

POLIMORFISME GEN TNF- α G-238A DAN IL-4 T-34C SERTA HUBUNGAN DENGAN KADAR IL-4 DAN TNF- α PASIEN PENYAKIT GRAVES

Raveinal¹, Siti Nurhajjah², Dwitya Elvira¹, Suci Maulida

1. Sub bagian alergi imunologi ilmu penyakit dalam FK UNAND / RS M Jamil Padang
2. Bagian Anatomi FK UNAND Padang

ABSTRAK

Pendahuluan: Penyakit Graves adalah hipertiroidisme ditandai pembesaran tiroid difus dengan penyebab imunologi. Kondisi autoimun dengan adanya antibodi Imunoglobulin G (IgG) yang mengikat dan mengaktifkan reseptor tirotropin. Pemberian PTU dapat menurunkan hormon tiroid mencapai normal akan tetapi kadar IL-4 tidak pernah mencapai nilai normal. Penyakit Graves di Taiwan didapatkan polimorfisme gen promotor sitokin TNF- α G-238A, sedangkan gen IL-4 tidak berbeda dibanding kontrol sehat. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui dan menganalisis polimorfisme TNF- α G-238A dan gen IL-4 T-34C serta hubungannya dengan antibodi tiroid, kadar IL-4 dan TNF- α pasien penyakit Graves.

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif analitik, dengan jumlah sampel 35 orang pasien penyakit Graves di RSUP Dr. M. Djamil Padang. Darah vena diambil sebanyak 10cc untuk isolasi DNA, kadar TNF- α dan IL-4. Pemeriksaan polimorfisme gen TNF- α G-238A dan IL-4 T-34C dengan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *MspI* dan *MnlI* serta dielektroporesis pada agarose 2%. Pemeriksaan TNF- α dan kadar IL-4 menggunakan teknik ELISA. Analisis statistik untuk polimorfisme gen dengan uji Chi-Square dan untuk melihat hubungan antar variabel menggunakan uji ANOVA.

Hasil: Didapatkan polimorfisme TNF- α G-238A dengan distribusi alel GG (91,4%), GA (8,6%) dan AA (0%). Frekuensi alel G adalah 95,9% dan alel A 4,3%. Rerata kadar TNF- α adalah 62,8 \pm 16,6 pg/ml. Polimorfisme gen IL-4 T-34C dengan distribusi alel TT (28,6 %), TC (28,6 %), CC (42,9 %). Frekuensi alel T adalah 42,9 % dan alel C adalah 57,1 %. Rerata kadar IL-4 adalah sebesar 22,8 \pm 9,4 pg/ml.

Kesimpulan: penelitian ini dapat disimpulkan bahwa polimorfisme gen IL-4 T-34C lebih tinggi didapatkan pada penderita penyakit Graves dan terdapat kaitan antara polimorfisme gen ini dengan peningkatan kadar IL-4. Kemungkinan adanya kaitan antara polimorfisme gen IL-4 T-34C dengan kejadian penyakit Graves.

Kata Kunci: polimorfisme gen TNF- α G-238A, polimorfisme gen IL-4 T-34C, kadar IL4, kadar TNF α , penyakit Graves

PENDAHULUAN

Penyebab terbanyak tirotoksikosis adalah penyakit Graves. Penyakit Graves 5-10 kali lebih sering pada perempuan dibanding laki-laki. Insiden penyakit ini di Eropa berkisar 1 sampai 2 % dari semua penduduk dewasa. Penyakit Graves di Amerika \pm 1% dan 20-27/1000 perempuan dan 1,5-2,5/1000 laki-laki dilaporkan di Inggris (Djokomoeljanto, 2007).

Prevalensi hipertiroidisme di Indonesia belum diketahui, namun hasil penelitian di RSUP M Djamil Padang selama 9 bulan pada tahun 2012 ditemukan sekitar 25 pasien baru penyakit Graves (Ardiles dkk, 2012).

Penyakit Graves adalah hipertiroidisme ditandai pembesaran tiroid difus dengan penyebab imunologi. Penyakit Graves merupakan kondisi autoimun dimana terbentuknya anti-bodi Immunoglobulin G (IgG) yang mengikat dan mengaktifkan reseptor tiotropin disebut *thyroid-stimulating antibody* (TSAb) yang menyebabkan hipertrofi dan hiperplasia folikuler yang berakibat membesarnya kelenjar dan meningkatnya produksi hormon tiroid. Penyebab penyakit Graves multi-faktorial, ada kerentanan genetik serta interaksi antara faktor endogen dan faktor lingkungan (Dharmana, 2007).

Proses imunologi diperkirakan karena rendahnya klonal sel T supresor (Ts) secara genetik yang bertanggung jawab terhadap produksi TSAb. Penyebab tirotoksikosis ialah kerusakan fungsi sel limfosit T supresor (Ts) sebagai sel regulator yang mengatur aktivasi dan menekan fungsi sel B (Metchick et al, 2005).

Sel T berperan pada inflamasi, aktivasi makrofag dalam fagositosis, aktivasi dan proliferasi sel B dalam produksi antibodi. Sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 akan membantu diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi. Penyakit Graves umumnya dihubungkan dengan penyakit predominan Th2.

Faktor genetik menimbulkan Th2 dominan pada penyakit Graves. Mutasi pada gen dari ligan-ligan dan reseptor-reseptor ini dapat menimbulkan efek respon imun. Sitokin diproduksi oleh limfosit intratiroidal menginduksi dan mempertahankan proses autoimun pada penyakit Graves.

Interleukin-4 (IL-4) merupakan bagian dari sitokin tipe 2 yang memproduksi

antibodi dan respon alergi. Paschke dkk menemukan berbagai pola peningkatan akumulasi IL-2, IL-4, IL-10 & INF- γ pada spesimen operasi tiroid dari pasien Graves. Peranan aktivitas sel T bertanggung jawab dalam menimbulkan kerusakan autoimun dominan memproduksi IL-4. IL-4 merupakan sitokin yang dihasilkan sel limfosit Th yang mempunyai peranan dalam aktivasi sel B untuk membentuk antibodi. IL-4 menginduksi perubahan isotipe ke IgG1, IgG3, IgG4 dan IgE. IL-4 menstimulasi jumlah isotipe *Immunoglobulin G-secreting cells* (IgG3-SCs) yang dihubungkan dengan derajat beratnya penyakit Graves dan kadar TRAb disamping dapat juga merubah ke IgG1 yang bisa menstimulasi produksi TRAb secara efektif (Jones et al, 1999; Paschke et al, 1994).

Th2 mensekresi IL-4, IL-5, IL-10 dan IL-13 yang menginduksi pembentukan antibodi. Penyakit Graves akan mengeksaserbasi respon imun dan menimbulkan inflamasi. Penelitian Fisfalen ME dkk (1997) pada pasien tiroiditis Hashimoto dan penyakit Graves, didapatkan 53% klon Th0 berasal dari pasien penyakit Graves dan reaktif terhadap *human recombinant TSH-receptor extra-cellular domain* (TSH-R). Sebagian besar klon Th2 (82%) reaktif dan terbukti dari darah perifer dan 64% klon ini memproduksi IL-4 dan IL-10

Manifestasi klinis penyakit Graves meliputi gejala hipertiroidisme, pembesaran kelenjar tiroid difus, optalmopati infiltratif, dan dermopati (Suastika, 2009). Pengobatan yang tepat untuk hipertiroidisme dan prognosis tergantung etiologi. Pengobatan tirotoksikosis dengan obat anti tiroid, β -bloker, ablasi radiasi iodine dan pembedahan (Djokomoeljanto, 2007; Suastika, 2009; Metchick et al, 2005).

Pengobatan medikamentosa yang lazim digunakan adalah golongan tionamid terutama propiltiourasil (PTU). Efek PTU menghalangi proses hormonogenesis intratiroid, mengurangi disregulasi imun intratiroid serta konversi perifer dari T4 menjadi T3, bersifat immunosupresif dengan menekan produksi TSAb melalui kerjanya mempengaruhi aktifitas sel T limfosit kelenjar tiroid. Efek immunosupresif PTU melalui induksi apoptosis leukosit intratiroid dan menurunkan jumlah sel-sel Th dan *natural killer* (NK). Kekambuhan lebih sering

terjadi pada perokok, ukuran gondok besar dan TRAb positif pada akhir terapi. Terapi jangka panjang memerlukan monitoring terhadap reaksi alergi, agranulositosis & hepatotoksik. Pada penghentian terapi, angka kekambuhan sangat tinggi (50-60%). Terapi pemeliharaan pada penderita penyakit Graves akan berpengaruh terhadap kadar IL-4, IgE dan TSAb (Metchick et al, 2005; Dharmana, 2007). Proses imunologis dapat masih terus berlangsung pada saat kadar hormon tiroid dalam serum telah normal. Penghentian pengobatan pada saat ini berisiko terjadinya kekambuhan dalam waktu singkat.

Dominasi IL-4 berperan penting pada peningkatan TRAb, IgE dan berhubungan dengan derajat beratnya penyakit Graves yang disebabkan karena IL-4 menginduksi perubahan ke isotipe IgG1, IgG3, IgG4 dan IgE sehingga berperan dalam perkembangan, progresivitas dan pemeliharaan penyakit Graves.

Penelitian Ardiles dkk (2012) mendapatkan setelah pemberian PTU selama 3 bulan dan 9 bulan terdapat penurunan hormon tiroid mencapai normal akan tetapi kadar IL-4 tidak pernah mencapai nilai normal.

Shiau et al (2011) mendapatkan gen promotor sitokin TNF- α G-238A dan G-308A berhubungan erat dengan kejadian penyakit Graves di Taiwan, sedangkan gen IL-4 dan IL-6 tidak berbeda dibanding kontrol sehat.

Veeramuthumari (2011) di India Selatan mendapatkan mutan G alel lebih sering di temukan pada pasien penyakit Graves dan disimpulkan bahwa polimorfisme gen CTLA-4 berhubungan dengan penyakit ini.

Berdasarkan latar belakang peneliti ingin mengetahui polimorfisme TNF- α G-238A dan gen IL-4 T-34C serta hubungannya dengan antibodi tiroid, kadar IL-4, dan TNF- α pada pasien penyakit Graves.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian analitik dengan pendekatan *cross sectional study*. dengan jumlah sampel yang akan diteliti sebanyak 35 orang pasien penyakit Graves di RSUP Dr. M. Djamil Padang. Darah vena diambil sebanyak 10cc, Isolasi DNA menggunakan kit isolasi Roche. Isolasi DNA sesuai dengan prosedur Roche. Pemeriksaan polimorfisme gen TNF- α

G-238A dan IL-4 T-34C dengan teknik PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *MspI* dan *MnII* serta dielektroporesis pada agarose 2%. Pemeriksaan antibodi Tiroid dan kadar IL-4 menggunakan teknik ELISA. Pembuatan campuran PCR untuk satu reaksi, terdiri dari master mix PCR, H₂O atau aquabides, Buffer PCR, MgCl₂, dNTPs, enzim Amplitaq. Primer gen TNF- α G-238A Primer F (forward) 5'-AGAAGACCCCCCTCGGAACC-3' Primer R (reverse) 5'-TTGGGGACACAAGCA TCAAGG-3' dengan besar produk PCR 75bp. Gen IL-4 T-34C Primer F 5'-CTCATTTTCCGTCCGTTTCAGC-3', dan Primer R 5'-GAAGCAGTTGGGACGTGAGA-3' dengan besar produk PCR 150bp. Kemudian campuran PCR dimasukkan ke dalam mesin PCR (*Roche*), sebanyak 35 siklus.

Pemeriksaan RFLP gen TNF- α G-238A dan gen IL-4 T-34C. Produk PCR dipotong dengan menggunakan enzim *MspI* untuk gen TNF- α G-238A dan enzim *MnII* untuk gen IL-4 T-34C kemudian dilanjutkan dengan proses elektroporesis

Analisis statistik untuk polimorfisme gen dengan uji Chi-Square dan untuk melihat hubungan antar variabel dengan menggunakan uji ANOVA.

HASIL PENELITIAN

Jumlah sampel dalam penelitian ini adalah sebanyak 35 orang penderita penyakit Graves. Penderita penyakit Graves didapatkan di RSUP Dr. M. Djamil Padang dan RS Yos Sudarso Padang. Sampel penderita penyakit Graves yang datang ke rumah sakit tersebut dijadikan sebagai sampel sampai memenuhi jumlah minimal sampel. Karakteristik subyek penelitian dapat dilihat pada tabel 1 berikut ini.

Tabel 1. Karakteristik Subyek Penelitian

| Karak teristik | Penderita penyakit Graves |
|-------------------|------------------------------|
| Jenis Kelamin | |
| Laki-laki | 10 (28,6 %) |
| Perempuan | 25 (71,4 %) |

| Usia | |
|-------------|-------------|
| < 30 tahun | 9 (25,7%) |
| 30-40 tahun | 6 (17,1%) |
| ≥ 40 tahun | 15 (42,9 %) |

Pada tabel 1 dapat dilihat karakteristik subyek pada penelitian ini, dimana ditemukan jenis kelamin perempuan lebih banyak menderita penyakit Graves dibandingkan laki-laki. Usia penderita penyakit Graves lebih sering terjadi pada usia diatas 40 tahun yaitu sebanyak 15 orang (42,9 %).

Polimorfisme gen IL-4 T-34C dan TNF- α G-238A

Hasil pemeriksaan polimorfisme gen IL-4 T-34C dan TNF- α G-238A dapat dilihat pada tabel 2. Polimorfisme gen IL-4 T-34C ditemukan 3 alel yaitu alel dengan genotip TT, genotip TC, dan genotip CC. Polimorfisme gen TNF- α G-238A ditemukan 3 alel yaitu alel dengan genotip GG, genotip GA, dan genotip AA.

Tabel 2. Polimorfisme gen IL-4 T-34C dan TNF- α G-238A

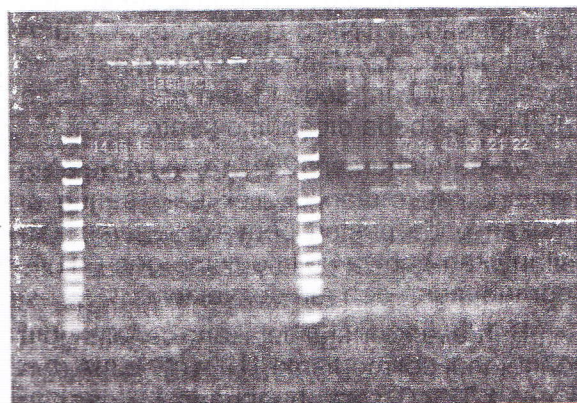
| Genotip/alel | Penderita Penyakit Graves | |
|----------------------|---------------------------|-------|
| | n (35) | f (%) |
| TNF- α G-238C | | |
| GG | 32 | 91,4 |
| GA | 3 | 8,6 |
| AA | 0 | 0 |
| Alel G | 67 | 95,7 |
| Alel A | 3 | 4,3 |
| IL-4 T-34C | | |
| TT | 10 | 28,6 |
| TC | 10 | 28,6 |
| CC | 15 | 42,9 |
| Alel T | 30 | 42,9 |
| Alel C | 40 | 57,1 |

Kejadian polimorfisme gen IL-4 T-34C pada penyakit Graves dapat dilihat pada tabel 2 dimana tampak sebagian besar alel dengan genotip TT yaitu ditemukan sebanyak 10 kasus (28,6%) dan alel genotip TC 10 kasus (28,6%) dan 15 kasus alel dengan genotip CC (42,9%). Frekuensi masing-masing alel dari gen ini adalah alel T sebanyak 52,9% dan alel C sebanyak 57,1%.

Polimorfisme gen TNF- α G-238C juga didapatkan jumlah alel dengan genotip GG yaitu 32 kasus (91,4%), genotip GA sebanyak 3 kasus (8,6%) dan tanpa kasus genotip AA (0 %). Frekuensi alel untuk gen TNF- α G-238C adalah alel G sebanyak 95,9 % dan alel A sebanyak 4,3 %.

Hasil penelitian ini didapatkan bahwa polimorfisme gen IL-4 T-34C lebih besar yaitu sebesar 57,1 %, dibandingkan gen TNF- α G-238C sebanyak 8,5 %.

Rerata kadar IL4 dengan polimorfisme gen IL-4 T-34C adalah $25,43 \pm 12,05$ pg/ml dibandingkan tanpa polimorfisme IL-4 T-34C yaitu $19,44 \pm 2,22$ pg/ml. Rerata kadar TNF- α dengan polimorfisme gen TNF- α G-238C adalah $57,18 \pm 8,09$ pg/ml di bandingkan tanpa polimorfisme gen TNF- α G-238C yaitu $64,14 \pm 18,04$ pg/ml



Gambar 1. Hasil PCR dan restriksi gen dengan enzim MnlI.

Kadar IL-4 dan TNF- α

Hasil Ellisa untuk melihat kadar IL-4 dan TNF- α penderita penyakit Graves dapat dilihat pada tabel 3.

Pada tabel 3, dapat dilihat nilai rerata kadar IL-4 adalah sebesar $22,77 \pm 9,43$ pg/ml, sedangkan rerata kadar TNF- α yang didapatkan sebanyak $62,84 \pm 16,64$ pg/ml.

Tabel 3. Kadar IL-4 dan TNF- α

| Kadar (pg/ ml) | N | Min | Max | Mean | Std. Deviation |
|----------------------|----|-------|--------|-------|-------------------|
| IL-4 | 35 | 16,68 | 56,70 | 22,77 | 9,43 |
| TNF- α | 35 | 44,39 | 107,69 | 62,84 | 16,64 |

PEMBAHASAN

Pada penelitian ini ditemukan distribusi alel polimorfisme gen IL-4 T-34C lebih tinggi yaitu sebesar 57,1 %. Hasil polimorfisme gen ini lebih tinggi dibandingkan dengan yang didapatkan oleh Shiau et al (2011) yaitu sebesar 28,3%. Mereka juga menyimpulkan bahwa polimorfisme gen IL-4 T-34C tidak berkaitan dengan kejadian penyakit ini dan kemungkinan polimorfisme gen ini tidak berhubungan dengan terjadinya penyakit Graves.

Polimorfisme gen TNF- α G-238A pada penelitian ini didapatkan sebesar 4,3 % , hasil ini lebih rendah dibandingkan penelitian oleh Shiau dkk (2011). Penelitian oleh Shiau et al (2011) mendapatkan 59,4% juga lebih

DAFTAR RUJUKAN

- Ardiles, J. Raveinal, Manaf, A, Decroli, E 2012. Pengaruh pemberian propiltiourasil terhadap T3, T4, TSH dan IL-4 setelah terapi inisial dan terapi lanjutan pada pasien penyakit Graves. Tesis. IPD, FK.Unand.
- Dharmana E, 2007. *Aspek Immunologik Autoimmune Thyroid Diseases*. Buku Ajar Tiroidologi klinik. Semarang:53-63.
- Djokomoeljanto, 2007. *Tirotoksiko-sis*. Buku Ajar Tiroidologi klinik. Semarang 217-73.
- Jones. B M, Carol C.H. Kwok, Annie W.C. Kung, 1999. Effect of radioactive iodine therapy on cytokine production in Graves' disease: transient Increases in Interleukin-4 (IL-4), IL-6, IL-10, and tumor necrosis factor- α , with longer term increases in interferon- γ production. *The J Clin Endocrinol Metabolism* 84 (11):4106-10.
- Metchick. LN, Carlone V, Haag.BL, 2005. Clinical review article: Thyrotoxicosis hospital physician: 46-56.
- Mira JP, Cariou A, Grall F, et al, 1999. Association of TNF2, TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA* 282(6):561-8.
- Paschke R, Schuppert F, Taton M, Velu T, 1994. Intrathyroidal cytokine gene expression profiles in autoimmune thyroiditis. *J Endocrinol*; 141: 309-15.
- Shiau MY, Huang CN, Yang TP, Hwang YC, Tsai KJ, Chi CJ et al, 2007. Cytokine

tinggi dibandingkan dengan polimorfisme gen IL-4 T-34C. Polimorfisme gen ini menyebabkan peningkatan kadar IL4 yang diperkirakan mempunyai peranan terjadinya penyakit Graves. Penelitian Ardiles dkk (2012) mendapatkan bahwa kadar IL4 berhubungan erat dengan penyakit Graves dimana didapatkan kadar IL4 selalu di atas nilai normal walaupun klinis pasien sudah perbaikan

Kemungkinan kaitan antara peningkatan kadar IL4 ini dengan polimorfisme gen IL4 T-34C. Peningkatan kadar IL4 menyebabkan kerentanan terhadap penyakit Graves.

Shiau et al (2011) mendapatkan gen promotor sitokin TNF- α G-238A dan G-308A berhubungan erat dengan kejadian penyakit Graves di Taiwan, sedangkan gen IL-4 dan IL-6 tidak berbeda dibanding kontrol sehat. Veeramuthumari (2011) di India Selatan mendapatkan mutan G alel lebih sering di temukan pada pasien penyakit Graves dan disimpulkan bahwa polimorfisme gen CTLA-4 berhubungan dengan penyakit ini.

Perlunya penelitian untuk melihat keterkaitan ketidakberhasilan pengobatan penyakit Graves ini dengan polimorfisme kedua gen ini. Penelitian proteomik juga sangat dibutuhkan untuk membuktikan keterkaitan antara polimorfisme beberapa gen ini dengan peningkatan ekspresi gen sehingga ditemukan apakah peningkatan ekspresi protein ini menyebabkan penyakit ini.

promoter poly-morphisms in Taiwanese patients with Graves disease. Clin Biochem ;40:213-217.

Suastika K, 2009. Manifestasi klinik penyakit Graves dalam Naskah Lengkap Simposium Nasional V Penyakit Kelenjar Tiroid. Semarang: 51-61.

Veeramuthumari P, Isabel W, Kannan K, 2011. A Study on the Level of T3,

T4, TSH and the Association of A/G Polymorphism with CTLA-4 Gene in Graves' Hyperthyroidism among South Indian Population. Ind J Clin Biochem 26(1):66-69.

Weetman AP, 2000.Review articles; Medical progress: Graves' disease. New England J Med 26(10):1236-48.