

HUBUNGAN POLIMORFISME GEN VITAMIN D RESEPTOR DENGAN PERIODONTITIS KRONIS

(POLYMORPHISM OF VITAMIN D RECEPTOR GENE IS ASSOCIATED WITH CHRONIC PERIODONTITIS)

Nurlindah Hamrun

Departemen Biologi Oral
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hasanuddin
Jl. Perintis Kemerdekaan KM.10 Tamalanrea Makassar
E-mail: lindahamrun@gmail.com

Abstract

Chronic periodontitis is caused by enhanced resorption of the alveolar bone supporting the teeth and is associated with intraoral inflammation after infection with certain bacteria. Genetic polymorphisms in vitamin D receptor (VDR) gene are associated with bone homeostasis and immunological reaction. The aim of this study was to determine whether polymorphism in VDR gene exons is associated with the incidence of chronic periodontitis. A case-control study was performed on a group of 162 subjects whose ages ranged from 25 to 60 years, were divided into two groups : 81 healthy individuals (control group) and 81 subjects with chronic periodontitis. The polymorphism in the VDR gene was analyzed by polymerase chain reaction, followed by TaqI restriction endonuclease digestion. The result showed that the polymorphism in the vitamin D receptor gene was found in chronic periodontitis with TT genotype (86.4%), Tt genotype (12.4%), and tt genotype (1.2%). This study also determines taqI polymorphism of the VDR gene is associated with the incidence of chronic periodontitis case (OR 12.57; CI: 1.6-99.8). In conclusion, polymorphism of the vitamin D receptor gene is associated with the incidence of chronic periodontitis (OR 12.57).

Key words: chronic periodontitis, polymorphism, Vitamin D receptor

PENDAHULUAN

Periodontitis kronis adalah salah satu penyakit yang banyak dijumpai pada masyarakat di negara maju maupun negara berkembang dan merupakan penyebab utama hilangnya gigi pada usia lanjut. Oleh karena itu, untuk meningkatkan kualitas hidup usia lanjut, penjelasan mengenai patogenesis penyakit ini dianggap sebagai hal yang penting. Periodontitis kronis disebabkan oleh inflamasi intra oral setelah infeksi dengan bakteri tertentu dan meningkatnya resorpsi tulang alveolar pendukung gigi.¹

Kerentanan individual terhadap periodontitis umumnya bervariasi dan ada beberapa individu yang mencapai usia tua tanpa menunjukkan tanda-tanda kerusakan periodontal sedangkan individu lainnya sudah terkena serangan periodontitis yang progresif pada usia yang lebih muda. Variasi pada respons hospes ini diperantarai oleh berbagai faktor genetik dan tidak berhubungan dengan standar kebersihan mulut.² Untuk menjelaskan perbedaan kerentanan individu terhadap periodontitis pada

populasi dewasa, dan gen yang menjadi protein yang bertanggung jawab terhadap imunitas telah banyak dilaporkan sebagai gen yang rentan. Tetapi karena gen-gen tersebut tidak memadai untuk menjelaskan seluruh faktor pejamu pada periodontitis kronis yang merupakan suatu penyakit multifaktor, diharapkan adanya gen yang lebih rentan.^{1,3} Beberapa penelitian menunjukkan bahwa polimorfisme gen *Vitamin D Receptor* (VDR) dapat menjadi komponen genetik dan genotip yang dapat memberi petunjuk kecenderungan kepadatan tulang yang rendah. Polimorfisme genetik pada gen VDR berhubungan dengan homeostatis tulang dan karena resorpsi tulang alveolar merupakan karakteristik utama periodontitis kronis, dapat diduga bahwa mediator metabolisme tulang seperti VDR dan polimorfisme genetiknya berperan penting pada kerentanan periodontitis kronis.^{4,5} Gen VDR merupakan sebuah gen kandidat yang menarik dalam hubungannya dengan periodontitis karena gen ini mempengaruhi fungsi metabolisme tulang dan fungsi imun. *Single nucleotide polymorphisms TaqI*

VDR mungkin berhubungan dengan kerentanan periodontitis kronis sebagai sebuah polimorfisme tunggal dan atau kombinasi dengan polimorfisme gen VDR lain.⁶

Penelitian tentang peranan polimorfisme gen VDR terhadap densitas mineral tulang dan sistem imun telah banyak dilaporkan, tetapi penelitian tentang efek polimorfisme gen VDR terhadap periodontitis masih sangat sedikit dan hasil yang diperoleh berbeda-beda. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah polimorfisme pada exon 9 gen VDR yang diketahui melalui enzim restriksi *Taq I* berhubungan dengan kejadian periodontitis kronis.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian observasional dengan menggunakan rancangan *case control*. Kriteria sampel adalah laki-laki atau wanita berusia 25-60 tahun, tidak menderita diabetes, hepatitis atau HIV, tidak merokok, tidak sedang hamil/menyusui/tidak menggunakan alat KB, suku Bugis Makassar dan bersedia mengikuti prosedur penelitian.

Pengambilan sampel kasus dilakukan di Bagian Periodontologi Rumah Sakit Gigi dan Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin, Makassar. Kelompok subjek terdiri atas 81 pasien yang didiagnosa periodontitis kronis terdiri atas 14 laki-laki dan 67 perempuan, dan kelompok kontrol sebanyak 81 pasien tanpa periodontitis kronis.

Pemeriksaan klinis meliputi kedalaman poket (*Probing pocket depth*) yaitu jarak dari *free gingival margin* ke dasar poket (mm) dan hilangnya perlekatan jaringan (*Clinical attachment loss*): jarak dari *cemento enamel junction* ke dasar poket. Nilai terbesar diambil, dari 6 permukaan gigi yang diperiksa: MB, midB, DB, ML, midL, dan DL. Kemudian dilakukan pemeriksaan *Polymerase Chain Reaction* (PCR) yang meliputi ekstraksi dan pemurnian DNA, amplifikasi pada mesin PCR sebanyak 32 siklus dengan suhu 94°C, *annealing* selama 1,5 menit pada suhu 59°C dan *extension* selama 2 menit pada suhu 72°C. Setelah selesai 30 siklus, kemudian diikuti dengan pemanasan pada suhu 72°C selama 7 menit. *Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR* (RFLP-PCR) dilakukan untuk merestriksi untaian DNA yang telah diamplifikasi oleh mesin PCR. Polimorfisme gen VDR akan dideteksi pada exon 9 dengan menggunakan primer spesifik *Taq I*:

5'-CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' dan

5'-GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'

5 µl hasil amplifikasi PCR dan 2 µl *loading buffer* dicampur dan dimasukkan ke dalam cetakan gel agarose 1,5% yang sudah diberi Etidium Bromida.

Agar gel direndam pada wadah yang berisi buffer TBE. Selanjutnya elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 80 Volt.

Setelah proses elektroforesis selesai, gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Hasil pengamatan setiap pita fragmen DNA, ditentukan posisinya dalam bp (basepair) berdasarkan jarak pita-pita marker/ladder. Pita-pita fragmen pada jarak yang berbeda dari sampel menandakan perbedaan dari gen VDR yang polimorfisme dan yang tidak polimorfisme. Semua yang dihasilkan dari perbedaan ini ditandai dengan huruf "t" (terdapat daerah restriksi) atau huruf "T" (tidak terdapat daerah restriksi).

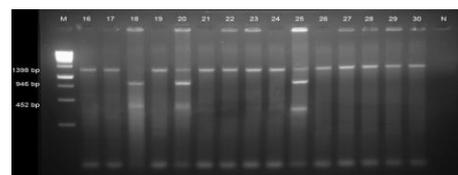
HASIL

Jumlah sampel kasus perempuan 82,7% lebih banyak dari sampel laki-laki 17,3%. Kelompok penderita periodontitis kronis mempunyai OHI-S, kehilangan gigi dan karies yang lebih tinggi dibanding kelompok kontrol. Hal ini sesuai dengan laporan penelitian-penelitian sebelumnya yang menunjukkan peranan OHI-S (*Oral hygiene indeks-simplified*) dan karies terhadap terjadinya periodontitis kronis.

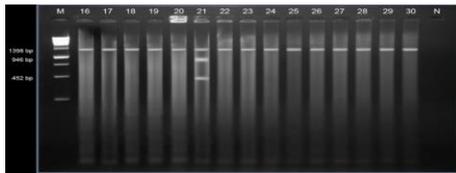
Tabel 1. Karakteristik sampel penelitian

Karakteristik	Kasus (n=81)		Kontrol (n=81)	
	Rerata	SD	Rerata	SD
Umur (tahun)	38,90	9,24	37,61	11,82
Tinggi Badan (cm)	155,53	6,55	157,33	7,33
Berat Badan (kg)	55,46	6,45	56,19	9,22
IMT (kg/m) ²	22,47	2,90	23,18	3,40
Kehilangan gigi	2,48	2,69	1,06	1,07
DMF-T	2,17	2,3	2,04	1,69
OHI-S	2,63	0,96	2,29	0,69
PPD (mm)	4,54	1,27	-	-
CAL (mm)	3,02	1,48	-	-

Polimorfisme gen VDR memberikan 3 bentuk genotipe yaitu genotipe TT (1 band), tt (2 band) dan Tt (3 band). Pada Gambar 1 & 2, tampak tidak ada daerah restriksi pada posisi genotipe TT (1398 bp), sedangkan pada genotipe Tt tampak adanya daerah restriksi yaitu pada posisi 946 bp, 452 bp dan 1398 bp. Pada genotipe tt tampak 2 daerah restriksi yaitu pada posisi 946 bp dan 452 bp.

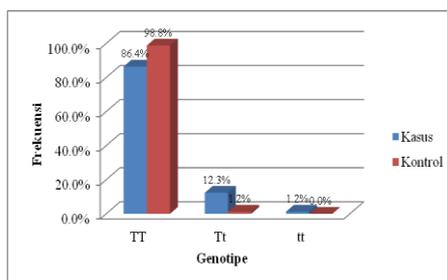


Gambar 1. Salah satu hasil pemeriksaan RFLP PCR kelompok kasus



Gambar 2. Salah satu hasil RFLP-PCR pada kelompok kontrol

Pada kelompok kasus, genotipe TT (86,4%) lebih banyak ditemukan dibanding genotipe Tt (12,3%) dan tt (1,2%). Sedangkan pada kelompok kontrol ditemukan genotipe TT (98,8%), Tt (1,2%) dan genotipe tt tidak ada yang ditemukan.



Gambar 3. Frekuensi genotipe gen VDR pada kelompok kasus dan kontrol

Tabel 2 memperlihatkan bahwa genotip TT pada kelompok kasus didapatkan 86,4% dan genotipe Tt/tt sebanyak 13,6%. Pada analisis hubungan genotipe gen VDR dengan kejadian periodontitis kronis ditemukan bahwa kelompok kasus dengan genotip TT dan Tt gen VDR mempunyai OR 12,5 (95% CI: 1,6-99,8) untuk menderita periodontitis kronis dibanding kelompok kontrol ($p: 0,005$).

Tabel 2. Hubungan genotipe Gen VDR dengan kejadian periodontitis kronis

Genotipe Gen VDR	Kasus		Kontrol		p	OR	95% CI
	n	%	n	%			
TT	70	86,4	80	98,8	0,005	12,5	1,6-99,8
Tt/tt	11	13,6	1	1,2			

p : Fisher's Exact Test, OR: Odds ratio, CI : Confidence Interval

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini diperoleh hubungan yang signifikan antara polimorfisme pada exon 9 gen VDR dan kejadian periodontitis kronis. Hal ini berarti bahwa polimorfisme gen VDR berhubungan dan menjadi faktor risiko untuk terjadinya penyakit periodontitis kronis.

Serupa dengan hasil penelitian ini, Brito⁴ dan Brett dkk.⁷ melaporkan adanya hubungan yang signifikan

antara polimorfisme gen VDR pada pasien periodontitis kronis pada ras kaukasia. Hasil penelitian terbaru dilaporkan oleh Borges MAT⁸ yang menemukan OR 4,57 antara VDR dengan periodontitis kronis pada populasi Brazil. Hasil ini dibantah oleh Yoshihara dkk.¹⁰ pada populasi Jepang yang tidak menemukan perbedaan yang signifikan dalam distribusi VDR *BsmI* antara kelompok kasus dan kelompok kontrol. Hal ini didukung oleh Sun dkk.¹² dan Tachi dkk.¹ yang melaporkan bahwa hubungan yang antara polimorfisme gen VDR dengan kejadian periodontitis kronis tidak bermakna.^{1,4,7,8}

Hasil penelitian mengenai hubungan polimorfisme gen VDR dengan periodontitis kronis masih tidak konsisten, sebagian menemukan adanya hubungan yang bermakna dan sebagian lainnya tidak menemukan hubungan tersebut. Hal ini dapat dipahami oleh karena periodontitis kronis merupakan penyakit poligenik, tidak disebabkan oleh satu gen saja tetapi oleh interaksi beberapa gen. Keanekaragaman masyarakat dalam populasi, ras, faktor lingkungan geografis dan etnik adalah faktor yang juga mungkin berpengaruh, karena efek genetik mungkin berbeda dari etnik yang berbeda.⁹

Odd Ratio (OR) 12,57 yang diperoleh dalam penelitian ini, menjelaskan bahwa sampel yang mengalami polimorfisme gen VDR lebih berisiko 12,57 kali untuk menderita penyakit periodontitis kronis dibandingkan yang tidak mengalami polimorfisme gen VDR. Hal ini mungkin disebabkan fungsi gen VDR yang terlibat dalam berbagai proses seperti dalam metabolisme tulang dan pengaturan respon imun.

Pengaruh gen VDR terhadap periodontitis kronis dalam hubungannya dengan densitas mineral tulang, dapat dijelaskan sebagai berikut: Kalsitrol, bentuk vitamin D hormonal yang aktif, bekerja melalui reseptor vitamin D dan merupakan suatu elemen vitamin D-responsif spesifik yang menginduksi sintesis osteokalsin (BGLAP; 1122600), protein non-kolagen terbanyak dalam tulang. Dalam beberapa penelitian pada saudara kembar, variasi kadar osteokalsin serum terbukti memiliki komponen genetik utama dan berhubungan erat dengan diversitas genetik densitas tulang. 1,25(OH)₂D₃ berperan penting dalam pemeliharaan konsentrasi kalsium dan fosfat dalam darah. Defisiensi vitamin D menyebabkan insufisiensi absorpsi kalsium dan fosfat dalam diet sehingga meningkatkan sekresi hormon paratiroid yang akan memobilisasi simpanan kalsium tulang. Aktivasi VDR melalui dosis farmakologis 1,25(OH)₂D₃ dapat mengatur osteoblast secara langsung, melalui induksi protein remodeling-tulang yaitu osteokalsin dan osteopontin, serta memper-

baiki reseptor aktivator ligand NF-kB (RANKL), suatu sinyal parakrin osteoklastogenesis. VDR mengatur homeostasis tulang melalui aksinya dalam osteoblast dan kondrosit, serta melalui metabolisme tulang.¹⁰

Para peneliti menyatakan bahwa VDR berperan lebih penting dalam tulang trabekular dibandingkan pada tulang kortikal, dan bahwa variasi alel VDR bertanggung jawab atas variasi BMD. Bila terjadi variasi pada DNA atau polimorfisme maka VDR yang berperan penting dalam memelihara konsentrasi kalsium dan fosfat dalam darah menjadi terganggu sehingga kemungkinan mengakibatkan penurunan densitas mineral tulang di seluruh tubuh, termasuk maksila dan mandibula. Penurunan densitas tulang rahang akan meningkatkan porositas alveolar, yaitu perubahan pola trabekular dan peningkatan kecepatan resorpsi tulang setelah invasi bakteri patogen periodontal. Infeksi periodontal meningkatkan pelepasan sitokin proinflamasi secara sistemik, yang mempercepat resorpsi tulang sistemik.¹¹

Dalam hubungannya dengan sistem imun, vitamin D memicu diferensiasi monosit dan menghambat proliferasi limfosit dan sekresi sitokin, seperti interleukin 2 (IL2), interferon- γ , dan IL12. VDR banyak diekspresikan dalam sel-sel imun, seperti sel-sel antigen, natural killer cells, sel T dan sel B, selain itu, 1,25(OH)₂D₃ dinyatakan memiliki efek imunomodulator yang poten. Efek imun 1,25(H)2D3 pada dasarnya dimediasi oleh aksi pada sel-sel dendritik.^{12,13}

Peptida yang dihasilkan oleh host berperan dalam pertahanan imunitas innate melawan infeksi mukosa. VDR yang diaktivasi oleh 1,25(OH)₂D₃ menginduksi ekspresi CAMP dan β -defensin 4 dan membunuh bakteri dalam makrofag. Aktivasi *Toll like receptor* (TLR) oleh lipopeptida yang dihasilkan oleh bakteri meningkatkan ekspresi VDR dan CYP27B1 dalam makrofag, suatu mekanisme yang meningkatkan induksi gen target. β -defensin memiliki aktivitas antimikroba terhadap mikroba rongga mulut, termasuk bakteri penyebab-periodontitis seperti *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, dan *Fusobacterium nucleatum*, *Candida*, dan virus *papiloma*. Penderita HIV-DRR yang seringkali mengalami abses dental, memberikan bukti lain bahwa vitamin D berperan dalam imunitas *innate* rongga mulut.^{14,15,16}

Apabila salah satu komponen tersebut mengalami perubahan, misalnya akibat mutasi atau polimorfisme, maka keseluruhan mekanisme tersebut akan terganggu. Contoh, apabila gen VDR mengalami perubahan sekuens pada DNA nya, maka gen VDR

tidak dapat berikatan dengan vitamin D aktif (1,25D₃), sehingga tidak dapat menginduksi ekspresi CAMP dan β -defensin 4 dan kemampuan untuk membunuh bakteri dalam makrofag juga bakteri penyebab periodontitis menjadi terganggu. Meskipun gen VDR dan peptida yang dihasilkan host memiliki peranan yang penting dalam memediasi aktivitas antimikroba dari TLR1 dan TLR2, namun komponen tersebut bukan merupakan efektor tunggal sebagai penentu terhadap mekanisme pertahanan akibat serangan mikroba.¹⁴

Berdasarkan penjelasan di atas, tampak bahwa polimorfisme pada exon 9 (*Taq I*) pada gen VDR dapat memiliki pengaruh pada menurunnya fungsi imun maupun resorpsi tulang. Tachi¹ melaporkan bahwa kemungkinan pengaruh pada resorpsi tulang lebih berkontribusi secara lebih efektif untuk menyebabkan EOP (Early-Onset Periodontitis) dan L-EOP (Localized Early Onset Periodontitis), sementara pengaruh terhadap fungsi imun berkontribusi secara lebih efektif dalam menyebabkan periodontitis kronis.

Sebagai kesimpulan, polimorfisme gen VDR berhubungan dengan kejadian periodontitis kronis dengan OR 12,5 (95% CI 1,6-99,8). Polimorfisme gen VDR ditemukan pada penderita periodontitis kronis, dengan frekuensi genotipe TT 86,4%, Tt 12,4% dan tt 1,2%.

Daftar Pustaka

1. Tachi Y, Shimpuku H, Nosaka Y. Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with chronic periodontitis. *Life Sci* 2003; 73 : 3313-21.
2. Manson JD, Eley BM. Outline of periodontics. Alih bahasa: Anastasia S. Hipocrates. 2004: 44-80.
3. Shimpuku H, Ohura K. Association of interleukin-1 gene polymorphisms with adult periodontitis in Japanese. *J Osaka Dental University* 2001; 35: 99-104.
4. De Brito Junior RB, Scarel-Caminaga RMS, Trevilato PC. Polymorphisms in the Vitamin D receptor gene are associated with periodontal. *J Periodontol* 2004; 75: 1090-1095.
5. Valdivielso JM, Fernandez E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. *Clinica Chimica Acta* 2006; 371: 1-12.
6. Laine MI, Loos B, Crielaard W. Gene polymorphisms in chronic periodontitis, Review article. *J International Dent* 2010; 22.
7. Brett PM, Zygianni P., Griffiths GS. Functional gene polymorphisms in aggressive and chronic periodontitis. *J Dent Res* 2005; 84: 1153-94.
8. Borges MAT, Fiquirado LC, Brito JRB. Microbiological composition associated with vitamin D receptor gene polymorphism in chronic periodontitis.

- Braz Oral Res 2009; 23(2): 203-8.
9. Naito M, Miyaki K, Zhang L. Association Between Vitamin D receptor gene haplotypes and chronic periodontitis among Japanese men. *J International Medical sciences* 2007; 4(4): 216-22.
 10. Kitazawa R, Kitazawa S. Vitamin D3 augments osteoclastogenesis via vitamin D responsive element of mouse RANKL. *Gene Promoter* 2002. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 290: 650-5.
 11. Kuo L-C, Polson AM, Kang T. Associations between periodontal diseases and systemic diseases: a review of the inter-relationships and interactions with diabetes, respiratory diseases, cardiovascular diseases and osteoporosis. *Public Health* 2008; 122: 417-33.
 12. Nagpal S, Na S, Rathnachalam R. Noncalcemic actions of vitamin D receptor ligands. *Endocr Rev* 2005; 26: 662-87.
 13. Makhisima M, Lu TT, Xie W. Vitamin D receptor as an intestinal bile acid sensor. *Science* 2002; 1313-16.
 14. Liu TP, Krutzik SR, Modlin RL. Therapeutic implication of TLR and VDR partnership. *TRENDS in molecular medicine* 2007; 13: 3.
 15. Nizet V, Ohtake T, Lauth XI. Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 2001; 454-7.
 16. Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M. Role of β -defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol* 2007; 179-84.