

POLIMORFISME GEN TNF- α -308G>A PADA PENDERITA SINDROM DOWN

Siti Nurhajjah¹, Safrina D. Ratnaningrum², Farmaditya E. P. Mundhofir³,
Sultana MH Faradz³

Abstrak

Penderita sindrom Down (SD) sering mengalami gangguan sistem imun, yang menyebabkan kerentanan terhadap infeksi, tingginya angka kesakitan dan kematian. Polimorfisme gen TNF- α -308G>A berkaitan dengan peningkatan kerentanan terhadap infeksi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada penderita SD di Semarang. Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif, dengan jumlah sampel 68 orang (34 penderita SD dan 34 kontrol) yang ada di laboratorium CEBIOR. Pemeriksaan polimorfisme gen ini dilakukan dengan menggunakan metode PCR-RFLP dan enzim restriksi NcoI serta dielektroporesis pada gel agarose 2%. Polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada penderita SD didapatkan 4,4%, sedangkan pada kelompok kontrol 2,9%. Polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada penderita SD ditemukan di daerah ini lebih rendah dibandingkan dengan tempat lain. Kemungkinan adanya perbedaan etnik mempengaruhi kejadian polimorfisme gen TNF- α pada populasi di Indonesia dibandingkan dengan populasi di Caucasia.

Kata kunci: Sindrom Down, polimorfisme TNF- α -308G>A, PCR-RFLP

Abstract

People with Down syndrome (DS) often have impaired immune system, which causes susceptibility to infection, morbidity and mortality. TNF- α -308G>A polymorphism was found to be associated with the increase of susceptibility to infection. The aim of this research is to determine the distribution and allele frequency of TNF- α -308G>A polymorphism among DS patients in Semarang. This is a descriptive research with 68 subjects (34 DS patients and 34 control groups) in the CEBIOR laboratory. The polymorphisms of genes were examined using PCR-RFLP, NcoI restriction enzyme, and electrophoresis on 2% agarose gel. Polymorphism of TNF- α -308G>A was found 4,4% on the DS groups and 2,9% on the control group. Polymorphisms in gene TNF- α -308G>A found in DS was lower in this area compared to other area. The difference in the ethnic background might be a well plausible explanation for the differentiation between polymorphisms on TNF- α in Indonesian population compared to Caucasian population.

Keywords: Down syndrome, TNF- α -308G>A polymorphism, PCR-RFLP

Affiliasi Penulis: 1. Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang. 2. Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. 3. Unit Molekuler dan Sitogenetik, Laboratorium CEBIOR, Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang. **Korespondensi:** Siti Nurhajjah, Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Jl. Perintis Kemerdekaan No. 94 PO BOX 49 Padang 25127. Email: sitinurhajjah@yahoo.co.id, Telp/HP: +6281363394123

PENDAHULUAN

Sindrom Down (SD) merupakan kelainan kromosom yang ditandai dengan kelebihan satu kromosom 21.¹ Insiden penderita SD dilaporkan sekitar 1/300 sampai 1/1000 kelahiran, dimana kasus ini masih tinggi ditemukan di Finlandia 1/364 kelahiran, Dubai 1/449, dan Belanda 1/625.²⁻⁴ Jumlah penderita SD di Indonesia belum didapatkan data secara pasti, namun dari data rekam medik di *Central of Biomedical Research* (CEBIOR) Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang ditemukan sebanyak 123 penderita SD yang diperiksa kromosom selama tahun 2005 sampai 2010.

Kelebihan satu kromosom 21 mengakibatkan peningkatan ekspresi dan ketidakseimbangan beberapa gen, sehingga menyebabkan terjadinya gangguan sistem imun, *intellectual disability* (ID) dan kelainan organ pada penderita SD.^{1,5,7} Gangguan sistem imun pada penderita SD disebabkan karena disfungsi imunitas spesifik dan nonspesifik, sehingga dapat meningkatkan kerentanan infeksi, angka kesakitan dan kematian.⁸⁻¹²

Penderita SD sering mengalami infeksi saluran nafas, saluran cerna, telinga serta infeksi pada mulut, dan gigi.¹³⁻¹⁷ Infeksi saluran nafas merupakan kasus yang paling sering ditemukan dan sebagai penyebab kematian.^{9,13} Penderita ini yang dirawat dengan infeksi saluran nafas selama wabah virus H1N1 terjadi peningkatan sebesar 16 kali lipat dan sebanyak 335 kali lipat terjadi kematian di beberapa rumah sakit. Angka kematian pada penderita SD 23.3% lebih tinggi dibandingkan dengan pasien yang bukan SD (0,1%).¹⁸

Kerentanan infeksi berkaitan dengan polimorfisme gen *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α) dan gen *toll-like receptor 4* (TLR4) serta beberapa sitokin lain.^{19,20} Polimorfisme gen TNF- α -308G>A ini berkaitan juga dengan penyakit *coeliac* pada penderita SD.¹⁵

Beberapa peneliti juga menemukan bahwa polimorfisme gen TNF- α -308G>A berkaitan dengan kerentanan terjadi sepsis pada penduduk Asia.¹⁹ Polimorfisme gen TNF- α ini berhubungan dengan komplikasi syok septik dan kematian pada penderita infeksi.²¹ Lokasi gen TNF- α yaitu berada pada

kromosom 6p21.3 dan dalam daerah *major histocompatibility complex* (MHC) kelas III. Polimorfisme gen ini mengakibatkan peningkatan kadar TNF- α .^{19,22}

TNF- α adalah sitokin utama pada respon inflamasi terhadap infeksi bakteri gram negatif dan mikroba lainnya.²³ TNF- α pada kadar yang tepat berfungsi mengaktifkan imunitas seluler dan memberi perlindungan terhadap mikroba, namun pada kadar yang berlebihan akan mengakibatkan kerusakan jaringan yang berat dan syok septik bahkan menyebabkan kematian.^{23,24}

Beberapa peneliti melaporkan bahwa terjadi peningkatan kadar TNF- α pada penderita SD dibandingkan dengan bukan penderita SD.^{25,26} Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada penderita SD di Semarang.

METODE

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif. Sampel pada penelitian adalah penderita SD dan kontrol, yang sudah dilakukan ekstraksi DNA menggunakan metode *salting-out* oleh peneliti sebelumnya di laboratorium CEBIOR FK Undip dan telah mendapatkan persetujuan komite etik. Jumlah sampel sebanyak 34 penderita SD dan 34 kontrol (bukan SD). Sampel diambil dengan menggunakan teknik *simple random sampling*.

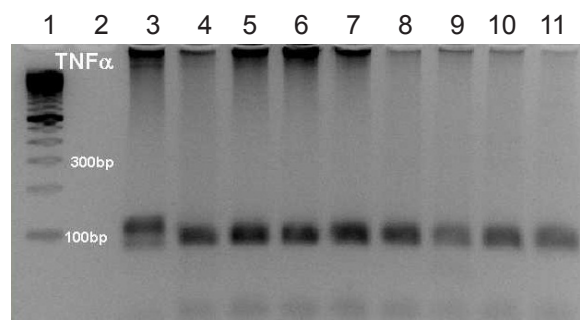
DNA di amplifikasi dengan menggunakan mesin PCR (*Aplied Biosystem*). Prosedur PCR gen TNF- α -308G>A merujuk prosedur yang digunakan dalam penelitian Ngestiningsih dan Faradz. Primer yang digunakan sebagai berikut; primer forward (5' AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT 3') dan primer reverse (5'TCG GAA TCG GAG CAG GGA GGA3').^{22,27} Setelah itu produk PCR dipotong dengan menggunakan teknik *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) memakai enzim restriksi *NcoI* dan dielektroporesis di agarose 2%, 100 volt selama 1 jam.

Polimorfisme gen TNF- α -308G>A alel G/G didapatkan dua fragmen yaitu 87bp dan 20bp, alel G/A terdapat 3 fragmen yaitu 87bp dan 20bp serta 107bp, alel A/A hanya ada satu fragmen dengan ukuran 107bp. Data diolah dan ditampilkan dalam bentuk gambar serta tabel distribusi dan frekuensi alel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil RFLP gen TNF- α -308G>A kelompok SD dan kontrol dapat dilihat pada gambar 1. Alel dengan genotip G/A ditemukan pada sampel SD yaitu lajur 3, dimana produk PCR terpotong pada salah satu alel sehingga terlihat fragmen dengan ukuran 107 bp, 87bp dan 20bp, sedangkan pada lajur 4-11 adalah sampel kontrol, menunjukkan alel dengan genotip G/G, dimana produk PCR terpotong pada kedua alel, sehingga terlihat fragmen dengan ukuran 87bp dan 20bp.

Kejadian polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada subyek dapat dilihat pada tabel 1, dimana alel dengan genotip G/G sebanyak 94,12%, A/G (2,94%), dan A/A (2,94%) dengan frekuensi alel G (95,6%) dan alel A (4,4%), sedangkan pada kelompok kontrol ditemukan alel G/G (94,12%), alel A/G (5,88%), A/A (0%), dan frekuensi alel G:A (97,1% : 2,9%).



Gambar 1. Hasil RFLP Gen TNF- α -308G>A (sampel gambar diambil dari subyek pada kelompok SD dan kontrol).

Keterangan: Lajur 1 menunjukkan DNA marker dengan kenaikan 100bp, lajur 2 kontrol tanpa DNA. lajur 3 menunjukkan alel dengan genotip G/A pada sampel SD, dimana produk PCR terpotong pada salah satu alel, sehingga terdapat 3 fragmen 107bp, 87bp dan 20bp, lajur 4-11 menunjukkan alel G/G pada sampel kontrol, dimana produk PCR terpotong pada kedua alel, sehingga terdapat fragmen dengan ukuran 87bp dan 20bp.

Tabel 1. Perbandingan Polimorfisme Gen TNF- α -308G>A pada Penderita SD dan Kontrol

Kelompok	Alel Gen TNF- α -308G>A			Frekuensi alel	
	G/G	G/A	A/A	G%	A%
	n (%)	n (%)	n (%)		
SD	32 (94,12)	1 (2,9)	1 (2,9)	95,6	4,4
Kontrol	32 (94,12)	2 (5,9)	0	97,1	2,9

Distribusi dan frekuensi alel polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada kedua kelompok subyek penelitian ti-dak didapatkan perbedaan. Hasil yang sama juga ditemukan oleh Karjono dkk,²⁸ Mergani et al,²⁹ Özhan et al,³⁰ dan Sallakci et al,³¹ dimana mereka juga tidak menemukan perbedaan distribusi alel antara kasus dibandingkan dengan kontrol.

Ngestiningsih dan Faradz,²⁷ Minhas et al,³² Mira et al³³ dan Cataldo et al,¹⁵ melaporkan temuan yang berbeda yaitu terdapat perbedaan distribusi polimorfisme gen TNF- α -308G>A antara kelompok kasus dengan kelompok kontrol.

Somi et al, juga menemukan tingginya frekuensi alel polimorfisme gen TNF- α -308G>A, namun secara statistik tidak terdapat perbedaan polimorfisme gen ini antara penderita infeksi Hepatitis B virus (HBV) dibandingkan kontrol.³⁴ Paskulin et

al (2011) menemukan perbedaan distribusi antara alel normal dan alel polimorfisme (72%:28%) tetapi tidak ada kaitan dengan terjadinya syok septik pada penderita yang dirawat di ICU beberapa rumah sakit di Brazil Selatan.³⁵

Perbandingan distribusi masing-masing alel gen TNF- α -308G>A antara kasus dan kontrol yang ditemukan oleh beberapa peneliti dapat dilihat pada tabel 2.

Penelitian ini menemukan alel dengan genotip A/A lebih banyak pada kasus sedangkan penelitian lain di Semarang tidak ditemukan. Hasil yang berbeda dilaporkan oleh Ngestiningsih dan Faradz, dimana polimorfisme gen ini lebih banyak ditemukan pada kontrol dibandingkan penderita DHF, hal ini berbeda dengan hasil yang ditemukan beberapa peneliti sebelumnya.²⁷

Tabel 2. Distribusi Polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada Beberapa Penelitian

No	Peneliti	Subjek	n	Distribusi alel		
				TNF- α -308G>A		
				G/G(%)	G/A(%)	A/A (%)
1	Penelitian ini, Indonesia	Kasus	34	94,12	2,94	2,94
		Kontrol	34	94,12	5,88	0
2	Karjono dkk, Indonesia. ²⁸	Kasus	68	90	10	0
		Kontrol	55	87	13	0
3	Ngestiningsih dan Faradz, Indonesia. ²⁷	Kasus	50	42	58	0
		Kontrol	45	9	73	18
4	Hidayat, Indonesia ³⁶	Kasus	20	100	0	0
		Kontrol	20	95	5	0
5	Mergani et al, Sudan. ²⁹	Kasus	93	84,4	13,8	1,8
		Kontrol	109	90,3	9,7	0
6	Özhan et al, Turki ³⁰	Kasus	103	14,6	41,7	43,7
		Kontrol	93	20,8	37,0	40,8
7	Minhas et al, Pakistan ³²	Kasus	153	39	49	12
		Kontrol	116	73	23	4
8	Cataldo et al, Itali ¹⁵	Kasus	10	40	60	0
		Kontrol	220	74,1	24,1	1,8
9	Mira et al, Prancis ³³	Kasus	89	60,6	36	3,4
		Kontrol	87	81,3	17,2	1,5
10	Sallakci et al, Turki ³¹	Kasus	118	87,3	11	1,7
		Kontrol	111	87,4	12,6	0

Ngestiningsih dan Faradz,²⁷ Minhas et al,³² Mira et al³³ dan Cataldo et al,¹⁵ melaporkan temuan yang berbeda yaitu terdapat perbedaan distribusi polimorfisme gen TNF- α -308G>A antara kelompok kasus dengan kelompok kontrol.

Hasil pada penelitian ini, dimana polimorfisme gen TNF- α pada kontrol tidak ditemukan alel dengan genotip A/A. Hasil yang didapatkan tidak sesuai dengan prinsip Hardy-Weinberg yaitu proporsi relatif dari genotip pada suatu populasi akan tetap konstan dari satu generasi ke generasi berikutnya. Prinsip Hardy-Weinberg ini terganggu jika pada suatu populasi terjadi perkawinan yang tidak acak, jumlah populasi yang kecil dan terjadinya migrasi serta adanya mutasi gen.³⁷

Kemungkinan tidak sesuai hasil dalam penelitian ini dengan prinsip Hardy-Weinberg disebabkan karena kemungkinan ada pengaruh ras dan etnik terhadap kejadian polimorfisme gen ini. Hal ini dibuktikan dari hasil penelitian yang dilakukan Lamsis et al pada populasi di daerah Sulawesi.

Mereka menemukan perbedaan kejadian polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada etnik Bugis, Makasar, dan Toraja.³⁸

Kelemahan penelitian ini adalah kami tidak memeriksa polimorfisme gen TNF- α penderita SD yang sedang terinfeksi atau yang mempunyai riwayat infeksi berulang, sehingga belum bisa disimpulkan bahwa polimorfisme gen ini berkaitan dengan peningkatan kerentanan terhadap infeksi pada penderita SD.

SIMPULAN

Penelitian ini dapat disimpulkan bahwa polimorfisme gen TNF- α -308G>A pada penderita SD ditemukan lebih rendah jika dibandingkan hasil temuan penelitian lain. Kemungkinan adanya perbedaan etnik mempengaruhi kejadian polimorfisme gen ini pada populasi di Indonesia dibandingkan dengan populasi di Caucasia.

Penelitian selanjutnya perlu dilakukan pemeriksaan polimorfisme gen TNF- α pada penderita SD yang mengalami infeksi di

beberapa daerah yang ada di Indonesia, sehingga dapat diketahui kaitan polimorfisme gen TNF- α -308G>A dengan peningkatan kerentanan infeksi dan pengaruh perbedaan etnik dengan kejadian polimorfisme TNF- α .

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada seluruh staf lab

DAFTAR RUJUKAN

1. Wiseman FK, Alford KA, Tybulewicz VLJ, Fisher EMC. Down syndrome-recent progress and future prospects. *Hum Mol Genet* 2009;18(1):75-83.
2. Marttala J, Yliniem O, Glissler M, Nieminen P, Ryyanen M. Prevalence of Down syndrome in a pregnant population in Finlandia. *Acta Obstet Gynecol* 2010;89:715-17.
3. Murthy SK, Malhotra AK, Mani S, et al. Incidence of Down syndrome in Dubai, UAE. *Med Princ Pract* 2007;16:25-8.
4. Weijerman ME, van Furth AM, Vonk Noordegraaf A, van Wouwe JP, Broers CJ, Gemke RJ. Prevalence, neonatal characteristics and first-year mortality of Down syndrome. *J Pediatr* 2008;152:15-9.
5. Sherman SL, Allen EG, Bean LH, Freeman SB. Epidemiology Down syndrome. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2007;13(3):221-7.
6. Besser LM, Shin M, Kucik JE, Correa A. Prevalence of Down syndrome among children and adolescents in Metropolitan Atlanta. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2007;79(11):765-74.
7. Freeman SB, Allen EG, Oxford-Wright CL, et al. The national Down syndrome project: design and implementation. *Public Health Reports* 2007;122:62-72.
8. Gocchi G, Matrocola M, Capelli M, Bastelli A, Vitali F, Corvaglia L. Immunological pattern in young children with Down syndrome: Is there a temporal trend? *Acta Paediatr* 2007;96:1479-82.
9. Ram G, Chinen J. Infection and immunodeficiency in Down syndrome. *Clin Exp Immunol* 2011;164(1):9-16.
10. Megged O. Down syndrome and *streptococcus* group A disease in hospitalized children. *Acta Pediatr* 2010;99:796-8.
11. Garrison MM, Jeffries H, Chistakis DA. Risk of death for children with Down syndrome and Sepsis. *J Pediatr* 2005;147(6):723-5.
12. Shimada A, Hayashi Y, Ogasawara M, et al. Proinflammatory cytokinemia is frequently found in Down syndrome patients with hematological disorders. *Leukemia Res* 2007;31:1199-1203.
13. Bloemers BL, Broers CJ, Bont L, Weijerman ME, Gemke RJ, van Furth AM. Increased risk of respiratory tract infections in children with Down syndrome: the consequence of an altered immune system. *Microbes Infect* 2010;12:799-808.
14. Bruijn M, Van der Aa LB, Van Rijn RR, Bos AP, Van Woensel JBM. High incidence of acute lung injury in children with Down syndrome. *Intensiv Care Med* 2007;33:2179-182.
15. Cataldo F, Scola L, Piccione M, et al. Evaluation of cytokine polymorphism (TNF-alpha, IFN-gamma and IL-10) in Down patients with celiac disease. *Dig Liver Dis* 2005;37(12):923-7.
16. Venail F, Gardiner Q, Mondain M. ENT and speech disorders in children with Down's syndrome: an overview of pathophysiology, clinical features, treatments, and current management. *Clin Pediatr* 2004;43(9):783-91.
17. Hennequin M, Faulks D, Veyrune JL. Significance of oral health in persons with Down syndrome: A literature review. *Dev Med Child Neurol* 1999;41:275-83.
18. Pérez-Padilla R, Fernández R, García-Sancho C. Pandemic (H1N1) 2009 Virus and Down Syndrome Patients. *Emerg Infect Dis* 2010;16:1312-14.

19. Teuffel O, Ethier MC, Beyene J, Sung L. Association between tumor necrosis factor-alpha promoter -308 A/G polymorphism and susceptibility to sepsis and mortality: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 2010;38: 276-82.
20. Sinead C, Corr Luke AJ, O'Neill. Genetic variation in toll-like receptor signaling and the risk of inflammatory and immune diseases. *J Innate Immun* 2009;1:350-57.
21. Cipprino C, Caruso C., Lio D, et al. The-308G/A polymorphism of TNF-alpha influences immunological parameters in old subjects affected by infectious diseases. *Int J Immunol-genet* 2005;32(1):13-8.
22. Barber RC, Aragaki CC, Rivera-chavez FA, Purdue GF, Hunt JL, Harton JW. TLR4 and TNF- α polymorphism are associated with an increased risk for severe sepsis following brain injury. *J Med Genet* 2004;41:808-13.
23. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Conlin A. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia; WB Saunders Company 2007.
24. Plebanski M, Proudfoot O, Pouniotis D, Coppel RL, Apostolopoulos V, Flannery G. Immunogenetics and design of Plasmodium falciparum vaccines for use in malaria endemic populations. *J Clin Invest* 2002;110:295-300.
25. Murphy M, Friend DS, Pike-Nobile L, Epstein LB. Tumor necrosis factor alpha and IFN-gamma expression in human thymus. *J Immunol* 1992;149(7):2506-12.
26. Trotta MBF, Azul JBS, Wajngarten M, Fonseca SG, Goldberg AC, Kalil JE. Inflammatory and immunological parameters in adults with Down syndrome. *Immun Ageing* 2011;8(1); 1-7.
27. Ngestiningsih D, Faradz SMH. Polimorfisme alel TNF- α pada penderita DHF di Semarang. *M Med Indones* 2006;41:46-50.
28. Karjono BJ, Susilaningsih N, Purnawati RD. Polimorfisme gen TNF-alfa, TLR4, CD-14 dan kadar TNF-alfa plasma pada penderita infeksi saluran kemih karena E.coli (Lap Panel Ristek 2010). Semarang Fakultas Kedokteran Undip 2010.
29. Mergani A, Khamis AH, Haboor AB, et al. Lack of association between -308 tumor necrosis factor polymorphism and susceptibility to cerebral malaria among Central Sudanese children. *Int J Genet Mol Biol* 2010;2(5):67-71.
30. Özhan G, Yanar HT, Ertekin C, Alper-tunga B. Polymorphisms in tumor necrosis factor alpha (TNF α) gene in patients with acute pancreatitis. *Mediators Inf* 2010;2:1-6.
31. Sallakci N, Akcurin G, Köksoy S, et al. TNF-alpha G-308A polymorphism is associated with rheumatic fever and correlates with increased TNF- α production. *J Autoimmun* 2005;25:150-4.
32. Minhas K, Micheal IS, Ahmed F, Ahmed A. Strong Association between the-308 TNF promoter polymorphism and allergic rhinitis in Pakistani patients. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2010;20(7):563-6.
33. Mira JP, Cariou A, Grall F, et al. Association of TNF2, a TNF- α promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality. *JAMA* 1999;282(6):561-8.
34. Somi MH, Najafi L, Noori NB, et al Tumor necrosis factor-alpha in Iranian patients with chronic hepatitis B. *Indian J Gastroenterolog* 2006;25:14-5.
35. Paskulin DD, Fallavena PR, Paludo FJO, et al. TNF-308 G/A promoter polymorphism (rs1800625) and outcome from critical. *Braz J infect Dis* 2011;15(3):231-8.
36. Hidayat ST. Polimorfisme gen CYF19 dan TNF-alpha pada penderita endometriosis. Tesis Semarang, Program Magister Ilmu Biomedik Konseling Genetika Undip 2009.
37. Andrews CA. The Hardy-Weinberg Principle. *Nature Edu Knowledge* 2010;3(10):65.
38. Lamsis F, Flannery GR, White NG, Muratore R, Kaelan C, Mitchell RJ. Alleles and haplotypes of tumor necrosis factor (TNF) alpha and beta genes in three ethnic populations of Sulawesi Indonesia. *Hum Biol* 2002;74(3):381-96.