

ARTIKEL PENELITIAN

Ekspresi Gen Interleukin-6 pada Tikus Model Alzheimer yang Diberi Sel Punca

Farhan Royan Permanahadi¹, Amel Yanis², Tuti Handayani³, Aisyah Elliyanti³, Asterina⁴

1. Fakultas Kedokteran Universitas Andalas; 2. Bagian Psikiatri FK Unand/RSUP Dr. M. Djamil Padang;
3. Bagian Radiologi FK Unand/RSUP Dr. M. Djamil Padang, 4. Bagian Biokimia FK Unand

Korespondensi: Amel Yanis, e-mail: amel.yanis.dr@gmail.com HP: 08129458518

Abstrak

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ekspresi gen IL-6 pada tikus model Alzheimer yang diinduksi $AlCl_3$ setelah diberi sel punca. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian *cross sectional control study* yang menggunakan 18 sampel RNA hewan coba yang dibagi menjadi tiga kelompok (K, $AlCl_3$, $AlCl_3+MSC-WJ$). **Hasil:** Rata-rata rasio ekspresi gen IL-6 yang didapatkan pada kelompok K, $AlCl_3$, $AlCl_3+MSC-WJ$ berturut-turut adalah 1,6; 1,8; dan 1,1. Didapatkan ada perbedaan yang bermakna setiap kelompok hewan coba dengan nilai $p = 0,010$ ($p < 0,05$). **Kesimpulan:** Kesimpulan yang didapat adalah terjadinya penurunan ekspresi gen IL-6 pada tikus model Alzheimer yang diberi sel punca (MSC-WJ).

Kata kunci: Penyakit Alzheimer, Interleukin-6 (IL-6), *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ), $AlCl_3$

Abstract

Objective: The purpose of this study was to observe the IL-6 gene expression in $AlCl_3$ -induced Alzheimer mice models after being given stem cells. **Method:** This study was a cross-sectional control study that uses 18 samples of animal test RNA that are grouped into three groups (K, $AlCl_3$, $AlCl_3+MSC-WJ$). **Results:** The mean ratio of the IL-6 gene that was obtained from group K, $AlCl_3$, and $AlCl_3+MSC-WJ$ group was 1,6; 1,8; and 1,1 respectively. There was a significant difference in each group with $p = 0,010$ ($p < 0.05$). **Conclusion:** It is concluded that there was a decreased gen IL-6 expression from Alzheimer mice models after being given by stem cells (MSC-WJ).

Keywords: Alzheimer's disease, Interleukin-6 (IL-6), *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ), $AlCl_3$

PENDAHULUAN

Setiap tiga detik satu orang di dunia mengalami demensia.¹ *World Health Organization* (WHO) mendefinisikan demensia sebagai sindrom neurodegeneratif yang timbul karena adanya kelainan yang bersifat kronis dan progresif disertai dengan gangguan fungsi luhur multipel seperti kemampuan berhitung, kapasitas belajar, kemampuan berbahasa, dan pengambilan keputusan.² Bentuk demensia yang paling banyak adalah penyakit Alzheimer.³

Penyakit Alzheimer atau *Alzheimer's disease* adalah salah satu jenis demensia yang ditandai dengan penurunan fungsi ingatan, fungsi kognitif, berbahasa, perubahan tingkah laku serta gangguan dalam menjalankan aktivitas sehari-hari sehingga penderitanya mengalami ketergantungan dalam pemenuhan kebutuhan dasar sehari-hari. Menurut *Alzheimer's Disease International* (ADI), penyakit Alzheimer didiagnosis pertama kali pada tahun 1906 dan sekitar 50 juta orang di seluruh dunia mengalami demensia saat ini.^{1, 3, 4}

Penyakit Alzheimer jarang terjadi pada usia muda dan lebih sering pada usia 65 tahun ke atas.⁵ Data lain menyebutkan angka kejadian penyakit Alzheimer meningkat secara eksponensial setiap lima tahun ketika menyentuh usia 65 tahun.⁶ Sementara menurut WHO, populasi orang tua meningkat setiap tahun di seluruh dunia dan diperkirakan pada tahun 2030 dan 2050 prevalensi demensia secara berturut-turut meningkat menjadi 78 juta dan 139 juta.

World Health Organization baru-baru ini merilis data kasus penderita demensia dan didapatkan sekitar 55 juta orang menderita demensia dengan 60% penderitanya berasal dari negara

berpenghasilan rendah salah satunya Indonesia. Berhubungan dengan data tersebut, pada tahun 2016 diperkirakan sekitar 1,2 juta kasus demensia terjadi di Indonesia, angka ini akan meningkat menjadi 2 juta pada tahun 2030 dan 4 juta orang pada tahun 2050.^{2, 7} Tentu saja itu bukan merupakan angka yang kecil mengingat tingkat pengetahuan masyarakat Indonesia terhadap penyakit Alzheimer masih minim.

Penyakit Alzheimer hingga saat ini masih dalam tahap penelitian karena penyebabnya belum diketahui dengan pasti. Namun, beberapa faktor berikut diduga menjadi pencetus timbulnya penyakit Alzheimer antara lain, proses penuaan, paparan zat toksik seperti aluminium, hipertiroid atau hipotiroid, diabetes, trauma kepala, stres, depresi berat, hipertensi, penyakit autoimun, kelainan genetik, dan penumpukan protein beta-amyloid (A β) yang memicu terjadinya proses inflamasi.⁴

Interleukin-6 (IL-6) adalah sitokin proinflamasi yang memiliki efek pleiotropik paling kuat yang berperan dalam regenerasi jaringan, imunitas, dan metabolisme.^{8, 9, 10} Sistem pertahanan tubuh akan merespon dengan baik jika IL-6 cepat diproduksi. Namun, lain hal jika IL-6 diproduksi dalam jumlah banyak. Hal tersebut akan menyebabkan suatu ketidakseimbangan dan timbulnya berbagai penyakit. Sebuah studi menyebutkan bahwa IL-6 menjadi biomarker yang baik pada penyakit inflamasi kronis termasuk penyakit Alzheimer.¹¹

Inflamasi kronis yang terjadi pada penyakit Alzheimer menyebabkan terjadinya peningkatan stress oksidatif sehingga mengakibatkan aktifnya jalur *Nuclear Factor Kappa B* (NF κ B). Peningkatan kadar ROS juga memicu

pembebasan NFκB dan memungkinkan faktor transkripsi bertranslokasi dari sitoplasma ke nukleus sehingga jalur NFκB juga teraktivasi. Peningkatan aktivasi jalur NFκB menyebabkan ekspresi gen IL-6 menjadi berlebihan yang kemudian mendorong dan memperkuat peradangan saraf.⁸

Pada otak pengidap penyakit Alzheimer, IL-6 ditemukan pada tahap awal deposisi amiloid dan pembentukan plak Aβ. *Interleukin-6* juga dapat meningkatkan perkembangan plak Aβ sehingga menyebabkan kehilangan sinapsis dan disfungsi kognitif. Peningkatan IL-6 dalam jumlah banyak menyebabkan penurunan volume hipotalamus atau hipokampus. Diduga gangguan memori dan metabolisme diakibatkan oleh peningkatan IL-6 yang tidak terkontrol. Data yang sama menyebutkan bahwa disregulasi IL-6 ini merupakan penyebab terjadinya hal demikian. Tidak hanya itu, ekspresi IL-6 juga meningkat pada cairan serebrospinal dan plasma pengidap Alzheimer.^{12, 13}

World Health Organization menyebutkan hingga saat ini belum ada obat kuratif untuk penyakit Alzheimer.² Akan tetapi, ada dua kelas obat yang disetujui pemakaiannya dan digunakan hingga saat ini. Obat *Cholinesterase Inhibitors* yang terdiri dari Donepezil, Rivastigmine, dan Galantamine merupakan obat kelas pertama. Obat *N-methyl D-aspartate (NMDA) Antagonists* atau jenis lainnya yaitu Memantine merupakan obat kelas kedua penyakit Alzheimer. Kedua kelas obat tersebut hanya bersifat simptomatik, tidak menyembuhkan ataupun mencegah penyakit. Para peneliti hingga saat ini masih mengembangkan berbagai terapi kuratif, salah satunya adalah terapi sel punca. Sel punca diketahui memiliki potensi regeneratif

seperti pertumbuhan saraf ditambah dengan kemajuan teknologi akhir-akhir ini yang mempermudah pengembangan terapi sel punca. Dengan demikian, terapi sel punca sangat menjanjikan di masa mendatang dan diharapkan menjadi pengobatan kuratif untuk penyakit Alzheimer.^{5, 14}

Stem cell (sel punca) adalah sel yang mempunyai kemampuan memperbaharui diri melalui pembelahan sel mitosis dan berdiferensiasi menjadi berbagai sel khusus. Berdasarkan pengertiannya saja dapat kita ketahui bahwa sel punca dapat digunakan sebagai terapi berbagai penyakit. Berbagai organ seperti tulang, otot, kulit, otak, saraf, dan organ lainnya dapat berkembang dan melakukan regenerasi dengan bantuan sel punca.

Uji klinis fase pertama pada tahun 2015 dilakukan menggunakan sel punca mesenkimal darah tali pusat manusia. Uji klinis ini dilakukan pada sembilan pasien Alzheimer ringan hingga sedang, sel punca disuntikkan ke dalam hipokampus penderita Alzheimer dan didapatkan hasil bahwa pemberian sel punca aman dan tidak menimbulkan efek yang berbahaya. Beberapa uji klinis lain masih dalam uji coba. Berdasarkan beberapa uji klinis, terapi sel punca terhadap Alzheimer masih dalam tahap lanjut penelitian mengingat penyakit Alzheimer adalah penyakit kronis progresif yang didiagnosis setelah penderitanya sudah lama terkena Alzheimer. Harapan sebagai terapi untuk banyak penyakit dan cedera serius dari sel punca sangat besar. Para peneliti dan dokter medis sangat berharap dapat mewujudkan impian akan sel punca sebagai terapi untuk memulihkan sel dan jaringan yang hilang, rusak, atau menua dalam tubuh manusia.^{15, 16}

Berdasarkan penjelasan di atas,

diketahui bahwa penyakit Alzheimer masih dalam tahap penelitian karena penyebabnya yang belum pasti serta pengobatan kuratif yang belum ada hingga saat ini, serta terjadinya peningkatan ekspresi IL-6 selama perjalanan penyakit Alzheimer. Oleh karena itu, penelitian ini berfokus kepada ekspresi gen IL-6 pada tikus model Alzheimer.

METODE

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *falcon tube*, *tissue culture flask*, incubator CO₂, *flow cytometri*, *nano drop*, dan PCR konvensional. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu sampel RNA hewan coba model Alzheimer, kit cDNA, primer gen GAPDH dan IL-6, dan *gel agarose* 1,5%.

Isolasi RNA

Isolasi semua RNA menggunakan reagen TRIzol™. Homogenisasi jaringan dengan 1 ml TRIzol™. Kemudian, tambahkan kloroform sebanyak 200 µl, bolak-balikkan *tube* dan siap untuk dilakukan inkubasi selama 5 menit. Sentrifugasi selama 15 menit dengan kecepatan 12.000xg. supernatan dimasukkan ke dalam *microtube* yang baru. Tambahkan isopropanol 2x dan inkubasi kembali. Lakukan sentrifugasi kembali dengan kecepatan yang sama selama 10 menit. Buang supernatan dan cuci dengan etanol 70%. *Vortex* secara perlahan setelah *tube* dibolak-balik. Kemudian, sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 7500xg. Sebelum divakum, buang supernatan terlebih dahulu. Resuspen pelet dalam *RNAse free water* 25-40 µl setelah vakum selesai. Selanjutnya, kuantifikasi dan samakan pada konsentrasi 1000 ng.¹⁷

Sintesis cDNA

cDNA disintesis menggunakan *aliquot cDNA synthesis kit (Sensifast cDNA Asynthesis kit bioline cat no. bi 65045)*. Semua komponen dimasukkan ke dalam *microtube (Tabel 1)*. Selanjutnya, inkubasi reaksi tersebut selama 10 menit pada suhu 25°C. kemudian, selama 15 menit pada suhu 42°C dan selama 5 menit pada suhu 85°C menggunakan PCR konvensional.

Tabel 1 Komponen Sintesis cDNA

Komponen cDNA	Volume
5x TransAMp	4 µl
Reverse Transcriptase (RTase)	1 µl
Nuclease-free water	5 µl
RNA template (100x)	10 µl

PCR

Semua proses PCR dilakukan dalam rentang amplifikasi selama 34 siklus amplifikasi yang terdiri dari langkah, denaturasi 95°C selama 15 detik, *annealing* 60,4°C selama 15 detik, *extension* 72°C selama 10 detik, dan *final extension* 72°C selama 5 menit.¹⁷ cDNA yang diperoleh menjadi sasaran amplifikasi PCR untuk memperkirakan ekspresi gen IL-6 dan GAPDH. Urutan primer *reverse* dan *forward* gen IL-6 yang digunakan adalah sebagai berikut: 5'CAATCAGAATTTGCCATTGCACAA-3' dan 5'CAAATTCGTTGTCATACCAGG-3'

Elektroforesis

Visualisasikan hasil PCR menggunakan teknik elektroforesis. Waktu yang digunakan untuk elektroforesis adalah 60 menit dengan tingkat ketegangan 100 volt secara konstan. Jika sudah selesai, lakukan pemotretan gel di atas sinar UV.

Pengukuran konsentrasi gen

Pengukuran konsentrasi gen dalam penelitian ini menggunakan metode semi kuantitatif.¹⁷

Analisis data

Data yang diperoleh adalah ekspresi gen *interleukin-6* pada tikus model Alzheimer yang diberi sel punca. Kemudian data perbedaan rata-rata ekspresi gen *interleukin-6* pada tikus model Alzheimer yang diberi sel punca ketiga kelompok dianalisis menggunakan One Way ANOVA dan *Post-Hoc Bonferroni*. Jika data tersebut tidak terdistribusi normal maka dilakukan uji alternatif *Kruskal Wallis*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Ekspresi Gen *Interleukin-6* Kelompok Perlakuan Pemberian MSC-WJ

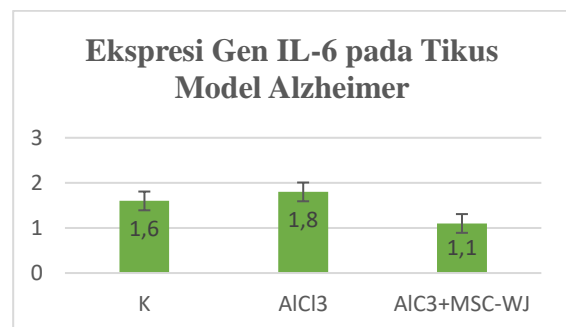
Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa terdapat penurunan ekspresi gen IL-6 pada tikus model alzheimer yang diberi MSC-WJ ($p < 0,05$). Berdasarkan data yang ditampilkan pada **Tabel 2** didapatkan hasil pengukuran ekspresi gen IL-6 menggunakan uji *one-way anova* dengan nilai signifikansi $p = 0,01$.

Tabel 2. Rasio Ekspresi Gen *Interleukin-6*

Kelompok	Nomor Sampel	Rasio
Kontrol	1	2,3
	2	1,7
	3	1,3
	4	1,6
	5	1,4
	6	1,6
Rata-rata		1,6
AIC ₃	1	1,6
	2	1,6
	3	2,3
	4	1,8
	5	1,6
	6	1,5
Rata-rata		1,7
AIC ₃ + MSC-WJ	1	1,8
	2	0,8
	3	1,1
	4	1,5
	5	0,9
	6	0,8
Rata-rata		1,1

Nilai ekspresi gen IL-6 di setiap kelompok berbeda-beda, terlebih setelah

diberikan sel punca (**Gambar 1**). Pada kelompok kontrol, didapatkan nilai ekspresi gen IL-6 sebesar 1,6. Pada kelompok AIC₃, didapatkan nilai ekspresi gen IL-6 sebesar 1,8. Pada kelompok AIC₃+MSC-WJ, didapatkan nilai ekspresi gen IL-6 sebesar 1,1 sehingga dapat disimpulkan pemberian MSC-WJ pada tikus model Alzheimer dapat menurunkan ekspresi gen IL-6.



Gambar 1. Grafik Rata-rata Rasio Ekspresi Gen *Interleukin-6*

Hal tersebut dikaitkan dengan MSC-WJ yang memiliki tingkat proliferasi yang tinggi dan *immunomodulator* terkuat dibandingkan dengan sel punca yang lain.¹⁸ *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* juga memiliki faktor parakrin anti-inflamasi atau yang disebut dengan *secretome*.¹⁹ Vesikel ekstraseluler (MSC-EVs) yang dikeluarkan oleh MSC-WJ dapat melewati sawar darah otak sehingga bisa membantu proliferasi sel-sel saraf yang sudah rusak dan mengurangi inflamasi yang terjadi pada jaringan otak.²⁰ Ukuran dan morfologi vesikel yang dikeluarkan berbeda-beda serta terdapat molekul bioaktif di dalamnya seperti *messenger RNA* (mRNA), *microRNAs* (miRNAs), sitokin, kemokin, dan faktor *immunomodulator* yang mengatur fenotip dan fungsi tertentu dari interaksi yang dihasilkan.

SIMPULAN

Ekspresi gen IL-6 pada tikus model Alzheimer yang diinduksi $AlCl_3$ mengalami penurunan setelah diberi perlakuan *Mesenchymal Stem Cells Wharton's Jelly* (MSC-WJ).

DUKUNGAN FINANSIAL

Tidak ada.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih kepada Dr. dr. Amel Yanis, Sp.KJ(K) dan dr. Tuti Handayani,

DAFTAR PUSTAKA

1. International AD. Dementia Statistics [Internet]. 2020. Available from: <https://www.alzint.org/about/dementia-facts-figures/dementia-statistics/>
2. WHO. Dementia [Internet]. who.int. 2021. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
3. Ayodele T, Rogaeva E, Kurup JT, Beecham G, Reitz C. Early-Onset Alzheimer's Disease: What Is Missing in Research? *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2021;21(2).
4. Purba JS. Inflamasi dalam Patologi Penyakit Alzheimer. *Medicinus*. 2020;33(3):65–71.
5. Anwal L. a Comprehensive Review on Alzheimer's Disease. *World J Pharm Pharm Sci*. 2021;10(7):1170.
6. Lane CA, Hardy J, Schott JM. Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*. 2018;25(1):59–70.
7. Indonesia A. Statistik Tentang Demensia [Internet]. 2019. Available from: <https://alzi.or.id/statistik-tentang-demensia/>
8. Cobourne-Duval MK, Taka E, Mendonca P, Soliman KFA. Thymoquinone increases the expression of neuroprotective proteins while decreasing the expression of pro-inflammatory cytokines and the gene expression NF κ B pathway signaling targets in LPS/IFN γ -activated BV-2 microglia cells. *J Neuroimmunol*. 2018;320:87–97.
9. Immunotherapy II-, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. 2018;1–15.
10. Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity* [Internet]. 2019;50(4):1007–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.03.026>
11. Saiki P, Nakajima Y, Van Griensven LILD, Miyazaki K. Real-time monitoring of IL-6 and IL-10 reporter expression for anti-inflammation activity in live RAW 264.7 cells. *Biochem Biophys Res*

- Commun [Internet]. 2018;505(3):885–90. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.173>
12. Lyra e Silva NM, Gonçalves RA, Pascoal TA, Lima-Filho RAS, Resende E de PF, Vieira ELM, et al. Pro-inflammatory interleukin-6 signaling links cognitive impairments and peripheral metabolic alterations in Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2021;11(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41398-021-01349-z>
 13. Sawkulycz X, Bradburn S, Robinson A, Payton A, Pendleton N, Murgatroyd C. Neurobiology of Aging Regulation of interleukin 6 by a polymorphic CpG within the frontal cortex in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2020;92:75–81. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.04.008>
 14. Wilson H, Pagano G, Politis M. Dementia spectrum disorders: lessons learnt from decades with PET research. *J Neural Transm* [Internet]. 2019;126(3):233–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00702-019-01975-4>
 15. Liu XY, Yang LP, Zhao L. Stem cell therapy for alzheimer's disease. *World J Stem Cells*. 2020;12(8):787–802.
 16. Ota KI. Fuel Cells: Past, Present and Future. *IEEJ Trans Fundam Mater*. 2008;128(5):329–32.
 17. Yarni SD. Pengaruh Pemberian Mesenchymal Stem Cells Wharton Jelly Terhadap Ekspresi Gen CALM1 dan CASP9 pada Tikus Alzheimer. *Andalas University*; 2021.
 18. Sun C, Wang L, Wang H, Huang T, Yao W, Li J, et al. Single-cell RNA-seq highlights heterogeneity in human primary Wharton's jelly mesenchymal stem/stromal cells cultured in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11(1):1–16.
 19. Costa LA, Eiro N, Fraile M, Gonzalez LO, Saá J, Garcia-Portabella P, et al. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells from natural niches to culture conditions: implications for further clinical uses. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2021;78(2):447–67. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-020-03600-0>
 20. Harrell CR, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and other extracellular vesicles as new remedies in the therapy of inflammatory diseases. *Cells*. 2019;8(12).