

# Peran TGF- $\beta$ 1 sebagai Regulator *Switching Isotype* sekresi sIgA Saliva

(The Role of TGF- $\beta$ 1 as switching isotype regulator on sIgA secretion in Saliva)

Pratiwi Soesilawati\*, Harianto Notopuro\*\*, Istiati Soehardjo\*, Afaf Baktir\*\*\*

## ABSTRACT

IgA Isotype switching requires the induction of TGF- $\beta$ 1 to regulate transcriptional activity. Disturbances in the differentiation of B cells can occur because of an increasing or decreasing in expression of TGF- $\beta$ 1. This difference causes the differentiation of B cells disrupted because TGF- $\beta$ 1 play a role in DNA re-arrangement for isotype switching in B cells, causing changes in membrane-bound antibody IgM became membrand-bound antibody IgA. This Study was aimed to identity and coralabe between sIgA with TGF beta. This research was conducted through the 30 samples from the case group with sIgA levels > 300 ng/ml and 30 samples from the control group with sIgA levels < 300 ng/ ml. Gingival tissues obtained during the extraction of deciduous teeth. Gingival tissue was inserted into a solution of 10% buffered formalin. Preparation of histological preparations followed by immunohistochemical staining procedure using monoclonal antibody anti-TGF- $\beta$ 1. This result showed that statistical tests of TGF- $\beta$ 1 in the case group contained an average of 26% of the entire field of view of the lamina propria. Average in the control group by 57% of the entire field of view of the lamina propria. Data on the number of TGF- $\beta$ 1 in the case and control groups are normally distributed. The results of the analysis by t test found significant differences in the mean number of TGF- $\beta$ 1 in the case and control groups ( $p = 0.000$ ). There is a strong correlation between TGF- $\beta$ 1 and sIgA. Decreased of TGF- $\beta$ 1 expression associated with decreased activation in the sIgA isotype switching, and vice versa.

**Key words:** TGF- $\beta$ 1, sIgA saliva, immunohistochemistry, switching isotype

## PENDAHULUAN

Beberapa penelitian menyimpulkan bahwa kadar sIgA pada kelompok individu tahan karies lebih tinggi daripada kelompok individu rentan karies (Lehner, 1996; Bratthall, 1996). Analisa penelitian ini menunjukkan kemampuan respon imun IgA bersifat protektif jika muncul pada saat terjadi kolonisasi *S. mutans* (Abbas & Lichtman, 2007).

Respon imun dalam saliva terhadap *S. mutans* menunjukkan karakteristik yang individual pada anak-anak. Keparahan infeksi berhubungan dengan dosis antigen dan usia anak berhubungan dengan kematangan respon imun. Pada umumnya spesifisitas dan kemampuan respon imun mukosa terhadap organisme berperan pada keberhasilan atau kegagalan kolonisasi kuman. (Slayton *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2010).

Respon imun melibatkan dua bagian utama dari sel yaitu T limfosit dan *antigen presenting cell* (APC). Limfosit adalah salah satu tipe sel darah putih yang diproduksi di sumsum tulang melalui proses hematopoeiesis. Limfosit

meninggalkan tulang belakang untuk bersirkulasi ke dalam darah dan sistem limfatik, serta berada di berbagai organ limfoid. Limfosit memproduksi dan mengedarkan *antigen binding cell-surface receptor*, sehingga limfosit memediasi spesifisitas, diversitas, memori dan pengenalan *self/nonself*. Dua populasi utama limfosit adalah *B lymphocyte* (sel B) dan *T lymphocytes* (sel T) (Abbas *et al.*, 2010).

Presentasi MHC dan proses pengenalan peptida antigen adalah jalur penting dalam menstimulasi respon imun. Mikroba ekstraseluler yang ditangkap oleh APC, termasuk limfosit B dan makrofag, dipresentasikan oleh molekul MHC klas II, dan diekspresikan dari APC. Sel T mempresentasikan CD4+ dan CD8+ dan sel NK untuk pengenalan antigen. CD4+ dan NK cells berfungsi sebagai imunitas sitotoksik sedangkan CD 8 + berfungsi sebagai imunitas humoral. CD4 kemudian berdeferensiasi menjadi *T helper-1* (Th1) dan *T helper2* (Th2). Th1 dan Th2 masing-masing melepaskan sitokin. Sitokin yang dihasilkan sel Th1 antara lain IFN-  $\gamma$  dan IL-2 yang berfungsi pada

\* Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga

\*\* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga

\*\*\* Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Airlangga

proliferasi sel T. Th2 memproduksi IL-10, IL-4 dan IL-6 untuk merangsang proliferasi sel B dan sintesa antibodi (Medzhitov, 2007; Medzhitov & Janeway, 2000).

Limfosit B mengalami maturasi di sumsum tulang. Saat keluar dari sumsum tulang, limfosit B mengekspresikan *antigen-binding receptor* atau *B-cell reseptor* yang merupakan molekul antibodi. Antibodi yang diproduksi oleh sel B adalah suatu glikoprotein yang terdiri dari dua rantai polipeptida H dan dua rantai polipeptida L yang identik. Rantai H berikatan dengan rantai L melalui ikatan disulfida. Ikatan disulfida berikutnya mengikat dua pasang rantai. *Amino-terminal end* dari pasangan rantai H dan L membentuk cekungan tempat ikatan antigen. Saat sel B menangkap antigen yang cocok dengan antibodi yang terikat di membran, ikatan antigen-antibodi ini menyebabkan sel membelah dengan cepat, menjadi sel B memori dan sel B efektor yang disebut sel plasma. Sel B memori memiliki masa hidup yang panjang daripada sel naif, dan memiliki *membran-bound* antibodi (Abbas *et al.*, 2010).

*Membran-bound antibody* pada sel B mampu mengenali antigen secara kimiawi berbentuk protein, lipid, karbohidrat, dan asam nukleat. Reseptor sel T sebaliknya hanya mampu mengenali antigen yang terikat pada protein sel membran yang disebut molekul *Major Histocompatibility Complex* (MHC). Molekul MHC yang berperan pada rekognisi disebut "*antigen presentation*". Molekul ini bersifat polimorfik atau diversifikasi genetik. MHC adalah kompleks genetik yang besar dengan lokus multipel. Tiap molekul MHC mampu berikatan dengan peptida antigen yang terderivasi dari degradasi molekul antigen intraseluler (Abbas *et al.*, 2010).

Kekebalan tubuh inang tidak mengenali setiap antigen, tetapi hanya beberapa struktur mikroorganisme yang umum. Struktur ini disebut sebagai *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) dan reseptor sistem imun inang berevolusi untuk mengenali PAMP melalui *pattern-recognition receptors* (PRR). PAMP yang banyak dikenal adalah bakteri lipopolisakarida, peptidoglikan, asam *lipoteichoic*, *mannans*, *Dioxyribo Nucleic Acid* (DNA) bakteri, *double-stranded* RNA, dan glukon. Struktur ini secara kimia berbeda, tetapi molekul PAMP mampu mengenali antigen (Medzhitov & Janeway, 2000).

PAMP dibentuk oleh mikroba patogen, dan bukan oleh inang. Jalur pengenalan inang terhadap PAMP dapat dijelaskan sebagai berikut. Pada jalur pertama lipopolisakarida disintesis oleh bakteri. Selanjutnya PRR mengenali lipopolisakarida dan memberi sinyal kepada inang tentang keberadaan organisme penyebab infeksi. Kedua, struktur ini dikenali oleh sistem kekebalan tubuh

inang untuk pengenalan patogenitas mikroorganisme. Ketiga, PAMP membentuk struktur yang sesuai dengan patogen (Abbas *et al.*, 2010).

Sistem imunitas mukosa didominasi oleh satu *isotype* immunoglobulin yaitu sekretori IgA (sIgA). IgA adalah immunoglobulin yang jumlahnya paling besar di mamalia (Macpherson *et al.*, 2000). Sekitar 70-75% dari seluruh immunoglobulin yang diproduksi terdiri dari IgA. sIgA berperan besar pada imunitas adaptif dan imunitas alami (Macpherson & Uhr, 2004).

Rasio IgA:IgG pada sekresi glandula parotis ke dalam kavitas oral 500 kali lebih besar dibanding sekresi di dalam serum. Densitas IgA plasma sel di glandula parotis 2-3 kali lebih tinggi dibanding densitas IgA di glandula labial dan submandibula. Tampak jelas bahwa IgA berperan penting pada mikrobiologi oral (Brandtzaeg, 2007).

IgA adalah antibodi yang diproduksi di jaringan limfoid mukosa, disalurkan secara aktif melalui epitel, dan berikatan dengan mikroba untuk menetralkan mikroba yang menyerang organisme melalui organ mukosa. Antibodi yang disekresi di epitel berikatan dengan mikroba untuk mencegah pembentukan kolonisasi di inang. Tipe imunitas ini disebut imunitas mukosa atau *secretory immunity* (Kindt *et al.*, 2006). Paparan antigen pada mukosa mengaktifkan sel T dan sel B untuk menghantarkan induksi aktivasi efektor mukosa. Sistem imun mukosa mengaktifkan antigen-spesifik pada efektor mukosa di lokasi paparan awal antigen. Jalur ini disebut jalur respon antibodi sIgA di mukosa yang dimediasi oleh sel B dan sel T (Ogra *et al.*, 1999).

Membran mukosa yang melapisi sistem pencernaan, respirasi dan urogenital merupakan pintu masuk sebagian besar patogen. Pertahanan permukaan mukosa berasal dari *mucosal-associated lymphoid tissue* (MALT). Sekretori Ig A berbentuk dimer atau tetramer, polipeptida rantai J, dan rantai polipeptida yang disebut *secretory component*. Komponen sekretori terdiri dari reseptor yang mampu menghantar polimer IgA menuju membrane sel. Polipeptida rantai J pada IgA identik dengan IgM pentamer dan memiliki fungsi dalam memfasilitasi polimerisasi IgA dan sIgA, sebagai golongan utama antibodi di jaringan mukosa. (Abbas *et al.*, 2010).

Sel B mengenali epitop antigen dari *S. mutans* seperti sel dendritik dan mempresentasikannya ke sel T. Kompleks HLA kelas II dan peptida antigen mengaktifkan sel Th2 yang terikat pada TCR (Rodriguez, 2005).

Hal ini menghasilkan sinyal sitokin yang dikeluarkan di sinaps Th2-sel B menyebabkan migrasi sel B ke pusat germinal dari folikel untuk berproliferasi hingga terjadi

hipermutasi somatik dan *switching isotype* atau *class switch recombination* (CSR). Induksi ini terjadi karena pengenalan kompleks sel T - HLA Kelas II-epitop antigen. Mutasi terjadi pada rantai berat dan ringan dari variabel (V) di segmen gen Ig dalam pusat germinal, menyebabkan peningkatan ikatan afinitas antibodi. Gen regio konstan (C) terus berubah dan respon imun adaptif terhadap antigen PaC I/II menjadi matur. Regio ini berperan penting dalam merekrut sitokin dari sel-sel lain dan menghasilkan sifat *isotype* fungsional yang berbeda. Bagian dari regio *isotype* C dikenali oleh sel efektor imunitas tertentu. Regio C juga membantu mengangkut antibodi dan melibatkan transpor aktif, seperti sIgA. Selama proliferasi sel B dalam Germinal Center, regio C antibodi mengalami modifikasi menjadi CSR. CSR terbentuk untuk merespon sitokin yang diproduksi Th untuk perubahan CSR menjadi IgA. Perubahan ini membutuhkan sitokin TGF- $\beta$ 1 dengan kontribusi dari IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, dan IL-10 yang telah diinduksi oleh interaksi antara HLA kelas II-antigen, sel-Th2 dan sel B (Van Wallace, 2010).

Kecenderungan jaringan limfoid mukosa memproduksi IgA karena sitokin utama yang menginduksi *switching isotype* ini yaitu TGF- $\beta$ 1 diproduksi dalam jumlah besar pada jaringan limfoid mukosa. Produksi TGF- $\beta$ 1 terkait dengan hambatan produksi IL-4 oleh sel Th2 untuk menghambat produksi IgE. IgA yang telah diproduksi lamina propria dari organ mukosa secara aktif disalurkan oleh reseptor khusus yaitu Fc *receptor* melalui epitel ke dalam lumen. aktivasi sIgA membutuhkan TGF- $\beta$ 1 untuk mengaktifkan sel B untuk menghasilkan IgA (Borish & Steinke, 2003; Lebman *et al.*, 1990).

Diperkirakan *isotype switching* terjadi di lokasi mukosa induktif, sedangkan produksi IgA oleh sel plasma terjadi pada mukosa efektor, memisahkan *switching* IgA dan IgA yang disekresi oleh sel B menjadi kompartemen imunitas yang berbeda. Masing-masing tahapan memerlukan sinyal spesifik, seperti molekul *costimulatory*, sitokin, dan sel T-helper, yang menimbulkan spesifik antigen sIgA di bagian efektor mukosa. Baik Th1-Th2 maupun sitokin memberi kontribusi signifikan terhadap *switching* IgA di membrane permukaan sel B (Lebman *et al.*, 1990).

Proses *switching* memerlukan transformasi TGF- $\beta$ 1 yang mampu mengaktifkan *switching* sel B ke isotype IgA. TGF- $\beta$ 1 menginduksi sebagian kecil (< 2%) sel B untuk *switching* ke *isotype* IgA dalam kultur aktif sel B. TGF- $\beta$ 1 meningkatkan *switching* sel B menjadi IgA sebesar 10% sampai 20% di *Peyer's Patch*. Dengan demikian, beberapa aktivasi sinyal berkontribusi terhadap *switching*

*isotype* IgA terutama TGF- $\beta$ 1 dengan mengarahkan *switching* IgA (Lebman *et al.*, 1990). Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui hubungan sIgA dengan TGF beta.

## MATERI DAN METODE

Populasi penelitian adalah siswa sekolah dasar dari suku Jawa, berusia 6-9 tahun yang tersebar di wilayah Surabaya. Populasi kasus adalah siswa dengan sIgA rendah (< 300 ng/ml) dan populasi kontrol adalah siswa dengan sIgA tinggi ( $\geq$  300 ng/ml). Jumlah sampel 60 terbagi menjadi 30 sampel kelompok kontrol dan 30 sampel kelompok kasus.

Pengambilan sampel di Sekolah Dasar (SD) di seluruh wilayah Surabaya dengan membagi wilayah Kotamadya menjadi lima klaster yaitu Surabaya tengah, barat, timur, utara dan selatan berdasar data dari Departemen Pendidikan Nasional Kotamadya Surabaya. Pada tiap klaster dilakukan *judgement sample* untuk mendapatkan 2 SD pada tiap wilayah. Dilakukan koleksi sampel saliva oleh peneliti pada seluruh siswa SD usia 6-9 tahun yang memenuhi kriteria inklusi untuk uji kadar sIgA. Hasil pengukuran kadar saliva selanjutnya digunakan sebagai dasar penentuan kelompok kasus dan kontrol melalui pemadanan usia dan jenis kelamin pada dua kelompok sampel. Hasil pemeriksaan menunjukkan 170 siswa memenuhi kriteria inklusi. Berdasar uji ELISA pada sampel saliva terhadap 170 siswa tersebut diambil secara random 30 siswa dengan kadar sIgA rendah (< 300 ng/ml) dan 30 siswa dengan kadar sIgA tinggi ( $\geq$  300 ng/ml) berdasar kategori Rashkova (2009).

Jaringan gingiva diperoleh saat ekstraksi gigi sulung. Dilakukan proses histologi dan imunohistokimia untuk pemeriksaan ekspresi TGF- $\beta$ 1.

TGF- $\beta$ 1 adalah salah satu *growth factor* yang berperan pada *class switching* IgA. Biomarker ini diperiksa melalui sampel jaringan gingiva menggunakan reaksi antigen-antibodi yaitu imunohistokimia untuk mengetahui jumlah ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada jaringan gingiva. Jaringan gingiva disimpan dalam buffer formalin 10%, diperoleh saat ekstraksi gigi sulung. Dilakukan proses histologi dan imunohistokimia untuk pemeriksaan ekspresi TGF- $\beta$ 1. Reagensia Imunohistokimia TGF- $\beta$ 1 adalah Gelas objek dengan lapisan *Poly-L-Lysine*, *Xylol*, Alkohol absolute, 96% dan 70%, *Protease K* 0,025%, PBS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, *Monoclonal antibody anti-TGF- $\beta$ 1 Ab* (cat#NB 100-91995, *Novus Biologicals*), *Streptavidin – HRP* (*secunder antibody streptavidin-HRP* dari *IHC kit accessories*), *DAB-Chromogen*, *Meyer's Hematoxylin* dan *Entelan*.

Imunohistokimia dilakukan di Laboratorium Gramik, Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Penghitungan ekspresi TGF- $\beta$ 1 dilakukan oleh tiga orang reviewer untuk memastikan pengamatan. Dokumentasi preparat dilakukan melalui fotomikroskopi.

## HASIL DAN DISKUSI

Pemeriksaan ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada struktur lamina propria ginggiva melalui imunohistokimia menggunakan monoclonal antibody anti- TGF- $\beta$ 1 dengan penghitungan ekspresi TGF- $\beta$ 1 menggunakan program Cell D (Olympus) melalui mikroskop PX-71 (Olympus) dan kamera P-61 (Olympus). Hasil penghitungan ekspresi TGF- $\beta$ 1 tampak pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Hubungan rerata TGF- $\beta$ 1 pada kelompok kasus dan kelompok kontrol

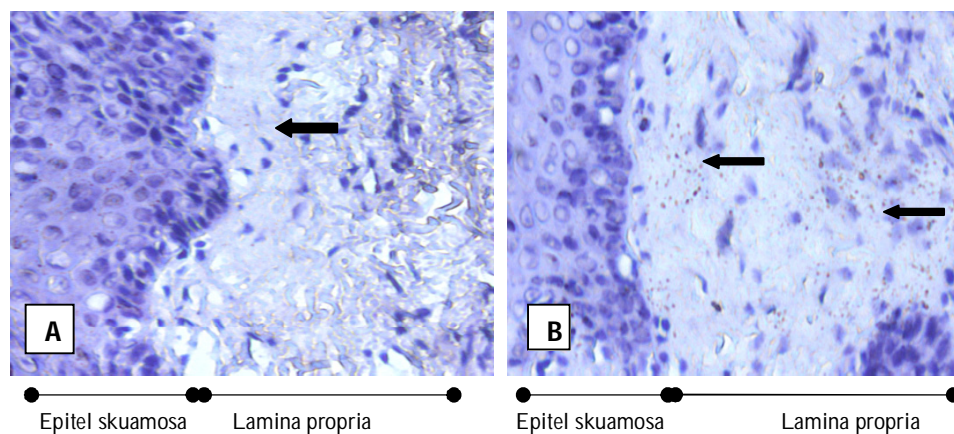
Kelompok	n	Rerata	TGF- $\beta$ 1 SD	Min	Mak	t-test
Kontrol	30	0,5730	0,12075	36	77	t = 12,531
Kasus	30	0,2637	0,06083	18	36	p = 0,000

Tabel 1, menunjukkan uji statistik TGF- $\beta$ 1 pada kelompok kasus terdapat rerata sebesar 26% dari seluruh lapang pandang lamina propria. Rerata pada kelompok kontrol sebesar 57% dari seluruh lapang pandang lamina propria. Data jumlah TGF- $\beta$ 1 pada kelompok kasus dan kontrol berdistribusi normal. Hasil analisis dengan uji t terdapat perbedaan bermakna rerata jumlah TGF- $\beta$ 1 pada kelompok kasus dan kontrol (p = 0,000).

Pada kelompok kasus diperoleh rerata TGF- $\beta$ 1 sebesar 0,26 dan rerata sIgA 168,5 ng/ml, sedangkan pada kelompok kontrol rerata TGF- $\beta$ 1 sebesar 0,57 dan rerata sIgA 491,3 ng/ml. Korelasi antara TGF- $\beta$ 1 dan sIgA sebesar 0,922 pada Tabel 1. Angka tersebut menunjukkan terdapat korelasi kuat antara TGF- $\beta$ 1 dan sIgA. Analisis jalur pada penelitian ini menunjukkan TGF- $\beta$ 1 secara langsung berpengaruh terhadap kadar sIgA. Hubungan ini dapat dianalisis melalui teori *isotype switching*.

*Isotype switching* IgA membutuhkan induksi TGF- $\beta$ 1 untuk mengatur aktivitas transkripsi. TGF- $\beta$ 1 menghambat kelangsungan hidup atau ekspresi IgA pada sel B yang mengalami *rearrangement* DNA pada lokus IgA setelah stimulasi LPS. Diduga transkripsi sel B dari pasien dengan imunodefisiensi IgA akan meningkatkan jika dirangsang dengan TGF- $\beta$ 1 secara in vitro. Gangguan pada diferensiasi sel B dapat terjadi oleh karena peningkatan atau penurunan ekspresi TGF- $\beta$ 1. Perbedaan ini menyebabkan diferensiasi sel B terganggu karena TGF- $\beta$ 1 menginduksi CD40 dan berbagai sitokin yang berperan pada sekresi sIgA (Islam et al., 1994).

Tingkat antibodi IgA saliva ditekan mengikuti perkembangan karies. Penelitian pada peningkatan kadar antibodi IgG dan IgM dalam serum selama perkembangan karies menunjukkan bahwa kompleks imun yang terdiri dari antibodi serum dan antigen *S. mutans* mampu menekan stimulasi sistem imunitas mukosa. Hal ini didukung oleh penelitian yang mengungkapkan bahwa perawatan karies diikuti dengan peningkatan kadar antibodi IgA terhadap *S. mutans*, menyebabkan penurunan tingkat antibodi IgG dan IgM di serum (Marcotte & Lavoie, 1993).



**Gambar 1.** Ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada jaringan gingiva.  
Keterangan: Ekspresi TGF- $\beta$ 1 pada kelompok kasus (A) lebih rendah dibanding kelompok kontrol (B)

## SIMPULAN

Terdapat korelasi kuat antara TGF- $\beta$ 1 dan sIgA. Penurunan ekspresi TGF- $\beta$ 1 berhubungan dengan penurunan aktivasi *switching isotype* pada kelompok sIgA rendah, demikian pula sebaliknya.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH**, 2007. Basic Immunology: Function and disorders of the immune system. 2<sup>nd</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier. pp. 47–157.
- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S**, 2010. Cellular and Molecular Immunology. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier.
- Borish LC, Steinke JW**, 2003. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.*, 111: 460–475.
- Brandtzaeg P**, 2007. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? In: *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp 288–311.
- Islam KB, Baskin B, Nilsson L, Hammarstrom L, Sideras P, Smith CI**, 1994. Molecular analysis of IgA deficiency. Evidence for impaired switching to IgA. *J. Immunol.* 152: 1442–1452.
- Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA**, 2006. *Kuby Immunology*. 6<sup>th</sup> Ed. WH Freeman & Co. pp 236–341.
- Lebman DA, Lee FD, Coffman RL**, 1990. Immunology Molecular Characterization of Germ-Line Immunoglobulin A Transcripts Produced During Transforming Growth Factor Type, 8-Induced Isotype Switching (polymerase chain reaction). *J. Immunol.* 87: 3962–3966.
- Lebman DA, Lee FD, Coffman RL**, 1990. Mechanism for transforming growth factor b and IL-2 enhancement of IgA expression in lipopolysaccharide-stimulated B cell cultures. *J. Immunol.* 144: 952–959.
- Lehner T**, 1996. *Imunologi Pada Penyakit Mulut*. Terjemahan Farida dan Suryadana. Ed.3. Jakarta: EGC press. pp. 61–89.
- Macpherson AJ, Uhr T**, 2004. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science*, 303: 1662–1665.
- Marcotte H & Lavoie MC**, 1993. Evaluation of mouse salivary IgA directed against indigenous oral bacteria. *J. Immunoassy.* 14: 63–81.
- Medzhitov R, Janeway CA**, 2000. Innate Immunity. *Advances in Immunology. NEJM June*: 343–338.
- Medzhitov R**, 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449(7164): 819–826.
- Ogra PL, Mestecky J, Lamm ME, Strober W, Bienenstock J, McGhee JR**, 1999. *Mucosal Immunology*. San Diego: Academic Press. pp. 485–506.
- Rashkova M, Baleva M, Peneva M, Toneva N, Jegova G**, 2009. Secretory Immunoglobulin A And Dental Caries of Children With Different Disease And Conditions Influencing Oral Medium. *Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers) book 2*, pp. 6–9.
- Rodriguez PD**, 2005. B cells as antigen presenting cells. *Cellular Immunology* 238(2): 67–75.
- Slayton RL, Cooper ME, Marazita ML**, 2005. Tuftelin, Mutans Streptococci, and Dental Caries Susceptibility. *J Dent Res.* 84(8): 711–714.
- Van Wallace MC**, 2010. *Immunogenetic of dental Caries*. Dissertation. School of Dentistry, Indiana University, USA.