

## Analisis SNP (Single Nucleotide Polymorphism) Promotor GEN IL-10 pada Penderita Filariasis

### SNP Analysis of The Promoter IL-10 Gene in Filaria Infected Patient

Atina Maria<sup>1</sup>, Anto Budiharjo<sup>1</sup>, Hermin Pancasakti Kusumaningrum<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia

<sup>2</sup>Departemen Biologi Universitas Diponegoro, Semarang, Indonesia,

\*E-mail: [atinamaria20@gmail.com](mailto:atinamaria20@gmail.com)

#### Abstrak

Filariasis limfatik merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh nematoda dari jenis *Wuchereria bancrofti* dan *Brugia malayi* dewasa yang menghuni jaringan limfatik. Filariasis limfatik ini disebarkan oleh empat genus nyamuk, yaitu, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* dan *Mansonia*. Respon imun terhadap parasit filaria terdiri dari *Thelper2* (Th2) dan melibatkan produksi *cytokin* –IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, dan IL-13, *isotype antibody*—IgG1, IgG4 and IgE, dan meningkatnya populasi *eosinophils* dan makrofag yang aktif. Polimorfisme pada daerah promotor gen IL-10 diidentifikasi berhubungan dengan tinggi rendahnya produksi IL-10 pada sel darah perifer pada stimulasi *in vitro* dengan *lipopolysaccharide* (LPS). Sampel diambil dari penderita filariasis, kemudian diekstraksi dan diamplifikasi pada posisi -1082, -819, -592. Hasil amplifikasi kemudian di restriksi dan di sekuensing. Hasil penelitian dari sampel penderita filariasis yang diteliti menunjukkan memiliki haplotip ACA pada analisis RFLP. Analisis hasil sekuensing menggunakan dua aplikasi, yaitu *DNA baser* dan *Bioedit*. Analisis menggunakan *DNA baser* dan *Bioedit* serta dibandingkan dengan tag SNP didapatkan satu SNP. Perbandingan antara sekuens DNA yang didapatkan dengan tag SNP mendapatkan haplotip CC.

**Kata kunci:** *Filariasis; gen IL-10; SNP*

#### Abstract

*Lymphatic filariasis is a disease caused by adult Wuchereria bancrofti and Brugia malayi nematodes that stay in the lymph system. The parasite are transmited by four genus of mosquitos; Anopheles, Culex, Aedes and Mansonia. Immune responses against this parasitic include Thelper (TH2) and involve the production of cytokine –IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, dan IL-13, isotype antibody—IgG1, IgG4, and IgE and increasing the population of eosinophils dan activated macrophage. Polymorphism in the promoter region of il-10 gene has shown a correlation with the production of cytokine IL-10 in peripheral blood in in-vitro stimulation of LPS. Sample was taken from a filariasis patient and extracted then amplified on position -1082, 819, and -592. The amplification product was restricted and sequenced. the result from RFLP analysis shows that the sampel has ACA haplotype. Sequencing result was analyzed using DNA baser and Bioedit. The analysis with DNA baser and Bioedit compared with GWAS Central tag SNP obtained one SNP. The comparison with SNP database showed CC haplotype.*

**Keywords:** *Filariasis; IL-10 gene; SNP*

#### PENDAHULUAN

Filariasis limfatik merupakan suatu penyakit yang disebabkan oleh nematoda dari jenis *Wuchereria bancrofti* dan *Brugia malayi* dewasa yang menghuni jaringan limfatik<sup>1</sup>. Penyakit ini bersifat kronis dan dapat menyebabkan cacat berupa

pembesaran kaki, lengan, dan alat kelamin, baik perempuan maupun laki-laki<sup>2</sup>. Filariasis limfatik ini disebarkan oleh empat genus nyamuk, yaitu, *Anopheles*, *Culex*, *Aedes* dan *Mansonia*<sup>3</sup>.

Larva filaria memasuki tubuh manusia melalui gigitan nyamuk. Setelah filaria memasuki tubuh, tubuh manusia memiliki

sistem pertahanan dalam melawan filaria. Respon imun terhadap parasit filaria terdiri dari Thelper2 (Th2) dan melibatkan produksi cytokin –IL-4, IL-5, IL-9, *IL-10*, dan IL-13, isotype antibody—IgG1, IgG4 and IgE, dan meningkatnya populasi eosinophils dan makrofag yang aktif. Interaksi antara sel T dengan beberapa sel inang, termasuk sel dendrit dan makrofag menginduksi dan meningkatkan respon Th2. Karakteristik umum infeksi adalah munculnya Th2 yang telah termodifikasi dan lingkungan yang dipenuhi oleh *IL-10*<sup>4</sup>.

Polimorfisme DNA merupakan perbedaan yang ada pada sebuah sekuens nukleotida antar individu. Perbedaan ini dapat berupa perbedaan pada pergantian satu pasang basa, delesi, atau insersi. Polimorfisme genetik timbul dari suatu mutasi. Polimorfisme paling sederhana adalah mutasi satu basa nitrogen yang dikenal dengan *Single Nucleotide Polymorphism* atau seringkali disebut dengan *snip*. Dalam ranah medis, SNP digunakan untuk pemetaan kelainan genetik dalam penggambaran pengaruh genetik dalam penyakit yang memiliki banyak faktor seperti kanker payudara, penyakit kardiovaskuler, asma, dan pemetaan haplotipe<sup>5</sup>.

Polimorfisme pada daerah promotor gen *IL-10* diidentifikasi berhubungan dengan tinggi rendahnya produksi *IL-10* pada sel darah perifer pada stimulasi *in vitro* dengan *lipopolysacharide* (LPS). *Restriction fragment length polymorphism* (RFLP) merupakan analisis yang digunakan untuk mendapatkan informasi mengenai mutasi yang terjadi pada region pendek spesifik. RFLP dapat digunakan untuk deteksi polimorfisme sekuens DNA<sup>6</sup>. Penjabaran di atas memberikan informasi bahwa informasi filariasis merupakan penyakit endemik di Indonesia dengan kasus klinis yang cukup tinggi. Respon imun tubuh untuk melawan infeksi filariasis meliputi respon dari Thelper berupa produksi cytokin dan isotype antibody. Mutasi yang terjadi pada promotor gen *IL-10* pada

penderita filariasis dapat diketahui dengan teknik RFLP

## METODE

### Alat dan bahan

*ThermoFisher Scientific NanoDrop 2000c, Multigene Optimax Thermal Cycler, Micropipette 10, Micropipette 100, Micropipette 200, Micropipette 1000 µl, Tip 20 µl, 200 µl, 1000 µl, Vortex, micro tube, tube PCR, Laminar Air Flow, tube stand, Mupid exU Submarine Elfro-system, cetakan agarose, sisir agarose, oven, microsentrifuge, lavender-top blood collection tube, gelas ukur, Gel doc.* Bahan yang digunakan antara lain darah yang diambil dari pasien filariasis di Kabupaten Pekalongan, alkohol, Ethanol 70%, ddH<sub>2</sub>O, *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) GB10/GB300, KappaTaq Extra Hotstart Ready Mix with Dye, agarose, DNA ladder, loading dye, buffer TAE, Etidium bromida.*

### Ekstraksi dan Amplifikasi DNA

Ekstraksi DNA darah mengikuti protokol dari *Geneaid Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) GB10/GB300*. Hasil ekstraksi di ukur kemurniannya menggunakan *ThermoFisher Scientific NanoDrop 2000c*. Amplifikasi DNA dilakukan dengan protokol *Kappa Taq Hotstart PCR kit* dan instrumen *Multigene Optimax Thermal Cycler*. Ampifikasi dilakukan pada tiga posisi (tabel 1.1)

Tabel 1.1 Basa Primer yang digunakan

Posisi	Primer
-1082	F 5' CTCGCTGCAACCCAACTGGC-3' R 5' TCTTACCTATCCCTACTTCC-3'
-819	F 5'-TCATTCTATGTGCTGGAGATGG-3' R 5'-TCATTCTATGTGCTGGAGATGG-3'

-592 F 5'-CCTAGGTCACAGTGACGTGG-3'  
5' GGTGAGCACTACCTGACTAGC-3'

**Restriksi Enzim**

Hasil PCR kemudian didigesti selama dua jam pada suhu 37 °C dengan enzim restriksi *MnI* untuk polimorfisme pada -1082, *MaeIII* untuk polimorfisme pada -819 dan *RsaI* untuk polimorfisme pada -592.

**Sekuensing**

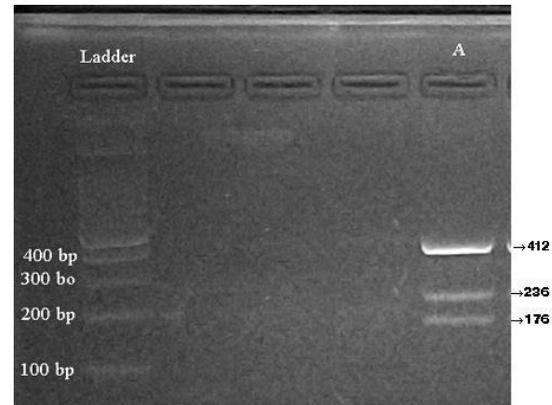
Hasil PCR dikirim untuk sekuensing di PT. Genetika Sains. Hasil Sekuensing kemudian dianalisis menggunakan aplikasi *DNA baser*, *Bioedit*, BLAST NCBI dan *GWAS Central*.

**HASIL DAN PEMBAHASAN** □ 12pt, uppercase, bold

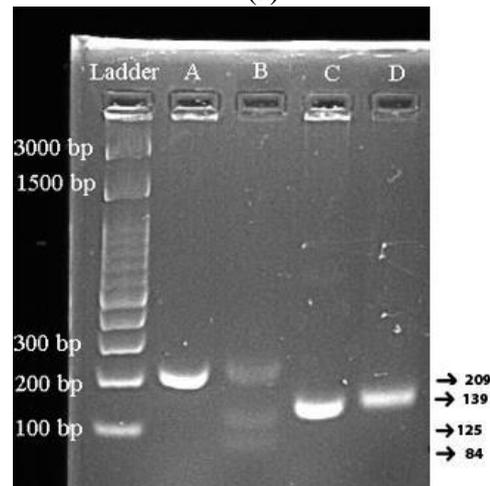
Restriksi dilakukan dengan tiga enzim, yaitu *MnI* untuk restriksi hasil amplifikasi pada posisi -1082, *MaeIII* untuk restriksi hasil amplifikasi pada posisi -819, dan *RsaI* untuk restriksi hasil amplifikasi pada posisi -592. Ketiga enzim ini dipilih karena ketiganya memiliki situs pengenal yang ada pada fragmen situs polimorfisme posisi -1082, -819, dan -592. Apabila terdapat alel \*A pada situs pengenal dalam fragmen DNA hasil amplifikasi maka akan terjadi pemotongan fragmen DNA menjadi 33 bp dan 106 bp pada posisi -1082. Jika terdapat alel \*T pada situs pengenal dalam fragmen DNA, maka tidak akan terjadi pemotongan fragmen DNA pada posisi -819. Apabila terdapat alel \*T pada situs pengenal dalam fragmen DNA, pemotongan tidak terjadi pada posisi -592.

Hasil amplifikasi DNA pada posisi -592 mengalami pemotongan menjadi tiga fragmen DNA, yaitu sepanjang 412 bp, 236 bp, dan 176 bp, hal ini menunjukkan bahwa sampel memiliki alel \*A. Hasil amplifikasi DNA pada posisi -819 mengalami pemotongan menjadi tiga fragmen DNA sepanjang 84 bp, 125 bp, dan 209 bp, yang menandakan pada sampel ini terdapat alel

\*C. Hasil restriksi menunjukkan bahwa hasil amplifikasi DNA pada posisi -1082 tidak mengalami pemotongan oleh enzim. Hal ini menunjukkan bahwa pada sampel ini terdapat alel \*A (Gambar 1.2).



(a)



(b)

Gambar 1.2 Visualisasi hasil restriksi (a) pada posisi -592 (A) terdapat pemotongan fragmen amplifikasi menjadi fragmen sepanjang 236 bp dan 176 bp. (b) terdapat pemotongan fragmen amplifikasi posisi -819 menjadi fragmen sepanjang 125 bp dan 84 bp (B), berbeda jika dibandingkan dengan hasil amplifikasi (A). Tidak terdapat pemotongan pada hasil amplifikasi posisi -1082 (D) sehingga menghasilkan fragmen yang sama dengan hasil amplifikasi (C) yaitu 139 bp.

Haplotip yang didapatkan pada posisi -1082/-829/-592 adalah ACA.

Polimorfisme pada posisi -1082 G/A dengan alel A berhubungan dengan meningkatnya transkripsi gen IL-10 pada sel *mast* B<sup>7</sup>. Studi yang sebelumnya dilakukan menyatakan bahwa haplotip GCC, ACC, atau ATA yang dibentuk oleh SNP IL-10-1087AG, IL-10-824CT, dan IL-10-597AC berperan dalam kapasitas produksi in vitro IL-10. Haplotip ATA dideskripsikan sebagai produksi in vitro IL-10 yang paling rendah<sup>8</sup>. Transkripsi IL-10 yang meningkat oleh sel mas B akan menyebabkan terhambatnya produksi sitokin IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2 oleh sel Th1. IL-2 berfungsi untuk menstimulasi pertumbuhan dan diferensiasi respon sel T, dengan turunnya sitokin IL-2, pertumbuhan serta diferensiasi sel T terhambat. Sel T merupakan kunci dalam imunitas melawan infeksi filaria dalam menekan perkembangan filaria. IFN- $\gamma$  berfungsi dalam eliminasi parasit.

Hasil Sekuensing dianalisis menggunakan aplikasi *DNA baser*, *Bioedit*, BLAST NCBI dan *GWAS Central*. Analisis yang dilakukan menunjukkan adanya SNP pada posisi basa ke -761 dengan genotip yang muncul adalah C. Perbandingan dengan *database* di *GWAS Central* menunjukkan terdapat haplotip CC pada sampel. SNP -819 (rs1800871) merupakan substitusi basa C atau T yang merupakan polimorfisme dimorfik dan mempengaruhi produksi *IL-10*. SNP -592 (rs1800872) merupakan substitusi basa C atau A dan berlokasi pada daerah dengan fungsi regulasi negatif. Regulasi negatif merupakan proses penghambatan ekspresi gen dimana protein represor menempel pada operator. Haplotip CC pada rs1800871 dan rs1800872 telah diketahui meningkatkan produksi IL-10<sup>10</sup>.

## KESIMPULAN

Hasil analisis RFLP sampel penderita filariasis yang diteliti menunjukkan adanya haplotip ACA. Analisis hasil sekuensing menggunakan dua aplikasi, yaitu *DNA baser* dan *Bioedit*. Analisis menggunakan

*DNA baser* dan *Bioedit* serta dibandingkan dengan tag SNP didapatkan satu SNP. Perbandingan antara sekuens DNA yang didapatkan dengan tag SNP mendapatkan haplotip CC.

## DAFTAR RUJUKAN

1. Fernando, Rajan L. Sujatha S.E. Leong, Anthony S. Y. 2001. *Tropical Infectious Diseases: Epidemiology, Investigation, Diagnosis and Management*. UK : Cambridge University Press
2. Nwoke BEB, Nwoke EA, Ukaga CN, Nwachukw MI. Epidemiological Characteristics of Brancoftian filariasis and the Nigerian Enviroment. *Journal of Public Health and Epidemology*. 2010; 2(6):113-117
3. WHO. 2013. *Lymphatic filariasis: a handbook of practical entomology for national lymphatic filariasis elimination programmes*. [www.who.int](http://www.who.int) diakses pada tanggal 2 Maret 2017
4. Babu, S., and T. B. Nutman. "Immunology of Lymphatic Filariasis." *Parasite Immunology*. N.p., 05 Sept. 2014. Web. 13 Mar.
5. Walker, J and Rapley, R. 2007. *Medical BioMethods Handbook*. USA: Springer Science and Business
6. Marwal, A, Anurag K, Gaur R.K. 2014. *Animal Biotechnology: Molecular Markers: Tool for Genetic Analysis*. USA: Elsevier
7. Rees, L. E., Wood, N. A., Gillespie, K. M., Lai, K. N., Gaston, K., & Mathieson, P. W. (2002). The interleukin-10 - 1082 G/A polymorphism: allele frequency in different populations and functional significance. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*, 59(3), 560-569. doi:10.1007/s00018-002-8448-0
8. Kube, D. "Isolation of the Human Interleukin 10 Promoter. Characterization of the Promoter Activity in Burkitt's Lymphoma Cell Lines." *Cytokine* 7.1 (1995): 1-7.

9. Goel, Chandra Trilok. Goel, Apul. 2016. *Lymphatic Filariasis*. USA: Springer