. R., Moraes, M. O., Vieira, L. M. M., Cabello, P. H., Bakker, A. M., Matos, H. J., Huizinga, T. W. J., Ottenhoff, T. H. M., Sampaio, E. P., & Sarno, E. N. (2002). Role of

tumor necrosis factor-α and interleukin-10 promoter gene polymorphisms in leprosy. *Journal of Infectious Diseases*, *186*(11), 1687–1691. https://doi.org/10.1086/345366

Sari, N., Sari, N., Amiruddin, M. D., Amin, S., & Adam, A. M. (2013). *Tinjauan Pustaka tumor necrosis factor- α (tnf- α) pada penyakit kusta*. *2*, 35–40.

Scollard, D. M. (2000). Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. *Microbes and Infection*, *2*(15), 1835–1843.

Shepard, C. C. (1960). The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *The Journal of Experimental Medicine*, *112*(3), 445–454.

Shields, E. D., Russell, D. A., & Pericak-Vance, M. A. (1987). Genetic epidemiology of the susceptibility to leprosy. *The Journal of Clinical Investigation*, *79*(4), 1139–1143.

Singh, P., & Cole, S. T. (2011). Mycobacterium leprae: genes, pseudogenes and genetic diversity. *Future Microbiology*, *6*(1), 57–71.

Sutedja, E. K., Agusni, J. H., & Dharmadji, H. P. (2016). *Korelasi Kadar Interleukin-10 Serum dengan Indeks Bakteri pada Pasien Kusta yang Telah Mendapat Pengobatan Multidrug Therapy (MDT)(The Correlation between Interleukin-10 Serum with Bacterial Index in Multidrug Therapy-treated Leprosy Patients)*.

Tomioka, H. (2011). Immunology of leprosy-roles of cytokines in host defense against leprosy bacilli. *Leprosy*, 72–88.

Trifunović, J., Miller, L., Debeljak, Ž., & Horvat, V. (2015). Pathologic patterns of interleukin 10 expression–a review. *Biochemia Medica*, *25*(1), 36–48. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.274.23.16513

Trivella, D. B. B., Ferreira-Júnior, J. R., Dumoutier, L., Renauld, J. C., & Polikarpov, I. (2010). Structure and function of interleukin-22 and other members of the interleukin-10 family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, *67*(17), 2909–2935. https://doi.org/10.1007/s00018-010-0380-0

Tu, H. (2006). Psychoneuroimmunology of Interleukin-10. *Doctoral Dissertation*.

Wolk, K., Witte, E., Reineke, U., Witte, K., Friedrich, M., Sterry, W., Asadullah, K., Volk, H. D., & Sabat, R. (2005). Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22? *Genes & Immunity*, *6*(1), 8–18.

World Health Organization (WHO). (2020). Guidelines for the diagnosis, treatment and prevention of leprosy. In *World Health Organization: Vol. Jan* (Issue 2).