

**DETEKSI GEN IL-6 DAN TNF- α DENGAN METODE PCR PADA PENDERITA
HEPATITIS B DILABORATORIUM KLINIK MAXIMA KOTA KENDARI**

***DETECTION OF IL-6 AND TNF- α USING PCR METHOD IN HEPATITIS B
PATIENTS IN MAXIMA CLINICAL LABORATORY KENDARI CITY***

Sanatang, Sri Anggarini Rasyid, Tiara Mayang Pratiwi Lio

Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis, Univ. Mandala Waluya Kendari

Corresponding author : chemist_ana82@yahoo.com

Abstrak

Penyakit Hepatitis B adalah inflamasi yang terjadi pada organ hati yang dapat disebabkan oleh virus hepatitis B. Pada saat terjadi inflamasi sitokin yang ada dalam tubuh akan merespon atau mengenali jenis patogen berupa virus yang masuk ke dalam tubuh. *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) adalah salah satu sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam proses inflamasi hati, dan Interleukin-6 (IL-6) adalah sitokin yang disekresikan dari jaringan tubuh pada fase infeksi akut atau kronik. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mendeteksi gen TNF- α dan IL-6 pada penderita hepatitis B dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR). Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah semi kuantitatif, dengan desain penelitian eksperimental. Populasi pada penelitian adalah seluruh penderita suspek yang melakukan pemeriksaan rapid Hepatitis B (HbsAg) di Laboratorium Klinik Maxima Kota Kendari sebanyak 7 orang. Teknik penarikan sampel menggunakan *total sampling* dengan kriteria inklusi sampel yaitu pasien yang tidak memiliki riwayat penyakit lain selain hepatitis B. Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa dari ketujuh sampel penderita hepatitis B yang diperiksa menggunakan metode PCR 3 sampel dengan hasil positif (45%) terhadap gen TNF- α dan 7 (100%) hasil negative terhadap gen Interleukin 6 (IL-6). Sehingga dapat disimpulkan bahwa jenis sitokin yang berperan saat terjadi inflamasi ketika seseorang terinfeksi Virus Hepatitis B adalah *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α).

Kata kunci: TNF- α , IL-6, PCR, Hepatitis B

Abstract

Hepatitis B disease is inflammation that occurs in the liver that can be caused by the hepatitis B virus. When inflammation occurs, cytokines in the body will respond or recognize the type of pathogen in the form of a virus that enters the body. *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) is one of the pro-inflammatory cytokines that play a role in the liver inflammatory process, and Interleukin-6 (IL-6) is a cytokine secreted from body tissues in the acute or chronic infection phase. The purpose of this study was to detect TNF- α and IL-6 genes in hepatitis B patients using the polymerase chain reaction (PCR) method. The type of research used in this study is semi-quantitative, with an experimental research design. The population in this study were all suspected patients who underwent rapid Hepatitis B (HBsAg) examination at the Maxima Clinical Laboratory, Kendari City, as many as 7 people. The sampling technique used total sampling with sample inclusion criteria, namely patients who did not have a history of other diseases other than hepatitis B. - α and 7 (100%) were negative for the Interleukin 6 (IL-6) gene. So it can be concluded that the type of cytokine that plays a role when inflammation occurs when a person is infected with the Hepatitis B Virus is *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α).

Keywords: TNF- α , IL-6, PCR, Hepatitis B

Pendahuluan

Penyakit Hepatitis sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan dunia dan masih menjadi persoalan serius di beberapa negara. Hepatitis menjadi penyakit terbesar kesepuluh penyebab kematian di dunia (Hardjoeno 2007). Penyakit Hepatitis yang disebabkan oleh virus hepatitis menyebar dengan beberapa jenis virus sebagai agen penyebabnya seperti Hepatitis A virus (HAV), Hepatitis B virus (HBV), Hepatitis C virus (HCV), Hepatitis D virus (HDV), dan Hepatitis E virus (HEV). Virus-virus tersebut dapat memberikan gejala klinik yang serupa. Jenis virus hepatitis yang paling dikenal adalah HAV dan HBV. Hepatitis B merupakan salah satu penyakit hepatitis virus yang paling dikenal (Price and Wilson 2012).

Indonesia menjadi negara dengan penderita Hepatitis B ketiga terbanyak di dunia setelah China dan India dengan jumlah penderita 13 juta orang, sementara di Ibukota diperkirakan satu dari 20 penduduk menderita penyakit Hepatitis B. Sebagian besar penduduk kawasan ini terinfeksi Virus Hepatitis B (VHB) sejak usia kanak-kanak. Sejumlah Negara di Asia, 8-10% populasi orang menderita Hepatitis B kronik. Infeksi Hepatitis B masih tinggi kejadiannya 4%-30% pada orang normal, sedangkan pada penyakit hati menahun angka kejadiannya 20% - 40%. Pada ibu hamil prevalensinya sebesar 4% dan penularan ibu hamil yang mengidap Hepatitis ke bayinya sebesar 45,9%. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia prevalensi Hepatitis B di Provinsi Sulawesi Tenggara pada tahun 2017 berjumlah 157 orang dan pada tahun 2018 mengalami peningkatan dari tahun sebelumnya yaitu 343 orang (Kemenkes 2013).

Diagnosa pemeriksaan hepatitis B dapat dilakukan dengan beberapa pemeriksaan diantaranya pemeriksaan serologis, pemeriksaan biokimia, dan pemeriksaan molekuler. Pemeriksaan serologis berfungsi sebagai indikator awal dari VHB dan diagnosis screening, yaitu HBsAg dengan menggunakan metode imunokromatografi, selain itu untuk pemeriksaan kuantitatif HBsAg juga dilakukan dengan metode ELFA (*Enzym Linked Fluorescence Assay*). Pemeriksaan biokimia berfungsi untuk melihat fungsi hati dalam hal ini pemeriksaan SGOT dan SGPT menggunakan metode spektrofotometri, pemeriksaan molekuler yang berfungsi untuk deteksi dan pengukuran DNA VHB dalam serum atau plasma, Pemeriksaan lain untuk diagnose hepatitis antara lain *Radio Immune Assay* (RIA), *Hybrid Capture Chemiluminescence* (HCC), Amplifikasi signal (metode *branched DNA/bDNA*), dan amplifikasi target (metode *Polymerase Chain Reaction*) (Sudjadi. 2008).

Pada penilaian fungsi hati dilakukan pemeriksaan fungsi sintesis hati yaitu albumin, globulin, elektroforesis protein, *Protrombin time* dan *Cholinesterase*. Fungsi ekskresi diukur kadar bilirubin dan asam empedu, dan uji detoksifikasi dapat digunakan pemeriksaan ammonia serum. Pengukuran aktivitas enzim hepatoseluler seperti SGPT dan SGOT digunakan untuk menilai integritas sel hati, kekurangan dari tes ini adalah tidak dapat digunakan untuk menentukan derajat kerusakan hati disebabkan oleh beberapa factor seperti konsumsi obat-obatan seperti narkotika, antibiotic, antihipertensi, rifamisin dan lain sebagainya sehingga mampu meningkatkan kadar SGOT/SGPT olehnya itu perlu dilakukan pemeriksaan penunjang lainnya untuk melihat fungsi hati seperti albumin, globulin, dan bilirubin. sedangkan ALP dan GGT lebih mengarah ke kolestasis. Penentuan etiologi penyakit hati dapat digunakan penanda untuk hepatitis autoimun, keganasan sel hati, atau penanda hepatitis virus (Rizalinda dkk.2014). Deteksi Interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF – α) menggunakan PCR bertujuan untuk melihat adanya gen interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF – α) pada penderita hepatitis B melalui amplifikasi DNA target.

Metode Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Agustus – September 2020 di Laboratorium Diagnostik Molekuler Program Studi D-IV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Mandala Waluya Kendari. Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah semi kuantitatif, dengan desain penelitian experimental. Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh penderita suspek Hepatitis B yang melakukan pemeriksaan rapid HBsAg di Laboratorium Klinik Maxima Kota Kendari sebanyak 7 orang. Sampel ditentukan dengan *total sampling*.

Pemeriksaan gen dimulai dengan isolasi DNA dari sampe serum menggunakan kit isolasi dan purifikasi DNA (*TheDNA Extraction*) dari Geneaid. Penentuan genotip IL-6 yaitu dengan cara fragmen DNA di amplifikasi dengan primer spesifik F: 5'-GGAGTCACACACTCCACCT-3' dan R: 5'-CTGATTGGAAACCTTATTAG-3', serta primer spesifik TNF- α adalah F: 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGG-3', dan R: 3' ACACACAA GCATCAAGGATACC-5'. (Citrawati 2019; Iran 2014).

Campuran reaksi PCR (volume akhir 25 μ L) yang terdiri dari: 2 μ L primer mix (1 μ L *primer forward* dan 1 μ L *primer reverse*) ke dalam microtube PCR 0,2 ml ditambahkan 15 μ L PCR *master mix* (1x buffer PCR, 150 nM dNTP, dan 0,5 U *Taq* DNA polymerase), kemudian ditambahkan 3 μ L *Nuclease Free Water* dan 5 μ L DNA *template*. Kondisi temperatur reaksi PCR gen IL-6 adalah sebagai berikut: Denaturasi awal dilakukan pada suhu 95°C selama 15 menit, *annealing* pada suhu 56°C selama 1 menit, *extension* pada suhu 72°C selama 1 menit, dan *final extension* pada suhu 72°C selama 10 menit (Iran 2014). Sedangkan kondisi temperatur reaksi PCR gen TNF- α adalah sebagai berikut: Denaturasi awal dilakukan pada suhu 94°C selama 30 detik, *annealing* pada suhu 60°C selama 30 detik, dan *extension* pada suhu 72°C selama 40 detik (Citrawati, 2019). Produk PCR yang diperoleh dari proses PCR dengan kondisi PCR yang telah disesuaikan kemudian dielektroforesis menggunakan gel agarose.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Penelitian

Deteksi gen interleukin-6 (IL-6) dan Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) pada penderita hepatitis B Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui ada atau tidaknya gen TNF- α dan IL-6 pada penderita hepatitis B. Pada penelitian ini diperoleh hasil pengukuran konsentrasi DNA yang dapat dilihat pada **Tabel 1**. berikut:

Tabel 1. Hasil Uji Kualitas dan Kuantitasi DNA menggunakan Spektrofotometer

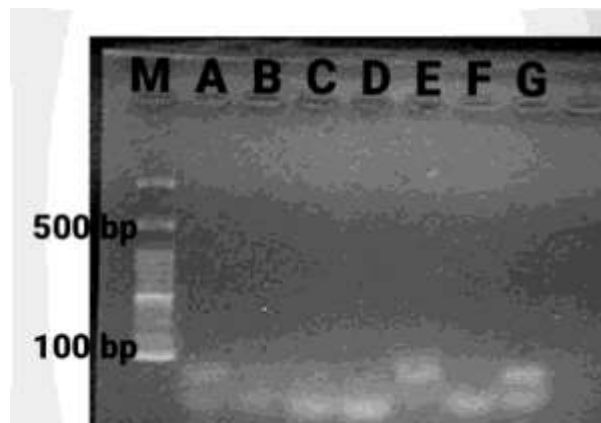
Sampel	Konsentrasi			Ratio (A260/A280)
	DNA (X 50 μ g/mL X 100)	A 260	A280	
A	12,670	2,534	2,319	1,099
B	12,700	2,540	2,311	1,092
C	12,860	2,572	2,331	1,103
D	12,635	2,527	2,304	1,096
E	12,485	2,497	2,283	1,093
F	12,915	2,583	2,339	1,104
G	12,730	2,546	2,347	1,084

Pengukuran Kadar SGOT dan SGPT merupakan salah satu parameter yang dapat di jadikan sebagai diagnosis penunjang kerusakan fungsi hati, Kadar SGOT dan SGPT Penderita Hepatitis B dapat di lihat pada **Tabel 2** berikut ini :

Tabel 2. Hasil Pengukuran Kadar SGOT dan SGPT Penderita Hepatitis B

Kode Sampel	KADAR (IU/L)	
	SGOT	SGPT
A	23	31
B	17	14
C	32	45
D	57	72
E	47	69
F	30	25
G	48	20

Berdasarkan penelitian yang telah di lakukan, di peroleh hasil visualisasi DNA terhadap gen IL-6 dan TNF – α pada penderita hepatitis B, dapat di lihat pada **Gambar 1. dan Gambar 2.**berikut ini:



Gambar 1.Hasil Visualisas Interleukin-6.

Tidak terdapat pita DNA pada seluruh sampel



Gambar 2. Hasil Visualisas *Tumor Necrosis Factor Alpha*. Terdapat pita DNA pada sampel B, D, dan E

Pembahasan

Berdasarkan hasil pengukuran terhadap sampel penderita suspek Hepatitis B (Tabel 1.) Sampel yang mempunyai konsentrasi DNA tertinggi adalah sampel F yaitu 12,915 $\mu\text{g/mL}$ dan konsentrasi paling rendah adalah sampel E yaitu 12,485 $\mu\text{g/mL}$. Tinggi atau rendahnya konsentrasi DNA yang di hasilkan dalam proses isolasi dapat di sebabkan oleh beberapa factor yaitu factor suhu inkubasi. Sampel yang telah di campurkan dengan larutan lysis buffer diinkubasi pada suhu tertentu. Jika suhu inkubasi yang digunakan terlalu tinggi maka dapat merusak DNA, sedangkan jika suhu terlalu rendah maka membrane serta jaringan sel tidak dapat hancur. Waktu inkubasi yang terlalu lama maka dapat merusak DNA dan jika terlalu sebentar tidak dapat menghancurkan membrane dan jaringan sel. Oleh karena itu baik suhu dan waktu, kedua – duanya harus diatur dengan sebaik mungkin agar diakhir diperoleh konsentrasi DNA yang diinginkan. Kombinasi antara lama waktu dan suhu inkubasi yang tepat dapat menghasilkan isolate DNA yang diharapkan sehingga dapat digunakan untuk melakukan tahapan selanjutnya seperti PCR. Akan tetapi selain konsentrasi DNA, kemurnian DNA juga merupakan syarat penting agar tahapan PCR dapat berhasil.

Kemurnian DNA merupakan rasio antar A260 dengan A280. Isolat DNA dikatakan murni jika nilai rasio A260/A280 berkisar antara 1,8 sampai 2,0. Pada penelitian ini sampel – sampel yang memiliki kemurnian diantara 1,8 – 2,0 adalah sampel C (1,103) dan sampel F (1,104). Sedangkan sampel A, B, D, E dan G memiliki nilai kemurnian lebih kecil dari 1,8 yang mengindikasikan bahwa adanya kontaminasi pada DNA hasil isolasi. Kontaminan itu dapat berupa etanol ataupun jumlah DNA yang terlalu sedikit. Hal ini sejalan dengan penelitian (Ariani. 2007) bahwa Nilai rasio untuk DNA untai ganda murni yaitu 1,8 – 2,0. Nilai rasio di bawah 1,8 menunjukkan adanya kontaminasi protein, sedangkan diatas 2,0 menunjukkan adanya kontaminasi RNA.

Konsentrasi maupun kemurnian DNA yang dihasilkan sangat dipengaruhi oleh faktor teknis selama pengerjaan isolasi DNA, diantaranya adalah factor pemindahan supernatan yang mengandung DNA setelah diinkubasi ke dalam tabung eppendorf yang baru dan pengeringan isolat harus dilakukan secara teliti agar jaringan yang telah hancur yang berada

di dasar tabung tidak ikut terambil, sedangkan pengeringan DNA yang berupa pelet pada tahap akhir isolasi harus benar-benar kering dari larutan sebelumnya yang dipakai untuk purifikasi. Jika pengeringan kurang sempurna, maka larutan purifikasi seperti etanol atau alcohol dapat menurunkan kemurnian DNA pada saat pengukuran di spektrofotometer. Selain faktor teknis, factor alat dan bahan yang di gunakan sangat berpengaruh pada kualitas DNA yang di dihasilkan. Alat – alat seperti tabung eppendorf, tabung PCR, dan tip harus steril sebelum digunakan untuk isolasi DNA.

Penderita hepatitis B adalah seseorang yang terinfeksi virus yang berlangsung dalam hati, selama terjadi infeksi tubuh akan mengenali bakteri patogen atau virus yang mengarah pada *celluler recruitment* dan timbulnya respon sitokin proinflamatori termasuk interleukin-6 (IL-6) dan *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α). Respon inflamasi ini berlanjut ke pembersihan bakteri pathogen atau virus dan memungkinkan tubuh untuk kembali pada keadaan homeostatis. Berdasarkan Gambar 2. deteksi gen TNF- α menggunakan metode *Polimerase Chain Reaction* dari 7 sampel penderita hepatitis B diperoleh 3 sampel positif ditandai dengan munculnya pita DNA *Tumor Necrosis Factor Alpha* dengan ukuran 152 bp setelah gel agarosa di visualisasi menggunakan UV Transluminator. Sesuai dengan penelitian tentang Deteksi Gen Polimorfisme TNF- α pada penderita Tuberculosis bahwa gen TNF- α ditandai dengan terdapatnya pita DNA pada ukuran 152 bp di gel elektroforesis (Rosana 2015). Sedangkan berdasarkan Gambar 1. Tidak terdapat pita DNA yang berarti bahwa tidak terdeteksinya DNA interleukin- 6 dari seluruh sampel.

Jika di kaitkan dengan kadar SGOT dan SGPT seperti di jelaskan pada Tabel 2., terdapat untuk sampel positif yaitu sampel D dan E dan menunjukkan bahwa pada kadar SGOT dan SGPT meningkatnya. Hal ini menandakan penderita tersebut telah dikatakan sebagai penderita akut, Sedangkan untuk sampel yang negatif memiliki kadar SGOT dan SGPT yang normal. Pada umumnya nilai SGPT lebih tinggi daripada nilai SGOT pada kerusakan parenkim hati akut, sedangkan pada proses kronis di dapatkan sebaliknya (Riswanto 2009).

Deteksi selanjutnya adalah deteksi gen Interleukin-6 pada penderita hepatitis B, di peroleh hasil negative hal ini di tandai dengan tidak adanya pita DNA Interleukin – 6 yang terbentuk setelah visualisasi DNA. Hal ini disebabkan IL- 6 memang tidak terdapat pada sampel hasil ekstraksi DNA, selain itu juga umumnya IL-6 hanya berperan penting pada mekanisme pertahanan tubuh dan berkontribusi padamanifestasi kerusakan jaringan. Hal ini sejalan dengan penelitian Elipta (2013) tentang penentuan Kadar IL–6 menggunakan metode ELISA pada penderita KHS (Karsinoma Hepatoseluler) secara statistik bermakna lebih tinggi di bandingkan dengan penderita hepatitis Bakut/kronik. Selain itu juga menurut penelitian Budiarto (2018) tentang Kaitan Genotyping Error Dengan Performa Diagnostik Molekuler Berbasis Amplifikasi Asam Nukleat bahwa Eror PCR di pengaruhi oleh beberapa factor diantaranya adanya biokontaminan yang mempengaruhi amplifikasi DNA, optimasi kondisi PCR yang sebelumnya perlu dilakukan, sumber arus listrik yang kurang stabil dan lainsebagainya.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian maka dapat disimpulkan bahwa dengan metode PCR maka dapat dilakukan pendeteksian gen TNF- α dan TNF- α memiliki tingkat prevalensi yang lebih tinggi di bandingkan dengan Interleukin6

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih kepada, Yayasan Mandala Waluya Kendari, LPPM Universitas Mandala Waluya dan Prodi D-IV Teknologi Laboratorium Medis Universitas Mandala Waluya yang telah memfasilitasi pelaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Ariani. 2007. Metodologi Penelitian Kebidanan. Yogyakarta : Nuha Medika Abbas. 2015. Fungsi dan Kelainan Sistem Imun. Edisi Kelima. ELSEIVER. Hal.64
- Budiarto, Bugi Ratno. 2018. Kaitan genotyping errors dengan performa diagnostik molekuler kanker berbasis amplifikasi asam nukleat. *Biodidaktika : Jurnal Biologi dan Pembelajarannya*. Vol 13, No. 2
- Citrawati. 2019. Detection Of Tumor Necrosis Factor – α Gen Promoter Polymorphism Among Liver Cirrhosis Patient With Chronic Hepatitis B Virus (VHB) Infection In Surabaya, Indonesia. *Indonesian Journal Of Tropical and Infection Disease*. Vol: 7 No: 5 Agustus 2019. (Diakses pada 15 Februari 2020)
- Elipta. 2013. Perbandingan Kadar Interleukin 6 Pada Penderita Karsinoma Hepatosesuler dan Hepatitis B Kronik. Universitas Gajah Mada.
- Hardjoeno, 2007. Kapita Selekta Hepatitis Virus Dan Interpretasi Hasil Laboratorium, Lembaga Penerbitan Universitas Hasanuddin (LEPHAS).5-14
- Iran. 2014. Interleukin – 6 (IL-6) dan Interleukin 10 (IL-10) Gene Polymorphisms And Recurrent Pregnancy Loss In Romanian Population. Vol : 12. No: 9 Hal : 617 – 622.
- Kementrian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Laporan hasil riset kesehatan dasar Indonesia (Riskesdas)*. Jakarta: Badan Litbangkes. hlm.109-110.
- Price, Wilson et.al. 2012. Patofisiologi: Konsep klinis proses-proses penyakit. Edisi ke-6. Jakarta: EGC. hlm 485-90
- Riswanto (2009). SGOT (Serum Glutamic Oxaloacetic Transaminase) dan SGPT (Serum Glutamic Pyruvic Transaminase), diakses di <http://labkesehatan.blogspot.com>
- Rizalinda, Maisuri dkk, 2014. Studi molekuler Virus Hepatitis B pada Serum Infeksi Hepatitis B tersamar. Makassar. UNHAS
- Rosana Agus. 2015. Deteksi Variasi Genetik Tumor Necrosis Factor Alpha Metode RFLP. Makassar : Universitas Hasanuddin.
- Sudjadi. 2008. *Bioteknologi Kesehatan*. Penerbit Kanisius. Yogyakarta

SANATANG ET.AL. 2022. DETEKSI GEN..... BIOMA; 7 (1) : 21-28

Tim Biologi Molekuler. 2017. Isolasi DNA, PCR, dan Elektroforesis. Jurusan Biologi Fakultas MIPA UHO dan Prodi TLM STIKES Mandala Waluya Kendari.

World Health Organization. 2012. Hepatitis B. Department of Communicable Diseases Surveillance and Response.

Wilson, Walker et.al. 2010. Principles and Techniques Of Biochemistry and Molecular. Cambridge University Press.

Yusuf, Z.K.,2010. Polymerase Chain Reaction (PCR).Jurnal sanitek.vol.5. No.6.Hal : 30 – 31.