

DISERTASI

VARIABILITAS GENETIK *CANDIDA ALBICANS* MUKOSA RONGGA MULUT PADA TINGKAT REGULASI PENYAKIT DIABETES MELLITUS

**PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER (GEN SAP1
DAN SAP3 *CANDIDA ALBICANS*)**



RETNO PUDJI RAHAYU

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2004**

**VARIABILITAS GENETIK *CANDIDA ALBICANS* MUKOSA
RONGGA MULUT PADA TINGKAT REGULASI
PENYAKIT DIABETES MELLITUS**

**PENDEKATAN BIOLOGI MOLEKULER (GEN SAP1
DAN SAP3 *CANDIDA ALBICANS*)**

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga
Telah dipertahankan di hadapan
Panitia Ujian Doktor Terbuka
Pada hari : Jumat
Tanggal : 23 September 2004
Pukul 10.⁰⁰ WIB**

Oleh :

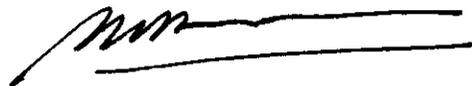
**RETNO PUDJI RAHAYU
NIM. 090013742 D**

Lembar Pengesahan.

Disertasi ini telah di setujui
pada tanggal 28 September 2004

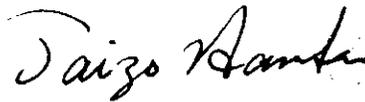
Oleh:

Promotor,



Prof. Dr. M. Rubianto, drg., MS., Sp. Perio
NIP. 130 675 835

Ko – Promotor I,



Prof. Taizo Hamada, DDS PhD

Ko – Promotor II,



Dr. F. M. Judajana, dr., Sp. PK(K)
NIP. 130 675 593

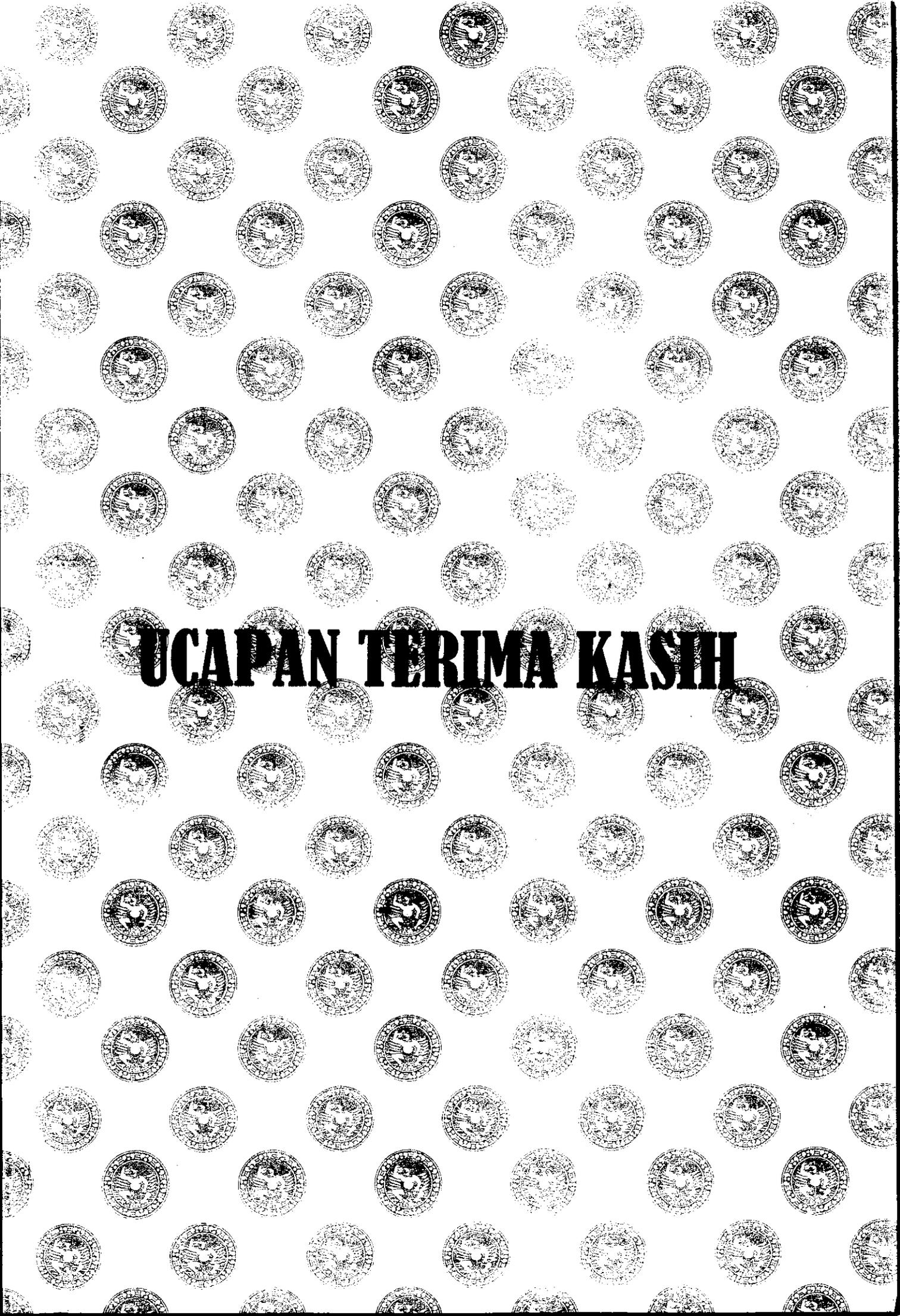
**Telah diuji pada Ujian Doktor tahap I (Tertutup)
Tanggal 4 Agustus 2004**

PANITIA PENGUJI DISERTASI Tahap I :

Ketua : Prof.Dr.Marsetio Donosepoetro.,dr.,SpPK

**Anggota : 1. Prof.Dr.M.Rubianto,drg.,MS.,SpPerio
2. Prof.Taizo Hamada, DDS.,Ph.D
3. Dr. F.M Yudajana, dr.,SpPK (K)
4. Prof.Dr Askandar Tjokroprawiro,dr.,SpPD–KEMD
5. Widya Asmara, drh., MSc.,Ph.D
6. Dr.Hadi Soenartyo,drg.,MSc.,SpPM
7. Dr.R.Darmawan Setijanto,drg.,M.Kes**

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
NO. 5687/JO3/PP/2004
Tanggal 10 Agustus 2004**



UCAPAN TERIMA KASIH

UCAPAN TERIMA KASIH

Perjalanan panjang yang saya lalui selama menjalani pendidikan ini meninggalkan begitu banyak kenangan dan arti yang mendalam di sanubari. Kelelahan dalam beberapa warsa menapak jenjang kehidupan akhirnya berganti dengan kelegaan mengiringi tuntasnya sebuah karya untuk mengawali kehidupan selanjutnya. Semua itu karena limpahan berkat dan karunia Allah Yang Maha Kuasa dan Maha Pengasih. Dengan segenap keikhlasan dan ketulusan saya panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah Yang Maha Pengasih sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Rangkaian proses dan pendewasaan diri dalam menuangkan kreasi, inovasi dan daya sintesis dalam sebuah karya ilmiah tidak akan membuahkan hasil optimal tanpa tuntunan dan peran para pembimbing secara terpadu. Karenanya, ucapan terima kasih yang tak terhingga saya haturkan kepada :

Prof.Dr.Moh.Rubianto,drg.,MS.,SpPerio atas kesediaannya menjadi promotor, yang dalam kesibukan dan diantara waktu luangnya sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, masih menyempatkan memberi arahan dan bimbingan dengan penuh pengertian dan kesabaran sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini sebagai sebuah karya ilmiah.

Prof.Taizo Hamada, DDS selaku ko-promotor I, yang telah memberi saya kesempatan untuk dapat menyelesaikan bagian dari penelitian ini di Lab. *Molecular Biology Prosthetic of Dentistry Hiroshima University Japan*, dengan profesionalisme yang tinggi dan bijak membimbing, memberikan dorongan, saran serta asupan keilmuan yang sangat berharga dalam proses penyelesaian disertasi ini.

Dr. F.M Yudajana, dr.,SpPK (K) selaku ko-promotor II, yang diantara kesibukannya yang tinggi beliau tanpa pernah bosan mengingatkan, memotivasi dan memberikan dukungan moril, serta asupan keilmuan dalam rangka pengembangan kematangan dan

pendewasaan berfikir serta bagaimana harus bersikap sebagai seorang ilmuwan sejati.

Prof.Dr.Marsetio Donosepoetro,dr.,SpPK, Penasehat Akademik dan konsultan sejak awal saya mengikuti pendidikan program S3 pada Program Pascasarjana Universita Airlangga. Dengan bijak beliau selalu memberikan wacana dan wawasan bahwa seorang ilmuwan itu harus berpikir secara sederhana, runtut dan rasional dalam menuntun proses pematangan dan pendewasaan menulis sebuah karya ilmiah yang bermutu.

Prof. Dr. Askandar Tjokropawiro, dr.,SpPD – KEMD, Kepala Laboratorium Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, dan selaku konsultan dengan bijak memberikan bimbingan dan arahan serta memberi ijin dan bantuan untuk pengambilan sampel penelitian di Poli Endokrinologi Penyakit Dalam RSUD.Dr.Soetomo Surabaya. Dengan kearifannya pada awal penentuan batas lingkup penelitian beliau memberikan gambaran dan pengenalan tentang penyakit Diabetes Mellitus dalam kaitannya menentukan arah bahasan dalam disertasi ini.

Kesempatan menimba ilmu secara berkelanjutan tidak lepas dari peran banyak pihak yang berkaitan. Untuk itu secara tulus dan penuh keikhlasan saya menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang setinggi-tingginya kepada :

Pemerintah Republik Indonesia melalui **Departemen Pendidikan Nasional** yang telah memberikan kesempatan dan bantuan beasiswa BPPS dalam mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Rektor Universitas Airlangga **Prof.Dr.med.H.Puruhito,dr.,SpB (TKV)**, dan mantan Rektor **Prof.H.Sudarto,dr.,DTM&H.,Ph.D** atas ijin yang diberikan sehingga saya dapat mengikuti pendidikan Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, **Prof. Dr.H. Muh. Amin,dr.,SpP(K)** dan mantan Direktur Program Pascasarjana

Universitas Airlangga **Prof. Dr.H. Soedijono Tirtowidardjo,dr.,SpTHT(K)** serta semua asisten direktur yang telah memberi kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Selain itu kelancaran proses pengurusan administrasi selama mengikuti pendidikan ini tidak lepas dari peran seluruh staf administrasi Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Prof. Dr.Mandojo Rukmo,drg.,MSc.,SpKG selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran dan **Prof. Dr. Juliati Hood A., dr., MS, SpPA., FIAC** mantan Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya atas berbagai nasehat dan perhatian yang diberikan kepada saya selama saya mengikuti Program Doktor dan yang telah banyak memperlancar proses akademik kepada saya selama belajar.

Prof.Dr.Moh.Rubianto,drg.,MS.,SpPerio, Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga **Dr. Budihardjo,drg.,MSc.,SpPerio** yang telah memberikan ijin dan kesempatan mengikuti program pendidikan Doktor di Program Pascasarjana universitas Airlangga.

Widya Asmara,drh.,MSc.,Ph.D, Kepala Lab. Rekaya genetika PAU-Bioteknologi Universitas Gajah Mada selaku konsultan di bidang Biologi Molekuler tempat saya menyelesaikan penelitian ini, yang selalu menyediakan waktu untuk berkonsultasi dan dengan penuh kesabaran mendorong saya untuk selalu berpandangan ke depan dalam mengikuti perkembangan ilmu, dan meningkatkan kemampuan melakukan pekerjaan di laboratorium

Pembimbing dan Panitia Penguji mulai dari ujian kualifikasi, ujian proposal dan ujian kelayakan :

Prof.Dr.Moh.Rubianto,drg.,MS.,Sp.Perio;Dr.F.M Yudajana,dr.,SpPK(K)
Prof.Dr.Marsetio Donosepoetro,dr.,SpPK; Dr.Iwan Hernawan,drg.,MS;
Prof.Dr.AskandarTjokroprawiro,dr.,SpPD-KEMD; Widya Asmara, drh.
MSc.,Ph.D; Prof.Edy Suwandoyo,dr,SpPD; Dr.Prihartini,dr.,SpPK;

Prof.Dr.IndroHandojo,dr.,SpPK(K-IM); Dr.Hadi Soenartyo,drg.,MSc., SpPM

Para Dosen di Program Pascasarjana universitas Airlangga yang telah menambah wawasan keilmuan saya :

Prof.Purnomo Suryohudojo,dr.,SpBK; Prof. Bambang Rahino,dr; Prof. Eddy Pranowo Soediby,dr.,MPH (alm); Prof.Dr.H.Glinka, SVD; Prof.Dr.Muljono Notoesudirdjo,dr.,MPH.,SpKJ ; Prof.Dr.Soehartono Taat Putra,dr.,MS; Widodo J.Pudjirahardjo,dr.,MS., MPH.,DrPH; Prof. Soetandyo Wignyosoebroto,MPA;Dr.L.Dison; Prof.Dr.Kuntoro,dr., MPH; Prof.Dr.Koento Wibisono S; Siti Pariani,dr.,MPH.,Ph.D.

Ucapan terima kasih yang tulus dan setinggi-tingginya saya sampaikan kepada **Bapak Sastra Kosasih,SH** dan **Pimpinan PT.Wismilak , Prof.Dr.Habil Josef Glinka SVD** serta **Bapak Y. Jason**, yang turut mendukung kelancaran pelaksanaan penelitian dan penyelesaian akhir pendidikan program doktor baik dalam bentuk moril maupun materiil yang jumlahnya relatif tidak sedikit.

Selanjutnya dengan rasa hormat saya menyampaikan penghargaan dan ucapan terima kasih yang sangat dalam kepada :

Dr. Seicho Makihira,DDS; Dr. Masahiro Nishimura,DDS; Dr. Hirocki Nikawa,DDS. Yang telah membimbing dan membantu saya dengan penuh dedikasi dalam pekerjaan laboratorium dan dalam mempelajari berbagai teknik biologi molekuler diagnostik serta penelusuran berbagai pustaka selama saya belajar di Lab. *Molecular Biology Prosthetic of Dentistry Hiroshima University Japan.*

Dr.Aulanni'am,drh.,DES pembimbing, sahabat dan motivator yang telah banyak memberi saran, kritik yang positif dan analisis yang tajam, dan bersama dengan : **Sri Kunarti Priambodo,drg.,MS.,SpKG; Indah Listiana Kriswandini,drg.,M.Kes; Susi Kristiani,drg.,M.Kes** dan **Retno Indrawati,drg.,M.Kes** senantiasa membangkitkan semangat dan motivasi disaat saya mengalami penurunan semangat dalam kurun medio pelaksanaan pendidikan program doktor ini.

Prof.Dr.Hendromartono,dr.,SpPD-KEMD;Dr.H.Agung Pranoto, dr., MSc.,SpPD-KEMD dan Sony Wibisono Mudjanarko, dr.,SpPD yang telah membantu kelancaran saya dalam proses pengambilan sampel di Poli Endokrinologi RSUD Dr.Soetomo Surabaya. Dengan sabar menyediakan waktu untuk berkonsultasi sehingga penelitian ini dapat selesai.

Prof. Dr.Indro Handojo,dr.,SpPK (K-IM) selaku konsultan di bidang Imunologi yang telah membimbing dan memberi asupan keilmuan yang sangat berharga bagi penulisan disertasi saya. Sekaligus saya ucapkan terima kasih yang tulus kepada **mbak Tuti dan Bapak Ketut Wijadi** selaku analis Patologi Klinik yang telah membantu dalam pengambilan sampel darah dan pekerjaan laboratorium.

Prof. Dr. Juliati Hood A., dr., MS, SpPA., FIAC selaku konsultan dibidang Patologi Anatomi yang dengan sabar dan bijaksana memberikan bimbingan dan asupan ilmu yang sangat berguna dalam penyelesaian disertasi ini.

Kepala laboratorium Biologi Mulut FKG Unair **Markus Budi Rahardjo,drg.,M.Kes** yang telah memberikan ijin untuk melanjutkan pendidikan doktor pada Program Pascasarjana universitas Airlangga serta semua teman sejawat di Lab.Biologi Mulut FKG Unair atas dukungan, pengertian dan dorongan semangatnya sehingga disertasi ini dapat selesai.

Rekan sejawat Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Gigi Unair : **Dr.Istiati,drg.,SU; Diana Nurwati,drg.,MS; Edhi Jularso,drg.,MS; Bambang Sumaryono,drg.,M.Kes; Dr.Theresia Indah B,drg.,M.Kes** atas pengertian, dukungan dan kerja samanya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Mantan Kepala Lab.Patologi Anatomi FKG Unair : **Soewarni DS,drg** yang selalu membimbing dalam keilmuan, dan senantiasa membangkitkan semangat selama perjalanan saya menyelesaikan disertasi ini.

Dr.Hadi Soenartyo,drg.,MSc.,SpPM selaku konsultan yang dengan sabar dan bijak selalu memberikan bimbingan dan asupan keilmuan dalam memahami kelainan di rongga mulut khususnya akibat infeksi oleh *C.albicans*.

Dr.Iwan Hernawan,drg.,MS yang membimbing dan memberikan wacana dalam keilmuan *Oral Diabetology* yang sangat berharga dalam proses penyelesaian disertasi ini.

Dr.R.Darmawan Setyanto,drg.,M.Kes konsultan dibidang statistik yang telah banyak membantu dan memberikan bimbingan dalam analisis data, serta dorongan moril sehingga disertasi ini dapat selesai.

Dr. I Ketut Suidiana,drs.,Msi yang dengan sabar selalu memberikan dorongan moril dan bantuan dalam proses dokumentasi hasil pemeriksaan sitologi maupun HPA.

Rekan sejawat : **Mudjani,drg.,MS; Peter Agus,drg.,SpBM; Bagus Subadi,drg.,MPED.,SpPM;Hening Tuti hendarti, drg.,MS., SpPM; Isidora Karsini,drg.,MS.,SpPM; Dr.Latief Mooduto, drg., MS. ,SpKG; Ketut Suardita,drg.,Ph.D** yang selalu memberi dukungan moril dalam menyelesaikan disertasi ini.

Rekan sejawat **Totok Purnomo,Drs.,Apt.,M.Si** atas bantuannya dalam desain penulisan hasil penelitian sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Lingkungan yang nyaman, tenang dan akrab dalam melaksanakan tugas rutin sehari-hari di klinik Medis Ubaya merupakan pembangkit semangat untuk berkarya dan berkarya. Sungguh suatu kewajaran bila saya menyampaikan rasa terima kasih yang tulus dan sedalam-dalamnya kepada para sejawat : **Dr. F.M Yudajana, dr.,Sp PK (K); Arief Firman Hidayat,drg; Cokorda Wiadnyani,dr; Nico Hudaya,dr; Hastin,drg; I Gusti Made Sarjana,SH; Arif mashudi,AMK; Sudjarmiasih dan Heni Setiawati**. Tanpa dukungan dan keakraban yang tercipta diantara sesama, pastilah saya tidak berada pada jenjang pendidikan yang pada saat ini sudah diraih.

Saudara **Wibi Riawan, SSi** yang diantara kesibukannya di Lab. Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, telah meluangkan waktu membantu analisis data penelitian ini, juga saudara **Ramadhona Murti Pahlevi, Ssi**, **Dwi Wulandari, Ssi**, **Syailin dan Rendi** yang telah meluangkan waktu dalam analisis Fenogram dan desain grafis untuk penulisan naskah disertasi ini.

Ibu **Sumilah** dan Ibu **Farida Malaka** selaku analis dan sekaligus teknisi yang dengan sabar, tekun dan setia membantu selama proses penelitian di Lab. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Saudara **Toni Rowaedi** dan **Nurika Ekawati**, staf Laboratorium Rekayasa Genetika PAU-Bioteknologi Universitas Gajah Mada yang dengan profesional dan sabar senantiasa meringankan beban pekerjaan di laboratorium sehingga penelitian dapat selesai dengan tepat waktu.

Kepada teman-teman sekelas peserta pendidikan program doktor angkatan 2000/2001 di Universitas Airlangga, yang merupakan sahabat yang menemani, memotivasi, mengingatkan dan memberi asupan, yang semuanya memberikan nilai tambah dalam rangkaian proses keberhasilan yang telah saya capai hingga saat ini. Untuk itu tanpa mengurangi rasa penghargaan karena tidak mungkin menyebut nama satu persatu, saya menyampaikan ungkapan terima kasih atas segala keakraban dan kekompakan yang telah terjalin selama ini.

Ungkapan terima kasih yang tulus saya sampaikan kepada **Mr. Sova J. Mukowin** yang selalu memberi motivasi dan dukungan moril, dengan sabar membimbing dalam mempelajari bahasa yang merupakan nilai tambah tersendiri dalam menyelesaikan penulisan disertasi ini

Ucapan terima kasih yang sangat dalam dan tulus saya sampaikan kepada **dr. Cissy Cecilia, SpRM (Aerztin)** beserta staf *Save The Student* (STS) Universitas Airlangga atas segala doa dan dukungannya sehingga disertasi ini dapat selesai.

Peran aktif kepada semua **pasien Diabetes Mellitus dan Non-Diabetes Mellitus** atas kesediaannya untuk diteliti dan tekun menerima

sara-saran saya, merupakan dukungan riil terlaksananya penelitian ini. Untuk itu saya sampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya .

Tumbuh menjadi besar dan berkembang menjadi dewasa, karena tuntunan dan belaian kasih ayah **Sukiyo Rahardjo S** (alm) dan ibu tercinta **Hj. Siti Suwartini**. Sangat tidak berlebihan bila beliau berdua menerima sujud bakti dan terima kasih ananda atas segala curahan dan restu yang tidak terhingga, selalu memberikan dorongan untuk maju dan mencapai pendidikan yang setinggi-tingginya untuk menjadi manusia yang berguna bagi agama, bangsa dan negara.

Dengan rasa cinta dan hormat, saya haturkan terima kasih dan penghargaan yang tiada ternilai kepada ayah **V. Soekamto** (alm) dan ibu mertua **Is Angela Soekamto** atas segala doa dan bimbingannya sehingga saya berhasil mencapai jenjang pendidikan akademik yang tertinggi ini.

Penghargaan dan rasa terima kasih yang tulus saya sampaikan untuk ke tiga adikku sarimbit : **Dwi Riyani – Moh. Chanin, Drs. Ec; Prasusi Utari – Meifianto, drg; Gunawan Wibisono, SE - Pratiwi Susilawati, drg., M. Kes** atas segala perhatian, motivasi serta dukungan moril yang melengkapi semangat untuk segera menyelesaikan studi.

Diantara rangkaian ucapan terima kasih ke segala pihak, tidak lengkap bila melupakan orang-orang terdekat dalam kehidupan saya. **Suami tercinta Iskandar Djauhari, drs**, orang pertama yang memberi ijin melanjutkan studi, mengerti akan segala konsekuensi yang harus ditanggung dan permata hati kami berdua **Regina Purnama Dewi**, untuk itu saya menyampaikan penghargaan, rasa hormat dan terima kasih yang sangat dalam atas segala pengertian, perhatian, kesabaran, doa dan limpahan kasih sayang yang mengiringi perjalanan panjang menabung keberhasilan untuk hari esok, walaupun harus mengorbankan satu periode kehidupan untuk selalu saling dekat dan berbagi rasa.



RINGKASAN

Ringkasan

Variabilitas Genetik *Candida albicans* Mukosa Rongga Mulut Pada Tingkat Regulasi Penyakit Diabetes Mellitus

Retno Pudji Rahayu

Di dalam rongga mulut terdapat berbagai strain *C. albicans* dengan karakteristik fenotipe tertentu yang menentukan sifatnya sebagai komensal atau patogen. Infeksi oleh *C. albicans* ini merupakan salah satu komplikasi dari penyakit Diabetes Mellitus (DM) yang paling tinggi angka kejadiannya di rongga mulut. Pada DM regulasi jelek lasimnya disertai keadaan *immunocompromise* dari sistem imun inang dengan manifestasi suatu imunodefisiensi. Kondisi ini mengakibatkan terjadi penurunan jumlah dan aktivitas sel T (baik secara kuantitas maupun kualitas) sehingga terjadi gangguan pada fungsi pengenalan terhadap antigen dan gangguan produksi sitokin proinflamatori diantaranya IL-1 β dan TNF- α . Sampai saat ini penatalaksanaan infeksi oleh *C. albicans* di mukosa rongga mulut pada penderita DM masih belum memberikan hasil yang memuaskan. Hal ini karena etiopatogenesisnya yang kompleks meliputi gangguan sistem imunitas dan interaksi molekuler yang sampai saat ini belum dapat dijelaskan secara tuntas di bidang kedokteran gigi.

Pada penelitian ini digunakan 33 sampel *C. albicans* yang diambil dari penderita DM dan non-DM. Analisis yang dilakukan dalam penelitian ini meliputi karakterisasi *C. albicans* yang meliputi serotipe dengan uji serotyping, genotipe dengan metode RAPD, keberadaan gen SAP1 dan SAP3 dengan metode PCR dan pemeriksaan kadar IL - 1 β dan TNF- α dengan metode *Indirect ELISA*. Selanjutnya data dianalisis dengan uji analisis statistik Anova one way dan visualisasi grafik dengan Explore.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa *C. albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM regulasi baik mempunyai hubungan kekerabatan genotipe yang dekat dengan *C. albicans* pada mukosa rongga mulut DM regulasi jelek (jarak genetik 0,762). Keberadaan gen SAP1 mempunyai kecenderungan nilai rata-rata

yang sama Non-DM ($39104,19 \pm 4156,22$), DM regulasi baik, ($25259,79 \pm 7429,71$) dan DM regulasi jelek ($26281,29 \pm 4312,39$). Keberadaan gen SAP3 *C.albicans* pada DM regulasi jelek ($14793,86 \pm 8851,28$) mempunyai nilai rata-rata yang lebih tinggi dibanding dengan gen SAP3 *C.albicans* pada DM regulasi baik ($10319,53 \pm 9028,21$) dan non-DM ($11512,86 \pm 1348,26$). *C.albicans* serotipe A yang ditemukan pada penderita DM regulasi baik, DM regulasi jelek dan non-DM lebih dominan dibanding serotipe B. Terdapat perbedaan yang signifikan antara kadar sitokin IL-1 β dan TNF- α pada DM regulasi jelek, terhadap kadar IL-1 β dan TNF- α pada DM regulasi baik dan non-DM yang terinfeksi oleh *C.albicans*. Sebaliknya kadar IL-1 β dan TNF- α pada DM regulasi baik tidak berbeda bermakna terhadap kadar IL-1 β dan TNF- α pada non-DM.

Berdasar pada hasil analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini ditemukan bahwa ada hubungan antara keberadaan gen SAP3, keragaman genetik dan virulensi *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi penyakit DM. Virulensi tidak saja ditentukan oleh serotipe seperti teori yang terdahulu tetapi ada keterkaitan dengan keberadaan gen SAP3. Dengan demikian maka hasil penelitian ini dapat dipakai sebagai dasar penentuan diagnostik yang lebih akurat pada konsep infeksi oleh *C.albicans* di mukosa rongga mulut penderita DM .

SUMMARY

Oral Mucosa *C. albicans* Genetic Variability in Diabetes Mellitus Regulation Levels

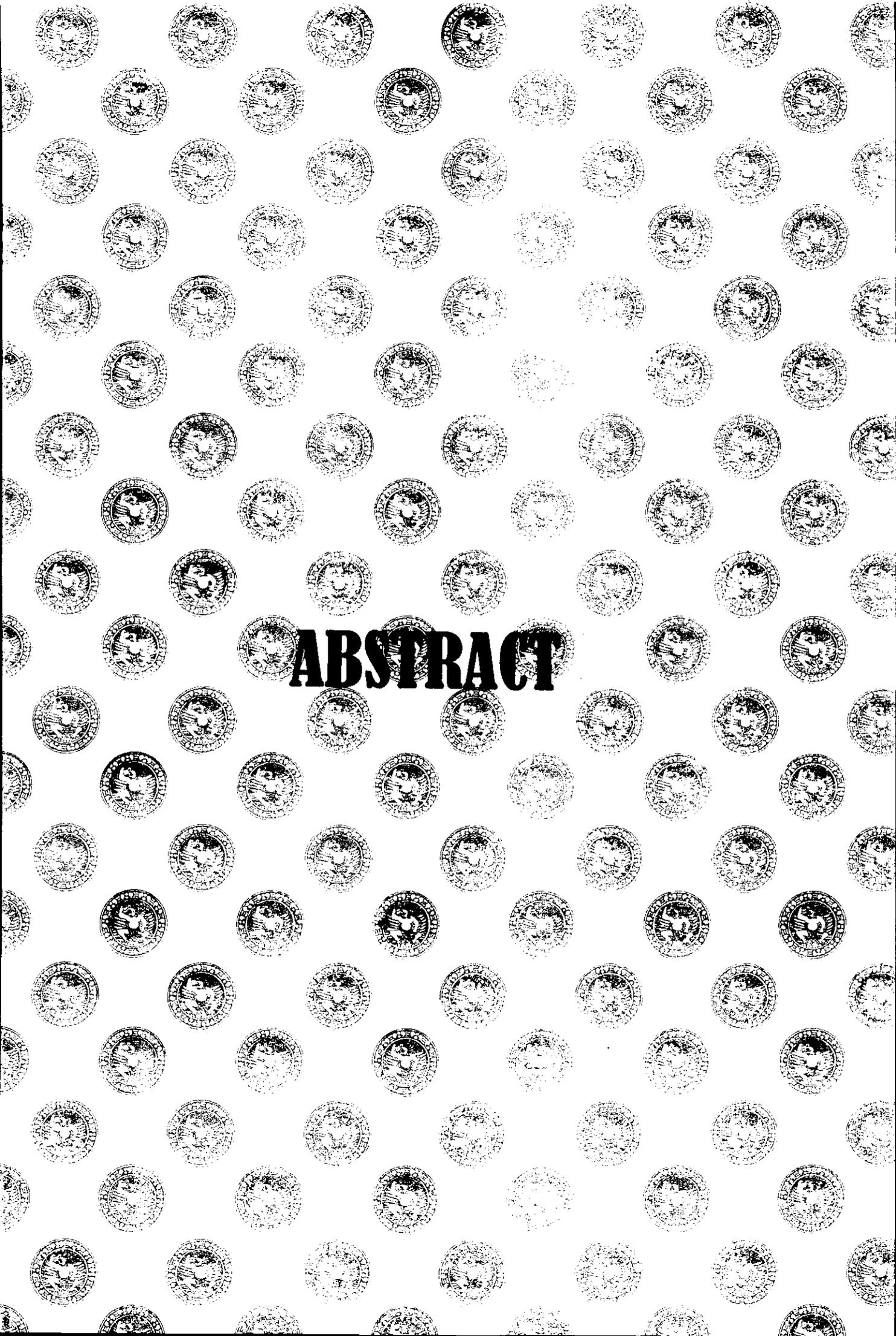
Retno Pudji Rahayu

Various *C. albicans* strains exist in the oral cavity. These strains are of certain phenotypes, characterizing them as commensal or pathogenic. Oral cavity *C. albicans* fungus infection is a Diabetes Mellitus (DM) complication, which prevalence rate is among the highest. Oral Mucosa *C. albicans* infection in DM patients is an effect of various changes occurring in the oral cavity. Poorly-regulated DM is accompanied by a compromised immune system, manifesting as an immunodeficiency. In such case, T-cell activity (either qualitatively or quantitatively) becomes abnormal, effecting in the functional disorder of antigen recognition and cytokine production, including IL-1 β and TNF- α . To date, oral mucosa *C. albicans* infection in DM patients remains to be a problem receiving less than satisfactory solutions at dental medical settings. This is due to its complicated ethiopathogenesis, involving immunity and molecular factors, and to the fact that, to date, molecular factors in dentistry has not yet been fully understood.

Thirty-three valid *C. albicans* samples analyzed in this study were collected from *C. albicans* in DM and non-DM patients. Analysis in this research comprised of *C. albicans* characterization, which involves of a serotyping test, genotype determination using RAPD method, and gene existence identification of SAP1 and of SAP3 using PCR and IL-1 β and TNF- α levels test by means of Indirect ELISA. Data were then statistic analyzed with a one way Anova and Explore graphic visualization.

The result of a phenogram analysis revealed that *C. albicans* colonizing the oral mucosa of poorly-regulated DM patients had the tendency of close genetic relationship (with a genetic distance of 0.762) to that of well-regulated DM patients. The existence of SAP1 genes had a similar tendency, with an average score for non-DM patients of 39104.19 ± 4156.22 , well-regulated DM patients of 25259.79 ± 7429.71 and poorly-regulated DM patients of 26281.29 ± 4312.39 . With reference to regulation levels, the existence of SAP3 genes *C. albicans* in DM patients showed an average score in non-DM patients of 11512.86 ± 1348.26 , lower than that of well-regulated DM patients of 10319.53 ± 9028.21 and poorly-regulated DM patients of 14793.86 ± 8851.28 . In this study, of all *C. albicans* samples taken from well-regulated DM patients, poorly-regulated DM patients and non-DM patients, more than 75% were of serotype A and the remaining were of serotype B. The existence of serotype B in poorly-regulated DM was higher than that in other groups. IL-1 β and TNF- α in poorly-regulated DM patients were significantly different from those in other groups, while well-regulated DM patients had no significant difference from non-DM patients in terms of IL-1 β and TNF- α .

It can be concluded that the isolated existence of SAP3 genes *C. albicans* in Surabaya is influenced by the level of regulation of DM patients. A correlation was found between the genetic variability and *C. albicans* virulence and the level of regulation in DM patients. Virulence is not only determined by serotype, such as that suggested by antecedent theory, but also influenced by the existence of SAP3 genes. Thereby, the result of this study can be employed as a basis for a diagnostic determination with a more accurate concept of *C. albicans* infection in the oral mucosa of DM patients.



ABSTRACT

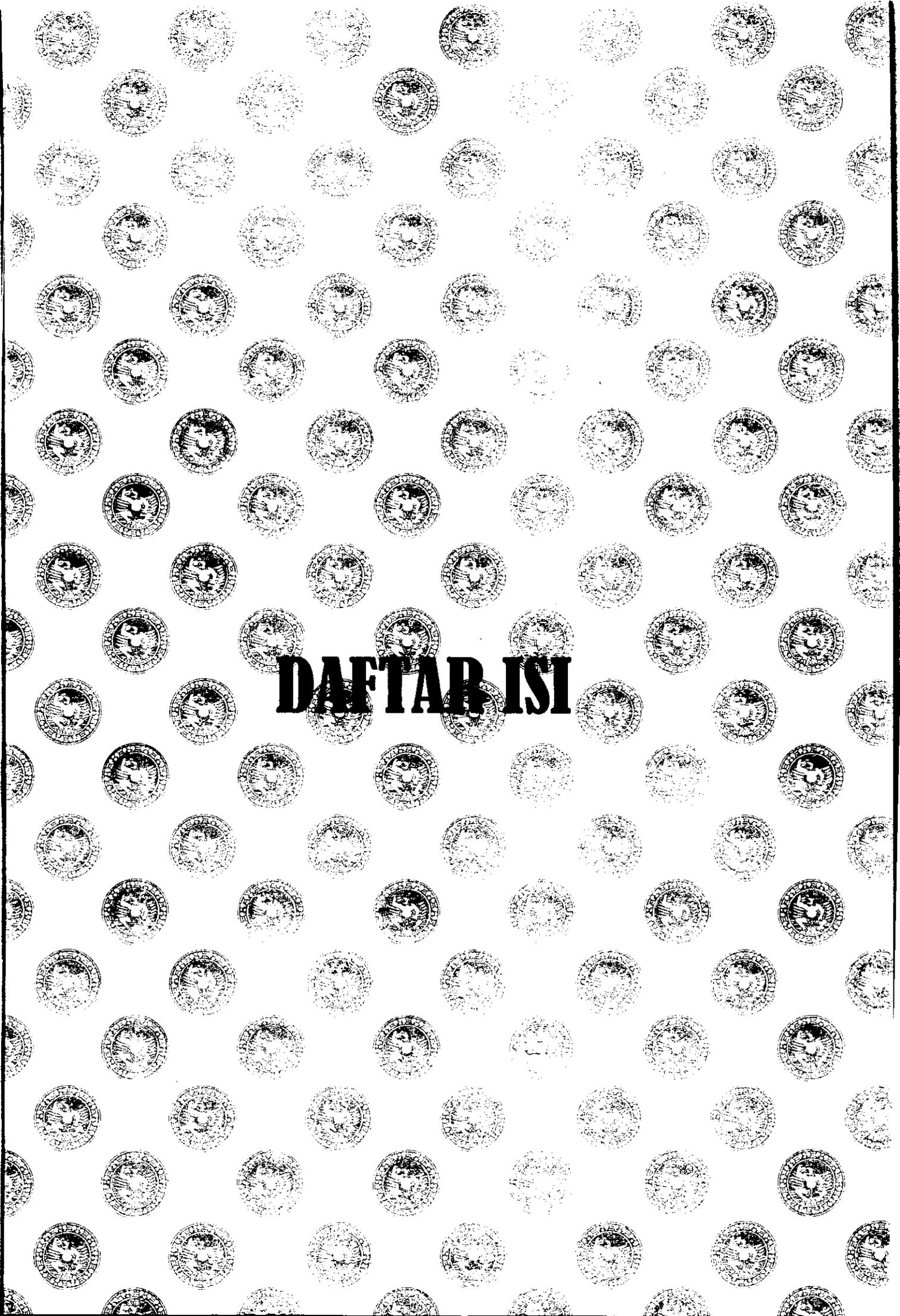
ABSTRACT

Genetic Variability of *C. albicans* at Oral Mucosa in Regulation Levels of Diabetes Mellitus Diseases

Retno Pudji Rahayu

C. albicans infections were found in 80% of the Diabetes Mellitus (DM) population. This is because the etiopathogenesis underlying this infection is complicated, involving both immunity and molecular pathways, while the molecular pathway of this infection remains to be fully understood. The objectives of this study were to comprehend the etiopathogenesis of *C. albicans* infection in the oral cavity of DM patients at a molecular level by observing the existence of SAP1 and SAP3 genes, and to comprehend the genetic variability of *C. albicans* isolated in Surabaya. The result of a phenogram analysis described that *C. albicans* colonizing the oral mucosa of well-regulated DM patients had the tendency to be of close genetic relationship (with a genetic distance of 0.762) to that of poorly-regulated DM patients. With reference to regulation levels, the existence of SAP3 gene *C. albicans* in DM patients showed an average score in non-DM patients of 11512.86 ± 1348.26 , lower than that of well-regulated DM patients of 10319.53 ± 9028.21 and poorly-regulated DM patients of 14793.86 ± 8851.28 . In this study, of all *C. albicans* samples taken from well-regulated DM patients, poorly-regulated DM patients and non-DM patients, more than 75% were serotype A and the remaining were serotype B. The existence of serotype B in poorly-regulated DM patients was higher than that in other groups. IL-1 β and TNF- α in poorly-regulated DM patients were significantly different ($p < 0.005$) from those in other groups, while well-regulated DM patients had no significant difference from non-DM patients in terms of IL-1 β and TNF- α . It can be concluded that the isolated existence of SAP3 genes *C. albicans* in Surabaya was correlated by the level of regulation of DM patients. A correlation was found between genetic variability and *C. albicans* virulence and the level of regulation in DM patients. Virulence was not only determined by serotype, such as that suggested by antecedent theory, but also correlated by the existence of SAP3 genes. Thereby, the result of this study can be employed as a basis for a diagnostic determination with a more accurate concept of *C. albicans* infection in the oral mucosa of DM patients.

Keywords: Diabetes Mellitus, *C. albicans* infections, Secretory Aspartyl Proteinases (SAP), genetic variability and cytokine



DAFTAR ISI

DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR PENGESAHAN	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	xiv
SUMMARY	xvi
ABSTRACT	xviii
DAFTAR ISI	xix
DAFTAR GAMBAR	xxii
DAFTAR TABEL	xxiii
DAFTAR GRAFIK	xxiv
DAFTAR SINGKATAN	xxv
BAB I	
Pendahuluan	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	8
1.3 Tujuan Penelitian	9
1.4 Manfaat Penelitian	10
BAB 2	
Tinjauan Pustaka	
2.1 Pengertian, dan ciri <i>C. albicans</i>	
2.1.1 Pengertian <i>C. albicans</i>	11
2.1.2 Ciri <i>C. albicans</i>	12
2.2 Identifikasi <i>C. albicans</i>	12
2.3 Enzim <i>Secretory Aspartyl Proteinase (SAP)</i>	13
2.4 Patogenesis Infeksi <i>C. albicans</i> di Rongga Mulut Penderita Diabetes Mellitus	16
2.5 Imunitas Pada Infeksi Jamur <i>C. albicans</i>	21
2.6 <i>Immunocompromise</i>	25
2.7 Diabetes Mellitus	28
2.8 Diabetes Mellitus dengan A1c	31
2.9 <i>Polymerase Chain Reaction (PCR)</i>	38
2.10 <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	43
2.11 <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	44

BAB 3

Kerangka Konseptual Dan Hipotesis

3.1 Kerangka konseptual	51
3.2 Bagan Kerangka konseptual	56
3.3 Hipotesis Penelitian	58

BAB 4

Metodologi Penelitian

4.1 Rancangan Penelitian	59
4.2 Populasi Penelitian Dan Sampel	60
4.3 Besar sampel	60
4.4 Cara Pengambilan Sampel	61
4.5 Variabel Penelitian	63
4.6 Tahapan Penelitian	65

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat Penelitian	66
4.7.2 Bahan Penelitian	66
4.7.3 Cara kerja	66
4.7.4 Prosedur Penelitian	67
4.7.4.1 Pemeriksaan Sitologi (Papanicolaou)	68
4.7.4.2 Media Kultur <i>C.albicans</i> dan kondisi pertumbuhan	68
4.7.4.3 Pemeriksaan Kadar A1C	69
4.7.4.4 Pembuatan <i>Spheroplast</i>	70
4.7.4.5 Isolasi DNA	70
4.7.4.6 Penentuan Kemurnian DNA	71
4.7.4.7 PCR Gen EFB1	72
4.7.4.8 PCR Gen SAP1 dan SAP3	72
4.7.4.9 Analisa Hasil PCR	73
4.7.4.10 Identifikasi Strain <i>C.albicans</i>	73
4.7.4.11 Pemeriksaan Kadar IL-1 β dan TNF- α	74
4.7.4.12 <i>Randomly Amplified Polymorphism DNA</i> (RAPD)	76
4.7.4.13 Elektroforesis Hasil RAPD	76
4.7.4.14 Tempat Penelitian	76
4.7.4.15 Analisis Data	77

BAB 5

Hasil Penelitian	78
------------------	----

BAB 6

Pembahasan	98
------------	----

BAB 7

Kesimpulan Dan Saran 124

DAFTAR PUSTAKA 126

LAMPIRAN 135

DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1 Mekanisme Hambatan Perlekatan <i>C.albicans</i> oleh Antibodi	25
Gambar 2.2 Skema Sifat Metabolik AGE	34
Gambar 2.3 Fase AGE Pada Diabetes Mellitus	35
Gambar 2.4 Infeksi yang terkait Diabetes Mellitus	36
Gambar 2.5 Gangguan Mekanisme Sistem Pertahanan inang	36
Gambar 2.6 Proses Amplifikasi Pada PCR	40
Gambar 5.1 Pemeriksaan Sitologi dengan pengecatan Papanicolaou Broth	79
Gambar 5.2 Kultur <i>C. albicans</i> dalam media Sabouraud Dextrose Borth	80
Gambar 5.3 Hasil Tes Fermentasi gula	80
Gambar 5.4 Serotipe <i>C.albicans</i>	82
Gambar 5.5 Hasil RAPD <i>C.albicans</i> Pada DM Teregulasi	83
Gambar 5.6 Hasil RAPD <i>C.albicans</i> Pada DM Tidak Teregulasi	83
Gambar 5.7 Hasil RAPD <i>C.albicans</i> Pada non-DM	84
Gambar 5.8 Fenogram RAPD	87
Gambar 5.9 Hasil PCR Gen EFB1, SAP1 dan SAP3	89

DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 5.1 Fragmen DNA Hasil RAPD	85
Tabel 5.2 Karakter Hasil RAPD	86
Tabel 5.3 Matriks Similaritas	86
Tabel 5.4 Hasil Uji HSD IL-1 β	92
Tabel 5.5 Hasil Uji HSD TNF- α	92
Tabel 5.6 Hubungan Serotipe dengan Polimorfisme dan Keberadaan gen SAP1 dan SAP3	94
Tabel 5.7 Hubungan Serotipe dengan Polimorfisme, Keberadaan gen SAP1, SAP3 , kadar IL-1 β dan TNF- α	97

DAFTAR GRAFIK

	Hal
Grafik 5.1 Prosentasi Serotipe A dan B pada <i>C.albicans</i>	82
Grafik 5.2 Distribusi Polimorfisme <i>C.albicans</i> pada beberapa Tingkat Regulasi DM	88
Grafik 5.3 Distribusi Keberadaan gen SAP1 pada beberapa Tingkat Regulasi DM	90
Grafik 5.4 Distribusi Keberadaan gen SAP3 pada beberapa Ringkat regulasi DM	90
Grafik 5.5 Hasil Pemeriksaan Kadar IL-1 β	92
Grafik 5.6 Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α	93
Grafik 5.7 Distribusi Polimorfisme pada Serotipe A dan B <i>C.albicans</i>	94
Grafik 5.8 Distribusi Keberadaan gen SAP1 pada serotipe A dan B <i>C.albicans</i>	94
Grafik 5.9 Distribusi Keberadaan gen SAP3 pada Serotipe A dan B <i>C.albicans</i>	95
Grafik 5.10 Distribusi Kadar IL-1 β pada Serotipe A dan B <i>C.albicans</i>	96
Grafik 5.11 Distribusi Kadar TNF- α pada Serotipe A dan B <i>C.albicans</i>	96

DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1 Pemeriksaan Serotyping dan Analisis statistik Serotyping	135
Lampiran 2 Metode RAPD	136
Lampiran 3 Hasil Uji Statistik Eksistensi SAP1 dan SAP3	145
Lampiran 4 Hasil Uji Statistik IL-1β dan TNFα	148
Lampiran 5 Hasil uji Statistik Interaksi Serotipe <i>C.abicans</i> dengan Eksistensi gen SAP1 dan SAP3, variabilitas genetik dan Kadar IL-1β dan TNFα	151
Lampiran 6 Pemeriksaan Sitologi	156

DAFTAR SINGKATAN

A	:	<i>Adenine</i>
AGE	:	<i>Advanced Glycocyalted End Products</i>
RAGE	:	<i>Receptor Advanced Glycocyalted End Products</i>
C	:	<i>Cytosine</i>
<i>C. albicans</i>	:	<i>Candida albicans</i>
DM	:	<i>Diabetes Mellitus</i>
DNA	:	<i>Dioxiribose Nucleid Acid</i>
ELISA	:	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
G	:	<i>Guanine</i>
IgA	:	<i>Immunoglobulin A</i>
SIgA	:	<i>Secretory Immunoglobulin A</i>
IgG	:	<i>Immunoglobulin G</i>
IL - 1β	:	<i>Interleukin - 1β</i>
NADPH	:	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleutida Phosphate</i>
OHI	:	<i>Oral Hygiene Index</i>
PCR	:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMN	:	<i>Polymorphonuclear</i>
RAPD	:	<i>Random Amplyfied Polymorphism DNA</i>
SAP	:	<i>Secretory Aspartyl Proteinase</i>
T	:	<i>Tymine</i>
TNF - α	:	<i>Tumor Necrotic Factor - α</i>
ECM	:	<i>Extra Cellular Matrix Protein</i>
AIDS	:	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>

BAB 1

PENDAHULUAN

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Data epidemiologi menunjukkan bahwa angka kejadian Diabetes Mellitus (DM) di Indonesia tahun 1998 sebanyak 3,5 juta orang, dan pada tahun 2000 meningkat menjadi lebih dari 4 juta orang (Tjokrowiro, 2000). Di tahun 2003 jumlah penderita DM di Indonesia menjadi 5,7 juta jiwa dan Indonesia merupakan negara ke 6 tertinggi dalam jumlah angka kejadian DM setelah India, Cina, Amerika Serikat, Pakistan dan Jepang. Diperkirakan tahun 2020 akan meningkat menjadi 7 juta orang dan dalam kurun waktu 1 atau 2 dekade yang akan datang prevalensi DM akan tetap meningkat. Meningkatnya angka kejadian DM di Indonesia, akan berpengaruh pula pada peningkatan kejadian komplikasi akibat DM dengan manifestasinya di rongga mulut. Salah satu manifestasi di rongga mulut akibat DM adalah kejadian infeksi yang disebabkan oleh *C. albicans* yang dikenal sebagai *oral candidosis*, dan meningkatnya prevalensi DM ini maka akan mempengaruhi peningkatan kejadian komplikasi yang menyertainya.

Penyakit Diabetes Mellitus (DM) ditandai dengan hiperglikemia kronik sebagai akibat dari penurunan sekresi insulin dan atau penurunan sensitifitas sel target terhadap kerja insulin yaitu *insulin resistances* (Robbins *et al*, 1999; Pranoto dan Tjokrowiro, 2004), yang ke duanya

mengakibatkan gangguan metabolisme glukosa dan terjadinya hiperglikemia (Robbins *et al*, 1999; Tjokropawiro, 2000; Tjokropawiro, 2003). Hiperglikemia merupakan kejadian awal dari peristiwa disfungsi endotel, yang kemudian berkembang menjadi penyebab terjadinya komplikasi menahun dari DM karena terbentuknya AGE yaitu *Advanced Glycylated End Products* (Tjokropawiro, 2000). AGEs bersifat sangat tidak stabil, reaktif dan toksis serta dapat menyebabkan mutagenesis dari bakteri (Wautier, 2001). Akumulasi AGEs akan menyebabkan komplikasi patogenik DM dan salah satu komplikasi DM di mukosa rongga mulut adalah infeksi *C.albicans* yang dikenal sebagai *Oral candidosis*.

C.albicans adalah organisme komensal dalam rongga mulut, merupakan jamur dimorfik yaitu patogen oportunistik dan merupakan flora normal di rongga mulut. Di dalam rongga mulut terdapat berbagai strain *C.albicans* dengan karakteristik fenotipe tertentu yang menentukan sifatnya sebagai komensal atau patogen. *C.albicans* dalam perkembangannya menjadi patogen dapat melalui dua perubahan yaitu overkolonisasi atau dengan perubahan bentuk (*switching*) dari *blastophore* menjadi *hyphae* (Gale *et al*,1998; Felk *et al*, 2002). Perubahan status *C.albicans* dari komensal menjadi patogen ini berhubungan erat dengan faktor lokal dan sistemik yang sampai saat ini masih sulit untuk dijelaskan secara tuntas dalam eksperimen (Staib *et al*,2000; Willis *et al*,2001). Keberhasilan *C.albicans* melekat pada epitel permukaan mukosa rongga mulut merupakan awal terjadinya infeksi.

Infeksi oleh *C.albicans* ini merupakan salah satu komplikasi dari penyakit DM yang paling tinggi angka kejadiannya di rongga mulut (Martinez *et al*, 1998). Infeksi *C.albicans* pada epitel permukaan mukosa rongga mulut adalah rekuren dan persisten pada penderita DM. Sekitar 80% dari populasi penderita DM di jumpai adanya *oral candidosis*. Keadaan ini merupakan problem klinis yang hingga saat ini masih belum dapat di atasi dengan baik (Elahi *et al*, 2001), hal ini karena penyakit ini masih endemis dan terapinya yang tidak pernah bisa efektif.

Sampai saat ini kejadian infeksi karena *C.albicans* pada mukosa rongga mulut penderita DM masih merupakan masalah yang belum dapat dijelaskan secara tuntas di bidang kedokteran gigi (Appleton *et al*, 2000). Hal ini karena etiopatogenesis yang mendasari terjadinya proses infeksi tersebut sangat kompleks meliputi gangguan pada sistem imun inang dan interaksi molekuler yang sampai saat ini masih belum tuntas penjelasannya.

Secara teoritis diketahui bahwa terjadinya penyakit infeksi merupakan manifestasi dari interaksi antara faktor internal (seperti faktor imunologi, genetik, hormon) dengan faktor eksternal (misalnya lingkungan, virus, bakteri dan jamur). Etiopatogenesis penyakit infeksi oleh *C.albicans* yang sejauh ini diketahui adalah interaksi antara faktor imunologi dengan *C.albicans*, akan tetapi ternyata masih belum bisa menyelesaikan permasalahan perawatan secara tuntas, sehingga memerlukan eksplorasi pada tingkat molekuler. Untuk melakukan eksplorasi ini diperlukan pemahaman molekuler tentang hubungan antara derajat keparahan DM

yang ditentukan berdasar pada tingkat regulasi DM dengan variabilitas genetik *C.albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM.

C.albicans yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut tentunya mempunyai keragaman genetik yang berbeda pada setiap strain. Penampakan dari suatu karakter (fenotipe) *C.albicans* ditentukan oleh faktor genetik dan faktor lingkungan (Straub *et al*, 2001). Keadaan ini yang mengakibatkan adanya perbedaan genotipe diantara berbagai strain *C.albicans* yang ada didunia. Penanda DNA yang telah banyak digunakan dalam mempelajari keragaman genetik pada *C.albicans* adalah RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Waltimo *et al*, 2001; Munoz *et al*, 2003). RAPD adalah teknik amplifikasi secara random pada gen-gen yang ada pada *C.albicans* untuk mengetahui ada tidaknya polimorfisme.

Pengetahuan tentang data genetik seperti adanya variasi genetik pada *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM perlu diketahui untuk tujuan menentukan virulensi. Pengetahuan variasi genetik dapat digunakan sebagai pijakan dalam upaya perbaikan penatalaksanaan dalam menangani kasus infeksi oleh *C.albicans* pada penderita DM, namun demikian, sejauh ini hubungan antara serotipe dan genotipe *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga rongga mulut penderita DM dengan tingkat regulasi DM belum diketahui dengan jelas.

Infeksi oleh *C.albicans* yang terjadi pada penderita DM disebabkan karena adanya berbagai perubahan yang ada di dalam rongga mulut sebagai komplikasi penyakit DM. Perubahan yang terjadi antara lain

serostomia, penurunan pH saliva dan kadar glukosa yang tinggi dalam saliva (Quirino *et al*, 1995; Lamey, 2001), serta menurunnya sistem imunitas lokal maupun sistemik (Romani , 2002).

Resiko terjadinya kelainan di rongga mulut seperti infeksi *C.albicans* pada penderita DM akan meningkat karena berbagai faktor, yaitu faktor regulasi glukosa dan faktor higiene rongga mulut yang jelek (Hemawan , 2000).

Pada tahap awal terjadi infeksi oleh *C.albicans* tidak menimbulkan manifestasi klinis, dan baru akan memberikan manifestasi klinis bila proses ini berjalan lanjut dengan disertai berbagai kerusakan pada komponen jaringan mukosa rongga mulut. Pada keadaan ini akan mengakibatkan timbulnya kelainan di rongga mulut yaitu *oral candidosis* (Quirino *et al*, 1995). *Oral candidosis* pada penderita DM merupakan suatu infeksi nosokomial patogen karena keadaan *immunocompromise* dari sistem imun inang dengan manifestasi suatu imunodefisiensi (Lamey , 2001; Felk *et al*, 2002).

Berdasar dari berbagai hasil penelitian, pada penderita DM dijumpai adanya *oral candidosis* sebesar 54,6%, lesi yang proliferasif 28,6%, neoplasma 14% dan herpes 2,8% (Quirino *et al*, 1995). Dilaporkan bahwa peningkatan kejadian *oral candidosis* antara 43%-93% pada penderita dengan keadaan imunodefisiensi (Powderly, 1996). Hal tersebut menunjukkan bahwa kejadian *oral candidosis* meningkat dalam keadaan imunodefisiensi. Pada keadaan dengan *immunological competent* inang

yang menurun akibat DM, kolonisasi *C.albicans* yang terjadi merupakan langkah awal terjadinya infeksi *C.albicans* yang patogen.

Pada dinding sel *C.albicans* terdiri dari 3 molekul utama yaitu *mannoprotein*, β -glukan dan *chitin* yang dapat memberikan kontribusi pada ikatan *C.albicans* dengan epitel mukosa rongga mulut (Fu *et al*, 1998; Buurman *et al*, 1998; Piccini *et al*, 2002). Disamping itu, meningkatnya kadar glukosa pada DM memberikan suatu kondisi lingkungan yang sesuai bagi *C.albicans* untuk tumbuh berkembang dan mengadakan ikatan dengan epitel mukosa inang.

Pada keadaan kadar glukosa yang tinggi, maka reseptor molekul *mannoprotein* yang merupakan *protein like - lectin* akan berikatan dengan glukosa membentuk *glycomanoprotein* yang dikenal sebagai molekul adesin (Ribbot *et al*, 1994; Burman *et al*, 1998). Protein adesin ini memiliki kesamaan dengan integrin pada inang, yaitu integrin – like protein (Calderon *et al*, 2001), sehingga mampu mengenal *Arginine-Glycine-Aspartic Acid* (RGD Sequence) pada sel inang (Ribbot *et al*, 1994; Hostetter, 1996). Protein adesin ini juga berperan sebagai epitop dan akan bereaksi dengan reseptor pada permukaan epitel mukosa, selanjutnya terjadi ikatan antara *C.albicans* dengan reseptor pada epitel mukosa dan tahap selanjutnya adalah proses kolonisasi.

Sifat *immunocompromise* yang didapatkan karena kejadian sakit pada inang dapat menyebabkan keadaan cacatnya sistem imun, dan salah satu diantaranya adalah imunodefisiensi. Keadaan ini yang lazim menyertai penderita DM dan akan mengakibatkan gangguan pada

respons imun inang dan salah satunya adalah gangguan produksi sitokin diantaranya IL - 1 β dan TNF- α . Pada kondisi tersebut di atas juga dijumpai adanya kelainan pada fungsi fagositosis polimorfonuklear (PMN) dan makrofag (Dubois *et al*, 1998; Herring *et al*, 2002). Pada keadaan ini terjadi penurunan jumlah dan aktivitas sel T baik secara kuantitas maupun kualitas (Elahi *et al*, 2000), sehingga terjadi gangguan pada fungsi pengenalan terhadap antigen.

Secretory Aspartyl Proteinase (SAP) merupakan suatu enzim hidrolitik yang disekresi oleh *C.albicans* dan di kode oleh gen SAP1 sampai SAP 9 (Schaller *et al*, 1998; Schaller *et al*, 1999). SAP merupakan enzim yang spesifik karena mampu mendegradasi berbagai protein di tempat terjadinya infeksi. Enzim SAP yang di kode oleh gen SAP ini juga memberikan kontribusi pada virulensi *C.albicans* karena bersifat proteolisis, di samping itu juga memberikan kontribusi pada faktor pembentukan *hyphae* dan *phenotypic switching*. Keadaan ini berkaitan dengan kemampuan invasif dari strain *C.albicans* secara biokimiawi, genetik dan imunokimiawi (Koelsch *at al*, 2000; Felk *et al*, 2002). Perbedaan virulensi diantara berbagai strain *C.albicans* mempengaruhi kolonisasi dan produksi enzim *Secretory Aspartyl Proteinase* (SAP), dan pada *C.albicans* serotipe A ditemukan sekresi SAP meningkat secara *in vitro* (Hoegl *et al*, 1996).

Berdasar kepustakaan yang ada bahwa virulensi *C.albicans* pada berbagai strain diduga dipengaruhi secara dominan oleh 3 faktor yaitu aktivitas gen SAP melalui produknya berupa enzim yang bersifat protease

yaitu SAP1 dan SAP3, respons imun inang serta diduga pula bahwa variabilitas genetik berpengaruh pada virulensi *C.albicans*, maka timbul pemikiran untuk memahami dan mempelajari tentang variabilitas genetik serta peran SAP1 dan SAP3 *C.albicans* dalam proses perlekatan dan kolonisasi pada epitel mukosa rongga mulut yang merupakan langkah awal terjadinya infeksi.

Penelitian ini mengetrapkan suatu teknologi yang berdasar pada paradigma biologi molekuler dalam mempelajari variabilitas genetik *C.albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM, serta keberadaan gen SAP1 dan gen SAP3 yang juga berperan pada virulensi *C.albicans*. Berdasar hal tersebut, maka pada penelitian ini diharapkan dapat mengungkap etiopatogenesis infeksi *C.albicans* melalui mekanisme enzimatik dari SAP1 dan SAP3 pada tingkat molekuler.

1.2 Rumusan Masalah

Dari uraian di atas maka pokok permasalahan yang timbul adalah sebagai berikut : Apakah ada hubungan antara keberadaan gen SAP (SAP1 dan SAP3) dengan variabilitas genetik *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM dengan berdasar pada tingkat regulasi penyakit DM. Dari pokok permasalahan tersebut, dapat dibuat beberapa submasalah seperti tersebut dibawah ini :

1.2.1 Apakah ada hubungan antara keberadaan gen SAP1 dan SAP3

***C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM ?**

- 1.2.2 Apakah ada hubungan antara variabilitas genetik *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM ?
- 1.2.3 Apakah ada hubungan antara virulensi *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM?
- 1.2.4 Apakah ada hubungan antara keberadaan gen SAP1, SAP3, dan variabilitas genetik *C.albicans* isolat Surabaya serta kadar IL-1 β dan TNF- α inang dengan virulensi *C.albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan yang ingin dicapai dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

Tujuan Umum:

Memahami etiopatogenesis molekuler yang mendasari terjadinya proses infeksi oleh *C.albicans* isolat Surabaya pada penderita Diabetes Mellitus (DM).

Tujuan Khusus:

- 1.3.1 Menemukan hubungan antara keberadaan gen SAP1 dan SAP3 *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM.
- 1.3.2 Menemukan hubungan antara variabilitas genetik *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM.
- 1.3.3 Menemukan hubungan antara virulensi *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM.

- 1.3.4 Menemukan bahwa ada hubungan antara keberadaan gen SAP1, SAP3 dan variabilitas genetik *C. albicans* isolat Surabaya serta kadar IL-1 β dan TNF- α inang dengan virulensi *C. albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat Teoritis.

1. Memberikan kontribusi keilmuan dalam mengungkap bahwa keberadaan gen SAP (SAP1 dan SAP3) *C. albicans* berhubungan dengan tingkat regulasi Diabetes Mellitus.
2. Memberikan kontribusi keilmuan dalam mengungkap variabilitas genetik diantara *C. albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM.

Manfaat Praktis.

Dengan ditemukan adanya variabilitas genetik, perbedaan serotipe dan keberadaan gen SAP1 dan SAP3 *C. albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM, maka dapat bermanfaat sebagai dasar penentuan diagnostik yang lebih akurat dan penyempurnaan tatalaksana perawatan *oral candidosis* baik pada penderita DM dan non-DM.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pengertian dan Ciri *C.albicans*

2.1.1 Pengertian *C.albicans*

Candida albicans (*C.albicans*) adalah jamur yang berbentuk bulat, agak lonjong dan berwarna putih (Samaranayake *et al*, 1990). *Candida* merupakan genus yang termasuk dalam keluarga *Cryptococcaceae* yang memiliki 11 genus, akan tetapi hanya 7 spesies yang ditemukan di rongga mulut manusia, di vagina dan di saluran pencernaan yaitu *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.stellatoidea*, *C.pseudotropicalis*, *C.crusei*, *C.parapsilosis*, dan *C. guilliermondii*. Dari beberapa spesies *Candida* yang ada, spesies yang paling patogen adalah *C.albicans* karena merupakan spesies yang paling banyak di temukan pada permukaan mukosa dan paling sering menyebabkan infeksi di mukosa rongga mulut (Casadeval, 2002). Konsep penting dari patogenesis infeksi *C.albicans* adalah multifaktorial yang melibatkan faktor virulensi dan *immunological status* dari inang. Faktor virulensi *C.albicans* dapat memicu *immune resisten* dari inang dan hal ini sangat penting bagi upaya pengobatannya.

Untuk menimbulkan penyakit atau menginfeksi pada manusia oleh *C.albicans*, dibutuhkan:

1. Kemampuan untuk melekat atau menyerang jaringan inang.
2. Kemampuan untuk memperbanyak diri.
3. Kemampuan untuk menghindari dari sistem imun inang

4. Kemampuan untuk merusak jaringan inang.

2.1.2 Ciri *C.albicans*

C.albicans akan tumbuh pada media tertentu yang terdiri dari garam, karbon (mis. Glukosa), nitrogen dan fosfat. Organisme ini akan tumbuh pada temperatur berkisar antara 20 °C – 40 °C dan pH antara 2-8.

C.albicans adalah jamur yang mempunyai tiga bentuk morfologi

(Samaranayake, 1990), yaitu :

1. *Yeast* atau *yeast-like*, terlihat sebagai kumpulan sel berbentuk bulat atau oval dengan diameter antara 1,5-5 µm dan panjang 3-14 µm. Sel tersebut melekat pada *pseudomycellium* dalam kelompok kecil dan disebut blastospora.
2. *Mycelium*, sel yang membentuk ekor yang panjang pada pembiakan serum manusia atau hewan. Bentuk ini terlihat sebagai tonjolan yang akhirnya akan membentuk sekumpulan *pseudomycellium*.
3. *Chlamidospora* berbentuk *hyphae*

2.2 Identifikasi *C. albicans*

C.albicans dapat diidentifikasi untuk membedakannya dengan spesies *candida* lainnya dengan melalui berbagai metode :

1. Terbentuknya *germ-tubes* bila dibiakkan dalam serum darah manusia atau hewan selama 2 jam pada suhu 37°C.

2. Terbentuknya *chlamydo-spores* bila dibiakkan pada media yang kurang nilai nutrisinya seperti *corn meal agar*.
3. Dengan reaksi fermentasi gula.
4. Dengan reaksi pembentukan antigen – antibodi kompleks.

C.stelatoidea dapat dibedakan dengan *C.albicans* berdasarkan ketidak mampunya untuk mengasimilasi sukrosa. Akan tetapi, karena homology DNANYa yang tinggi pada ke dua *candida* tersebut maka diklasifikasikan bahwa *C.stelatoidea* sebagai varian *C.albicans* yang menunjukkan reaksi negatif terhadap sukrosa.

2.3 Enzim *Secretory Aspartyl Proteinase (SAP)*

C.albicans berbentuk uniseluler dan secara morfologi ada 3 bentuk yaitu *blastophore*, *pseudohyphae* dan *chlamidospore* atau *hyphae* (Samaranayake *et al*,1990). *Chlamidospore* adalah struktur yang tahan terhadap kondisi lingkungan yang buruk dan akan tumbuh ketika kondisi lingkungan menguntungkan bagi pertumbuhan vegetatif. Fase *hyphae* ini melekat lebih baik pada permukaan mukosa rongga mulut dibanding fase *blastophore*.

C.albicans mempunyai sejumlah karakteristik yang berperan sebagai faktor virulensi, sehingga dapat menyebabkan atau memperberat infeksi pada inang yang rentan terhadap infeksi. Berbagai faktor virulensi yang diekspresikan atau diperlukan oleh *C albicans*, tergantung pada tempat dan tahap infeksi serta respons dari inang. Faktor virulensi tersebut antara lain: perlekatan pada sel inang, kemampuan germinasi,

phenotypic switching dan sekresi enzim hidrolitik protease (Bernardis *et al*, 1999; Felk *et al*. 2002). Diantara faktor virulensi tersebut yang paling penting adalah sekresi enzim hidrolitik protease yaitu *Secretory Aspartyl Proteinase* (SAP) yang dikode oleh gen SAP (Schaller *et al*, 1998; Naglik *et al*, 1999; Felk *et al*. 2002). SAP pada *C.albicans* diekspresikan oleh banyak gen yaitu gen SAP1 – SAP9, dan umumnya diproduksi oleh *C.albicans* pada spesies yang virulen. Ekspresi SAP ini berkaitan dengan kemampuan invasif dari *C.albicans* secara biokimiawi, genetik dan imunokimiawi (Koelsch *et al*, 2000).

Pada proses perlekatan *C.albicans* pada epitel mukosa yang diikuti dengan kolonisasi, keadaan ini didukung oleh banyak faktor antara lain keadaan imunodefisiensi pada inang sendiri, peran dari *glycomannoprotein* yang merupakan bahan adesi dan adanya enzim SAP khususnya SAP1 dan SAP3 (Schaller *et al*, 1998; Koelsch *et al*, 2000). Enzim hidrolitik SAP yang dikode oleh gen SAP ini juga memberikan kontribusi pada virulensi *C.albicans* disamping faktor pembentukan *hyphae* dan *phenotypic switching*. SAP ini merupakan enzim yang spesifik karena mampu merusak lapisan keratin epitel dan mendegradasi berbagai protein ditempat terjadinya lesi tersebut seperti albumin, hemoglobin, kolagen, mucin dan sIgA (Naglik *et al*, 1999). Selain berperan pada proses perlekatan SAP juga berperan pada proses terjadinya kerusakan jaringan mukosa dan virulensi dari *C. albicans*.

Pada tahap terjadi ikatan antara *C.albicans* dengan epitel mukosa tersebut, gen SAP1 dan SAP3 akan teraktivasi dan akan memproduksi

enzim SAP1 dan SAP3 yang bersifat protease. Pada keadaan ini ekspresi SAP1 dan SAP3 lebih tinggi dibanding SAP2, SAP6 dan SAP8 dan enzim *Secretory Aspartyl Proteinases* (SAP1 dan SAP3) ini berperan dominan pada terjadinya kerusakan lapisan epidermis manusia (Schaller *et al*, 2000)

Berbagai referensi melaporkan bahwa enzim SAP1 dan SAP3 ini berperan paling dominan dalam proses awal terjadinya infeksi *C.albicans*, meskipun sebenarnya ada banyak SAP yaitu SAP1 s/d SAP9. Pada proses perlekatan dan kolonisasi *Candida albicans* pada manusia, gen SAP1-SAP7 mengekspresikan SAP dengan pola yang berbeda (Naglik *et al*, 1999; Staib *et al*, 2000). Produk gen SAP1 dan SAP3 ini meskipun protease, akan tetapi belum mengakibatkan rusaknya jaringan karena diduga fungsinya hanya mempengaruhi atau melisis protein yang disintesis pada proses aderensi tersebut sehingga *C.albicans* bisa mengadakan kolonisasi. Pada proses selanjutnya akan disekresi enzim berikutnya yaitu SAP2, SAP4 dan SAP6 yang juga bersifat protease dan berfungsi mendegradasi komponen *Extra Cellular Matrix Protein* (ECM) antara lain integrin, laminin, fibronectin dan kolagen serotipe IV. Pada kondisi berkurangnya ketahanan jaringan akibat keadaan imunodefisiensi pada inang, maka *C.albicans* akan berkembang menjadi infeksi yang invasif dan mengadakan invasi ke dalam jaringan yang lebih dalam melalui ikatan dengan endotel vaskuler sehingga virulensi menjadi meningkat (Staib *et al*, 2000; Asleson *et al*, 2001).

Angka kematian yang tinggi dilaporkan akibat infeksi sistemik dari strain *C.albicans* yang resisten terhadap obat, sehingga diperlukan pemahaman dari fungsi SAP secara individu yang akan merupakan target perkembangan bahan obat-obatan untuk infeksi *C.albicans* (*candidosis*) (Koelsch *et al*, 2000).

Saat ini telah dikembangkan tren baru dalam terapi secara farmakologis dari semua penyakit yang bersifat inhibisi pada substrat maupun reseptor, contohnya antara lain pada asma yang diterapi dengan *lecutrien reseptor antagonis*, dan pada penyakit hipertensi dengan *Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor* (ACE inhibitor). Sejalan dengan telah berkembangnya terapi imun dalam berbagai kasus infeksi, maka sudah saatnya teknik pengobatan pada *oral candidosis* akibat infeksi *C.albicans* dikembangkan ke arah imuno terapi dengan harapan dapat meningkatkan respons imun inang

2.4. Patogenesis Infeksi *C.albicans* di Rongga Mulut Penderita Diabetes Mellitus

C.albicans adalah merupakan organisme komensal dalam rongga mulut. Perubahan status *C.albicans* dari komensal menjadi patogen berhubungan erat dengan faktor lokal dan sistemik yang sampai saat ini masih sulit untuk dijelaskan secara tuntas dalam eksperimen. Hal ini karena patogenesis terjadinya infeksi *C.albicans* (*candidosis*) sangat kompleks meliputi baik imunitas maupun molekuler (Challacombe *et*

al,1994; Willis *et al*,1999; Staib *et al*,2000). Kompleksnya patogenesis infeksi *C.albicans* disebabkan karena adanya perbedaan :

1. Tipe infeksi, yaitu akut atau kronik
2. Bentuk *C.albicans* yaitu *yeast* atau *hyphae*
3. Hubungannya dengan sistem imun mukosal dan sistem imun spesifik
4. Hubungannya dengan faktor virulensi

Beberapa faktor predisposisi terhadap perkembangan infeksi *C.albicans* adalah (Bultz and Lombardi, 1996) :

1. Faktor sistemik

- a. Fisiologik : usia lanjut, kehamilan
- b. Kelainan endokrin yaitu : Diabetes Mellitus, Hypertiroidism.
- c. Defisiensi nutrisi antara lain zat besi, asam folat dan vit.B₁₂
- d. Proses keganasan : leukemia akut, agranulositosis
- e. Perubahan sistem imun, immunosupresi, AIDS, pemakaian kortikosteroid dan antibiotika spektrum luas.

2. Faktor Lokal

- a. Pemakaian protesa
- b. Adanya perubahan pada epitel mukosa seperti atrofi, hiperplasia dan displasia.
- c. Saliva:
 1. Perubahan kuantitas: Serostomia, Sjogren's syndrome, radioterapi dan terapi obat.
 2. Perubahan kualitas: pH, konsentrasi glukosa
- d. Flora komensal

- e. Diit karbohidrat tinggi
- f. Perokok

C.albicans bersifat patogen oportunistik, karena memanfaatkan situasi yang menguntungkan untuk perkembangannya sebagai faktor predisposisi (Staib *et al*, 2000). Diabetes Mellitus (DM) sebagai salah satu faktor predisposisi patogenesis infeksi *C.albicans* khususnya di rongga mulut yang dikenal sebagai *oral candidosis*. *Oral candidosis* merupakan manifestasi di rongga mulut yang paling banyak dijumpai pada penyakit DM. Dari berbagai hasil penelitian pada penderita DM 54,6% dijumpai adanya *oral candidosis*, 28,6% lesi-lesi proliferaatif, 14% neoplasma dan 2,8% herpes (Quirino *et al.*, 1995). Penyakit ini terjadi akibat infeksi *C.albicans* yang merupakan jamur patogen oportunistik, melekat pada mukosa termasuk mukosa rongga mulut sebagai flora normal dan tumbuh komensal (Samaranayake *et al*, 1990; Gale *et al*, 1996). Timbulnya infeksi ini karena pada penderita DM terjadi berbagai perubahan dalam rongga mulut sebagai komplikasi DM yang memungkinkan untuk pertumbuhan *C.albicans*, termasuk perubahan pada saliva sebagai faktor lingkungan, yang meliputi penurunan *flow rate saliva* dan pH saliva sehingga saliva menjadi lebih pekat dan menyebabkan serostomia serta peningkatan kadar glukosa saliva (Lamey, 2001). Perubahan yang ada pada mukosa rongga mulut sebagai faktor inang dimungkinkan karena perubahan respons imun, yaitu adanya penurunan atau tidak efektifnya sIgA pada permukaan mukosa, sehingga tidak dapat mencegah perlekatan *C.albicans* yang menyebabkan terjadinya infeksi.

Pada penderita DM yang lasim disertai dengan keadaan *immunocompromise* akan mengakibatkan terjadi imunodefisiensi dengan ditandai penurunan jumlah dan aktivitas sel T baik secara kuantitas maupun kualitas (Elahi *et al*, 2000; Herring *et al*, 2002), sehingga terjadi gangguan pada fungsi pengenalan terhadap antigen. Menurunnya kadar IgG dan IgA dalam serum penderita DM akan mengakibatkan menurunnya fungsi fagositosis. Hal lain karena terjadi gangguan fungsi komplemen akan menyebabkan menurunnya fungsi kemotaksis, akibatnya penderita DM menjadi rentan terhadap infeksi, salah satunya adalah infeksi oleh *C. albicans*.

Keadaan imunodefisiensi pada sel inang juga akan mengakibatkan terjadi gangguan produksi sitokin diantaranya IL -1 β dan TNF- α yang mengakibatkan terjadi gangguan fungsi fagositosis *Polymorphonuclear* (PMN) dan makrofag (Powderly, 1996; Dubois *et al*, 1998; Herring *et al*. 2002). Gangguan pada fungsi sel imunokompeten juga akan menurunkan pertahanan jaringan terhadap pertumbuhan *C. albicans* yang berlebih, sehingga akan memudahkan terjadi ikatan *C. albicans* pada epitel mukosa.

Pada dinding sel *C. Albicans* terdiri dari 3 molekul utama yaitu *mannoprotein*, β -glukan dan *chitin* yang dapat berikatan dengan epitel mukosa (Fu *et al*, 1998; Romani, 2002). *Mannoprotein* dan *mannan polysaccharides* berperan penting pada ikatan antara *C. albicans* dan inang (Piccini *et al*, 2002), sedangkan glukan dan *chitin* berfungsi menjaga *strength* dan *rigidity* serta menjaga bentuk sel dari kerusakan akibat kekuatan *turgor* dan *mechanical shearing* (Buurman *et al*, 1998).

Kadar glukosa yang meningkat pada DM memberikan kondisi lingkungan yang sesuai bagi *C. albicans* untuk mengadakan ikatan dengan epitel mukosa inang. Pada keadaan kadar glukosa tinggi, maka reseptor molekul *mannoprotein* yang merupakan *protein like - lectin* akan berikatan dengan glukosa membentuk *glycomanoprotein* yang dikenal sebagai molekul adesin (Burrman *et al*, 1998; Piccinni *et al*, 2002). Protein adesin ini memiliki kesamaan dengan *lectin* atau integrin pada inang, sehingga mampu mengenali *Arginine-Glycine-Aspartic Acid* (RGD Sequence) pada sel inang (Ribbot *et al*, 1994). Protein adesin ini berperan pula sebagai epitop (Piccinni *et al*, 2002) dan akan bereaksi dengan reseptor pada permukaan epitel mukosa. Selanjutnya terjadi ikatan antara *C. albicans* dengan reseptor epitel mukosa di rongga mulut. Ikatan ini dipengaruhi oleh molekul adesin yang terdapat pada dinding sel *C. albicans*, kemudian diikuti dengan proses perlekatan dan selanjutnya terjadi proses kolonisasi *C. albicans* di epitel mukosa rongga mulut.

Di dalam rongga mulut terdapat berbagai strain *C. albicans* dengan karakteristik fenotip tertentu yang menentukan sifatnya sebagai komensal atau patogen. *C. albicans* mengekspresikan molekul mirip integrin pada permukaannya yang dianggap terlibat dalam perlekatan *C. albicans* pada sel inang dan komponen membran dasar yang meliputi fibronektin dan reseptor laminin (Hostetter, 1994). *Polymorphonuclear neutrophil leucocyte* (PMN) dan makrofag dapat memfagosit dan membunuh *candida* bahkan tanpa adanya opsonisasi antibodi spesifik, meskipun aktivitasnya akan jauh lebih tinggi dengan adanya antibodi tersebut (Ribbot *et al*, 1994).

Dilaporkan bahwa kadar glukosa yang tinggi meningkatkan reseptor iC3b *C.albicans* yaitu suatu *adhesin receptor* pada *C.albicans* (Pendrak and Klotz, 1995) dan meningkatkan resistensi organisme terhadap fagositosis. Syarat dasar keberhasilan kolonisasi *C.albicans* di rongga mulut adalah kemampuan organisme untuk melekat pada *shedding surface* misalnya epitel permukaan atau *non-shedding*, misalnya enamel atau gigi tiruan akrilik. Data terbaru menunjukkan bahwa pelekatan *C.albicans* pada permukaan epitel atau akrilik gigi tiruan akan sangat meningkat dengan adanya *dietary carbohydrates*, termasuk glukosa dan sukrosa. Aderensi *C.albicans* pada sel inang adalah merupakan awal terjadinya kolonisasi sebagai komensal dan infeksi yang patogen (Ribbot *et al*, 1994; Romani, 2002), serta merupakan faktor yang mendasari terjadinya virulensi (Gale *et al*, 1998; Felk *et al*, 2002).

2.5 Imunitas Pada Infeksi *C.albicans*

Imunitas alami (*innate immunity*) merupakan bagian integral dari pertahanan tubuh inang terhadap semua infeksi jamur dan merupakan pertahanan lini terdepan terhadap infeksi *C.albicans* (Herring *et al*, 2002). Saliva merupakan pertahanan tubuh alami yang dinamis dalam rongga mulut, karena mempunyai aliran (*flow*) yang terus menerus untuk bekerja sebagai pertahanan terhadap masuknya benda asing atau mikro-organisme dalam mukosa (Lamey, 2001). Beberapa faktor dalam saliva yang berperan dalam mekanisme terjadinya infeksi di rongga mulut :

1. Flow rate saliva
2. Sistem buffer (bikarbonat dan fosfat)
3. pH saliva 6.7
4. Sistem anti bakterial yang berupa hidrogen peroksidase, tiosinase dan laktoperoksidase.

Ada beberapa bahan dalam saliva yang memberikan proteksi yaitu lisosim, laktoferin, laktoperoksidase dan mucin sebagai komponen pertahanan tubuh non spesifik. Saliva mengandung komponen respons imun spesifik dalam bentuk antibodi. Immunoglobulin yang paling penting dalam imunologi mukosal adalah sIgA dan sIgM yang mempunyai sifat lebih resisten terhadap proteolisis dan menghambat perlekatan bakteri, jamur maupun virus pada mukosa rongga mulut (Holmes *et al*, 2002).

Pertahanan rongga mulut tergantung pada integritas mukosa yang secara normal berfungsi melindungi dari penetrasi mikro-organisme maupun terhadap makromolekul yang bersifat antigenik. Mukosa dilindungi oleh 2 sistem imun yaitu sistem imun sistemik dan sistem imun sekretori. Rongga mulut adalah bagian dari sistem imun mukosal atau sistem imun sekretori yang dapat distimulasi secara lokal maupun sistemik. Pada infeksi karena *C.albicans* melibatkan ke dua jenis sistem imun tersebut.

Organisme *C.albicans* ditemukan sebagai komensal pada populasi sebanyak 40% dan infeksi yang ditimbulkannya terbatas pada epitel permukaan. Hal ini membuktikan bahwa imunitas humoral memegang peranan yang sangat penting terutama sIgA (Challachom *et al*, 1999). Di

dalam saliva IgA berbentuk dimer yang tersusun dari 2 molekul IgA yang di ikat menjadi suatu protein komponen sekretori (SC) (Holmes *et al*, 2002), selanjutnya IgA saliva terutama disintesis secara lokal di dalam kelenjar saliva oleh limfosit B dan limfosit B ini juga mensintesis rantai J sehingga terjadi dimerisasi molekul IgA dengan rantai J. Konsentrasi sIgA di rongga mulut selalu lebih besar daripada IgG. Dalam *whole saliva* konsentrasi sIgA, IgG dan IgM didapatkan masing-masing 20, 0,1 dan 0,1 mg/100ml. Beberapa fungsi sIgA (Bikandi *et al*, 2000) antara lain:

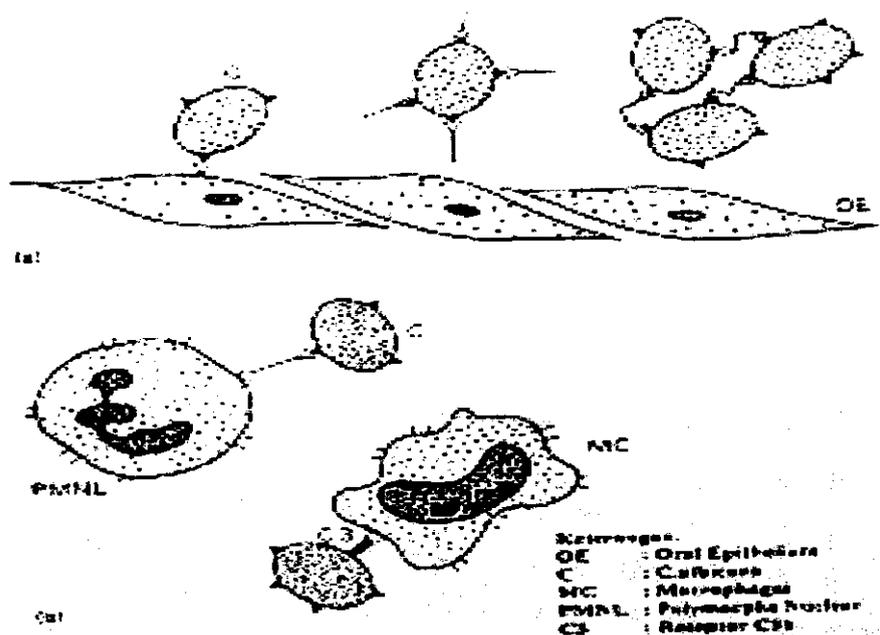
1. Netralisasi virus / mikro organisme
2. Netralisasi toksin
3. Menghambat aderensi atau pertumbuhan mikro organisme pada sel epitel
4. Eksklusi antigen dengan cara mencegah masuknya antigen ke dalam sistem imun sistemik

Limfosit, makrofag dan sel plasma ditemukan tersebar di antara asini kelenjar saliva. Sebagian besar sel plasma mengeluarkan IgM dan IgG sedangkan yang diproduksi oleh kelenjar saliva adalah sIgA.

Secara teoritis ke dua sistem imun yaitu imunitas seluler dan sekretori IgA berperan penting dalam perlindungan permukaan mukosa terhadap infeksi *C.albicans* . Studi pada hewan coba yaitu pada rhesus kera telah dibuktikan peran imunitas seluler pada infeksi *candida* yang kronis. Defisiensi IgA secara individu akan meningkatkan prevalensi infeksi *candida* dan pada penderita *candidosisi* kronis lebih dari 50% terjadi penurunan antibodi saliva IgA (Holmes *et al*, 2002). Studi pada

slgA dan IgG terhadap hambatan perlekatan candida, telah menunjukkan bahwa slgA mampu menghambat perlekatan *C. albicans* pada permukaan sel-sel epitel bukal dibandingkan dengan IgG.

Serum antibodi spesifik pada *whole cells* atau antigen *candida* terdapat dalam sera pada sebagian besar individu dan antigen *candida* dapat menstimulasi respons serum antibodi spesifik. Berdasar hal tersebut maka pengukuran antibodi untuk *C. albicans* digunakan sebagai skrining tes untuk keadaan imunodefisiensi humoral (Samaranayake *et al*, 1990). *C. albicans* mampu melekat pada sel-sel epitel mukosa rongga mulut dan vaginal, dimana perlekatannya pada mukosa rongga mulut dipengaruhi oleh *whole saliva* (Challachom *et al*, 1999). Beberapa strain *C. albicans* yang telah di isolasi dari kavitas rongga mulut memperlihatkan adanya produksi protease untuk IgA yang mampu mendegradasi IgA1, IgA2 dan slgA dengan cara memecah pada *inter α - chain disulphide bridges*. (Samaranayake *et al*, 1990). Keadaan ini memungkinkan karena strain tertentu dari *C. albicans* memproduksi beberapa protease yang patogenik untuk permukaan mukosa. Komponen antigenik utama dinding sel merupakan pecahan mannoprotein dan bentuk serotipe dari *C. albicans* bisa dibedakan dengan reaksi serologis.



Gambar 2.1 : Mekanisme hambatan perlekatan *C. albicans* oleh antibodi (Samaranayake *et al.*, 1990)

2.6 Immunocompromise

Sifat *immunocompromise* yang didapatkan karena kejadian sakit pada inang dapat menyebabkan keadaan cacatnya sistem imun, dan salah satu diantaranya adalah imunodefisiensi. *Immunocompromise* adalah keadaan di mana seseorang mempunyai satu atau lebih ketidaknormalan atau kecacatan pertahanan alami dan adaptif, sehingga jika terkena infeksi cenderung membahayakan kehidupan penderita (Sneller *et al.*, 1996). Faktor predisposisi *immunocompromise* adalah meliputi *cell-mediated immune suppression* dan *humoral immune defect* yang ke

duanya bisa diakibatkan oleh infeksi *C. albicans*. *Cell - mediated immunity* adalah penurunan jumlah maupun fungsi dari limfosit T (Goldsby *et al*, 2000))

Penderita dengan keadaan *immunocompromise* bisa terjadi penurunan respons imun yaitu imunodefisiensi atau meningkatnya respons imun yang ditandai dengan adanya hipersensitivitas pada penderita. Pada proses selanjutnya akan terjadi gangguan fungsi fagosit pada neutrofil, monosit dan makrofag. Pada penyakit dengan gangguan metabolisme berhubungan dengan adanya gangguan (abnormalitas) kemotaksis, aderensi, fagositosis dan bakterisidal. Keadaan *immunocompromise* yang lazim menyertai penderita DM dan yang akan mengakibatkan gangguan produksi sitokin sehingga terjadi suatu kelainan pada fungsi fagositosis polimorphonuklear (PMN) dan makrofag (Dubois *et al*, 1998; Herring *et al*, 2002). Pada keadaan ini terjadi penurunan jumlah dan aktivitas sel T (baik secara kuantitas maupun kualitas) (Elahi *et al*, 2000), sehingga terjadi gangguan pada fungsi pengenalan terhadap antigen.

Menurunnya kadar IgG dan IgA dalam serum penderita DM akan mengakibatkan menurunnya fungsi fagositosis. Selain itu terjadinya gangguan fungsi komplemen akan menyebabkan menurunnya fungsi kemotaksis, sehingga penderita DM menjadi rentan terhadap infeksi, salah satunya adalah infeksi oleh *C. albicans* (Casadevall, 2002). Penurunan fungsi sel imunokompeten pada penderita DM tersebut diperkirakan menyebabkan terjadinya penurunan pembentukan antibodi terhadap

antigen tertentu terhadap kejadian infeksi oleh *C.albicans.*, sehingga akan memudahkan terjadi ikatan *C.albicans* pada epitel mukosa. Ikatan ini dipengaruhi oleh molekul adesin yang terdapat pada dinding sel *Candida albicans*, kemudian diikuti dengan proses kolonisasi *Candida albicans* di epitel mukosa rongga mulut.

Keadaan *immunocompromise diseases* sangat berhubungan dengan penurunan produksi antibodi dan opsonisasi. Terjadi penurunan baik fungsi antibodi maupun kualitas pembentuk antibodi. Menurunnya aktivitas komplemen juga terjadi pada keadaan *immunocompromise* yang ditandai dengan adanya keterlambatan dalam proses penyelesaian reaksi komplemen akibat defisiensi komponen C5,C6,C7,C8 dan properdin (Goldsby *et al*, 2000)

Spesies *C.albicans* dapat mengikat komponen komplemen iC3b dan C3d, dimana reseptor untuk C3d telah diidentifikasi pada bentuk *Hyphae* bukan bentuk *yeast* dan merupakan 2 protein yaitu 62 kDa dan 70kDa. Terjadinya interaksi integrin like – lektin *C.albicans* dengan fragmen C3 karena D-mannose dan D-glukosa pada *C.albicans* mengkoting komplemen sehingga mengakibatkan hambatan terbentuknya *rosset* sel darah merah (Samaranayake *et al*,1990.) Walaupun didapatkan adanya reseptor-reseptor yang patogenik pada *C.albicans* dan terlibat dalam proses penyakit, akan tetapi sampai saat ini interaksi yang signifikan secara fungsional antara *C.albicans* dengan fragmen C3 belum diketahui dengan jelas.

Keadaan *immunocompromise* yang ada pada sel inang yang mengakibatkan terjadinya imunodefisiensi dan menyebabkan adanya gangguan produksi sitokin yang mengakibatkan gangguan fungsi fagositosis *Polymorphonuclear* (PMN) dan makrofag (Powderly, 1996; Dubois *et al*, 1998; Herring *et al*, 2002). Pada keadaan dimana terjadi defek dari fungsi PMN, maka neutrofil akan berperan sebagai pertahanan terhadap *C. albicans*, akan tetapi pada *oral candidosis* ini justru terjadi *neutrofil disfunction* dan defisiensi limfosit T (Elahi *et al*, 2000; Herring *et al*, 2002). Aktifitas PMN dikontrol oleh sitokin, dimana LGL (Large Granular Lymphocytes) akan mensekresi aktivator-aktivator yang poten bagi PMN untuk mengaktifkan dirinya sendiri sebagai anti jamur melalui produksi γ -interferon, α -interferon dan *Tumour Necrosis Factor* (Samaranayake *et al*, 1990), tetapi karena adanya defisiensi limfosit T maka mengakibatkan produksi sitokin oleh Th1 yaitu IL-12 dan IFN γ serta Th2 yaitu IL-4 dan IL-10 terjadi penurunan, sedangkan makrofag berperan penting sebagai *fungistatic* dan sebagai *fungicidal* (Elahi *et al*, 2000; Romani, 2002).

2.7 Diabetes Mellitus

Diabetes Mellitus (DM) adalah suatu sindroma khas ditandai dengan hiperglikemia kronik serta gangguan metabolisme karbohidrat, lemak dan protein yang dihubungkan dengan kekurangan relatif atau absolut sekresi insulin atau kerja insulin (Bennet, 1994).

Penyakit Diabetes Mellitus (DM) ditandai dengan hiperglikemia kronik sebagai akibat dari penurunan sekresi insulin dan atau kerja insulin

(Sutjahjo,1997). Terjadinya kerusakan pada sel β pankreas akan menyebabkan berkurangnya sekresi insulin. Kekurangan hormon insulin yang relatif atau absolut akan menyebabkan gangguan metabolisme glukosa yang pada akhirnya akan meningkatkan kadar glukosa darah atau hiperglikemia (Robbins *et al*,1999). Pada keadaan fisiologis, insulin diperlukan untuk merubah glukosa menjadi glikogen yang selanjutnya akan disimpan di dalam jaringan otot sebanyak 300-5000 g serta di dalam hati sebanyak 60-75 g. Berbagai pustaka melaporkan bahwa faktor yang berpengaruh terhadap kejadian infeksi *C.albicans* di rongga mulut adalah kadar glukosa darah yang tinggi dan tidak terkontrol. Pada DM dijumpai 2 tipe (Tjokroprawiro, 1997; Robbins *et al*, 1999) yaitu :

DM tipe 1 : disebut Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). Ditandai dengan hiperglikemia dan glukosuria, disertai gejala klinis akut (poliuria, polidipsia dan penurunan berat badan), dan ataupun gejala kronik. Gangguan primer terletak pada metabolisme karbohidrat, sedangkan gangguan sekunder pada metabolisme lemak dan protein. DM tipe 1 ini juga dipengaruhi oleh faktor genetik dan lingkungan. Gen yang diduga sebagai penyebab IDDM adalah gen diabetogenik (Suryohudoyo, 2000).

DM tipe 2 : disebut Non-Insulin Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM), dan terdapat pada 80%-90% penderita DM.

Batasan lain mengenai DM adalah suatu penyakit karena gangguan sistem metabolisme, dengan penyebab yang multifaktorial antara lain gangguan dari sistem genetik yang berinteraksi dengan lingkungan (Frizzel, 2000). Dari data epidemiologi dilaporkan bahwa angka kejadian DM semakin meningkat dari tahun ke tahun. Pada tahun 1995 dilaporkan jumlah pasien DM di dunia sekitar 135 juta orang. Tahun 2000 jumlah tersebut telah meningkat menjadi 175 juta dan pada tahun diperkirakan tahun 2025 akan mencapai 300 juta orang. Suatu peningkatan spektakuler yang oleh organisasi kesehatan sedunia (WHO) disebut sebagai ledakan pasien Diabetes Mellitus di abad 21. Diperkirakan 75% di antaranya berada di negara berkembang. Peningkatan tertinggi mungkin akan terjadi di kawasan Asean yaitu dari 33 juta penderita pada tahun 2000, menjadi 80 juta di tahun 2025. Di Indonesia dengan prevalensi 1.5 –2.3% jumlah penderita DM tahun 1998 lebih kurang sekitar 2.5 juta dan tahun 2000 kurang lebih 4 juta, dan tahun 2010 sekitar 5 juta (Tjokropawiro , 2000; Tjokropawiro, 2003).

Peningkatan jumlah penderita DM yang sangat mecolok di negara berkembang merupakan konsekuensi positif dari perbaikan ekonomi, perbaikan nutrisi, peningkatan pelayanan kesehatan dan peningkatan arus urbanisasi. Hal ini akan menimbulkan masalah baru bagi pemerintah Indonesia, yakni akan menimbulkan beban baru dari segi ekonomi Nasional karena memerlukan biaya pengobatan yang tinggi dan berlangsung seumur hidup. Tentunya keadaan tersebut akan sangat berdampak pada produktivitas sumber daya manusia, karena DM tidak

hanya terjadi pada usia lanjut saja tetapi juga pada usia produktif. Meningkatnya angka kejadian DM di Indonesia, akan berpengaruh pula pada peningkatan angka kejadian infeksi oleh jamur *C.albicans* khususnya *oral candidosis*, meskipun sampai saat ini belum ada data yang pasti tentang angka kejadian *oral candidosis*. Hampir semua penelitian epidemiologi menunjukkan bahwa ada korelasi antara kenaikan prevalensi *oral candidosis* dengan bertambahnya kejadian DM.

2.8 Diabetes Mellitus dan A1C

Haemoglobin A1C merupakan subklas dari A1 yang paling penting karena jumlahnya yang cukup banyak yaitu mencapai 70 % dari jumlah A1 (Robbins *et al*,1999). Haemoglobin A1C atau *Glycocyalted haemoglobin* adalah Hb yang mengalami glikosilasi yang berikatan dengan glukosa membentuk glikohaemoglobin. Dengan demikian erat kaitannya dengan Diabetes mellitus, sehingga digunakan sebagai parameter untuk mengetahui status DM penderita (Widjaja,1997). Pada penderita DM ditemukan kadar A1C meningkat 3 X dari kadar normal (kadar normal 3-6%). Kadar A1C tidak dipengaruhi oleh umur penderita, lama penyakit, berat badan, glukosa darah sesaat, penebalan membran basalis, makanan yang baru dimakan, latihan fisik maupun obat hipoglikemik oral (Kennedy, 1989). Berdasarkan sifat tersebut maka A1C dapat berfungsi sebagai :

1. Tes yang potensial untuk diagnosis DM.

2. Indeks dari status DM, yaitu dengan mengetahui kadar A1C dapat diketahui kadar darah rerata.
3. Model untuk memepelajari kelainan yang terjadi pada DM yang tidak terkontrol dalam jangka waktu yang lama.
4. Indikator untuk memonitor metabolisme karbohidrat dan insulin.

Interpretasi pengendalian DM dapat diketahui menurut kriteria kadar A1C, dan kadarnya dapat diperiksa dengan metode *ion exchange chromatography*, *colorimetry*, dan *immunoassay RIA* (Soedewo, 1986). Di Indonesia kadar A1C didasarkan pada hasil **Konsensus Pengelolaan Diabetes Mellitus di Indonesia (2002)** sebagai berikut :

Pengendalian baik	: < 6,5 %
Pengendalian sedang	: 6,5% – 8 %
Pengendalian buruk	: > 8 %

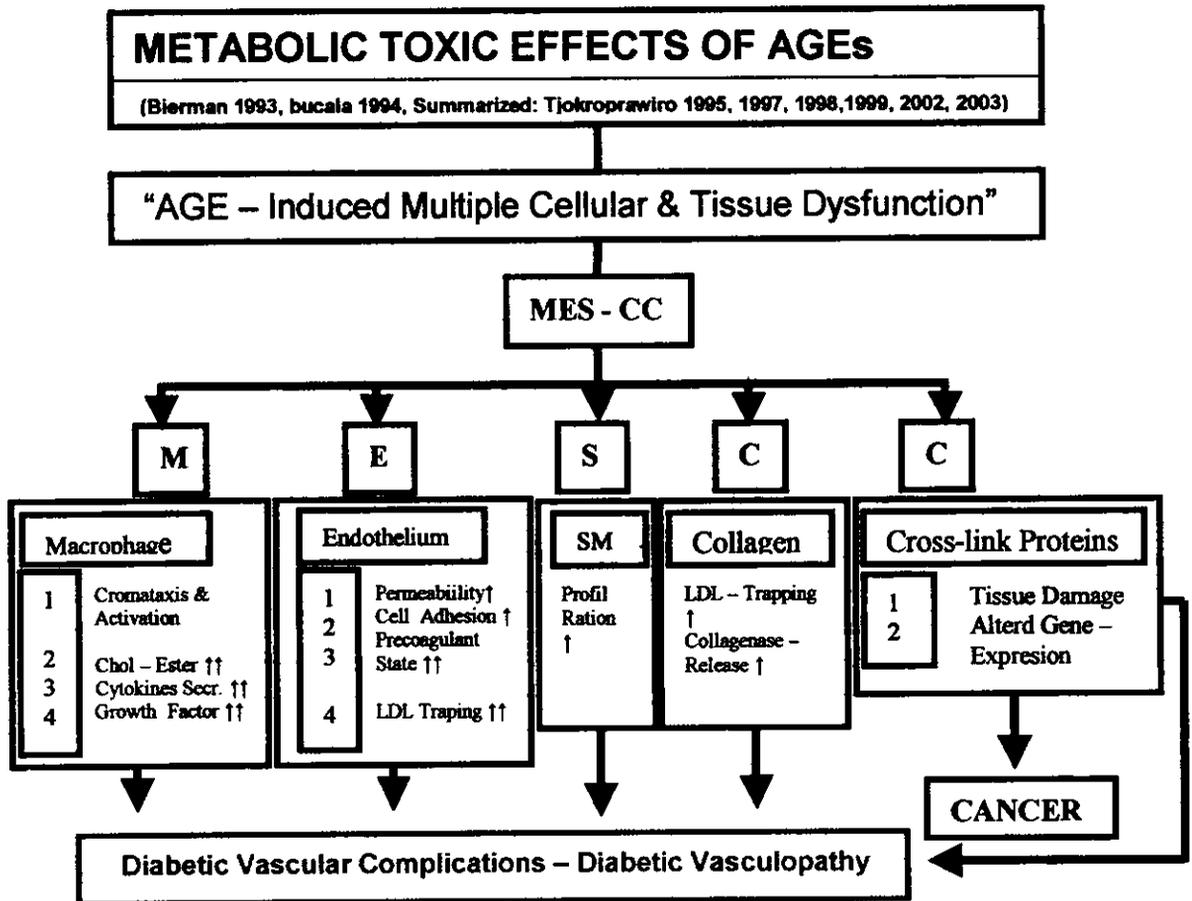
Proses glikosilasi pada umumnya terbagi menjadi dua yaitu glikosilasi yang terjadi dengan bantuan enzim dan tanpa bantuan enzim. Protein setelah bereaksi dengan karbohidrat terutama glukosa, akan mengalami perubahan sifat baik sifat fisik maupun sifat kimia. Proses glikosilasi yang terjadi pada penderita Diabetes Mellitus adalah reaksi glikosilasi non-enzimatik, yaitu ikatan antara molekul protein pada reaksi lisin dan sisa amino N-terminal dengan kadar glukosa yang tinggi. Keadaan ini akan meningkatkan perubahan struktur dan fungsi sel (Basta, 1996; Robbins *et al*, 1999).

Pada proses glikosilasi yang tinggi akan menghasilkan reaksi kovalen secara spontan yaitu *Advance Glycosylation End Product (AGE)*.

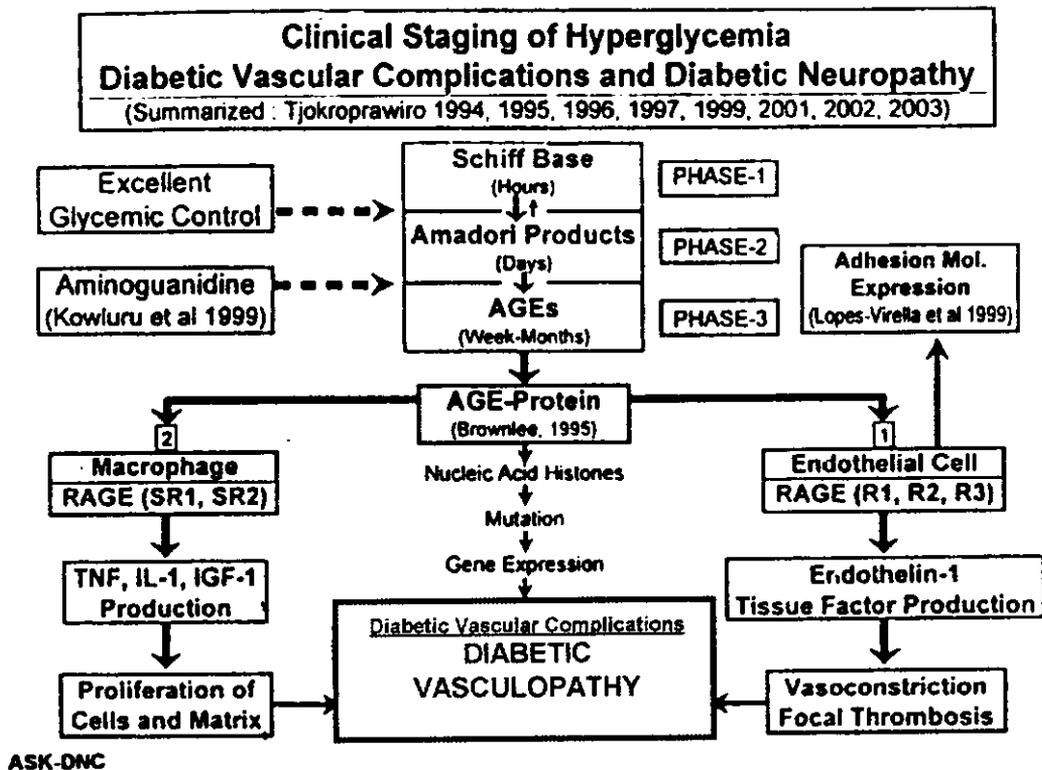
AGE merupakan hasil reaksi biokimia abnormal yang terjadi pada penderita DM (Basta, 1996; Tjokroprawiro, 2000). Peningkatan proses glikosilasi yang tinggi akan mengganggu fungsi protein seperti halnya efek pada aksi enzim, afinitas reseptor ligand atau tingkat katabolisme protein. Selain itu, peningkatan glikosilasi juga merupakan predisposisi kerusakan oksidasi protein dan menyebabkan gangguan fungsi oksidasi. Dengan demikian maka pengaruh glikosilasi maupun oksidasi dapat menyebabkan protein bersifat imunogenik (Robbins *et al*, 1999). Hal ini karena AGE yang terbentuk akan bereaksi dengan semua jenis protein dalam tubuh termasuk reseptor makrofag dan reseptor AGE pada endotel yang pada akhirnya memicu perkembangan komplikasi pada DM (Tjokroprawiro, 1997). Hiperglikemia merupakan kejadian awal dari disfungsi endotel, yang kemudian berkembang menjadi penyebab komplikasi menahun dari DM karena terbentuknya AGE (*Advanced Glycocolated End Products*) (Tjokroprawiro, 2000). Tindakan yang paling tepat untuk mencegah terjadinya proses yang irreversible (terbentuk AGE), adalah dengan menurunkan kadar glukosa darah secepat mungkin.

Penyakit Diabetes Mellitus ditandai dengan hiperglikemia kronik sebagai akibat dari penurunan sekresi insulin dan atau penurunan sensitifitas sel target terhadap insulin (*insulin resistance*), yang keduanya mengakibatkan gangguan metabolisme glukosa dan hiperglikemia (Robbins *et al*, 1999). Terjadinya kerusakan pada sel β pankreas akan menyebabkan berkurangnya sekresi insulin. Kekurangan hormon insulin yang relatif atau absolut akan menyebabkan gangguan metabolisme

glukosa yang pada akhirnya akan meningkatkan kadar glukosa darah atau hiperglikemia (Robbins *et al*, 1999). Berbagai pustaka melaporkan bahwa faktor yang berpengaruh terhadap kejadian infeksi *C.albicans* di rongga mulut adalah kadar glukosa darah yang tinggi dan tidak terkontrol.

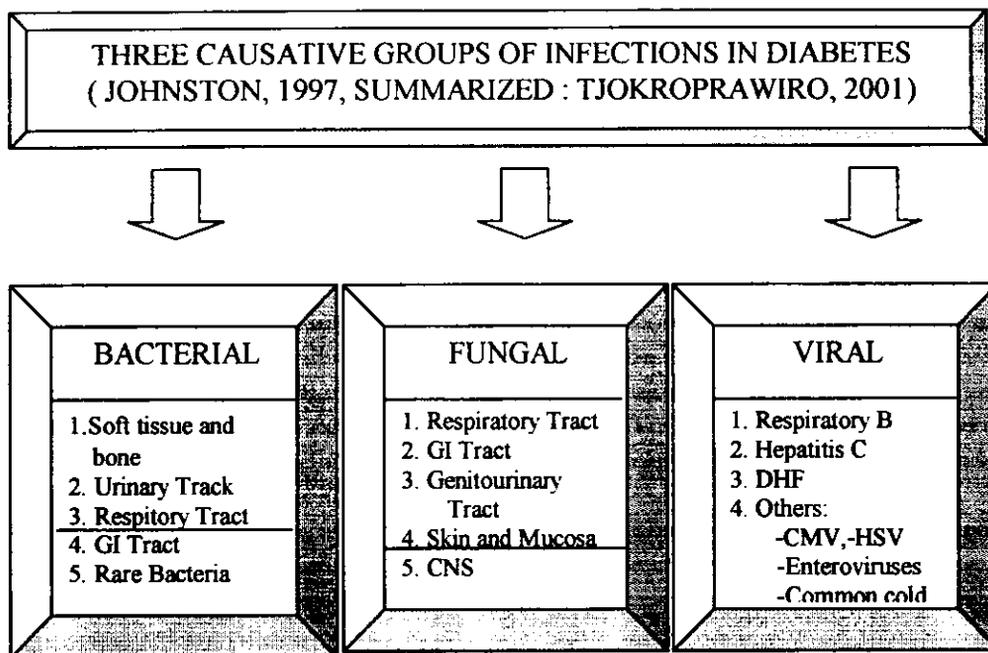


Gambar 2.2 : Skema Sifat Metabolik AGE (Tjokropawiro , 2003)

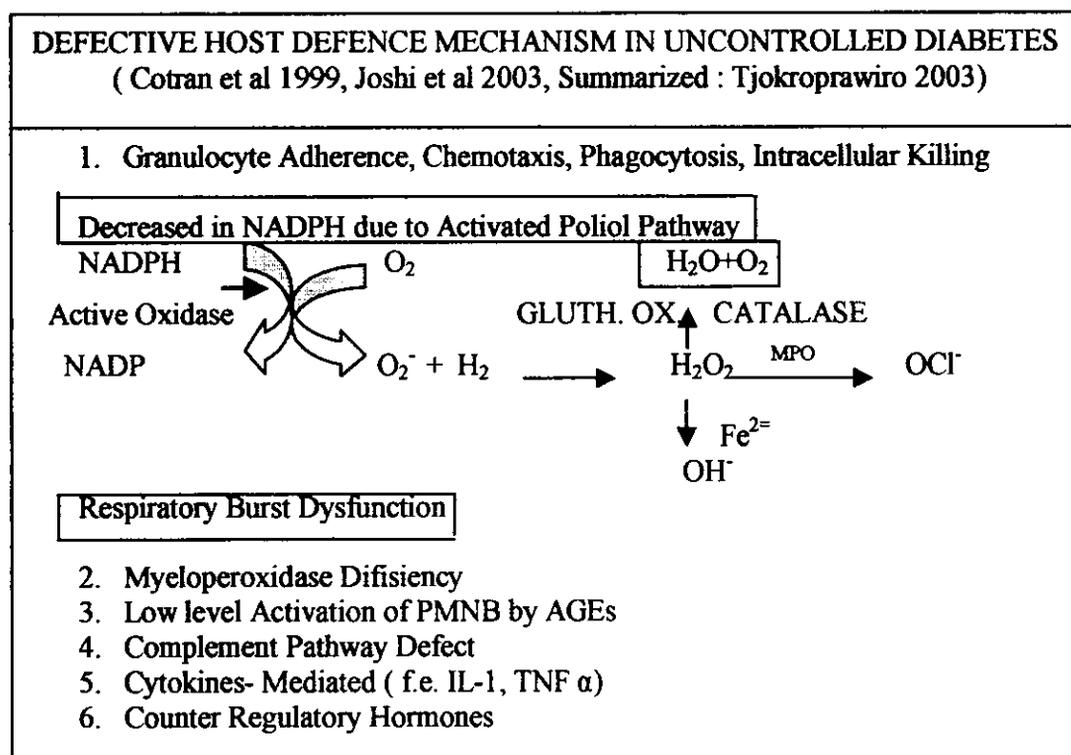


Gambar 2.3 : Fase AGE Pada DM (Tjokropawiro, 2003)

Proses glikosilasi non-enzimatik menghasilkan *Schiff Base* yang reversible (berlangsung beberapa jam), selanjutnya membentuk *Amadori Product* (berlangsung beberapa hari) dan kemudian *Amadori Product* akan berikatan dengan protein lainnya membentuk AGEs. AGEs yang terbentuk akan mengaktifasi sel endotel dan makrofag untuk memproduksi sitokin proinflamatori. Akumulasi AGEs pada plasma dan jaringan pada penderita DM dapat meningkatkan permeabilitas vaskuler, menghancurkan serat kolagen dan jaringan ikat. Terbentuknya AGEs yang *irreversible* akan mengakibatkan terjadinya berbagai komplikasi DM.



Gambar 2.4. Infeksi yang terkait Diabetes (Tjokroprawiro,2001)



Gambar 2.5. Gangguan Mekanisme Sistem Pertahanan inang (Tjokroprawiro, 2003)

Menurut Tjokroprawiro (2003) terdapat 3 kelompok infeksi yang terkait infeksi Diabetes Mellitus yaitu bakteri, jamur dan virus. Berbagai macam jamur yang dapat menginfeksi mukosa rongga mulut penderita DM antara lain adalah dari spesies *candida*. Akan tetapi spesies *candida* yang paling dominan menimbulkan infeksi sebagai salah satu komplikasi pada penderita DM adalah *C.albicans*, yaitu jamur yang bersifat patogen oportunistik. *C.albicans* ini dapat menginfeksi pada berbagai mukosa antara lain pada *respiratory tract*, *G I tract*, *Genitourinary tract*, *skin* dan mukosa rongga mulut.

Pada DM yang tidak terkontrol tingginya hiperglikemia dapat mengganggu berbagai fungsi neutrofil dan makrofag. Gangguan fungsi tersebut meliputi 4 proses yaitu : proses *chemotaxis*, *Granulocyte adherence*, *phagocytosis* dan *intracellular killing*. Kelainan pada ke 4 proses tersebut di atas karena adanya radikal bebas O_2^- yang berasal dari proses akibat penurunan NADPH karena adanya aktivasi *Polioi Pathway*, akibatnya terjadi *Respiratory Burst Dysfunction*. Keadaan ini menyebabkan terjadinya gangguan pada sistem ketahanan tubuh inang pada DM tidak teregulasi, yaitu gangguan pada *intracellular killing* terhadap bakteri maupun jamur penyebab infeksi, *Complement Pathway* serta pada *Cytokines- Mediated* antara lain $IL-1\beta$ dan $TNF-\alpha$ sebagai sitokin proinflamatori. Dengan demikian maka pada waktu terjadi infeksi pada DM tidak teregulasi, maka kadar ke dua sitokin proinflamatori meningkat. Ke dua sitokin tersebut akan menghambat aktivitas tyrosin

kinase dari reseptor insulin sehingga terjadi resistensi insulin (Tjokroprawiro, 2003).

2.9 *Polimerase Chain Reaction (PCR)*

Teknik PCR pertama kali dikembangkan oleh Kary Mullis pada tahun 1984 untuk mendapatkan amplifikasi dari suatu segmen DNA tertentu yang dibatasi oleh 2 oligonukleotida sintetik yang disebut primer. Teknik ini timbul karena adanya kemampuan untuk memurnikan DNA polimerase dan mensintesis oligonukleotida DNA secara kimia, sehingga memberi peluang untuk melakukan kloning pada suatu urutan spesifik DNA tanpa membutuhkan sel hidup (Stryer, 1995; Goldsby *et al*, 2000). Prinsip kerja PCR adalah sama dengan proses replikasi DNA secara *in vivo*. Terdapat 3 tahap reaksi yang berbeda dalam PCR, yaitu: denaturasi, annealing, dan polimerasi.

Proses PCR berlangsung dalam beberapa siklus, tergantung pada enzim polimerase, jumlah template, dan bahan-bahan lain dari komponen-komponen yang dibutuhkan dalam proses PCR antara lain DNA sample, dNTP, oligonukleotida primer yaitu nukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerisasi, enzim DNA polimerase untuk mengkatalis reaksi pemanjangan primer, ddH₂O, dan buffer PCR sebagai pelarut (Innis, 1990).

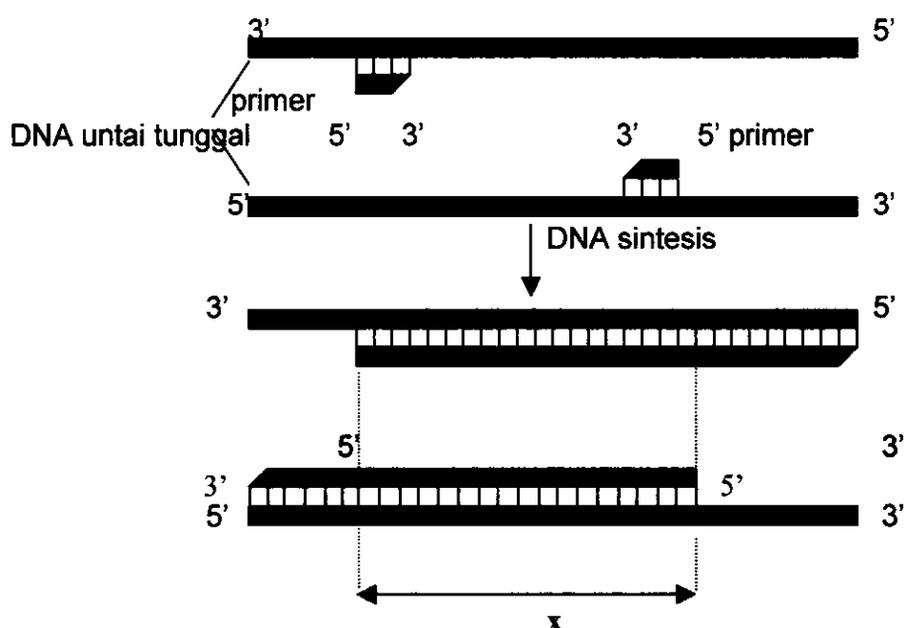
Prinsip dasar reaksi yang terjadi adalah denaturasi DNA *template* menjadi bentuk untai tunggal, hibridisasi primer pada DNA *template*, dan sintesis segmen DNA menggunakan deoxynucleoside triphosphates

(dNTPs) dan DNA polimerase. Reaksi ini dilakukan secara berurutan dan diulang hingga beberapa siklus, biasanya 25–40 siklus (Innis & Gelfand, 1990; Lodish *et al*, 2000)). Secara teoritis, dari sebuah DNA template dalam 30 siklus akan diperoleh 268.435.456 fragmen target yang merupakan produk PCR (Old & Primrose, 1994). Pada awal metode PCR ini dikembangkan, enzim yang digunakan adalah DNA Polimerase Klenow, sehingga pada saat mengalami pemanasan enzim ini menjadi rusak, oleh karena itu harus ditambahkan enzim baru untuk siklus berikutnya.

Terobosan baru timbul setelah diperkenalkan *Taq* DNA polimerase dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Akibatnya pada setiap pergantian siklus tidak perlu ditambahkan DNA polimerase yang baru, sehingga dapat dilakukan otomatisasi PCR dalam *thermal cycling programme*. Namun *Taq* DNA polimerase ini tidak memiliki 3'-5' *proofreading exonuclease*, sehingga dapat terjadi kesalahan pasang pada saat amplifikasi (Dieffenbach *et al*, 1995). Oleh karena itu, sedang dicari alternatif menggunakan bakteri lain yaitu *Thermococcus litoralis* (Vent™) (Roy *et al.*, 1991) dan *Pyrococcus furiosus* (Ruiz *et al.*, 1997).

Pemilihan *primer* sangat penting untuk keberhasilan PCR. *Primer* didesain agar dapat berkomplemen dengan cetakan DNA spesifik yang akan diperbanyak. *Primer* yang baik harus berhibridisasi secara efisien dengan sekuen DNA yang menjadi target tanpa melakukan hibridisasi dengan sekuen lain pada DNA yang sama. Beberapa acuan yang dipergunakan untuk memilih *primer* Biasanya panjang *primer* berkisar 18

- 28 nukleotida dengan komposisi G + C sekitar 50% – 60%. Semakin panjang *primer* semakin besar kemungkinan terjadi hasil yang tidak spesifik. Sebaiknya komposisi GC pada primer sama dengan komposisi GC pada cetakan DNA. Komposisi GC yang lebih dari 3 pada ujung 3' dari primer akan menyebabkan *mispriming* pada DNA yang kaya akan GC. Panjang primer dan komposisi GC akan mempengaruhi suhu untuk *annealing*. Suhu *annealing* biasanya beberapa derajat dari T_m (suhu disosiasi dari *primer*). Penentuan T_m adalah sebagai berikut (Dieffenbach *et al*, 1995) :

$$T_m = 4 (G+C) + 2 (A+T)$$


Gambar 2.6 : Permulaan amplifikasi pada suatu urutan nukleotida spesifik secara *in vitro* menggunakan teknik PCR (Stryer, 1995).

Ket: x = merupakan panjang produk PCR yang dihasilkan.

Hal yang perlu diketahui terlebih dahulu sebelum melakukan PCR adalah urutan nukleotida fragmen target yang akan diamplifikasi agar

dapat dirancang 2 buah primer yang akan digunakan. Masing-masing primer adalah komplemen dari fragmen target DNA dan merupakan pembatas bagian yang akan diamplifikasi. Biasanya panjang primer antara 17-30 nukleotida (Old & Primrose, 1994; Goldsby *et al*, 2000)) dan panjang fragmen DNA yang diamplifikasi adalah jarak antara ujung 5' primer *sense* hingga ujung 5' primer *antisense*.

Dalam melakukan PCR, tidak ada satu protokol yang dapat digunakan dalam berbagai situasi. Akibatnya, setiap aplikasi baru dari PCR harus dilakukan optimasi terlebih dahulu. Kegagalan yang sering timbul adalah hasil yang tidak terdeteksi, hasil yang diharapkan sangat sedikit, serta adanya latar belakang yang tidak spesifik karena terjadinya *mispriming* atau *misextension* dari primer yang digunakan (White *et al* , 1995; Ruiz *et al.*, 1997). Oleh karena itu penentuan suhu dan waktu reaksi serta banyaknya siklus yang dilakukan amat penting dan diperlukan optimasi.

Proses reaksi pertama kali yang dilakukan pada waktu PCR adalah memisahkan dua *strand* genomik DNA (*denaturation*) dengan pemanasan 95°C selama 30 detik atau 97°C selama 15 detik. Tidak sempurnanya proses denaturasi DNA ini akan menyebabkan terjadinya "*snap back*" dan menyebabkan kegagalan PCR. Bila fragmen DNA memiliki jumlah G + C yang lebih tinggi dari jumlah A + T, maka harus dipertimbangkan untuk menaikkan suhu denaturasi, karena G dan C terikat oleh 3 ikatan hidrogen, sedangkan A dan T hanya terikat oleh 2 ikatan hidrogen, sehingga untuk memisahkan ikatan GC diperlukan energi yang lebih besar

dibandingkan AT. Akan tetapi pemanasan yang tinggi akan menyebabkan turunnya aktifitas *Taq* DNA polimerase. Waktu paruh *Taq* DNA polimerase adalah 2 jam pada suhu 92,5° C, 40 menit pada suhu 95°C dan 5 menit pada suhu 97,5° C.

Langkah kedua yaitu hibridisasi primer pada *strand* DNA *template* untai tunggal atau biasa disebut proses *annealing*. Proses ini merupakan langkah yang sangat kritis, oleh karena itu diperlukan temperatur dan waktu yang tepat agar diperoleh hasil yang memuaskan. Temperatur yang terlalu tinggi menyebabkan primer tidak dapat melekat pada *template*, sebaliknya temperatur yang terlalu rendah menyebabkan primer melekat pada tempat yang tidak spesifik sehingga diperoleh banyak band dan hasil yang sedikit. Temperatur *annealing* yang digunakan biasanya 5°C dibawah T_m (*melting point temperature*) (Innis & Gelfand, 1990), sedangkan besarnya T_m dihitung dengan persamaan $4^{\circ}\text{C} \times (\text{jumlah G dan C}) + 2^{\circ}\text{C} \times (\text{jumlah A dan T})$ dari sekuen primer yang telah dirancang. Dalam praktek harga T_m ini dipertimbangkan antara 55° - 80° C (Innis & Gelfand, 1990; Coen, 1995).

Setelah terjadi hibridisasi primer pada DNA *template*, maka langkah berikutnya adalah *primer extension* yaitu sintesis fragmen DNA produk oleh enzim DNA polimerase dimulai dari ujung 3' masing-masing primer dengan bahan baku dATP, dCTP, dTTP, dan dGTP. Meskipun ekstensi primer ini merupakan langkah tersendiri, namun selama *annealing* juga terjadi ekstensi karena *Taq* DNA polimerase bekerja pada rentang

temperatur yang lebar, namun suhu yang optimum adalah 72 °C. Waktu yang dibutuhkan tergantung pada panjang dan konsentrasi DNA target karena pada suhu optimum ini kecepatan sintesisnya sekitar 35-100 nukleotida per detik tergantung pada bufer, pH, konsentrasi garam, dan keadaan *template* DNA (Innis & Gelfand, 1990). Biasanya waktu ekstensi 1 menit pada 72 °C sudah cukup baik untuk produk sampai dengan 2 kilobasa (Innis & Gelfand, 1990; Bloom, 1995).

2.10 Enzyme – Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA adalah salah satu metode untuk mengukur secara kualitatif maupun kuantitatif kadar antigen atau antibodi dengan menggunakan enzim sebagai label (Goldsby, 2000). Dewasa ini metode ELISA merupakan metode yang banyak digunakan di laboratorium dan dalam berbagai penelitian di bidang imunologi. Dibanding metode RIA (*Radioimmuno Assay*) maka ELISA mempunyai kelebihan antara lain :

1. Memiliki sensitivitas yang tinggi
2. Lebih spesifik
3. Peralatan yang dibutuhkan relatif lebih sedikit

Pembagian pokok / secara garis besar metode ELISA dibagi berdasarkan bahan yang dilabel terdiri dari (Handoyo ,1996) :

1. Pelabelan pada antigen yaitu pada Kompetitif ELISA
2. Pelabelan pada antibodi yaitu *Double Antibodi Sandwich* ELISA
3. Pelabelan pada anti-immunoglobulin yaitu meliputi :

- 3.1. ELISA tidak langsung (*indirect*) untuk penentuan antibodi
- 3.2. *Double antibody sandwich anti globulin* ELISA (*indirect sandwich ELISA*) untuk penentuan antigen
- 3.3. *Indirect inhibition* ELISA untuk penentuan antigen

Prinsip dasar ELISA Tidak Langsung.

Antigen yang terikat pada fase padat direaksikan dengan antibodi yang akan diukur, dan selanjutnya ditambahkan antibodi sekunder (konjugat) yang berlabel dengan enzim tertentu. Kemudian ditambahkan substrat dan hasilnya memberikan penampakan warna yang diukur dengan *micro ELISA reader* (Ausubel, 1995; Handoyo, 1996)

Sensitivitas uji ELISA dipengaruhi oleh :

1. Sifat dan berat molekul antigen
2. Afinitas reaksi antigen – antibodi
3. Perbandingan kadar antigen – antibodi

Faktor yang mempengaruhi spesifitas :

1. Kemurnian antigen
2. Profil spesifitas antisera
3. Derajat pengenalan antara konjugat enzim dan lawan imunnya

2.11 *Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD)*

Random Amplified Polymorphic DNA's (RAPD) adalah amplifikasi DNA secara *In vitro* dengan PCR yang bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Polimorfisme adalah perbedaan bentuk

dari struktur dasar yang sama (Kirby, 1990). Hal ini dapat terjadi karena adanya perubahan susunan pasangan basa yang disebabkan oleh penyisipan atau penambahan pasangan basa atau pengurangan basa tertentu (Pasternak, 1994). Metode ini dikembangkan oleh Welsh, McClelland and Williams pada tahun 1990 dengan cara mengkombinasikan teknik PCR menggunakan primer-primer dengan sekuen acak untuk keperluan amplifikasi lokus acak dari genom (Rafalski *et al.*, 1991).

Salah satu variasi yang telah dikembangkan dari metode dasar PCR adalah penggunaan penanda molekuler '*Random Amplified Polymorphic DNA's*' (RAPD) yang pertamakali dikembangkan oleh Williams dkk pada tahun 1990 dan Welsh & McClelland pada tahun 1990 (Widodo, 2003). Teknik RAPD yang merupakan modifikasi teknik PCR, hanya menggunakan satu primer pendek yang terdiri atas 10 basa. Metode ini pertamakali dikembangkan oleh Saiki *et al.*, pada tahun 1985

Metode RAPD mempunyai keunggulan pada kesederhanaan tekniknya dan cepat pengerjaannya. Teknik analisa RAPD mempunyai beberapa kelebihan seperti lebih cepat dalam pelaksanaannya, hanya butuh sampel DNA sedikit (0,5-50 nm), tidak membutuhkan radioisotop. Selain itu RAPD tidak membutuhkan informasi sekuen DNA lebih dulu, prosedurnya lebih sederhana dan jumlah sampel yang banyak dapat diproses dengan cepat (Faqih, 2004).

Selain keunggulan seperti tersebut di atas menurut Waugh and Powel (1992) menjelaskan bahwa terdapat kelemahan dalam teknik

RAPD yaitu sulit mendeteksi perubahan yang kecil pada struktural DNA (gen), kecuali jika menggunakan lebih dari 500 jenis primer. Dan efisiensi prosedur RAPD ditentukan oleh teknik untuk ekstraksi DNA dan amplifikasi PCR. Keberhasilan amplifikasi DNA dengan teknik RAPD sangat tergantung pada DNA target, panjang dan sekuen primer, unsur kimia utama (khususnya Mg^{2+}), konsentrasi primer, konsentrasi *template*, serotipe dan konsentrasi enzim polimerase, temperatur denaturasi, temperatur *annealing*, waktu dan temperatur *ekstension*, jumlah siklus amplifikasi dan prosedur penyusunan gel (Singer *et al.*, 1999).

PCR berdasar primer-primer tertentu yang telah dielektroforesis merupakan gambaran dari struktur molekul DNA yang digunakan sebagai *template* (Brown, 1995 dalam Sukartini, 2001).

Dasar dari teknik PCR-RAPD adalah penggunaan *primer* yang berupa oligonukleotida pendek (10 mer) dengan urutan basa secara acak untuk mengamplifikasi sekuen target secara acak pula dari suatu *template* DNA yang kompleks (Pammi *et al.*, 1994). Penanda RAPD dapat digunakan untuk membuat peta sifat dan sidik jari individu (Rafalski *et al.*, 1991). Informasi tentang hubungan genetik diantara individu dalam dan antara spesies mempunyai beberapa kegunaan penting bagi perbaikan suatu organisme.

Dari hasil penelitian pada *candida spp* tentang hubungan kekerabatan berdasarkan RAPD, disebutkan bahwa metode ini dapat dikatakan sederhana, cepat, dan akurat untuk karakterisasi sample. Amplifikasi DNA dengan teknik ini memberikan kelebihan sangat berarti

secara teknis dibandingkan metoda-metoda lainnya. Teknik PCR ini memanfaatkan dua sifat utama DNA yaitu komplementasi basa-basanya (A=T; G=C) dan anti paralelisme dari kedua rantai DNANYA.

RAPD menghasilkan data yang tidak spesifik dan tidak kodomain, namun karena kemudahan dan kecepatan dalam menganalisa data, maka teknik ini banyak digunakan (Waltimo,2001; Faqih,2004). Analisis dapat dilakukan dengan mengamplifikasi DNA dengan *random primer*. Adanya polimorphic DNA dapat dideteksi di bawah cahaya ultra violet setelah sebelumnya gel elektroforesis diberi Etidhium bromida (Etbr) sehingga menimbulkan pendar. Demikian pula mutasi yang terjadi pada tingkat DNA genom dapat terdeteksi dengan teknik RAPD dengan menggunakan berbagai jenis *arbitrary primer*. Semakin banyak jenis primer yang digunakan akan menambah besar kemampuan mendeteksi perubahan yang kecil dari pasangan basa DNA genom (Kirby, 1990).

Dalam mempelajari tingkat optimasi hasil keragaman genetik, pendugaan tentang hubungan genetik akan sangat berguna untuk identifikasi genotipe dan mengurangi jumlah individu yang dibutuhkan untuk pengambilan sampel dengan kisaran keragaman genetik yang luas. Marka RAPD dapat digunakan untuk membuat peta kaitan genetik dan untuk *finger printing* genom suatu spesies dan untuk mempelajari genetika populasi (Widodo,2003).

Teknik RAPD yang merupakan modifikasi teknik PCR, hanya menggunakan satu primer pendek yang terdiri atas 8 basa. Metode ini pertamakali dikembangkan oleh Saiki *et al.*, pada tahun 1985.

Oligonukleotida primer yaitu nukleotida pendek untuk mengawali reaksi polimerisasi, enzim DNA polimerase untuk mengkatalis reaksi pemanjangan primer, ddH₂O, dan buffer PCR sebagai pelarut (Innis, 1990). PCR sangat peka dimana satu molekul DNA tunggal dapat diampifikasi, selanjutnya dengan pewarnaan *etidium bromide* dan penyinaran lampu ultra ungu akan ditampakkan sebagai pita-pita pada gel agarosa. *Polimerase Chain Reaction* (PCR) berperan penting dalam bidang biologi molekuler dan sejak metode PCR ini dikembangkan, telah banyak merevolusi beberapa teknik biologi molekuler standar, dengan cara memodifikasi rancangan prosedur aslinya untuk kemudian disesuaikan dengan tujuan yang diinginkan. Salah satu variasi yang telah dikembangkan dari metode dasar PCR adalah penggunaan penanda molekuler '*Random Amplified Polymorphic DNA's*' (RAPD) yang pertamakali dikembangkan oleh Williams dkk pada tahun 1990 dan Welsh & McClennand pada tahun 1990 (Widodo,2003).

Komponen Reaksi PCR-RAPD

Komponen utama dalam suatu reaksi PCR-RAPD adalah DNA template, primer, enzim *polimerase*, dNTP, dan ion magnesium. Buffer standar dalam reaksi PCR-RAPD biasanya mengandung 50 mM KCL, 10 mM Tris Cl dan 1,5 mM MgCl₂.

DNA target atau Sampel DNA yang ingin diketahui urutan basanya diisolasi dari jaringan yang dipilih dengan metode isolasi tertentu. Konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi bergantung pada

kuantitas DNA yang dapat diukur dengan alat spektrofotometer atau alat lainnya.

Konsentrasi dNTP yang direkomendasikan adalah 1,5 mM untuk setiap campuran reaksi. Konsentrasi dNTP optimal untuk reaksi PCR bergantung pada konsentrasi $MgCl_2$, konsentrasi primer, kemurnian reaksi, panjang dari produk amplifikasi, dan jumlah dari siklus PCR (Pasternak and Bernard, 1994). Primer merupakan suatu oligonukleotida dengan urutan basa yang telah diketahui, merupakan komponen reaksi yang paling menentukan keberhasilan suatu proses amplifikasi. Secara teori, jumlah fragmen yang diamplifikasi dalam suatu reaksi PCR-RAPD tergantung pada panjang primer dan ukuran dari genom target serta kesesuaian urutan basa primer dan genom target. Untuk sebagian organisme biasanya digunakan primer dengan 9-10 nukleotida (Waugh and Powel, 1992).

Pada proses penempelan primer, ion Mg^{2+} sangat berpengaruh terhadap disosiasi pita template dan hasil amplifikasi, spesifitas hasil dan aktifitas enzim *Taq polimerase*. Pada umumnya konsentrasi Mg^{2+} yang lebih tinggi akan meningkatkan hasil amplifikasinya, tetapi menurunkan spesifitas reaksi dan meningkatkan *primer dimers*. Konsentrasi Mg^{2+} yang lebih rendah meningkatkan spesifitas tetapi menurunkan hasil.

Tahapan Reaksi PCR-RAPD

Tahapan di dalam proses reaksi PCR-RAPD adalah denaturasi template, penempelan primer pada sekuen target, dan perpanjangan primer yang telah menempel oleh aktifitas enzim *polimerase*.

Denaturasi adalah proses terurainya ikatan ganda DNA template karena pemanasan 90°C-95°C. Untuk DNA target dengan komposisi G+C yang tinggi diperlukan temperatur yang lebih tinggi atau waktu yang lebih lama. Satu segmen DNA pendek yang disebut primer dan diduga merupakan komplemen dari urutan DNA target, di *annealing* (ditempel) pada sampel target dengan cara penurunan temperatur sekitar 40°C bergantung pada panjang primer, selama lebih kurang 2 menit. Selanjutnya dengan menaikkan temperatur ke 70°C -75°C akan mengaktifkan *Taq-DNA polimerase* untuk proses perpanjangan *annealed prime*.

BAB 3
KERANGKA KONSEPTUAL
DAN HIPOTESIS

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konseptual Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan dengan berdasarkan pada konsep teknologi biologi molekuler mengenai *genotyping*, *serotyping*, serta keberadaan gen SAP1 dan SAP3 pada *C.albicans* untuk memahami variabilitas (keragaman) genetik *C.albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non-DM yang terinfeksi oleh *C.albicans*

Pada penderita DM lasimnya berada dalam keadaan *immunocompromise* yang dapat menyebabkan terjadi cacatnya sistem imun dan salah satu kelainan diantaranya adalah keadaan imunodefisiensi. Akibat dari inang yang mengalami imunodefisiensi, maka terhadap suatu kejadian infeksi akan menghasilkan suatu respons imun yang abnormal, sehingga respons imunologis terhadap infeksi sangat berkurang. Salah satu *agent* yang bisa menimbulkan infeksi dalam rongga mulut pada penderita DM adalah *C.albicans*. Timbulnya infeksi oleh *C.albicans* pada penderita DM dan non-DM, menurut hipotesis yang dikemukakan dipengaruhi oleh berbagai faktor yaitu :

1. Perbedaan serotipe dan genotipe *C.albicans*
2. Keberadaan gen SAP 1 dan SAP3 (*Secretory Aspartyl Proteinase*) yang menghasilkan enzim protease SAP1 dan SAP3
3. Respons imunologik pada inang.

Penyakit Diabetes Mellitus (DM) ditandai dengan hiperglikemia kronik sebagai akibat dari penurunan sekresi insulin dan atau kerja insulin (Sutjahjo, 1997; Robbins *et al*, 1999; Pranoto dan Tjokroprawiro, 2004). Keadaan hiperglikemia ini terjadi akibat adanya kerusakan pada sel β pankreas atau berkurangnya sekresi insulin, sehingga akan menyebabkan gangguan metabolisme glukosa yang akhirnya akan meningkatkan kadar gula darah atau terjadinya hiperglikemia (Robbins *et al*, 1999; Tjokroprawiro, 2003). Hiperglikemia merupakan kejadian awal dari peristiwa disfungsi endotel, yang kemudian berkembang menjadi penyebab adanya komplikasi menahun pada DM karena terbentuknya AGE (*Advanced Glycosylated End Products*) (Tjokroprawiro, 2000; Tjokroprawiro, 2003). Salah satu komplikasi yang terjadi di mukosa rongga mulut penderita DM pada kondisi AGE ini adalah infeksi oleh *C. albicans*.

Pada kondisi tersebut dan ditunjang dengan *immunocompromise* yang menyertainya, maka semakin memperparah penderita DM dan mengakibatkan gangguan produksi sitokin sehingga terjadi suatu kelainan pada fungsi fagositosis polimorfonuklear (PMN) dan makrofag (Dubois *et al*, 1998; Herring *et al*, 2002). Kondisi tersebut mengakibatkan terjadi penurunan jumlah dan aktivitas sel T baik secara kuantitas maupun kualitas (Elahi *et al*, 2000), sehingga terjadi gangguan pada fungsi pengenalan terhadap antigen. Selain itu juga terjadi gangguan fungsi komplemen yang menyebabkan menurunnya fungsi kemotaksis, sehingga penderita DM menjadi rentan terhadap infeksi, salah satunya adalah infeksi oleh *C. albicans* (Casadevall, 2002).

Penurunan fungsi sel imunokompeten pada penderita DM tersebut diperkirakan menyebabkan terjadi penurunan pembentukan antibodi terhadap antigen tertentu dari *C.albicans*. sehingga akan memudahkan terjadi ikatan *C.albicans* pada epitel mukosa rongga mulut.

Dari percobaan pada hewan diketahui bahwa serotipe *C.albicans* dan enzim *secretory aspartyl proteinase* (SAP) berperan pada virulensi dan kolonisasi *C.albicans*, dan menurut hipotesis yang dikemukakan diduga variabilitas genetik juga turut berperan dalam proses tersebut. Mengingat bahwa serotipe *C.albicans*, respons imun inang, enzim SAP dan variabilitas genetik berperan pada virulensi dan kolonisasi *C.albicans*, maka untuk mengidentifikasi variabilitas genetik dapat digunakan metode RAPD (*Randomly Amplified Polymorphism DNA*), sedangkan serotipe *C.albicans* diidentifikasi dengan metode *serotyping* dan keberadaan gen SAP yang menghasilkan enzim protease SAP1 dan SAP3 dapat diidentifikasi dengan metode PCR. Untuk respons imun inang digunakan metode *Indirect ELISA* yang bertujuan untuk mengetahui kadar sitokin proinflamatori IL -1 β & TNF- α pada penderita DM & Non-DM

C.albicans adalah suatu jamur patogen oportunistik dan merupakan flora normal di rongga mulut. *C.albicans* dalam perkembangannya menjadi patogen dapat melalui dua bentuk (dimorfik) yaitu overkolonisasi atau dengan perubahan bentuk (*switching*) menjadi *hyphae* (Gale *et al*, 1998). Salah satu faktor yang memberikan kontribusi ke arah patogen dan mengakibatkan infeksi yang invasif adalah *Secretory Aspartyl Proteinase* (SAP) yang dikode oleh gen SAP. Keberhasilan *C.albicans* melekat pada

permukaan epitel mukosa merupakan awal terjadinya infeksi melalui kedua bentuk tersebut.

Pada tahap awal, infeksi ini tidak menimbulkan manifestasi klinis, baru akan memberikan manifestasi klinis bila proses ini berjalan lanjut dengan di ikuti berbagai kerusakan pada komponen mukosa rongga mulut. Akibat dari keadaan ini maka akan menimbulkan kelainan di rongga mulut yaitu *oral candidosis* (Powderly, 1996). Angka kejadian infeksi *C.albicans* di rongga mulut dilaporkan meningkat antara 43%-93% pada penderita dengan keadaan imunodefisiensi (Powderly, 1996).

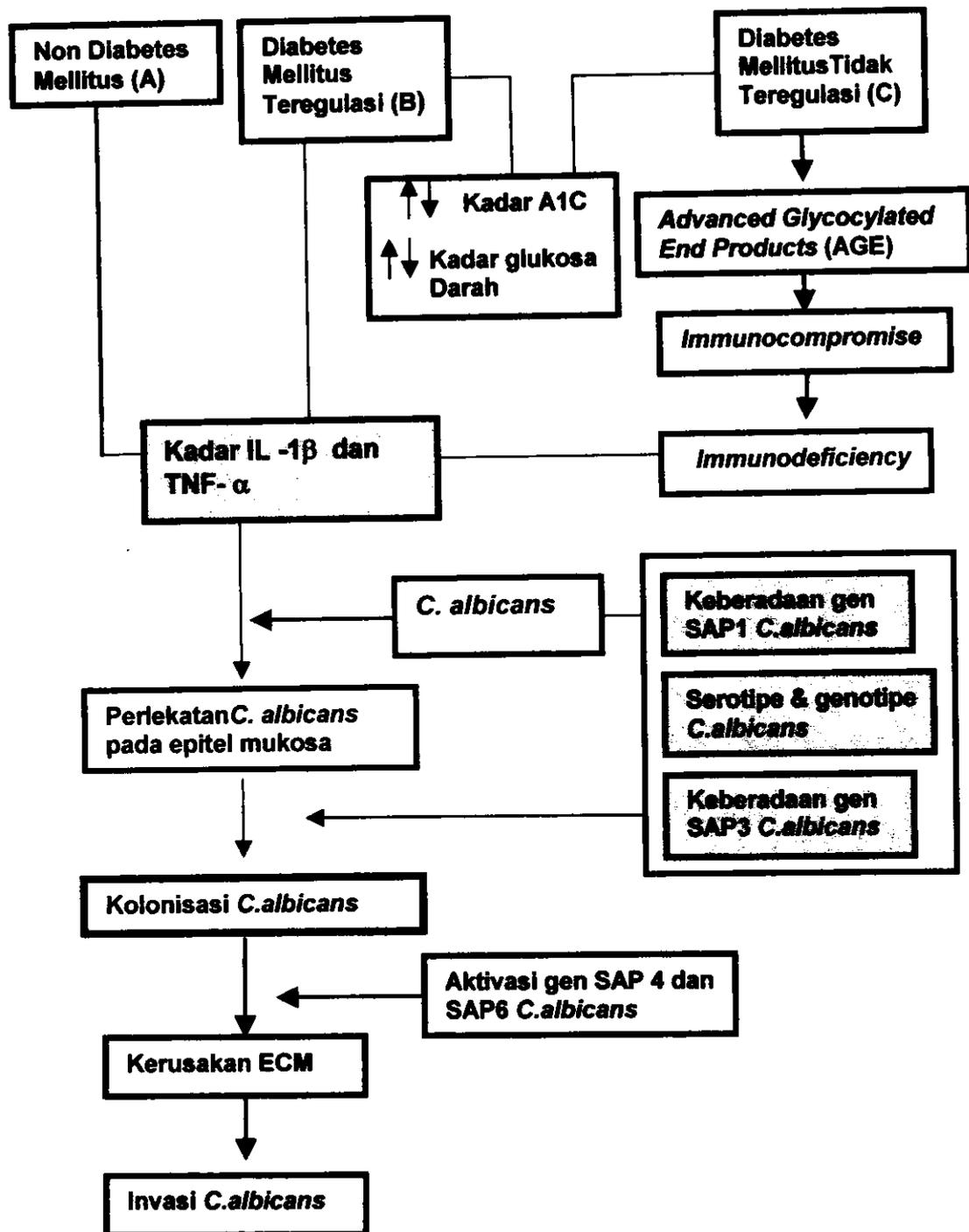
Di dalam rongga mulut terdapat berbagai strain *C.albicans* dengan karakteristik fenotip tertentu yang menentukan sifatnya sebagai komensal atau patogen. Virulensi *C.albicans* dipengaruhi oleh kemampuan perlekatan pada sel inang, *phenotypic switching* dan sekresi enzim hidrolitik protease dalam hal ini adalah SAP1 dan SAP3 (Bernardis *et al*, 1999; Felk *et al*, 2002) serta faktor inang sendiri. Pada keadaan *immunological competent* inang yang menurun akibat DM, kolonisasi *C.albicans* yang terjadi merupakan langkah awal terjadinya infeksi *C.albicans* yang patogen, namun sejauh ini hubungan antara serotipe atau karakter *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga rongga mulut pada penderita DM belum diketahui dengan jelas.

Apabila kondisi respons imun inang, genotip dan serotipe *C.albicans* serta keberadaan gen SAP1 dan SAP3 pada *C.albicans* yang mengkolonisasi penderita DM dan non-DM dapat diketahui, maka penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penentuan diagnostik yang

lebih akurat pada kejadian infeksi oleh *C. albicans* di mukosa rongga mulut sebagai manifestasi akibat komplikasi penyakit DM.

Pada proses awal terjadi infeksi yang diperantarai oleh perlekatan *C. albicans* pada epitel mukosa rongga mulut inang sampai timbulnya aktivasi dari gen SAP, dan akhirnya mengakibatkan invasi *C. albicans* ke jaringan yang lebih dalam melalui endotel vaskuler dapat digambarkan dalam suatu kerangka sebagai berikut :

3.2 Bagan Kerangka Konseptual.



Keterangan : ■ : variabel yang diteliti

□ : Landasan teori

Jadi hendaknya dicari kemungkinan adanya perbedaan serotipe dan genotipe yang mencerminkan virulensi *C.albicans* isolat Surabaya dalam hubungannya dengan tingkat regulasi DM yang dipengaruhi oleh faktor imunologis, sehingga dapat dipahami mekanisme perlekatan dan kolonisasi *C.albicans* pada mukosa rongga mulut penderita DM dan non-DM.

Gen SAP yang teraktivasi setelah *C.albicans* yang mengadakan perlekatan dengan sel inang akan mensekresi produk protein yang berupa enzim SAP1 dan SAP3 yang fungsinya diduga mempengaruhi atau melisis protein yang disintesis selama proses perlekatan dan akibatnya *C.albicans* bisa mengadakan kolonisasi. Keberadaan gen SAP1 dan SAP3 sangat penting peranannya karena enzim yang dihasilkan oleh kedua gen tersebut sangat dominan pengaruhnya pada proses awal terjadinya infeksi *C.albicans*. Melandasi pemikiran tersebut maka penelitian ini dimaksudkan untuk mengungkap etiopatogenesis infeksi *C.albicans* melalui mekanisme enzimatik dari SAP1 dan SAP3 pada tingkat molekuler, dan diharapkan bermanfaat bagi konsep penyempurnaan diagnosis *oral candidosis* yang lebih akurat dan memperbaiki penatalaksanaan dalam perawatan *oral candidosis* pada penderita DM.

3.3 Hipotesis Penelitian

C. albicans adalah flora normal yang tumbuh komensal di rongga mulut dan bersifat patogen oportunistik, sehingga pada penderita DM yang disertai dengan imunodefisiensi sebagai manifestasi kejadian *immunocompromise*, maka *C. albicans* yang tadinya bersifat sebagai flora normal akan berubah menjadi patogen.

Berdasar pada hal tersebut diatas maka **hipotesis penelitian** ini bertujuan membuktikan :

- 3.3.1 Ada hubungan antara keberadaan gen SAP1 dan SAP3 *C. albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM.
- 3.3.2 Ada hubungan antara variabilitas genetik *C. albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM.
- 3.3.3 Ada hubungan antara virulensi *C. albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM
- 3.3.4 Terdapat hubungan antara keberadaan gen SAP1 dan SAP3, variabilitas genetik *C. albicans* isolat Surabaya serta kadar IL - 1 β dan TNF- α inang dengan virulensi *C. albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM dan non-DM.

BAB 4

METODE PENELITIAN

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah observasional dengan bersifat *crosssectional study*. Dalam rangka membuktikan hipotesis, strategi penelitian ini dapat dibagangkan melalui beberapa tahapan penelitian yaitu :

1. Pemeriksaan Sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou* dan identifikasi *C.albicans* dengan pengecatan gram dan uji Fermentasi gula.
2. Karakterisasi *C.albicans* dengan melalui pemeriksaan serotipe dengan metode *serotyping* dan genotipe dengan RAPD
3. Pemeriksaan kadar sitokin proinflamatori IL-1 β dan TNF- α dengan metode *Indirect ELISA*
4. Keberadaan gen SAP1 dan SAP3 *C.albicans* dengan metode PCR dan hasil PCR diukur ketebalannya dengan Densitometer
5. Hubungan serotipe *C.albicans* dengan keberadaan gen SAP1, SAP3 dan variabilitas genetik *C.albicans*, serta kadar sitokin proinflamatori IL-1 β dan TNF- α inang.

4.2 Populasi Penelitian Dan Sampel

Populasi penelitian adalah penderita Diabetes Mellitus (DM) dan non-DM yang diperiksa di Poli Endokrinologi RSUD Dr. Soetomo dan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya.

Sampel : *C.albicans* pada mukosa rongga mulut non-DM dan penderita DM dengan diagnosa pasti Diabetes Mellitus berdasar pemeriksaan A1C dan kadar glukosa darah pada penderita yang datang berobat di Poliklinik Penyakit Dalam RSUD.dr Soetomo Surabaya

4.3 Besar Sampel.

Besar sampel ditentukan dengan menggunakan rumus besar sampel yang sesuai untuk penelitian uji diagnostik dengan pendekatan *cross-sectional* adalah dengan jumlah populasi (n) yang tak diketahui (Sunarjo,1992) :

$$\text{Rumus : } n = \frac{[Z_{1-\alpha/2} \sqrt{P_0(1-P_0)} + Z_{1-\beta} \sqrt{P_a(1-P_a)}]^2}{(P_a - P_0)^2}$$

$P_0 = 50\%$ P_0 : adalah kemungkinan terdapatnya serotipe A pada non-DM

$P_a = 90\%$ P_a : adalah kemungkinan terdapatnya serotipe A pada DM

$$\alpha = 0,05$$

Kuat Uji $(1 - \beta) = 90\%$ jadi $\beta = 0,1$

$$Z_{1-\beta} = 1,282$$

$$Z_{1-\alpha/2} = 1,96$$

$$n = \frac{[1,96 \sqrt{0,5 \times 0,5} + 1,282 \sqrt{0,9 \times 0,1}]^2}{(0,9 - 0,5)^2}$$

$$n = \frac{(0,98 + 0,3648)^2}{(0,4)^2}$$

$$n = 11$$

Berdasar hasil penghitungan sampel, maka besar sampel yang absah dalam setiap kelompok penelitian ini adalah 11 orang.

4.4 Cara Pengambilan Sampel

Semua penderita DM dan non DM yang akan disampling sebelumnya telah diberi penerangan tentang tujuan dan manfaat penelitian serta diminta kesediaannya dengan menandatangani surat pernyataan persetujuan pengambilan sampel / *inform consent* (lampiran) setelah terlebih dahulu peneliti melalui ujian kelayakan etik. Sampling dalam penelitian ini diambil dari setiap sampel yang memenuhi kriteria dengan pertimbangan bahwa kriteria yang telah ditetapkan cukup ketat, sehingga jumlah sampel yang diperoleh sangat terbatas. Sedang besar sampel ditentukan berdasarkan teknik penarikan sampel sesuai dengan jenis penelitian observasional *crosssectional*

Pengambilan sampel dilakukan dengan memilih kelompok subyek penelitian penderita DM yang datang berobat di klinik penyakit dalam RSUD .Dr.Soetomo dan klinik FKG Unair. Pengambilan darah sebanyak 7 CC dari darah perifer untuk pemeriksaan kadar A1C, kadar IL-1 β dan TNF- α . Kemudian dilakukan pengambilan *C.albicans* dengan cara

scrubing menggunakan *semen spatel* steril pada mukosa rongga mulut penderita untuk selanjutnya dilakukan kultur *C.albicans* dalam *Sabouraud dextrose agar* (Difco).

Kriteria Sampel Penderita serta .

1. Penderita DM yang tidak menderita penyakit infeksi lain di rongga mulut dengan *Oral hygiene* baik – sedang, karena *Oral hygiene* yang jelek merupakan salah satu faktor yang menyebabkan terjadinya infeksi *C.albicans* rongga mulut.
2. Diagnosa DM berdasar kadar A1C dengan tanpa melihat tipe DM :
 - DM teregulasi : Kadar A1C antara 6,5 % - 8 %
 - DM tidak teregulasi : Kadar A1C > 8 %
 - Non DM (kontrol) : Kadar A1C < 6,5%
3. Penderita tidak sedang mendapat pengobatan yang dapat menekan respons imun.
4. Penderita tidak sedang mendapat pengobatan steroid atau antibiotik, karena akan membunuh mikroorganisme kompetitif yang memungkinkan bagi pertumbuhan *C.albicans*
5. Mereka yang dalam waktu penelitian masih menunjukkan kadar A1c relatif tinggi :
 - Kadar A1C > 8 %
 - Jangka waktu mulai diperiksa kadar A1C dengan saat pengambilan sampel \leq 2 bulan

Kriteria Sampel non penderita serta .

1. Penderita dengan kelainan gagal ginjal, AIDS, kanker Hepatoseluler, karsinoma dsb.
2. Penderita DM yang sedang mendapat pengobatan immunosupresi
3. Penderita DM yang jangka waktu pemeriksaan kadar A1C sudah lebih dari 3 bulan.

4.5 Variabel Penelitian

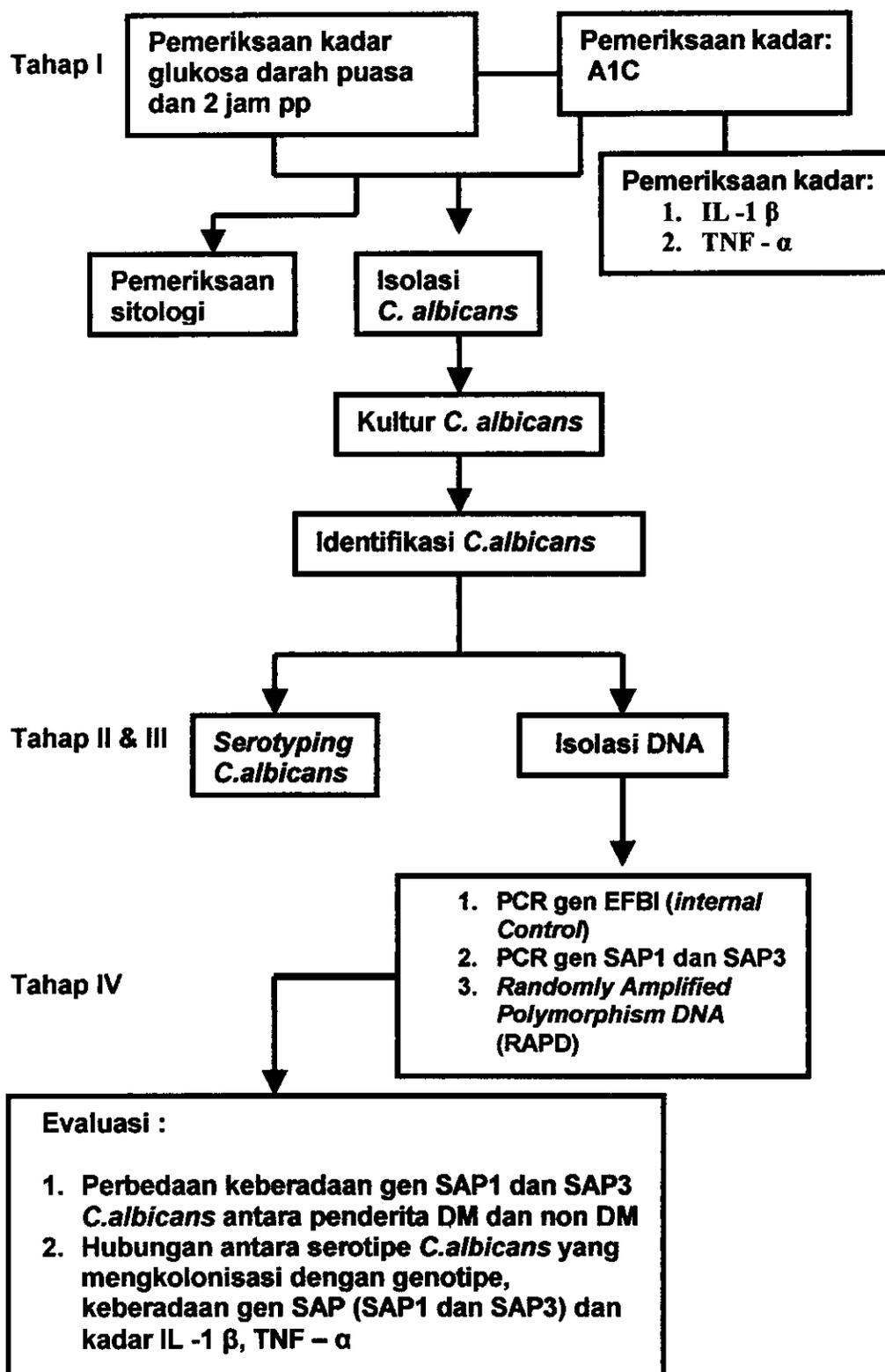
Variabel yang diamati : Tingkat regulasi DM, status *immunocompromise*, infeksi *C.albicans* rongga mulut, keberadaan gen SAP1 dan SAP3 , variabilitas *C.albicans* , serotipe *C.albicans* serta kadar A1C

Difinisi Operasional :

1. Variabilitas genetik *C.albicans* parameter yang digunakan adalah genotipe *C.albicans* dan pemeriksaannya dengan metode RAPD
2. serotipe *C.albicans* pemeriksaannya dengan *serotyping*.
3. Tingkat regulasi DM, parameter yang digunakan adalah kadar A1C. yaitu banyaknya kadar Hb yang mengalami glikosilasi yang ditentukan dengan metode RIA dan dinyatakan dalam persen (%).
4. *Status immunocopromise*, parameter yang digunakan adalah kadar IL-1 β dan TNF- α dan pemeriksaannya dengan metode *indirect ELISA*.

5. Keberadaan gen SAP1 dan SAP3 pemeriksaannya dengan metode PCR dan dilanjutkan dengan Densitometer.
6. Infeksi *C.albicans* rongga mulut ditandai dengan adanya *C.albicans* diantara sel epitel skuamous rongga mulut dan bentukan berbagai sel yang mengalami peradangan pada pemeriksaan sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou*.
7. Kontrol (Non DM) yaitu penderita yang datang ke klinik FKG Unair untuk pemeriksaan pada giginya dan bukan penderita DM yang diketahui dari anamnesa dan didukung oleh kadar A1C < 6,5%

4.6 Tahapan Penelitian.



4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat Penelitian

Orbital shaking, inkubator CO₂, Inkubator 37⁰ C, Laminar flow, Sentrifuse dengan berbagai kecepatan, microwave, vortex, inverted Mikroskop, mikroskop cahaya, Thermocycler, Elektroforesis, Spektrofotometri (UV-transluminator), ELISA Reader, Densitometer, *Object glass* dan *cover glass*

4.7.2 Bahan Penelitian

Bahan kultur *Candida albicans* isolat Surabaya, Sabouraud dextrose agar (Difco), YPD Broth (Difco), bahan pengecatan gram, bahan untuk pereaksi fermentasi gula, primer spesifik untuk SAP1 dan SAP3, primer EFB1, fenol, PBS, 0,9% NaCl, Tris - HCL, EDTA, Rnase inhibitor (Gibco BRL), pereaksi untuk isolasi DNA (Qiagen), pereaksi untuk PCR, 0.1% 2-mercaptoethanol, 100 Unit Lyticase, pereaksi untuk *serotyping* (*latron candida Check*), ELISA Kit IL -1 β dan TNF- α , Marker DNA Leader 100 bp (Sigma), Marker λ Hind III + Eco R1 (Promega), agarose powder, loading buffer, proteinase K, sorbitol, pereaksi untuk RAPD, *object glass*, *cover glass*, bahan fiksasi dan bahan pengecatan *Papanicolaou*.

4.7.3 Cara Kerja

1. Pemeriksaan kadar A1C dengan metode RIA
2. Pemeriksaan sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou*
3. Pemeriksaan kadar IL -1 β dan TNF- α dengan metode *Indirect ELISA*

4. *Oral scrubing* untuk pemeriksaan sitologi dan untuk isolasi *C.albicans* pada penderita DM, kemudian di kultur dalam *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco).
5. Identifikasi *C.albicans* dengan pengecatan gram dan uji fermentasi gula
6. Inokulasi *C.albicans* dan *counting sel candida* dengan *inverted* mikroskop.
7. Pembuatan spheroplast dan isolasi DNA dengan *Qiagen Kit* (*Promega*)
8. Keberadaan gen SAP1 dan SAP3 *C.albicans* dengan metode PCR hasilnya dilakukan pemeriksaan dengan Densitometer untuk mengukur ketebalan band yang ada.
9. Pemeriksaan *serotyping* menggunakan *latron Candida Check* (RM 302-K 25).
10. *Genotyping* dengan metode RAPD (*Randomly Amplified Polimorphism DNA*).

4.7.4 Prosedur Penelitian

Penderita DM yang datang ke Poli Endokrinologi RSUD Dr.Soetomo Surabaya diseleksi sesuai kriteria yang telah ditentukan yaitu penderita laki-laki usia 21 - 60 tahun (21 tahun dianggap dewasa sesuai standar Depkes) dan menderita DM minimal 2 tahun sejak diagnosis ditegakkan serta tidak terdapat penyakit lain selain DM. Penderita tidak memakai gigi palsu dan tidak sedang mendapat perawatan yang menggunakan antibiotik dan steroid. Kemudian penderita diberi

penjelasan tentang keperluan penelitian. Penderita yang bersedia ikut dalam penelitian diminta untuk menanda tangani *inform consent* yang terdiri dari 2 lembar yaitu lembar persetujuan penelitian dan lembar persetujuan menerima tindakan sebagai bukti kesediaan ikut serta dalam penelitian (lampiran).

Pengambilan darah sebanyak 7 cc dari darah perifer oleh analis laboratorium untuk pemeriksaan kadar A1C sebanyak 2 cc, dan 5 cc untuk pemeriksaan kadar IL-1 β dan TNF- α . Kemudian dilakukan pengambilan *C.albicans* dengan terlebih dahulu diinstruksikan untuk berkumur dan dilakukan *scrubing* pada mukosa rongga mulut dan dorsal lidah penderita dengan menggunakan *semen spatel* steril. Selanjutnya dilakukan dua macam pemeriksaan yaitu pemeriksaan sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou* dan hasil *scrubing* di *strick* pada media kultur dalam *Sabouraud Dextrose Agar* (Difco) untuk menumbuhkan *C.albicans*.

4.7.4.1 Pemeriksaan Sitologi (Sudiana , 1991)

Spesimen untuk pemeriksaan sitologi berasal dari *scrubing* pada lidah dan mukosa pipi. kemudian hasil *scrubing* yang telah dipulas pada *object glass* difiksasi dan dicat dengan prosedur *Papanicolaou*. dan di Mounting dengan DPX. (lampiran 6).

4.7.4.2 Media kultur dan Kondisi pertumbuhan

C.albicans isolat Surabaya dikultur selama 2 X 24 jam 37⁰ C pada Sabouraud dextrose agar (Difco). Kemudian dilakukan pengecatan gram

dan tes fermentasi gula. Pada pengecatan gram preparat dituangi *carbol gentian violet* selama 3 menit kemudian cat dibuang dan tuangi lugol selama 1 menit. Lunturkan dalam alkohol 96% selama 1 menit dan cuci dengan aquades selanjutnya dicat dengan air *fuchsine* selama 2 menit, lalu cuci dengan air dan keringkan untuk dilihat dibawah mikroskop cahaya untuk pengamatan koloni (*budding cell / hyphae*). Test Fermentasi gula dengan glukosa, maltosa, sukrosa dan laktosa , kemudian inkubasi dalam inkubator 37⁰ C 3 X 24 jam. Keberadaan *C.albicans* ditandai dengan adanya perubahan warna dari biru menjadi kuning pada suspensi glukose, maltosa dan sukrosa sedangkan laktosa tidak ada perubahan warna dan tetap memberikan warna biru. *C.albicans* yang didapat kemudian ditumbuhkan dalam media *Sabouraud Dextrose Broth* (Difco), inkubasi 18 - 20 jam 37⁰ C pada orbital shaking. Kemudian sentrifuse 700 g selam 5 menit pada 24⁰ C , cuci dengan PBS 3 X dan disimpan dalam bentuk suspensi dalam PBS.

4.7.4.3 Pemeriksaan Kadar A1C

Pemeriksaan A1C dilakukan di Lab. Klinika Jl. Prof. Dr.Mustopo Surabaya dengan cara kerja : Darah + EDTA dipipet sebanyak 2 µl dengan pipet yang bekerja secara otomatis yang merupakan rangkaian dari alat Bio-rad Diastat dan sudah menyimpan 1000 µl hemolisat (kit) kemudian dimasukkan kedalam *cup* sampel. Selanjutnya diletakkan pada well Diastat sesuai dengan nomor well yang tersedia. Selanjutnya alat

diprogram dengan start selama 10 menit dan hasil akan terbaca pada *print out*.

4.7.4.4 Pembuatan Spheroplast

C. albicans di inokulasikan pada *Yeast Pepton Dextrose Broth* (YPD *Broth*, Difco laboratories) yang mengandung dextrose. Setelah *aerobic incubation* pada 37°C selama 18 jam dalam *rotary incubator* pada 100 rev/min, sel *candida* di harvest dengan menggunakan sentrifus dan dicuci dua kali dengan phosphate buffered saline (PBS). Kemudian, sel *candida* dihitung dengan menggunakan hemocytometer dan disuspensikan menjadi 3.5×10^7 cell/ml dalam PBS. Pellet disuspensikan kembali dengan 600 ul sorbitol buffer (1 M sorbitol, 0.1 M EDTA p.H 7.5 and 1 ul B-Me) containing 200 U Litycase. Inkubasi 30°C selama 1 jam dan spheroplast yang dihasilkan di harvest melalui sentrifus pada 3000 rpm 5 menit. Pellet yang dihasilkan di suspensikan dalam 180 ul buffer ATL (Qiagen). Kemudian ditambahkan 20 ul Proteinase K kedalam supernatant dan di inkubasikan pada 55° C overnight.

4.7.4.5 Isolasi DNA

Setelah di inkubasi selama 55°C *overnight*, kemudian ditambahkan Rnase 4 ul dan supernatan di *treated* 200 ul buffer AL, inkubasi 70°C 10 menit. Kemudian di tambahkan 200 ul ethanol 96% dan langsung di vortek sampai homogen. Pindahkan semua supernatan ke *Dneasy Spin column 2ml collection tube* yang telah disediakan oleh pabrik

dan tambahkan 500 ul buffer AW1. Selanjutnya tube di sentrifuse dengan kecepatan 800 rpm 4°C selama 1 menit. Kemudian di letakkan di *Dneasy Spin Column in a new 2 ml collection tube* dan di tambahkan dengan 500 ul buffer AW2, di sentifuse selama 3 menit dengan kecepatan yang tinggi untuk mengeringkan *Dneasy membrane*. Pindahkan *Dneasy Spin Column* ke tube mikrosentrifuse 1.5 ml yang sudah sterile, dan pipet 200 ul buffer AE yang langsung di arahkan ke *Dneasy membrane*. Dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit dan kemudian di sentrifuse selama 1 menit dengan kecepatan 8000 rpm. Untuk langkah terakhir, ulangi lsekali lagi prosedur pemberian buffer AE.

4.7.4.6 Penentuan kemurnian dan Pengukuran konsentrasi DNA dengan UV/VIS, Jasco V-530.

Sampel DNA isolat Surabaya dipipet 10 µl ditambah MQ sampai 100 µl dihomogenkan kemudian dimasukkan dalam kuvet quart dan diukur serapannya dengan spektrofotometer ultraviolet pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. Sebagai blangko dipakai MQ. Nilai kemurnian DNA diperoleh dari hasil perhitungan rasio A_{260} / A_{280} . DNA dikategorikan murni bila rasio A_{260} / A_{280} berkisar antara 1,8 – 2,0. Konsentrasi DNA untai ganda di ukur dengan menggunakan perhitungan :

$$\text{Konsentrasi } (\mu\text{g/ml}) = A_{260} \times \text{FP (faktor pengencer)} \times 50 \mu\text{g/ml.}$$

4.7.4.7 PCR Gen EFB1 sebagai Internal kontrol

Pada PCR ini di gunakan primer gen EFB1 sebagai internal kontrol untuk *C.albicans*. dengan menggunakan primer EFB1 :

5' – ATTGAACGAATTCTTGGCTGAC –3'

5'- CATCTTCTTCAACAGCAGCTTG – 3'.

Volume akhir *PCR reaction mixture* 25 ul yang terdi dari : 10 X Buffer Mg Free, 25 mM MgCl², 2,5 mM dNTP mix, 25ng DNA, 20 uM primer and 100 U taq polymerase (Promega). Kemudian dicampur dan ependorf PCR di masukkan ke dalam *Master Cycler machine (Gene Amp PCR System 2499,Perkin Elmer)*. Kondisi PCR adalah : *Denaturation* 94°C selama 1 menit, *annealing* 55°C selama 1 menit dan *extension* 72°C selama 1 menit dan step akhir *extra extension* 72°C selama 10 minute. Banyaknya siklus PCR adalah 45 siklus.

4.7.4.8 PCR Gen SAP1 and SAP3

PCR untuk mendeteksi keberadaan gen SAP1 dan SAP3 dengan menggunakan primer :

SAP1 : 5' - AGGGAAAGGTATTTACACT - 3'

5' - CAGTTTCAATTCAGCTTGG - 3'

SAP3 : 5' - TGGATTGGAACATTTCTAATTC - 3'

5' - CAATCTCCAGAGGAGTACTTCC - 3'

PCR reaction mixture terdiri dari : 10 X buffer Mg Free, 25 mM Mg Cl₂, 2.5mMdNTP mix 25 ng DNA, 20uM primer SAP1 and SAP3 and 100.U Tag Polymerase (Promega). Volume akhir *PCR reaction mixture*

adalah 25 ul. Dicampur dengan hati-hati dan dimasukkan ke *PCR tube*, dan kemudian *PCR tube* di masukkan dalam *Master Cycler machine* (*Gene Amp PCR System 2499, Perkin Elmer*). Kondisi PCR : denaturation 94°C selama 1 menit, annealing 52°C selama 1 menit dan extension 72°C selama 1 menit. Extra extension 72°C selama 10 menit dan banyaknya siklus adalah 45 siklus.

4.7.4.9 Analisa Hasil PCR

Selanjutnya produk PCR di analisis menggunakan *Electrophoresis* (Gel Mate 2000, Toyobo) dengan cara di *running* pada 2 % agarose gel (Gibco BRL) yang mengandung 10 X TBE and Ethidium Bromide. Mesin *electrophoresis* bekerja pada 100 V selama 40 menit dan kemudian di lihat di *UV light Transluminator* kemudian di foto (dokumentasi) dengan *photographed* (Kodak Edas 290). Marker standard yang di gunakan 100 bp DNA Leader (Sigma).

4.7.4.10 Identifikasi Strain *C.albicans*

Identifikasi strain *C.albicans* dikerjakan dengan *latron Candida Check* (RM 302-K 25, Tokyo Japan). Dalam metode ini strain *C.albicans* di kelompokkan dalam dua *serotypes* yaitu *C.albicans* serotipe A dan serotipe B. Pembagian ini didasarkan pada reaksi ikatan antigen – antibodi. Pada serotipe A mempunyai determinan antigen pada permukaan sel yang tidak dimiliki oleh serotipe B. Bila pada reaksi ikatan antigen-antibodi terdapat reaksi aglutinasi positif, maka *C.albicans*

tersebut adalah serotipe A, sedangkan yang serotipe B didapatkan reaksi aglutinasi yang negatif. Koloni *C.albicans* dari kultur *plate agar* diletakkan pada *glass slide* yang sudah diberi antibodi monoklonal untuk *C.albicans*. Di inkubasi pada suhu ruang selama 10 menit, kemudian bisa dilihat ada tidaknya reaksi aglutinasi dengan membandingkan dengan kontrol. Sebagai kontrolnya adalah satu koloni *C.albicans* dimasukkan dalam larutan buffer saline.

4.7.4.11 Metode *Indirect ELISA* (Untuk pemeriksaan kadar IL -1 β dan TNF- α). Pemeriksaan ini menggunakan *ELISA Bender system Kit*.

Microplate ELISA (96 well) dicuci dengan washing buffer, setelah itu dimasukkan pada *microplate* sebanyak 100 μ l antibodi (duplo) pada tiap well. kemudian tambahkan 100 μ l IL-1 β standard dan TNF- α standard pada tiap well dan buat pengenceran 500 menjadi 7,8 pg/ μ l dengan cara ambil 100 μ l dari well pertama dan dimasukkan ke well berikutnya dst. Ambil 100 μ l Assay Buffer (duplo) dimasukkan pada well blangko. Kemudian ambil dan masukkan 50 μ l Assay Buffer (duplo) pada well sample. Ambil dan masukkan 50 μ l sampel. Tambahkan 50 μ l Biotin Conjugate dan inkubasi 2 jam pada temperatur ruang. Cuci *well Microplate* 3 X dengan washing buffer, kemudian tambahkan 100 μ l Streptavidin-HRP pada setiap sampel, inkubasi 1 jam pada temperatur ruang. Cuci *well Microplate* 3 X dengan washing buffer dan tambahkan 100 μ l TMB Substrat solution pada semua well dan inkubasi 10 menit pada temperatur ruang. Kemudian tambahkan Stop solution 100 μ l stop reaksi dengan

pengenceran yaitu 1/250, 1/500, 1/ 1000 1/2000, 1/ 4000 dan 1/8000, kemudian dimasukkan ke dalam *microplate* masing- masing 50 μ l tiap well. Setelah itu diukur titer dengan menggunakan ELISA *reader* dengan panjang gelombang 450 nm setelah inkubasi selama 30 menit.

4.7.4.12 Randomly Amplified Polymorphism DNA (RAPD)

Metode RAPD ini dengan menggunakan Primer NT Primer (Regina dan Widia, 2001) : **NT Primer : 5' CCCGTCAGCA 3'**

Untuk melakukan amplifikasi dalam metode RAPD-PCR dibutuhkan bahan seperti aquabides steril (ddH₂O), 10 X buffer (QIAGEN), dNTP (QIAGEN), Q-Solution (QIAGEN), Primer (NT Primer : 5' CCCGTCAGCA 3'), TE pH 8 steril, Taq polymerase, dan DNA sampel dengan alat bantu PCR (DNA thermal cycler dan tabung PCR). Kondisi PCR-RAPD Hot start 94°C selama 5 menit, denaturasi 94°C selama 1 menit, anealing 35°C selama 1 menit dan extension 72°C selama 2 menit. Extra extension 72°C selama 5 menit dan banyaknya siklus adalah 45 siklus. Untuk melihat keberhasilan amplifikasi PCR dilakukan elektroforesis 2%. Peralatan dalam proses ini adalah sub cell elektroforesis dan transluminator-UV polaroid gel kamera. Sedangkan bahan yang digunakan untuk elektroforesis dibutuhkan gel agarose 2% , Marker (100 bp DNA ladder), Etidium bromide (Etbr 30 μ l dalam 300 ml TBE 1x), loading dye (terdiri dari Bromophenol blue 0,25%, Formamide 30% sert Xylene Cyanol 0,25%) dan Buffer TBE 1x.

4.7.4.13 Elektroforesis Gel Agarose 2%

Untuk melihat keberhasilan PCR-RAPD dilakukan elektroforesis pada gel agarose 2% dengan volume 10 µl tiap-tiap sumuran (5µl hasil amplifikasi + 5 µl *loading dye*) dengan tegangan 100 volt selama kurang lebih 30 menit. Selanjutnya diwarnai dengan etidhium bromida selama 30 menit dan dideteksi dengan UV-iluminator, kemudian difoto dengan ploraid gel kamera. Hasil amplifikasi diukur berdasarkan DNA Penanda 100 bp DNA ladder dan *Marker λ Hind III + Eco R1*. Kemudian terhadap hasil amplifikasi ini dilakukan pengamatan untuk mengetahui dan memilih mana yang polimorfisme dan monomorfisme.

4.7.4.14 Tempat Penelitian

Pengambilan sampel penderita DM dilaksanakan di Poli Endokrinologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya, sedangkan untuk kontrol non-DM diambil di Klinik FKG Unair Surabaya dengan kriteria yang sama dengan kelompok DM. Untuk pemeriksaan kadar A1C dikerjakan di Lab. Klinik Surabaya dan pemeriksaan kadar IL-1 β dan TNF-α dikerjakan di Lab. Imunologi Patologi Klinik RSUD Dr. Soetomo Surabaya. Pemeriksaan sitologi dikerjakan di Lab. Patologi Anatomi FK Unair Surabaya. Pemeriksaan serotipe *C.albicans* dikerjakan di Lab. Mikrobiologi FKG Unair Surabaya, sedangkan pemeriksaan keberadaan gen SAP1 dan SAP3 serta genotipe dikerjakan di Lab. Biologi Molekuler *Department Prosthetic of Dentistry Hiroshima University Japan* dan di Lab.

Rekayasa Genetika – PAU Bioteknologi Universitas Gajah Mada
Yogyakarta.

4.7.4.15 Analisis Data

Untuk mengambil kesimpulan dalam memecahkan permasalahan pada penelitian ini digunakan analisis data sebagai berikut :

1. Untuk menemukan hubungan antara variabilitas genetik *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM dianalisis dengan Fenogram
2. Untuk menemukan hubungan antara keberadaan gen SAP1 dan SAP3 *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM, data dianalisis secara deskriptif (Explore).
3. Untuk menemukan hubungan antara serotipe *C.albicans* isolat Surabaya dengan tingkat regulasi DM, data dianalisis secara deskriptif (Explore).

BAB 5

HASIL PENELITIAN

BAB 5

HASIL PENELITIAN

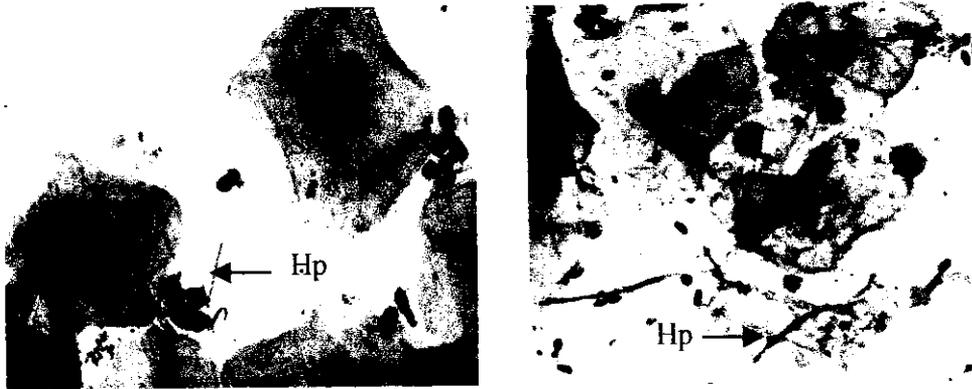
Uraian hasil penelitian akan dijelaskan berupa data dan analisis yang sesuai dengan tujuan dan hipotesisnya, dan penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai rancangan pelaksanaan penelitian yang terdiri dari 4 tahap penelitian, yaitu:

1. Pemeriksaan sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou* dan identifikasi *C.albicans* dengan pengecatan gram dan reaksi fermentasi gula.
2. Karakterisasi *C.albicans* dengan pemeriksaan serotipe dengan metode *Serotyping* dan genotipe dengan RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*)
3. Pemeriksaan gen SAP1 dan SAP3 dengan metode PCR dan ketebalan ban/pita diukur dengan Densitometer
4. Pemeriksaan kadar IL-1 β dan TNF- α sebagai sitokin proinflamatori pada inang dengan metode *Indirect ELISA*.

5.1 Pemeriksaan Sitologi Dan Identifikasi *C.albicans*

Pemeriksaan sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou* untuk mengetahui adanya infeksi *C.albicans* pada epitel mukosa rongga mulut. Hal ini perlu dilakukan karena infeksi oleh *C.albicans* tidak selalu disertai gejala klinis. Apabila pada sitologi tampak adanya bentukan spora dan

ataupun bentukan *hyphae* disertai adanya sel radang berarti ada infeksi *C.albicans*.

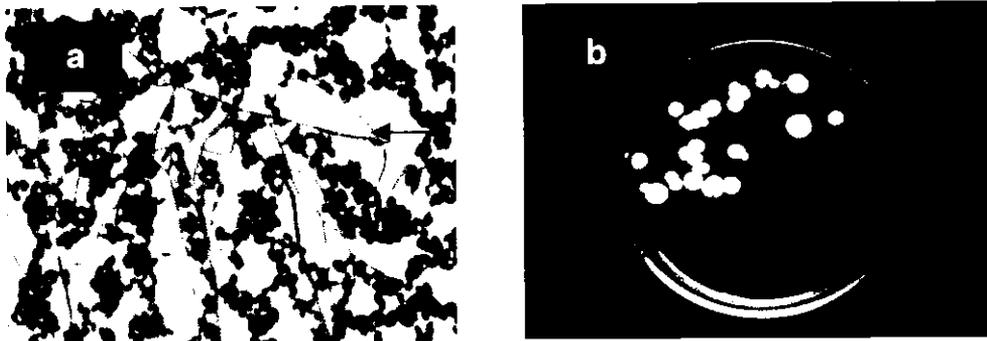


Gambar 5.1 Pemeriksaan Sitologi dengan pengecatan *Papanicolaou*

Ket. : Sr : Sel radang
 Hp : *Hyphae*
 Sp : Spora.

Pada pemeriksaan HPA dengan pengecatan *Papanicolaou* tampak adanya *C. albicans* dalam bentuk spora maupun *hyphae* yang terletak diantara sel epitel squamosa rongga mulut, juga tampak adanya berbagai sel radang.

Pada tahap selanjutnya dilakukan identifikasi *C.albicans* dengan tujuan untuk memperoleh data biokimiawi yang merupakan karakter *C.albicans*. Hasil data analisis biokimiawi menunjukkan bahwa *C.albicans* isolat Surabaya menunjukkan spesifikasi pada pemeriksaan dengan pengecatan gram dan reaksi fermentasi gula.



Gambar 5.2 (A) Pewarnaan Gram, (B) Kultur *C. albicans* dalam media *Sabouraud Dextrose Broth*

Ket. : tanda → (A) : bentukan hyphae *C. albicans*
 tanda → (B) : bentukan *C. albicans* dalam media kultur



Gambar 5.3 Hasil Tes Fermentasi gula pada *C. albicans*

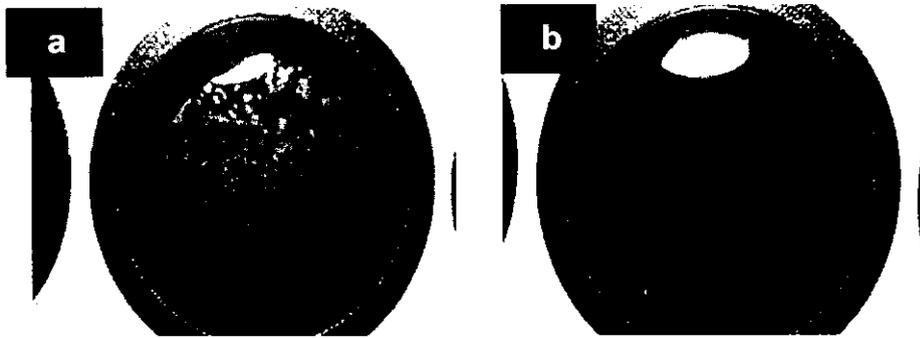
Hasil pemeriksaan untuk identifikasi spesies *candida* dengan menggunakan tes reaksi fermentasi gula yang terdiri dari glukosa, maltosa, sukrosa dan laktosa. *C. albicans* Isolat Surabaya memberikan hasil reaksi positif ditandai adanya perubahan warna dari biru menjadi kuning pada glukosa, maltosa dan sukrosa, sedangkan untuk laktosa memberikan hasil negatif.

5.2 Karakterisasi *C. albicans* dengan Serotyping dan Genotyping

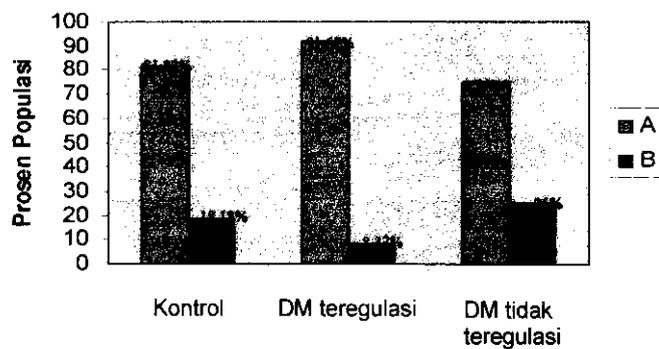
Karakterisasi *C. albicans* bertujuan untuk memperoleh data serotipe dan genotipe *C. albicans* yang menginfeksi pada mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non- DM.

5.2.1 Serotyping dengan menggunakan *latron Candida Check* (RM 302-K, Tokyo, Japan)

Pemeriksaan ini berdasarkan pada reaksi ikatan antigen-antibodi. Dalam metode ini strain *C. albicans* di kelompokkan dalam dua serotipe yaitu *C. albicans* serotipe A dan serotipe B. Pada serotipe A ditandai dengan adanya reaksi aglutinasi (Gb. 5.4a) dan pada serotipe B tidak terjadi aglutinasi (Gb. 5.4b). Pada grafik 5.1 tampak bahwa semua sampel yang didapat adalah *C. albicans* dengan serotipe A sebanyak (91,67%) pada penderita DM teregulasi, pada DM tidak teregulasi (75%) dan pada non-DM didapatkan sebesar (81,82%), sedangkan serotipe B (8,33%) pada penderita DM teregulasi, pada DM tidak teregulasi (25%) dan pada non-DM didapatkan sebesar (18,18%) (Lampiran 1). Jadi mayoritas serotipe *C. albicans* isolat Surabaya yang terdapat pada penderita DM dan non-DM adalah serotipe A. Akan tetapi *C. albicans* serotipe B pada DM tidak teregulasi prosentasenya lebih tinggi dibanding pada DM teregulasi dan non-DM. Ini berarti pada DM tidak teregulasi *C. albicans* serotipe B dapat menjadi patogen.



Gambar 5.4 (a) *C. albicans* Serotipe A (b) *C. albicans* Serotipe B



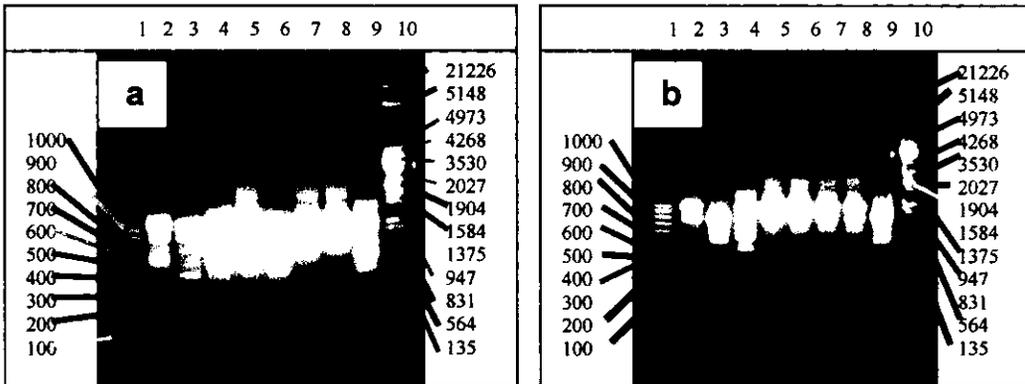
Grafik 5.1 Prosentase Populasi dari *C. albicans* Serotipe A dan Serotipe B

5.2.2 Genotyping *C. albicans*

Pemeriksaan genotipe *C. albicans* yang menginfeksi pada mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non-DM dilakukan dengan metode RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Pada metode ini digunakan primer NT : 5' CCGTCAGCA 3' dengan kondisi PCR-RAPD sebagai berikut : Hot start 94°C selama 5 menit, Denaturasi 94°C selama 1 menit, Anealing 35°C selama 1 menit dan

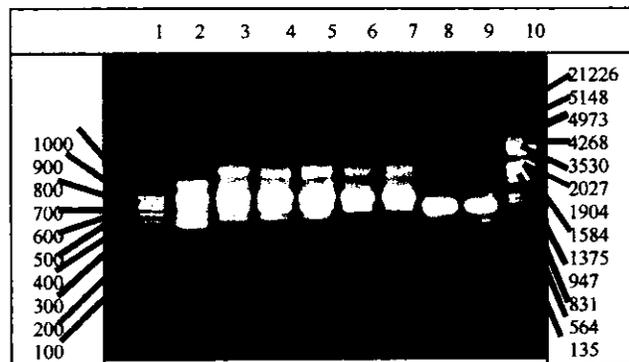
Extension 72°C selama 2 menit. Extra Extension 72°C selama 5 menit dan banyaknya siklus adalah 45 siklus.

Langkah selanjutnya hasil RAPD dielektroforesis pada gel agarosa 2 % yang memisahkan fragmen DNA *C.albicans* dengan kisaran 5148 – 200 bp yang tampak pada gambar 5.5; 5.6; dan 5.7



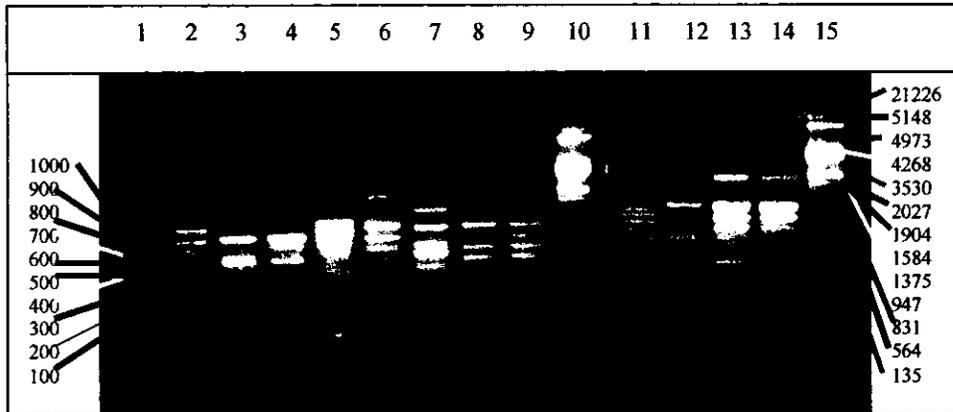
Gambar 5.5 Hasil RAPD *C.albicans* pada DM teregulasi dan DM tidak teregulasi dengan NT primer

Keterangan : a. Lane 2 sampai 9 DM teregulasi
 b. Lane 2 sampai 4 DM teregulasi ,
 Lane 5 s/d 9 (b) DM tidak teregulasi
 Lane 1 marker DNA 100 bp
 Lane 10 marker λ Hind III + Eco R1



Gambar 5.6 Hasil RAPD *C.albicans* pada DM tidak teregulasi dan Non - DM dengan NT primer

Keterangan : Lane 2 sampai 7 DM tidak teregulasi,
 Lane 8 dan 9 non-DM
 Lane 1 marker DNA 100 bp
 Lane 10 marker λ Hind III + Eco R1



Gambar 5.7 Hasil RAPD *C. albicans* pada non – DM dengan NT primer
 Keterangan: Lane 1 marker DNA 100 bp
 Lane 10 marker λ Hind III + Eco R1

Hasil RAPD *C. albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM tidak teregulasi hanya menunjukkan adanya 5 pola variasi genetik yaitu :

Pola 1 : lajur 5,6,7 (Gb.5.5) dan lajur 6,7 (Gb.5.6)

Pola 2 : lajur 8 (Gb.5.5) dan lajur 4,5 (Gb. 5.6)

Pola 3 : lajur 9 (Gb.5.5)

Pola 4 : lajur 2 (Gb.5.6)

Pola 5 : lajur 3 (Gb.5.6).

Untuk memperoleh data pada analisis Fenogram dilakukan penghitungan sebagai berikut : Jumlah pasangan basa dari fragmen DNA dihitung dengan menggunakan persamaan regresi linier dari kurva standar marker DNA yaitu sebagai berikut (data lengkap pada lampiran 2)

$$Y = - 2,8655 X + 3,913$$

$$Y = - 4,0403 X + 4,2548$$

Nilai Y merupakan log pasangan basa yang dihasilkan dari nilai Rf (*Retardaction factor*) dari pita DNA marker. Persamaan regresi tersebut

menunjukkan bahwa Y adalah *dependent variable* dan X adalah *independent variable*, maka perubahan X akan menyebabkan perubahan Y atau perubahan nilai Rf 2,8655 dan 4,0403 akan menyebabkan perubahan jumlah log pasangan basa.

Tabel 5.1 Fragmen DNA Hasil RAPD pada 3 kelompok sampel

Kelompok Sampel	Jumlah fragmen	Tipe fragmen	Ukuran fragmen DNA (bp)
B	15	1	2888
		2	2225
		3	1953
		4	1505
		5	1322
		6	1160
		7	952
		8	793
		9	659
		10	549
		11	457
		12	380
		13	316
		14	182
		15	151
C	12	1	2888
		2	2225
		3	1953
		4	1322
		5	1160
		6	952
		7	793
		8	659
		9	457
		10	380
		11	316
		12	105
A	14	1	3747
		2	3288
		3	2888
		4	2535
		5	2225
		6	1953
		7	1715
		8	1505
		9	1322
		10	1160
		11	952
		12	793
		13	549
		14	126

Tabel 5.2 Karakter hasil RAPD pada kelompok sampel

Kelp Sam pel	karakter																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
B	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
C	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
A	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

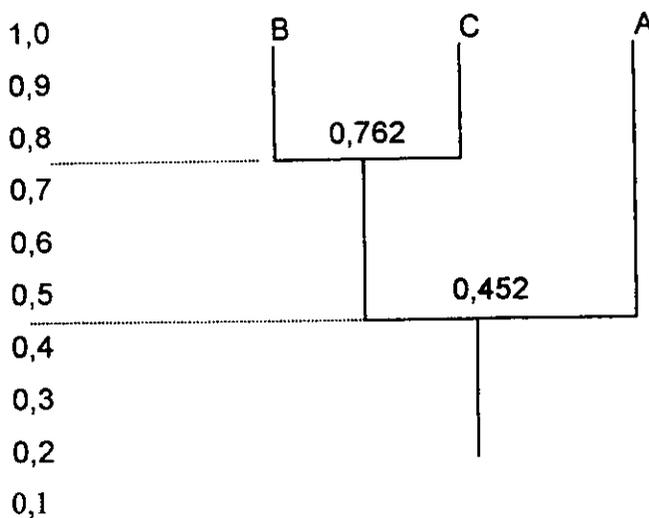
Keterangan : B : Kelompok sampel DM Teregulasi yang positif *C.albicans*
 C : Kelompok sampel DM Tidak Teregulasi yang positif *C.albicans*
 A : Kelompok sampel non-DM yang positif *C.albicans*

Tabel 5.3 Matrik Similaritas di antara kelompok sampel

Kelp. sampel	DM Teregulasi	DM Tidak Teregulasi	non - DM
	B	C	A
B	-	0,762	0,476
C	-	-	0,428
A	-	-	-

Kekerabatan atau keragaman genetik *C.albicans* yang mengkolonisasi pada penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan Non-DM berdasarkan genotipe diukur melalui matrik kesamaan dari fragmen DNA berdasar pada jarak genetik. Antara DM teregulasi dan DM tidak teregulasi diperoleh jarak genetik sebesar 0,762 (lampiran 2). Antara DM teregulasi dengan non-DM diperoleh jarak genetik sebesar 0,476. Antara DM tidak teregulasi dengan non-DM diperoleh jarak genetik sebesar 0,428 (lampiran 2).

Fenogram :



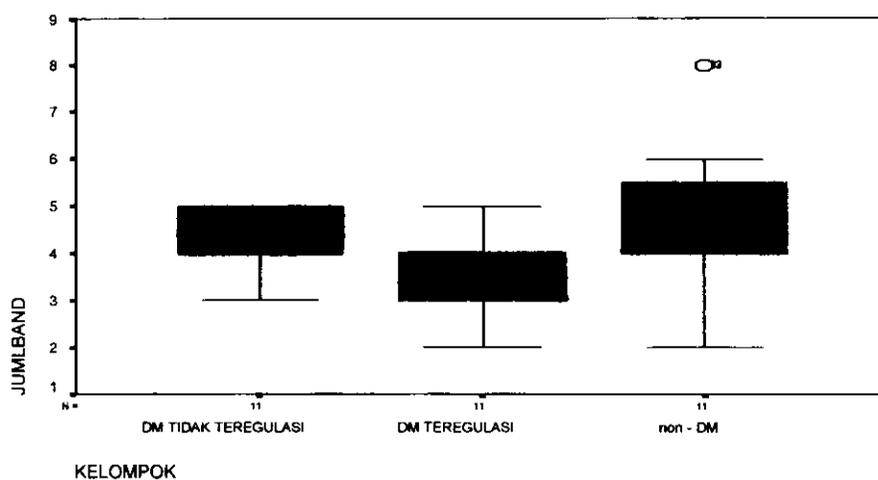
Gambar 5.8 Fenogram berdasarkan Matriks Kesamaan dari fragmen DNA *C.albicans* hasil RAPD

Hasil Fenogram menggambarkan bahwa *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut non-DM mempunyai kecenderungan hubungan nilai kekerabatan yang lebih jauh (jarak genetik 0,452) dengan *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi dan DM tidak teregulasi. Jarak genetik berkisar antara 0 – 1, dimana 0 adalah berarti jarak genetik yang jauh dan 1 adalah jarak genetik yang dekat. Sebaliknya, *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi mempunyai kecenderungan hubungan nilai kekerabatan yang lebih dekat (jarak genetik 0,762) dengan *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM tidak teregulasi.

Selain analisis fenogram, variabilitas genetik *C.albicans* yang ditemukan dapat pula dikelompokkan berdasarkan pola polimorfisme pita DNA hasil RAPD. Dari gambar 5.5, 5.6 dan 5.7 terlihat bahwa *C.albicans*

yang diisolasi dari non-DM menunjukkan pola polimorfisme yang sangat bervariasi, begitu juga pada *C.albicans* dari DM teregulasi. Hal yang berbeda terlihat pada hasil RAPD *C.albicans* dari penderita DM tidak teregulasi yang menunjukkan adanya variabilitas genetik diantara isolat *C.albicans* yang tidak tinggi dibanding dengan isolat *C.albicans* pada DM teregulasi dan non-DM.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa nilai rata-rata polimorfisme (berdasar jumlah band) pada non-DM ($4,91 \pm 2,02$) lebih tinggi dibanding dari nilai rata-rata polimorfisme pada DM teregulasi ($3,55 \pm 0,82$) dan DM tidak teregulasi ($4,27 \pm 0,65$) (lampiran 3).



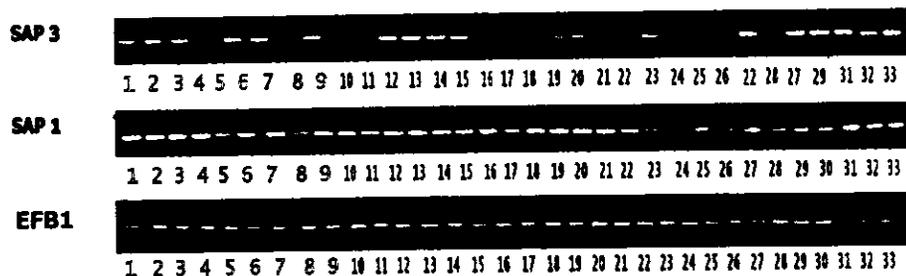
Grafik 5.2 Distribusi Jumlah band hasil RAPD *C.albicans* pada beberapa Tingkat Regulasi DM

5.3 Keberadaan gen SAP1 dan gen SAP3 (*Secretory Aspartyl Proteinase*)

Untuk mendeteksi keberadaan gen SAP1 dan gen SAP3 menggunakan metode PCR dengan tujuan mendapatkan amplifikasi dari

suatu segmen DNA tertentu yang dibatasi oleh 2 oligonukleotida sintetik (primer).

Kedua gen SAP ini akan mensekresi enzim SAP1 dan SAP3 yang berperan penting pada proses awal terjadinya infeksi oleh *C.albicans*, sehingga keberadaan ke dua gen tersebut perlu untuk diketahui pada *C.albicans* yang menginfeksi penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non DM. Hal ini karena SAP1 dan SAP3 ini berperan penting pada proses perlekatan dan kolonisasi *C.albicans*, selain itu SAP3 juga berperan penting pada *phenotypic switching*.

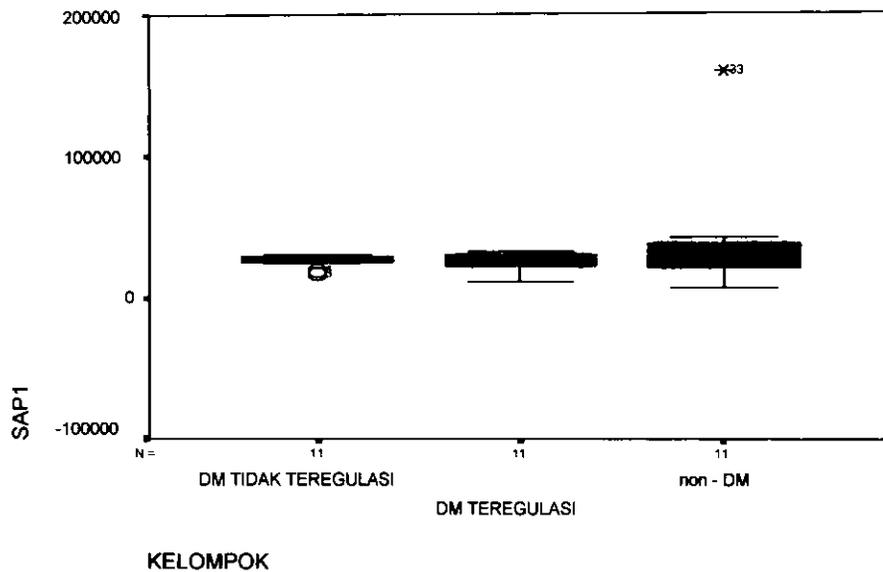


Gambar 5.9 Hasil PCR gen SAP1 dan SAP3 *C.albicans*

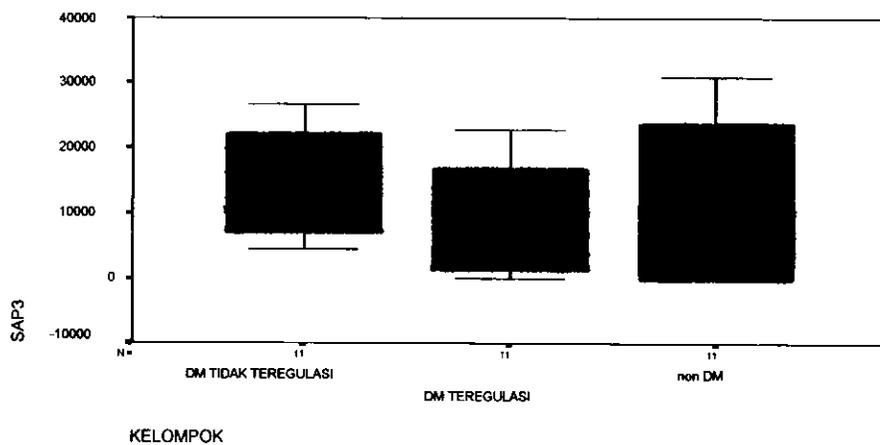
Keterangan : 1 s/d 11 : DM teregulasi
 12 s/d 22 : DM tidak teregulasi
 23 s/d : Kelompok kontrol

Gen EFB1 adalah "House Keeping Gen" sebagai internal kontrol. Hasil PCR gen SAP1 pada penderita DM teregulasi tampak pada semua sampel, sedangkan gen SAP3 pada sampel no.10 dan 11 tidak tampak. Pada DM tidak regulasi gen SAP1 maupun SAP3 tampak pada semua sampel. Pada Non-DM gen SAP1 juga tampak pada semua sampel, sedangkan gen SAP3 tidak tampak pada sampel no. 23,24,25,26,28 dan 30. Ini berarti pada DM tidak teregulasi *C.albicans* berhasil mengadakan

kolonisasi, sedangkan pada DM teregulasi dan non-DM tidak semua *C. albicans* mampu mengadakan kolonisasi.



Grafik 5.3 Distribusi Keberadaan gen SAP1 *C. albicans* pada beberapa Tingkat Regulasi DM .



Grafik 5.4 Distribusi Keberadaan gen SAP3 *C. albicans* pada beberapa Tingkat Regulasi DM .

Hasil analisis statistik terhadap gen SAP1 dan SAP3 *C. albicans* pada penderita DM berdasarkan tingkat regulasi menunjukkan bahwa gen SAP1 mempunyai hubungan nilai rata-rata keberadaan gen yang sama

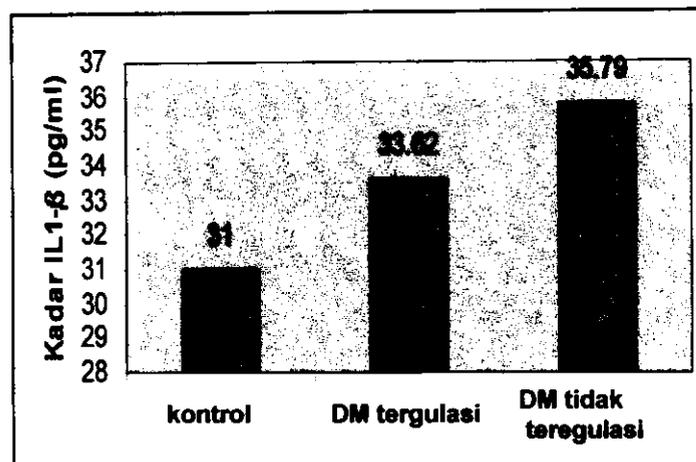
antara Non-DM ($39104,19 \pm 4156,22$); DM teregulasi ($25259,79 \pm 7429,71$) dan DM tidak teregulasi ($26281,29 \pm 4312,39$) (Grafik 5.3 dan lampiran 3). Selanjutnya hasil analisis data pada gen SAP3 *C. albicans* pada penderita DM berdasarkan tingkat regulasi menunjukkan bahwa nilai rata-rata keberadaan gen SAP3 pada Non-DM ($11512,86 \pm 1348,26$) lebih rendah dibanding pada DM teregulasi ($10319,53 \pm 9028,21$) dan DM tidak teregulasi ($14793,86 \pm 8851,28$) (Grafik 5.4 dan ampiran 3), sedangkan pada DM yang teregulasi mempunyai nilai rata-rata keberadaan gen SAP3 lebih rendah daripada DM tidak teregulasi. Dengan demikian maka pada penelitian ini ditemukan bahwa pada penderita DM tidak teregulasi *C. albicans* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut memiliki gen SAP3.

5.4 Pemeriksaan Sitokin *pro-inflammatory*

Pemeriksaan ini menggunakan metode Indirect ELISA (ELISA Bendermed system Kit) yang bertujuan untuk mengetahui kondisi *immunocompromise* penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan Non-DM yang terinfeksi oleh *C. albicans* melalui kadar sitokin proinflamatori antara lain IL-1 β dan TNF- α . Pada IL-1 β dengan Uji Anova Oneway pada $\alpha = 0.05$ didapatkan $p < 0.012$ atau $F = 5,091$ (lampiran 4), kemudian dilanjutkan dengan Uji Tucky HSD

Tabel 5. 4 Hasil Uji Beda IL-1 β setelah Anova (HSD)

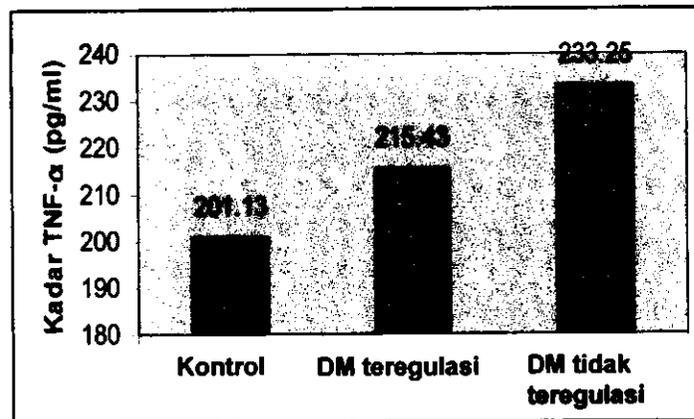
	DM teregulasi	DM tidak teregulasi	Non-DM
DM teregulasi	-	P = 0.029 (signifikan)	P=0.993 (non-sig.)
DM tidak teregulasi			P=0.022 (signifikan).
Non-DM			-

**Grafik 5.5** Hasil Pemeriksaan Kadar IL- 1 β (pg/ml) pada non-DM, DM teregulasi dan DM tidak teregulasi

Pada TNF- α dengan Uji Anova Oneway pada $\alpha = 0.05$ didapatkan $p < 0.007$ atau $F = 5,847$ (lampiran 4), kemudian dilanjutkan dengan Uji Tucky HSD

Tabel 5. 5 Hasil Uji Beda TNF- α setelah Anova (HSD)

	DM teregulasi	DM tidak teregulasi	Non-DM
DM teregulasi	-	P = 0.017 (signifikan)	P= 0.997 (non-sig.)
DM tidak teregulasi			P= 0.015 (signifikan).
Non-DM			-



Grafik 5.6 Hasil Pemeriksaan Kadar TNF- α (pg/ml) pada non-DM, DM teregulasi dan DM tidak teregulasi.

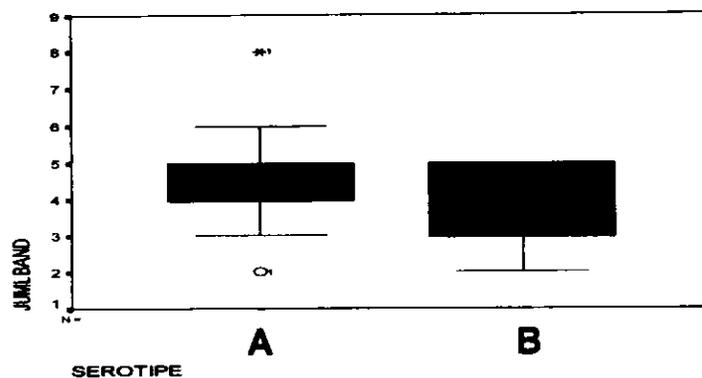
Hasil analisis statistik menunjukkan adanya perbedaan kadar sitokin yang signifikan ($\alpha = 0.05$) antara kadar IL-1 β pada penderita DM tidak teregulasi dengan kadar IL-1 β pada penderita DM teregulasi dan non - DM yang terinfeksi oleh *C.albicans*. Sedangkan kadar IL-1 β pada penderita DM teregulasi tidak berbeda bermakna dengan kadar IL-1 β pada non DM (Tabel 5.4 dan grafik 5.5). Demikian juga tingginya kadar TNF- α pada penderita DM tidak teregulasi menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan ($\alpha = 0.05$) dengan kadar TNF- α pada penderita DM teregulasi dan Non-DM. Sedangkan kadar TNF- α pada penderita DM teregulasi tidak berbeda bermakna terhadap kadar TNF- α pada Non-DM (Tabel 5.5 dan Grafik 5.6). Hal ini karena kondisi respons imun pada DM tidak teregulasi dimana *AGEs product* sebagai hasil glikosilasi akan menstimulasi peningkatan kadar IL-1 β dan TNF- α .

5.5 Hubungan antara Serotipe *C.albicans* dengan Polimorfisme dan Keberadaan gen SAP1 maupun gen SAP3

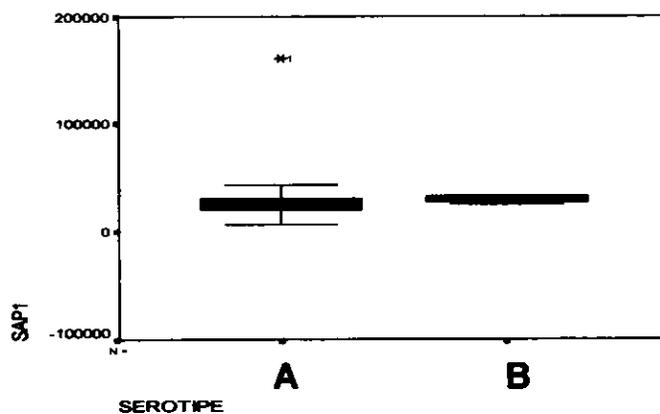
Serotipe A mempunyai rata-rata polimorfisme (4.36 ± 1.39) lebih tinggi dari pada nilai rata-rata polimorfisme (3.60 ± 1.34) pada serotipe B (Grafik 5. 7).

Tabel 5.6. Hubungan Serotipe *C.albicans* dengan Polimorfisme dan Keberadaan gen SAP1 dan SAP3

	Polimorfisme	Keberadaan gen SAP1	Keberadaan gen SAP3
Serotipe A	4.36 ± 1.39	30247.10 ± 26721.8	10995.52 ± 10147.59
Serotipe B	3.60 ± 1.34	30035.86 ± 3237.79	19002.85 ± 10978.88

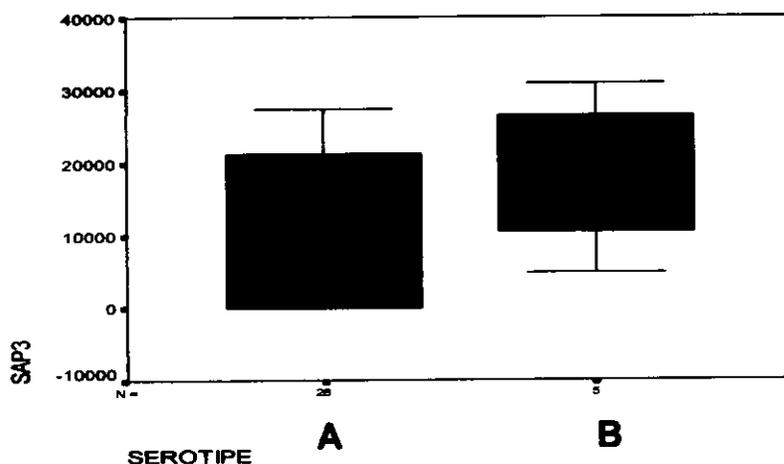


Grafik 5.7 Distribusi jumlah band pada Serotipe A dan B *C.albicans*



Grafik 5.8 Distribusi Keberadaan gen SAP1 pada Serotipe A dan B *C.albicans*

Serotipe A dan B mempunyai nilai rata-rata keberadaan SAP1 yang sama (30247.10 ± 26721.82) untuk serotipe A dan (30035.86 ± 3237.79) untuk serotipe B (Grafik 5.8).

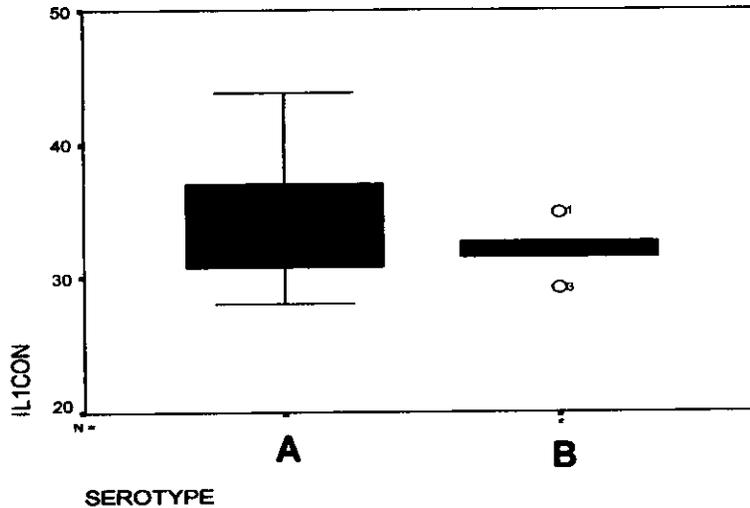


Grafik 5.9 Distribusi Keberadaan gen SAP3 pada Serotipe A dan B *C. albicans*

Pada serotipe A mempunyai nilai rata-rata SAP3 (10995.52 ± 10147.59) (lampiran 5), lebih rendah dari pada rata-rata SAP3 (19002.85 ± 10978.88) pada serotipe B (Grafik 5.9).

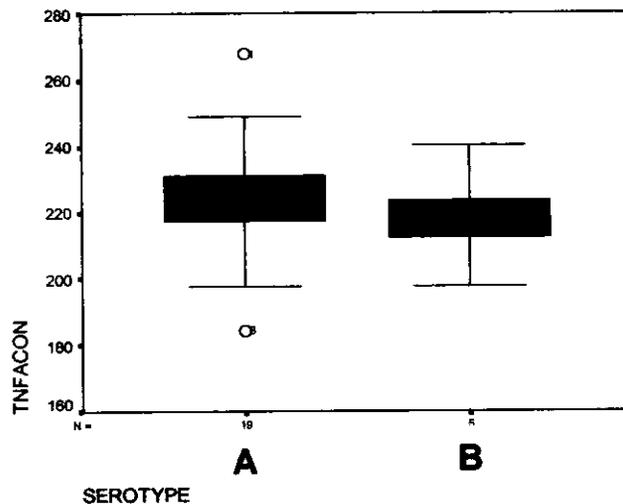
5.5. Hubungan Serotipe *C.albicans* dengan Kadar IL-1 β dan TNF- α inang

Serotipe A mempunyai nilai rata-rata konsentrasi IL-1 β (34.2446 ± 4.5695) lebih tinggi dari pada nilai rata-rata konsentrasi IL-1 β (32.1500 ± 2.0562) pada serotipe B (Grafik 5.10 dan lampiran 5).



Grafik 5.10 Distribusi Kadar IL-1 β pada Serotipe A dan B *C. albicans*

Serotipe A mempunyai nilai rata-rata konsentrasi TNF- α ($224,8561 \pm 18,5380$) lebih tinggi dari pada nilai rata-rata konsentrasi TNF- α ($218,1333 \pm 15,6461$) pada serotipe B (grafik 5.11).



Grafik 5.11 Distribusi Kadar TNF- α pada Serotipe A dan B *C. albicans*

Kadar ke dua sitokin proinflamatori yang tinggi pada serotipe A menunjukkan bahwa serotipe A lebih cenderung mudah berikatan dengan sel mukosa inang sehingga menstimulasi produksi IL-1 β dan TNF- α dan

kemudian akan mengaktifkan sel fagosit untuk membuat sel target menjadi lisis.

Tabel 5.7 Hubungan Serotipe *C.albicans* dengan Polimorfisme, Keberadaan gen SAP1 dan gen SAP3 serta Kadar IL-1 β dan TNF- α

Serotipe	Keberadaan gen SAP1	Keberadaan gen SAP3	Polimorfisme	Kadar IL-1 β	Kadar TNF- α
A	30247.10 \pm 26721.82	10995.52 \pm 10147.59	4.36 \pm 1.39	34.2446 \pm 4.5695	224.856 1 \pm 18.5350
B	30035.86 \pm 3237.79	19002.85 \pm 10978.88	3.60 \pm 1.34	32.1500 \pm 2.0562	218.133 33 \pm 15.641

Pada tabel ini merupakan rangkuman mengenai hubungan antara serotipe *C.albicans* dengan keberadaan Gen SAP1 dan SAP3, dengan Polimorfisme dan dengan kondisi respons imun inang.

BAB 6

PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini bersifat *observational crosssectional study* dengan tujuan untuk memahami etiopatogenesis infeksi *C.albicans* pada penderita DM agar diagnosis infeksi *C.albicans* dapat ditegakkan dengan lebih akurat, hal ini sesuai dengan *body of knowledge* di bidang Kedokteran Gigi yang berorientasi ke depan kearah *diagnostic preventive* dengan pengobatan *predictive medicine*.

Penelitian ini di dasarkan dengan pendekatan teknologi biologi molekuler dan imunologi untuk pemeriksaan variabilitas genetik *C.albicans*, serotipe dan keberadaan gen SAP1 dan SAP3 yang berhubungan dengan virulensi *C.albicans* serta kadar sitokin proinflamatori yang berhubungan dengan respons imun inang. Hasil penelitian ini juga diharapkan dapat memperbaiki tatalaksana perawatan *Oral Candidosis* pada penderita DM maupun non-DM.

6.1 Identifikasi *C.albicans* isolat Surabaya

Identifikasi *C.albicans* dilakukan setelah terlebih dahulu dilakukan pemeriksaan sitologi. Spesimen untuk pemeriksaan sitologi berasal dari smear pada lidah dan mukosa pipi kemudian dilakukan pengecatan dengan *Papanicolaou*, pemeriksaan ini bertujuan untuk memastikan adanya infeksi *C.albicans* di epitel mukosa rongga mulut penderita DM dan non-DM. Pada (Gb. 5.1), pemeriksaan ini menunjukkan keberadaan *C.albicans* baik dalam bentuk spora maupun *hyphae* serta adanya sel radang. Keadaan ini menunjukkan ada infeksi *C.albicans* pada mukosa rongga mulut penderita DM dan non-DM. *C.albicans* merupakan jamur yang tumbuh komensal di rongga mulut, bersifat

patogen oportunistik dan berperan penting pada kejadian infeksi di mukosa rongga mulut penderita dengan kondisi *immunocompromise* dimana salah satu diantaranya adalah penderita DM.

Infeksi *C.albicans* yang terjadi tidak selalu disertai manifestasi klinis, maka dari itu perlu dilakukan pemeriksaan sitologi untuk melihat apakah ada infeksi atau hanya keberadaan *C. albicans* yang tumbuh komensal. Selanjutnya pengamatan difokuskan untuk mengamati atau menilai keberadaan *C.albicans* melalui media kultur. Untuk tujuan tersebut, maka penelitian ini dirancang dalam 3 kelompok, yaitu kelompok kontrol non-DM dengan kadar A1C < 6,5% yang positif infeksi *C.albicans* (A), kelompok DM teregulasi dengan kadar A1C antara 6,5 % - 8% yang positif infeksi *C.albicans* (B) dan kelompok DM tidak teregulasi dengan kadar A1C > 8% yang positif infeksi *C.albicans* (C).

Pengambilan sampel *C.albicans* yang berasal dari penderita DM dan non-DM yaitu sejumlah 87 orang penderita DM dan 46 orang non-DM selama periode waktu Oktober 2003 – Januari 2004 di Poli Endokrinologi RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan Klinik FKG Unair. Sasaran penelitian ini adalah penyakit DM tipe 2, karena merupakan kelompok yang paling banyak (95%) dalam populasi penyakit DM dan identifikasi *C.albicans* isolat Surabaya bertujuan untuk memperoleh data biokimiawi yang merupakan karakter *C.albicans*. Dalam identifikasi ini digunakan metode pengecatan gram dan uji fermentasi gula untuk membedakan berbagai spesies *candida* yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut.

Hasil identifikasi *C.albicans* dengan pengecatan gram dan uji fermentasi gula diperoleh 12 penderita DM teregulasi dan 13 DM tidak teregulasi yang positif *C.albicans*, sementara itu dari 46 sampel non-DM yang datang ke Klinik FKG Unair diperoleh 12 orang yang positif *C.albicans*. Sisanya positif spesies *candida* yang lain dalam jumlah yang menyebar antara lain *C.galbrata*, *C.stelatoidea*, *C.krusei*, *C.parapsilosis* dan *C.tropicalis*. Namun berdasar pada hasil penghitungan bahwa besar sampel yang absah dalam penelitian ini adalah 11, maka sampel yang digunakan dalam masing-masing kelompok tersebut adalah 11 orang.

Berdasar dari analisis biokimiawi terhadap *C.albicans* menunjukkan adanya spesifikasi *C.albicans* pada pemeriksaan dengan pengecatan gram dan reaksi fermentasi gula. Hasil data pengecatan gram menunjukkan bahwa isolat *candida* yang didapat memang benar *C.albicans*, demikian pula pada hasil uji fermentasi gula menunjukkan hasil positif dengan adanya perubahan warna pada glukosa, maltosa dan sukrosa sedangkan laktose memberikan hasil yang negatif (Gb. 5.2 dan 5.3). Menurut Samaranayake (1990) *C.stelatoidea* adalah varian *C.albicans* karena pada reaksi fermentasi gula diperoleh reaksi negatif terhadap sukrosa dengan kata lain tidak mampu mengasimilasi sukrosa.

Jumlah *C.albicans* yang ditemukan dalam pemeriksaan skrening sampel ini menunjukkan bahwa *C.albicans* ditemukan dalam konsentrasi yang tinggi dibanding spesies *candida* yang lain pada penderita DM. Hal ini sesuai dengan penemuan beberapa peneliti terdahulu antara lain Leblond *et al*, 2000; Yokoyama *et al*, 2000; Newman *et al*, 2001 dan Regina, 2001 yang mengatakan

bahwa *C.albicans* merupakan jamur yang dominan pada penderita dengan keadaan imunokompromistik seperti halnya pada penderita DM.

Penyakit Diabetes Mellitus (DM) ditandai dengan hiperglikemia kronik sebagai akibat dari penurunan sekresi insulin dan atau penurunan sensitifitas sel target terhadap kerja insulin (Robbins *et al*, 1999; Tjokroprawiro,2000; Tjokroprawiro,2003). Hiperglikemia merupakan penyebab kejadian awal dari disfungsi endotel, yang kemudian berkembang menjadi penyebab adanya komplikasi menahun dari DM karena terbentuknya AGE (*Advanced Glycocylated End Products*) (Tjokroprawiro, 2000; Donosepoetro, 2004). AGE *product* merupakan suatu pendekatan baru dalam biokimiawi dan biologi molekuler untuk mengungkap patofisiologi berbagai penyakit kronis akibat komplikasi DM. Meskipun pada tahap awal proses glikosilasi menghasilkan *Schiff base* atau *Amadori product* masih bersifat *reversible* yang merupakan *exellent glycemic control*, namun demikian terdapat kecenderungan yang *irreversible* karena terbentuknya AGEs sebagai kompleks molekuler (Tjokroprawiro,2003) yang memberikan efek patogenik melalui interaksi dengan reseptor seluler yang spesifik (Lalla *et al*,1998; Donosepoetro, 2004).

Akumulasi AGE dalam jaringan akan meningkat dengan meningkatnya usia, karena kadar glukosa darah pada usia lanjut akan meningkatkan AGE (Nawroth *et al*, 1999). Peningkatan AGE ini akan merangsang perubahan pada struktur jaringan yang bersifat *irreversible* dan mengakibatkan komponen matriks ekstra seluler terganggu, yang juga akan merangsang produksi sitokin dan radikal bebas (Brownlee, 1995).

Berbagai pustaka melaporkan bahwa faktor yang berpengaruh terhadap kejadian infeksi *C.albicans* di rongga mulut adalah kadar glukosa darah yang tinggi dan tidak terkontrol. Pada DM ditemukan *carrier candida* yang tinggi, dan jumlah koloni berhubungan dengan tingkat kadar glukosa darah. Menurut Samaranayake, (1990) menyatakan bahwa pada penderita DM tidak teregulasi merupakan predisposisi infeksi superfisial dan sistemik termasuk infeksi *C.albicans*.

Infeksi *C.albicans* tidak selalu disertai gejala klinis termasuk munculnya bentuk *hyphae* (Harlina, 2000). Mengacu pada pendapat tersebut, maka pada penelitian ini difokuskan pada sampel yang mengandung kultur positif dari *scrubing* mukosa rongga mulut. Berdasarkan hasil kultur tersebut sudah dapat menggambarkan adanya infeksi *C.albicans*. Pertimbangan lain adalah karena jumlah kasus infeksi yang manifes kurang, maka yang diamati dengan ada atau tidaknya pertumbuhan *C.albicans* pada media pertumbuhan (Gb. 5.2 B dan 5.3). Hal ini didukung oleh Willis (1999), yang menyatakan bahwa 40 % penderita DM *carrier C.albicans* tidak menampakkan gejala klinis. Gejala eritema yang nampak tidak selalu manifes. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Phan (2000) yang menemukan bahwa *C.albicans* dalam bentuk baik *yeast* atau *blastophore* maupun *hyphae* keduanya dapat berinteraksi dengan sel inang. Interaksi tersebut melalui perlekatan pada epitel mukosa dan proses ini sebenarnya tergantung pada komposisi protein dinding sel *C.albicans* yang berfungsi sebagai molekul adhesin, meskipun demikian pada penelitian ini tetap dilakukan pemeriksaan sitologi untuk melihat ada tidaknya infeksi, dan ternyata hasil

sitologi menunjukkan adanya infeksi *C.albicans* yang ditandai dengan bentukan spora maupun *hyphae* diantara sel epitel skuamosa rongga mulut serta ditemukan adanya berbagai sel radang.

Sampai saat ini kejadian infeksi karena *C.albicans* pada mukosa rongga mulut penderita DM masih merupakan masalah yang belum dapat diatasi secara tuntas di bidang kedokteran gigi (Appleton *et al*, 2000). Hal ini karena etiopatogenesis yang mendasari terjadinya proses infeksi tersebut sangat kompleks meliputi gangguan pada sistem imunitas dan interaksi molekuler yang sampai saat ini masih belum tuntas penjelasannya. Menurut Elahi *et al*, (2001) bahwa infeksi *C.albicans* pada epitel mukosa rongga mulut penderita DM adalah rekuren dan persisten, dan menurut data ada sekitar 80% pada penderita DM di jumpai adanya *oral candidosis*. Keadaan ini merupakan problem klinis yang hingga saat ini masih belum dapat diatasi dengan baik di bidang kesehatan.

Meskipun spesies *candida* ini merupakan flora normal, namun di antara spesies tersebut ada yang bersifat patogen oportunistik yaitu *C.albicans*. Infeksi oleh jamur *C.albicans* ini merupakan salah satu komplikasi dari penyakit DM yang paling tinggi angka kejadiannya di rongga mulut (Martinez *et al*, 1998), sehingga keberadaan jamur ini harus diwaspadai, terutama pada penderita *immunocompromise*, hal ini juga sesuai dengan pendapat Mercure *et al*, 1999; Elie *et al*, 1998; dan Munoz *et al*, 2003, dimana kondisi *immunocompromise* tersebut dapat ditemukan pada penderita DM, penderita kanker dan penderita HIV.

Pada kondisi *immunocompromise* tersebut *C.albicans* akan mudah mengadakan perlekatan dengan mukosa rongga mulut, kemudian mengadakan kolonisasi dan terjadilah infeksi. Pada proses selanjutnya dapat terjadi invasi ke jaringan yang lebih dalam melalui perlekatan dengan endotel vaskuler. Pada kondisi sistemik inilah diperoleh data menurut (Jouault *et al*, 1997, Koelsch *et al*, 2000) bahwa 40 - 60 % infeksi *C.albicans* dapat menimbulkan kematian, dimana tingginya angka kematian yang dilaporkan ini akibat infeksi sistemik dari strain *C.albicans* yang resisten terhadap obat.

Dari data penelitian ini dapat diperoleh gambaran bahwa pada mukosa rongga mulut sebenarnya terdapat berbagai spesies *candida* dengan berbagai strain yang berbeda, meskipun demikian spesies yang paling dominan adalah *C.albicans*.

6.2 Pemeriksaan Serotipe *C.albicans* isolat Surabaya.

Pemeriksaan ini bertujuan untuk memperoleh data serotipe *C.albicans* yang menginfeksi pada mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non-DM, yang akan memberikan gambaran pengelompokkan jenis strain *C.albicans* secara serologi.

Pada (Gb.5.4a dan 5.4b), pemeriksaan serotipe *C.albicans* didasarkan pada reaksi ikatan antigen-antibodi. Strain *C.albicans* pada metode ini dikelompokkan dalam dua serotipe yaitu *C.albicans* serotipe A dan serotipe B. *C.albicans* serotipe A mempunyai determinan antigen pada permukaan sel yang tidak dimiliki oleh serotipe B. Adanya deteminan antigen tersebut yang

menyebabkan adanya perbedaan terjadinya reaksi aglutinasi pada serotipe A, sedangkan pada serotipe B tidak terjadi reaksi aglutinasi.

Pada penelitian ini *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut pada non-DM ditemukan sebesar 81.82 % adalah serotipe A dan 18.18 % serotipe B, dan *C.albicans* pada penderita DM teregulasi ditemukan sebesar 91.67 % adalah serotipe A dan 8.33 % serotipe B, sedangkan *C.albicans* pada DM tidak teregulasi 75 % adalah serotipe A dan 25 % serotipe B (Grafik 5.1). Dari data tersebut di atas nampak bahwa *C.albicans* serotipe B lebih tinggi jumlahnya dalam distribusinya terhadap infeksi *C.albicans* pada DM tidak teregulasi dibanding pada DM teregulasi dan non-DM, akan tetapi secara keseluruhan sampel *C.albicans* serotipe A merupakan kelompok yang paling banyak.

Menurut berbagai pustaka yang ada mengatakan bahwa serotipe A lebih virulen dibanding serotipe B (Hansenclever *et al*, 1961; Samaranayake *et al*, 1990; Beausejour *et al*, 1998), dengan demikian berdasar hasil data yang ada maka *C.albicans* isolat Surabaya yang ditemukan dalam penelitian ini mayoritas adalah jenis *C.albicans* yang sebenarnya lebih virulen sehingga mempunyai kecenderungan untuk berubah menjadi patogen.

Kemungkinan lain pada penelitian ini, dengan ditemukannya *C.albicans* serotipe B pada DM tidak teregulasi lebih tinggi jumlahnya dibanding pada DM teregulasi dan non-DM, hal ini menunjukkan bahwa pada DM yang tidak teregulasi *C.albicans* serotipe B mempunyai kontribusi yang besar untuk menjadi patogen. Berdasar hal tersebut di atas maka ke dua serotipe mempunyai

kontribusi yang sama untuk menjadi patogen. Dapat disimpulkan bahwa pada DM tidak teregulasi perbedaan virulensi *C.albicans* tidak berpengaruh karena baik serotipe A dan B mampu menjadi patogen. Hal ini sesuai dengan pendapat Jouault *et al*, (1997) dan Repentigny *et al*, (2000) bahwa patogenitas selain dipengaruhi oleh serotipe juga oleh komponen protein adesi pada dinding sel *C.albicans* dan keadaan respons imun inang. Keadaan ini dapat dipahami mengapa pada DM tidak teregulasi serotipe B mampu menjadi patogen, sebab pada kondisi ini glikosilasi yang tinggi mengakibatkan menurunnya respons imun pada penderita DM.

C.albicans adalah organisme komensal dalam rongga mulut, merupakan jamur dimorfik yaitu patogen oportunistik dan merupakan flora normal di rongga mulut. Di dalam rongga mulut terdapat berbagai strain *C.albicans* dengan karakteristik fenotip tertentu yang menentukan sifatnya sebagai komensal atau patogen. Menurut beberapa literature, serotipe A lebih virulen dari pada serotipe B, sehingga adanya perubahan lingkungan di rongga mulut dapat memudahkan terjadinya perubahan dari status yang komensal menjadi patogen. Hal ini bisa dimengerti karena virulensi berhubungan dengan kemampuan *C.albicans* dalam perlekatannya dengan reseptor permukaan sel inang dan juga kemampuan melekat dengan baik pada epitel mukosa maupun dalam mengadakan kolonisasi.

Berdasarkan uraian tentang serotipe ini, maka disimpulkan bahwa serotipe *C.albicans* pada DM tidak teregulasi mempunyai pola konsentrasi kontribusi

yang berbeda dengan serotipe *C.albicans* pada DM teregulasi dan non-DM dalam menyebabkan infeksi.

6.3 Pemeriksaan Genotipe *C.albicans* isolat Surabaya.

Pemeriksaan ini bertujuan untuk menemukan adanya kekerabatan genetik *C.albicans* isolat Surabaya yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM dan non-DM. Kekerabatan genetik ini diukur melalui matriks kesamaan dari fragmen DNA (Tabel 5.3) dan dapat dilihat melalui analisis fenogram yang dihasilkan (Gb. 5.8).

Pemeriksaan genotipe *C.albicans* isolat Surabaya yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM dan non-DM bertujuan untuk mendeteksi polimorfisme pada tingkat DNA. Polimorfisme adalah perbedaan bentuk dari struktur dasar untuk mencari variabilitas *C.albicans* secara epidemiologi molekuler. Penanda DNA yang telah banyak digunakan dalam mempelajari keragaman genetik pada *C.albicans* adalah RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) (Waltimo *et al*, 2001; Munoz *et al*, 2003)

Teknik analisa RAPD mempunyai beberapa kelebihan antara lain lebih cepat dalam pelaksanaannya, hanya butuh sampel DNA sedikit (0,5-50 nm), dan tidak membutuhkan radioisotop. Pada RAPD juga tidak membutuhkan informasi sekuen DNA lebih dulu, prosedurnya lebih sederhana dan jumlah sampel yang banyak dapat diproses dengan cepat (Faqih, 2004). *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut mempunyai keragaman genetik yang berbeda pada setiap strain. Penampakan dari suatu karakter (fenotipe)

C.albicans ditentukan oleh faktor genetik dan faktor lingkungan (Straub *et al*, 2001). Keadaan ini yang mengakibatkan adanya perbedaan genotipe di antara berbagai strain *C.albicans* yang ada di dunia.

Pengetahuan tentang data-data genetik seperti adanya variasi genetik pada *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM perlu diketahui untuk tujuan menentukan virulensi, baik secara kualitas maupun kuantitas. Pengetahuan variasi genetik dapat digunakan sebagai pijakan dalam upaya perbaikan penatalaksanaan untuk menangani berbagai kasus infeksi yang disebabkan oleh *C.albicans* pada penderita DM.

Hasil analisis Fenogram (Gb. 5.8) menggambarkan bahwa *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut non-DM mempunyai kecenderungan hubungan nilai kekerabatan yang lebih jauh (jarak genetik 0,452) dengan *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi dan DM tidak teregulasi. Sebaliknya, *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM teregulasi mempunyai kecenderungan hubungan nilai kekerabatan yang lebih dekat (jarak genetik 0,762) dengan *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut penderita DM tidak teregulasi. Sementara itu hasil analisis statistik (Grafik 5.2) menunjukkan bahwa rata-rata polimorfisme pada non-DM ($4,91 \pm 2,02$) lebih tinggi dibanding dari nilai rata-rata polimorfisme pada DM teregulasi ($3,55 \pm 0,82$) dan DM tidak teregulasi ($4,27 \pm 0,65$). Ke dua hasil ini menunjukkan bahwa variabilitas genetik inilah yang menyebabkan adanya keragaman dari karakteristik sifat pada tiap kelompok sampel yang bisa ditampilkan sebagai fenotipe. Dengan demikian maka karakter *C.albicans* yang

mengkolonisasi penderita DM teregulasi dan DM tidak teregulasi mempunyai kecenderungan genotipe yang sama.

Secara genetik di antara *C.albicans* yang mengkolonisasi mukosa rongga mulut pada penderita DM tidak teregulasi tidak menunjukkan adanya variasi yang besar hanya ditemukan 5 pola (Gb. 5.5 dan 5.6). Hal ini kemungkinan disebabkan karena adanya pengaruh dari kondisi lingkungan rongga mulut yang lebih memfasilitasi strain tertentu dari *C.albicans*. Beberapa faktor yang mungkin berpengaruh antara lain : kualitas dan kuantitas saliva, pola makan dan status gizi serta respons imun inang. Meskipun demikian hal ini masih perlu analisis lebih lanjut.

6.4 Pemeriksaan Gen SAP1 dan SAP3 (*Secretory Aspartyl Proteinase*).

Untuk mendeteksi keberadaan gen SAP1 dan gen SAP3 digunakan metode PCR (*Polymerase Chain Reaction*) yang bertujuan untuk mendapatkan amplifikasi dari suatu segmen DNA tertentu yang dibatasi oleh 2 oligonukleotida sintetik yang disebut primer. Teknik ini timbul karena adanya kemampuan untuk memurnikan DNA polimerase dan mensintesis oligonukleotida DNA secara kimia, sehingga memberi peluang untuk melakukan kloning pada suatu urutan spesifik DNA .

Enzim *Secretory Aspartyl Proteinases* khususnya SAP1 dan SAP3 adalah suatu enzim hidrolitik yang bersifat protease dan dikode oleh gen SAP1 dan gen SAP3. Ke dua SAP ini yang paling dominan di sekresikan pada proses awal terjadinya infeksi *C.albicans*, sehingga perlu untuk diketahui keberadaan

teregulasi dan non-DM. Keberadaan gen SAP3 pada hasil PCR dalam penelitian ini menunjukkan bahwa setelah *C.albicans* mampu melekat pada sel epitel mukosa rongga mulut juga mampu mengadakan kolonisasi.

Pendapat bahwa enzim SAP merupakan indikator patogenik *C.albicans* yang telah dibuktikan dalam berbagai hasil penelitian terdahulu pada hewan coba, hal ini didasarkan pada : Pertama, adanya mutasi pada gen SAP menyebabkan hambatan dalam penyebaran *candidiasis* ditunjukkan dengan menurunnya virulensi *C.albicans*. Kedua, pada biopsi jaringan dari tikus yang terinfeksi *C.albicans* telah dibuktikan bahwa SAP diproduksi secara in vivo berdasarkan pemeriksaan pengecatan dengan *Indirect Fluorescent-antibody*. Wu *et al*, (2000) mengemukakan dalam penelitiannya bahwa SAP merupakan target untuk penelitian kedepan dalam hubungannya dengan perkembangan resistensi obat dan faktor virulensi *C.albicans*.

Pada gambar hasil PCR gen SAP3 (Gb.5.9) memperlihatkan bahwa tidak semua sampel pada non-DM dan DM tereregulasi menampilkan SAP3. Hal ini menunjukkan bahwa meskipun *C.albicans* mampu mengadakan perlekatan dengan sel epitel mukosa rongga mulut, akan tetapi tidak semuanya mampu mengadakan kolonisasi. Berdasarkan hasil pemeriksaan diperoleh bahwa tingkat keberadaan gen SAP3 pada DM tidak tereregulasi lebih tinggi dibanding pada DM tereregulasi dan non-DM, yaitu keberadaan yang menunjukkan adanya perbedaan dalam hal perlekatan pada sel epitel dan kemampuan kolonisasi. Pada DM tidak tereregulasi dimana semua *C.albicans* yang telah mampu mengadakan perlekatan pada sel epitel mukosa rongga mulut juga mampu mengadakan kolonisasi.

Keberhasilan *C.albicans* mengadakan perlekatan dan kolonisasi di mukosa rongga mulut merupakan awal terjadinya infeksi, ini adalah tahap kritis dari kejadian infeksi oleh *C.albicans* di mukosa rongga mulut.

Pada beberapa sampel *C.albicans* yang mengkolonisasi epitel mukosa pada non-DM dan DM teregulasi menampilkan SAP3 seperti yang tampak pada hasil PCR (Gb. 5.9), hal ini disebabkan karena 2 faktor kemungkinan yaitu tingginya kadar glukosa saliva rongga mulut dan *carrier candida* pada non-DM dan penderita DM teregulasi. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian menurut Hema (2003) yang menemukan bahwa terdapat hubungan yang kuat antara kadar glukosa saliva dengan keberadaan *C.albicans* pada DM teregulasi dan non-DM. Berdasar pada keadaan tersebut maka penderita DM perlu diwaspadai adanya berbagai faktor yang dapat memicu terjadinya komplikasi DM terutama faktor lokal di rongga mulut selain faktor inang sendiri, karena *candida* yang mengkolonisasi mukosa mulut adalah *candida* yang patogen. Walaupun tanpa riwayat DM maka pada non-DM tersebut mempunyai peluang untuk terjadi *Oral candidosis* apabila faktor lingkungan sangat mendukung.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa tidak semua *C.albicans* isolat Surabaya semuanya pasti mempunyai gen SAP3, tetapi gen SAP1 dipunyai pada semua sampel *C.albicans*. Hal ini sesuai dengan penemuan Hoegl *et al*, 1996, bahwa SAP1 dan SAP3, sampai dengan SAP7 hanya dihasilkan oleh strain *C albicans* tertentu, sedangkan SAP2 di hasilkan oleh semua strain *C albicans*.

Pada kasus DM tidak teregulasi lasimnya ditemukan adanya keparahan kerusakan jaringan, dan ditemukan adanya keberadaan gen SAP3. Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa tidak setiap *C.albicans* mempunyai gen SAP1 sampai SAP9.

Gen SAP yang teraktifasi akan mensekresikan enzim SAP yang bersifat proteolisis dan mampu mendegradasi berbagai komponen pertahanan alami di mukosa rongga mulut seperti laktoferin, *mucin* dan laktoperoksidase (Hoegl *et al*, 1996). Demikian pula mempunyai kemampuan untuk mendegradasi albumin, hemoglobin, kolagen, dan slgA (Naglik *et al*, 1999). Berbagai kepustakaan melaporkan bahwa enzim ini berperan utama dalam proses awal terjadinya infeksi *C.albicans* yaitu pada proses perlekatan dan kolonisasi di mukosa rongga mulut. Proses kolonisasi *C.albicans* ini didukung oleh banyak faktor antara lain keadaan imunodefisiensi pada inang sendiri, peran dari *glycomannoprotein* (yang merupakan bahan adesin) dan adanya enzim *Secretory Aspartyl Proteinase* (Schaller *et al*, 1998; Schaller *et al*, 2001).

Di antara banyak SAP, yaitu SAP1 sampai dengan SAP9 ternyata hanya SAP1 dan SAP3 yang paling dominan berperan pada proses awal infeksi tersebut, sedangkan SAP2, SAP4 dan SAP6 berperan pada proses terjadinya kerusakan jaringan mukosa dan infeksi *C. albicans* sistemik (Schaller *et al*, 2001). SAP 5, SAP8 dan SAP9 sampai saat ini belum diketahui secara pasti perannya dalam infeksi *C.albicans* (Hoegl *et al*, 1996).

Pada tahap awal terjadinya ikatan antara *C.albicans* dengan epitel mukosa tersebut, gen SAP akan teraktivasi dan akan mensekresi enzim SAP1

dan SAP3 yang bersifat protease (Naglik *et al*, 1999; Staib *et al*, 2000). Produk gen SAP1 dan SAP3 ini meskipun suatu protease, belum mengakibatkan rusaknya jaringan karena di duga fungsinya hanya mempengaruhi atau melisis protein yang di sintesis pada proses perlekatan tersebut sehingga *C.albicans* mampu melakukan kolonisasi.

Pada proses lanjut setelah kolonisasi, maka akan disekresi enzim SAP berikutnya yaitu SAP2, SAP4 dan SAP6 yang juga bersifat protease dan berfungsi mendegradasi komponen *Extra Cellular Matrix Protein* antara lain: laminin, fibronektin, integrin dan kolagen serotipe IV (Staib *et al*, 2000; Pichova *et al*, 2001). Pada tahap selanjutnya, karena ditunjang dengan berkurangnya ketahanan jaringan akibat keadaan imunodefisiensi pada inang, maka *C.albicans* akan berkembang dengan mudah menembus basal membran dan invasi ke dalam jaringan yang lebih dalam melalui ikatannya dengan endotel vaskuler (Phan *et al*, 2000) sehingga terjadi peningkatan proses inflamasi secara sistemik.

6.5 Pemeriksaan Sitokin *pro-inflammatory*

Pemeriksaan ini menggunakan metode *Indirect ELISA* (ELISA Bendermed system Kit) yang bertujuan untuk mengetahui kondisi *immunocompromise* penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non-DM yang terinfeksi oleh *C.albicans*. Seperti telah diketahui adanya infeksi *C.albicans* menyebabkan stimulasi sitokin proinflamatori dan keberadaan sitokin proinflamatori diwakili oleh IL-1 β dan TNF- α . Sitokin IL-1 β adalah suatu regulator yang disekresi oleh makrofag untuk meregulasi dan mengaktifasi sel T helper dalam proses

sensitisasi imunogen. TNF- α berperan pada proses kematian sel yang disebabkan oleh proses apoptosis maupun proses nekrosis. Seperti diketahui pada DM tidak teregulasi terjadi peningkatan aktifitas makrofag akibat banyaknya kematian sel yang harus dieliminasi melalui proses fagositosis.

Pada DM tidak teregulasi hiperglikemia dapat mengakibatkan berbagai gangguan pada fungsi neutrofil dan makrofag. Gangguan fungsi tersebut meliputi 4 proses yaitu : proses *chemotaxis*, *Granulocyte adherence*, *phagocytosis* dan *intracellular killing*. Kelainan pada ke 4 proses tersebut di atas karena adanya radikal bebas O_2 dan Cl^- yang berasal dari proses akibat penurunan NADPH karena adanya aktivasi *Poliol Pathway*, akibatnya terjadi *Respiratory Burst Dysfunction*. *Respiratory Burst Dysfunction* ini berkaitan dengan menurunnya fungsi *intracellular killing*, sehingga imunogen tidak dapat dieliminasi melalui proses fagositosis.

Padapenelitian ini pemeriksaan sitokin proinflamatori yaitu TNF- α dan IL- 1β tidak diperiksa secara lokal tetapi secara sistemik melalui plasma darah, hal ini dengan pertimbangan karena menurut penelitian Harlina (2000) menyatakan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna pada perubahan respons imun mukosa mulut akibat infeksi *C.albicans* antara penderita DM teregulasi, DM tidak teregulasi dan non-DM.

Hasil analisis statistik menunjukkan ada perbedaan yang signifikan pada $\alpha = 0.05$ antara kadar sitokin IL- 1β pada penderita DM tidak teregulasi, dibanding dengan kadar IL- 1β pada penderita DM teregulasi dan non- DM yang terinfeksi oleh *C.albicans* (Tabel 5.4 dan grafik 5.5). Kadar TNF- α pada penderita DM tidak

teregulasi menunjukkan ada perbedaan yang signifikan dengan kadar TNF- α pada penderita DM tereregulasi dan non-DM (tabel 5.5 dan grafik 5.6). Sebaliknya kadar IL-1 β dan TNF- α pada DM tereregulasi tidak berbeda bermakna dibanding dengan kadar ke dua sitokin pada non- DM (Tabel 5.4 dan 5.5, Grafik 5..5 dan 5.6). Hal ini menggambarkan bahwa pada DM tereregulasi kondisi respons imun secara umum masih baik mendekati normal, karena pada DM tereregulasi kemampuan komponen imun masih mampu melakukan regulasi respons imun terhadap infeksi *C.albicans*. Hal ini dapat dilihat pada kadar ke 2 sitokin proinflamatori yang diperiksa dengan metode *Indirect ELISA* tidak berbeda bermakna dengan kadar sitokin pada non-DM, tetapi pada DM tidak tereregulasi terjadi suatu peningkatan jumlah komponen imun yang diperlukan untuk mengeliminasi sel target dalam proses infeksi.

Keadaan *immunocompromise* yang lasim terjadi pada DM tidak tereregulasi mengakibatkan terjadi penurunan kemampuan komponen imun terhadap pengenalan antigen, yang berarti terjadi kecacatan sistem imun yang berakibat imunodefisiensi. Hal ini nampak pada kemampuan komponen sistem imun yang menurun sehingga terjadi gangguan pada fungsi pengenalan terhadap antigen. Hal itu dapat ditunjukkan melalui penurunan jumlah dan aktivitas sel T baik secara kuantitas maupun kualitas (Elahi *et al*, 2000; Herring *et al*, 2002).

Pada penyakit DM, terjadinya hiperglikemia akan mengakibatkan terjadi proses glikosilasi non enzimatik, yang dapat merubah struktur dan fungsi protein termasuk imunoglobulin yang memberi kontribusi terhadap berbagai komplikasi DM termasuk infeksi. Menurut Tjokroprawiro (2003) hasil proses glikosilasi yang

tinggi akan mengakibatkan ikatan kovalen secara spontan yaitu *Advance Glycosylated End Product (AGE)* sebagai reaksi biokimia abnormal yang terjadi pada DM. Terbentuknya AGE akan menstimulasi peningkatan TNF- α dan IL-1 β yang disekresi oleh makrofag, hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini yaitu diperoleh bahwa kadar ke dua sitokin proinflamatori (TNF- α dan IL-1 β) pada DM tidak teregulasi lebih tinggi secara signifikan (pada $\alpha = 0.05$ dan $p < 0.007$ untuk TNF- α dan IL-1 β diperoleh $p < 0,012$) dibanding dengan kadar sitokin pada DM teregulasi dan non-DM. Akan tetapi selain disebabkan oleh AGE, menurut Tjokroprawiro (2003) kadar ke dua sitokin proinflamatori yang tinggi tersebut pada DM tidak teregulasi dapat terjadi karena adanya defek sistem imun yang dapat meningkatkan kepekaan terhadap infeksi.

Pada penyakit dengan gangguan metabolisme yaitu DM berhubungan dengan adanya gangguan (abnormalitas) kemotaksis, aderensi (perlekatan), fagositosis dan *intracellular killing* oleh radikal bebas OCL^- sehingga terjadi *Respiratory Burst dysfunction* (Tjokroprawiro, 2003). Gangguan kondisi cacatnya sistem imun akibat *immunocompromise* yang lasim menyertai penderita DM akan mengakibatkan gangguan produksi sitokin dan akibatnya terjadi kelainan pada fungsi fagositosis polimorphonuklear (PMN) dan makrofag (Dubois *et al*, 1998; Herring *et al*, 2002). Pada keadaan ini, makrofag yang berperan penting sebagai *fungistatic* dan sebagai *fungicidal* (Elahi *et al*, 2000; Romani, 2002) akan terganggu fungsinya.

Pada keadaan dimana terjadi defek system imun akan terjadi gangguan fungsi neutrofil dan defisiensi limfosit. Pada penelitian oleh Elahi *et al*, (2000) dan

Herring *et al.*,(2002) menyatakan adanya defisiensi limfosit T dan *neutrofil disfunction* akan mengakibatkan terjadinya *oral candidosis*. Aktifitas PMN dikontrol oleh sitokin, dimana LGL (Large Granular Lymphocytes) akan mensekresi aktivator-aktivator yang poten bagi PMN untuk mengaktifkan dirinya sendiri sebagai anti jamur melalui produksi interferon- γ , interferon- α , Tumour Necrosis Factor dan IL-1 (Samaranayake *et al* , 1990). Adanya defisiensi limfosit T maka mengakibatkan produksi sitokin oleh Th1 dan Th2 menurun.

Menurunnya kadar IgG dan IgA dalam serum penderita DM akan mengakibatkan menurunnya fungsi fagositosis, selain itu terjadinya gangguan fungsi komplemen akan menyebabkan menurunnya fungsi kemotaksis, sehingga penderita DM menjadi rentan terhadap infeksi, salah satunya adalah infeksi oleh *C. albicans* (Casadevall, 2002). Penurunan fungsi sel imunokompeten pada penderita DM tersebut diperkirakan menyebabkan terjadinya penurunan pembentukan antibodi terhadap antigen tertentu terhadap kejadian infeksi oleh *C.albicans*, sehingga akan memudahkan terjadi ikatan *C.albicans* pada epitel mukosa. Ikatan ini dipengaruhi oleh molekul adesin yang terdapat pada dinding sel *C.albicans*, kemudian diikuti dengan proses kolonisasi *C.albicans* di epitel mukosa rongga mulut.

Hubungan Serotipe dengan Kadar Sitokin proinflamatori, Keberadaan Gen SAP1, SAP3 dan Keragaman Genetik.

Pada (grafik 5.10) tampak bahwa serotipe A mempunyai nilai rata-rata konsentrasi IL-1 β lebih tinggi dibanding pada serotipe B, dan pada (grafik 5.11)

tampak bahwa serotipe A mempunyai nilai rata-rata konsentrasi TNF- α lebih tinggi dibanding pada serotipe B. Dengan demikian seperti diketahui bahwa serotipe A cenderung lebih mudah berikatan dengan mukosa sel inang dan dapat menstimulasi produksi IL-1 β dan TNF- α yang kemudian akan mengaktifkan sel fagosit (Orozco et al, 2000).

Tingginya kadar IL-1 β dan TNF- α sebagai sitokin proinflamatori pada DM tidak teregulasi dalam penelitian ini, sesuai dengan teori pada kejadian infeksi yang mengatakan bahwa pada keadaan imunokompromistik maka akan mengakibatkan respons terhadap imunogen sangat tinggi, karena pada DM tidak teregulasi terjadi kecacatan kemotaksis sehingga diperlukan sekresi IL-1 β dan TNF- α yang tinggi. Dalam keadaan ini makrofag juga mengalami hipereaktifitas karena produksi sitokin proinflamatori yang relatif tinggi. Selain itu terbentuknya *Advance Glycocolated End Product* akan menstimulasi adanya peningkatan kadar IL-1 β dan TNF- α . Adanya sekresi IL -1 β dan TNF- α yang tinggi pada kejadian infeksi oleh *C.albicans* berfungsi untuk merekrut leukosit ke daerah radang dengan tujuan untuk membuat sel target menjadi lisis.

Seperti diketahui mekanisme yang mendasari tingginya kejadian infeksi *C.albicans* pada penderita DM belum diketahui dengan jelas, tetapi hasil penelitian menunjukkan bahwa infeksi ini disebabkan karena perubahan respons imun inang dan faktor virulensi *C.albicans*. Faktor utama yang berpengaruh pada virulensi adalah kemampuan *C.albicans* untuk bertahan hidup pada epitel mukosa rongga mulut setelah terjadi proses perlekatan. Pendapat ini sesuai dengan teori yang ada bahwa serotipe yang mencerminkan virulensi

berhubungan dengan keberadaan antigen permukaan sel *C.albicans* dan antigen permukaan ini terkait dengan ikatan pada reseptor sel inang.

Pada serotipe A dan B keberadaan gen SAP1 pada penelitian ini menunjukkan kecenderungan nilai rata-rata serotipe A yaitu ($30247,10 \pm 26721,82$) dan kecenderungan nilai rata-rata serotipe B yaitu ($30035,86 \pm 3237,79$) (Grafik 5.8), hal ini dapat dipahami karena SAP1 berperan pada proses perlekatan *C.albicans* pada epitel mukosa sehingga keberadaannya tidak dipengaruhi oleh serotipe. Perlekatan *C.albicans* pada epitel mukosa selain dipengaruhi oleh keberadaan SAP1 juga oleh faktor lain seperti reseptor molekul *mannoprotein* yang merupakan *protein like-lectin* dan adanya reseptor iC3b. Keberadaan SAP3 ditemukan pada semua sampel *C.albicans* yang terdapat pada penderita DM tidak teregulasi, sedangkan pada DM teregulasi maupun non-DM SAP3 hanya ditemukan pada beberapa sampel saja. Keadaan ini menunjukkan bahwa tidak semua *C.albicans* mampu mengadakan kolonisasi setelah proses perlekatan pada epitel mukosa.

Pada serotipe A menunjukkan kecenderungan nilai rata-rata keberadaan gen SAP3 lebih rendah dibanding pada serotipe B (Grafik 5.9), dan keberadaan gen SAP3 *C. albicans* pada penderita DM berdasarkan tingkat regulasi menunjukkan bahwa nilai rata-rata keberadaan gen SAP3 pada non DM lebih rendah dibanding pada penderita DM tidak teregulasi maupun DM teregulasi, sedangkan pada penderita DM tidak teregulasi mempunyai kecenderungan rata-rata keberadaan gen SAP3 lebih tinggi dibanding dengan DM teregulasi dan non-DM. Keadaan ini menunjukkan bahwa adanya gen SAP3 pada penderita DM

tidak teregulasi berkaitan dengan kondisi respons imun inang yang juga akan mempengaruhi proses perlekatan dan kolonisasi *C.albicans*. Hal ini sesuai dengan pendapat Casadevall, (2002) bahwa keberadaan *C.albicans* yang tinggi pada kelompok DM tidak teregulasi disebabkan karena menurunnya kemampuan sistem imunitas penderita sendiri. Kecacatan sistem imun tersebut terutama pada limfosit T yang menurun baik dalam kualitas maupun kuantitas, dan hal ini akan berakibat kurangnya respons pembentukan antibodi spesifik, aktifitas fagosit yang terganggu dan berkurangnya kemampuan pengenalan terhadap determinan antigen pada *C.albicans*. Dengan begitu maka tingginya nilai rata-rata keberadaan gen SAP3 pada serotipe B karena didukung oleh kondisi imun inang pada penderita DM. Berdasar hasil penelitian tersebut maka serotipe B juga mempunyai kontribusi untuk menjadi pathogen, dengan demikian maka keberadaan gen SAP3 merupakan faktor yang turut memperkuat terjadinya virulensi. Dalam data ini pada *C.albicans* yang virulen hasil PCR menunjukkan adanya gen SAP3, dengan demikian maka virulensi tidak semata-mata ditentukan oleh serotipe seperti teori yang terdahulu tetapi virulensi juga berkaitan dengan keberadaan gen SAP3.

Pada penelitian ini ternyata yang positif SAP3 pada penderita DM tidak teregulasi tidak semuanya mempunyai serotipe yang sama, ada yang serotipe A dan B. Meskipun demikian, bukan berarti yang virulen semua adalah serotipe A karena didalam kasus ini pada serotipe B pun ada yang virulen dengan ditemukan adanya SAP3. Jadi dalam penelitian ini didapatkan bahwa *C.albicans*

yang virulen pada penderita DM tidak teregulasi adalah campuran antara serotipe A dan serotipe B.

Dari beberapa genotipe yang merupakan eksistensi keragaman genetik. *C.albicans*, serotipe A mempunyai kecenderungan nilai rata-rata polimorfisme (variasi genetik) lebih tinggi dibanding polimorfisme pada serotipe B. Hal ini kemungkinan karena serotipe A mempunyai virulensi dan kemampuan perlekatan yang lebih tinggi dibanding serotipe B melalui reseptor glikomanoprotein yang ada pada dinding sel *C.albicans*. Jadi pada penelitian ini ditemukan bahwa serotipe selain berkaitan dengan polimorfisme juga dipengaruhi oleh keberadaan gen SAP3.

Diantara isolat yang virulen selain ditemukan adanya gen SAP3 juga ditemukan adanya variasi genetik. Pada penelitian ini ditemukan pula bahwa *C.albicans* isolat Surabaya bukan hanya berasal dari satu genotipe tapi terdiri dari beberapa genotipe yang merupakan eksistensi keragaman genetik.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

Bab 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Hasil penelitian secara keseluruhan pada penelitian ini memperlihatkan empat pokok hal sebagai berikut :

1. Virulensi, keberadaan gen SAP1 dan SAP3 serta variabilitas genetik *C.albicans* isolat Surabaya yang mengkolonisasi pada mukosa rongga mulut penderita DM berhubungan dengan tingkat regulasi DM.
2. Dengan ditemukannya SAP3 pada DM tidak teregulasi, maka virulensi *C.albicans* tidak saja ditentukan oleh serotipe (Antigen determinan), namun ada keterkaitan dengan keberadaan gen SAP3.
3. Variabilitas genetik di antara *C.albicans* isolat Surabaya pada penderita DM tidak teregulasi cenderung homogen.
4. Variabilitas genetik di antara *C.albicans* isolat Surabaya pada penderita DM teregulasi cenderung heterogen.

DAFTAR PUSTAKA

DAFTAR PUSTAKA

- Appleton S S, Ellpola A N and Samaranayake L P, 2000. **Candidiasis : Pathogenesis, Clinical Characteristic and Treatment. J Calif Dent Assoc, 12 : 942-948**
- Asleson C M, Bensen E S, Gale C A, Melms A S, Kurischko and Berman J, 2001. **Candida albicans 1NT1-Induced Filamentation in Saccharomyces cerevisiae Depends on S1a2p. Molecular and Cellular Biology, 21(4): 1272 -1284.**
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D and Seidman J G, 1995. **Short Protocols In Molecular Biology. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology. Third Ed. Published by John Wiley & Sons Inc, pp 7.1 – 13.1**
- Beausejour A, Grenier D and Deslauriers N, 1998. **Protolytic Activation of the Interleukin-1 β Precursor by Candida albicans. Infection And Immunity, 66(2): 676-681.**
- Bennet PH, 1994. **Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and Impaired Glucose Tolerance in Joslin's Diabetes Mellitus. 13th Ed, Philadelphia Baltimore Hongkong London Munich Sidney, 193-201**
- Bernardis, F D., Mondello, F., Scaravelli, G., Pachi, A., Girolamo, A., Agatensi, L., and Cassone, A, 1999. **High Aspartyl Proteinase Production and Vaginitis in Human Immunodeficiency virus-infected women. Journal of Clinical Microbiology, 37:1376 -1380**
- Bikandi J M, Quindos G, Polonelli and Ponto, 2000. **Influence of Enviromental pH on the Reactivity of Candida albicans with Salivary IgA. J Dent Res 79 : 1439 -1442**
- Bloom M V, 1995. **Polymerase Chain Reaction. Carolina Biological Supply Company DNA Learning Center New York, pp 1-7.**
- Brownlee M, 1995. **Advanced Protein Glycocylation in Diabetes and Ageing. Annu Rev Med, 46 : 223-234**
- Bultz and Lombardi, 1996. **Antifungal Therapy in Oral Cavity. Periodontology 2000, 10:89-106**
- Buurman, E T, Westwater, C, Hube, B, Brown, A J P, Odds, F C, and Gow, N A R, 1998. **Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of Candida albicans. Proc Natl Acad Sci USA, 95 : 7670-7675.**

- Calderone R A and Fonzi W, 2001. Virulence Factors of *Candida albicans*. **Trends in Microbiology**, 9(7) : 327-334
- Casadevall A, 2002. **Aquired Immunity against Fungi**, in Immunology of Infectious Diseases. ASM Press American Society for Microbiology Washington, pp 223-231
- Challachom S and Shirlaw P J, 1999. **Immunology of Diseases of the Oral Cavity** : In Mucosal Immunology, Second Edition Academic Press San Diego London Boston, pp 1326-1327
- Coen D M, 1995. Current Protocols in Molecular Biology. **Suplly**, 26:1503-1508.
- Creighton T E, 1996. **Enzyme Catalysis**, in Proteins Structures and Molecular Properties, Second Edition W.H Freeman and Company New York, pp 386-390
- Dieffenbach C W, Lowe T M J and Dveksler G S, 1995. **General Concept for Primer Design**. PCR Primer, pp 133-136.
- Donosepoetro M, 2004. Molecular Pathology of Advanced Glycation End Products and Diabetic Atherosclerosis. **Surabaya Diabetes UPDATE – XIV**. Surabaya, 21-22 Agustus 2004 : 45-49
- Dubois N, Colina A R, Aumont F, Belhumeur P and Repentigny, 1998. Overexpression of *Candida albicans* secretory aspartyl proteinases 2 and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* do not augment virulence in mice. **Microbiology**, 144 : 2299-2310.
- Elahi S, Pang G, Clancy R and Ashman R B, 2000. Cellular and Cytokine Correlates of Mucosal protectin in Murine Model of Oral candidosis. **Infection and Immunity**, 68 (10) : 5771-5777.
- Elahi S, Clancy R and Pang G, 2001. A Therapeutic Vaccine for Mucosal Candidiasis. **Vaccine**, 19(17-19) : 2516-2521.
- Faqih AR, 2004. Optimasi Analisis Hasil Keragaman Genetik Ujung *Metapenaeus monoceros* Berdasarkan RAPD dan RFLP. **Tesis, Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang**.
- Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S and Nichterlein T, 2002. *Candida albicans* Hyphal Formation and the Expression of the Efg1-Regulated Proteinases SAP4 to SAP6 are Required for the Invasion of Parenchymal Organs. **Infection and Immunity**, 70 (7):3689-3700.

- Frizzel J P, 2000. **Altered Endocrine Function**, in Focus on Pathophysiology. Lippincott Williams & Wilkins Co.Ltd Philadelphia New York Baltimore, pp 606-703
- Fu Y, Filler S G, Spelberg B J, Fonzi W, Ibrahim A S and Kanbe T, 1998. Cloning and characterization of CAD1 / AAF1 Gene from *Candida albicans* that induces Adherence to Endothelial Cells after Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Infection and Immunity**, 66(5):2078-2084
- Gale C, Finkel D, Tao N, 1996. Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *Candida albicans*. **Proc Natl Acad Sci USA**, 93 : 357-361.
- Gale C A, Bendel C M, McClellan M and Hauser M, 1998. Linkage of Adhesion, Filamentous Growth and Virulence in *Candida Albicans* to a single gene 1NT1. **Science**, 279 : 1355-1358
- Gladden R, 1995. **Equipment Requirements for Agarose Electrophoresis**. **Polymerase Chain Reaction**, pp 138-139.
- Goldsby R A, Kindt T J and Osborne B A, 2000. **Vaccine**, in Kuby Immunology 4 th ed W.H Freeman And Company New York, pp 459-464.
- Goldsby R A, Kindt T J and Osborne B A, 2000. **Polymerase Chain Reaction**, in Immunology. Fourth ed W.H Freeman and Company, pp 580-582.
- Gumbiner B M, 1996. Cell Adhesion, in The molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. **Cell**, 84 : 345-357.
- Harlina, 2000. Respons Immunopatobiologis Mukosa Mulut Untuk Mengungkap Immunopatogenesis Infeksi *C.albicans* pada Penderita Diabetes Mellitus. **Disertasi S3, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya**.
- Hasenclever HF and William O M, 1961. **Antigenic Studies of Candida : Observation of Two Antigenic Group in *C.albicans***. **J Bacteriol**, 82: 570-573
- Hernawan I, 2000. Oral manifestations of Diabetes Mellitus. **Surabaya Diabetes UPDATE – VII**. Surabaya, 18-19 Nov 2000 : 45-53
- Hernawati S, 2003. Perubahan Kadar Glukosa Darah Dan Glukosa Saliva Terhadap Keberadaan *C.albicans* Pada Penderita DM teregulasi dan Tidak Teregulasi. **Tesis S2, Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga Surabaya**.

- Herring A C and Huffnagle G B, 2002. Innate Immunity and Fungal Infections, In Immunology of Infectious Diseases. **ASM Press American Society for Microbiology Washington** pp 127 – 134
- Hoegl L, Ollert M and Korting H C, 1996. The Role of *Candida albicans* Secreted Aspartic Proteinase in the Development of Candidosis. **J Mol Med**, 74 : 135-142
- Holmes A. R, Bandara B M and Cannon R D, 2002. Saliva Promotes *Candida albicans* Adherence to Human Epithelial Cells. **J Dent Res**, 8 : 28-32.
- Hostetter M K .1994. Adhesin and Ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. **Clinical Microbiology Review**, pp. 29-42.
- Hostetter M K, 1996. An Integrin – like Protein in *Candida albicans* in implications for pathogenesis. **Trends in Microbiology**, 4 : 242-246
- Hube, B., Sanglard, D., Odds, F C., Hess, D., Monod, M., and Schafer, W, 1997. Gene disruption of each of secreted aspartyl proteinases gene SAP1, SAP2 and SAP3 in *Candida Albicans* attenuates virulence. **Infection and Immunity**, 65 (3529-3538)
- Innis M A and Gelfand D H, 1990. **Optimization of PCR**, in PCR Protocols. Academic Press Inc San Diego California, pp 1-10.
- Jouault T, Delaunoy C, Sendid B, Ajana F and Poulain D, 1997. Differential Humoral Responses against α - and β -Linked mannose Residues Associated with Tissue Invasion by *Candida albicans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, 4(3) : 328-333.
- Kirby Lorne T, 1990. **DNA Fingerprinting : An Introduction**. Stockton Press. pp, 365.
- Koelsch G, Tang J, Loy J A, Monod M, Jackson K and Founding S I, 2000. Enzymic Characteristics of Secreted Aspartic Proteinases of *Candida albicans*. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1480 : 117-131.
- Lalla E, Lamster IB and Schidt AM. 1998. Enhanced Interaction of Advanced Glycation End Products with their Cellular Receptor RAGE: Implication for the Pathogenesis of Accelerated Periodontal Disease in Diabetes. **Ann Periodontol**, 3 : 13-19
- Lamey P J. 2000. **Oral Candidosis**, in Opening Comments Orofacial Disease in the UK The British Society for Oral Medicine Web Service, pp 1-8.

- Leblond A, Grimud L, Nail S, Boutige S, Sullivan D and Robert R, 2000. New Monoclonal Antibody Specific for *C.albicans* Germ Tube. **Journal of Clinical Microbiology**, 38 (1) : 61-67
- Lodish H, Berk A, Zipursky S L and Matsudaira P, 2000. **Polymerase Chain Reaction**, in Molecular Cell Biology. Fourth ed. W.H Freeman and Company, pp 246-247.
- Lupetti A, Guzzi G, Swart K, Campa M and Senesi S, 1995. Molecular Typing of *C.albicans* in Oral Candidosis : Karyotype Epidemiology with Human Immunodeficiency Virus-Seropositive Patients in Comparison with That with Healthy carriers. **Journal of Clinical Microbiology**, 33(5) : 1238-1242.
- Martinez J P, Gil M L, Ribot J L and Chaffin W, 1998. Serologic Response to Cell Wall mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. **Clinical Microbiology Reviews**, (11) : 121-141
- Mercure S, Senechal S, Auger P, Lemay G and Montplaisir S, 1999. *Candida albicans* Serotype Analysis by Flow Cytometry. **Journal of Clinical Microbiology**, 34(9) : 2106-2112.
- Munoz C, Xavier M, Tanaca L.V and Rodrigues C H, 2003. Identification of *Candida spp* By Randomly Amplified Polymorphic DNA and Differentiation between *C.albicans* and *C.dubliniensis* by Direct PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, 41(1):414-420.
- Naglik J R, Newport G, Challacombe S J and Greenspans J, 1999. **In Vivo Expression of Secreted Aspartyl Proteinases**, in Human Oral Candidiasis and Carriage. The 4th International Workshop on Oral manifestations of HIV Infection. Last Updated July, 2000.
- Nawroth PP, Bierhaus A, Vogel GE, Hofmann MA and Ziegler R, 1999. Non Enzymatic Glycation and Oxidative Stress in Chronic Illnesses and Diabetes Mellitus. **Med Klin**. 94(1): 29-38
- Newman SL and Holly A, 2001. *Candida albicans* is Phagocytosed, Killed and Processed for Antigen Presentation by Human Dendritic Cells. **Infection and Immunity**. 69(11): 6813-6822.
- Old R .W., and Primrose S.B, 1994. **Principles of Gene Manipulation: An introduction to genetic engineering**. 5 th ed Blackwell Scientific Publication Oxford, pp 167-190.
- Orozco A, Zhou X and Filler S, 2000. Mechanism of the Proinflammatory Responses of Endothelial Cells to *C.albicans* Infection. **Infection And Immunity**. 68(3) : 1134-1141

- Pammi K, Schertz, Xu G, Hart. J Mullet, 1994. **RAPD Markers in Sorghum**. Theoretical and Applied Genetics, 89:80-88
- Pasternak Jack and Bernard R, 1994. **Molecular Biotechnology**. ASM Press Washington DC, pp 500.
- Pendrak ML and Klotz SA, 1995. Adherence of *Candida albicans* to host cells. **FEMS Microbiology Letters**, 129 : 103-114
- PERKENI, 2002**. Konsensus Pengelolaan Diabetes Mellitus Tipe 2 di Indonesia.
- Phan Q T, Belanger P H and Filler S G, 2000. Role of Hyphal Formation in Interactions of *Candida albicans* with Endothelial cells. **Infection and Immunity**, 68:3485-3490
- Piccini M P, Vultaggio A, Scaletti C, Livi C, Gomes M J and Giudizi M G, 2002. Type 1 T Helper Cellc Specific for *Candida albicans* Antigens in Peripheral Blood and Vaginal Mucosa Women with Recurrent Vaginal Candidiasis. **The Journal of Infectious Diseses**, 186 : 87-93.
- Pichova I, Pavlickova L, Dostal J and Dolejsi E, 2001. Secreted Aspartic Proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitaniae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. **Eur J Blochem**, 268 : 2669-2677.
- Powderly W G, 1996. Series on Fungal Infections. **JIAPAC**, Oct 2nd in 6-prot.1-5
- Pranoto A dan Tjokroprawiro A, 2004. Mutasi Mitokondria dan Diabetes Mellitus, dalam *Mitochondrial Medicine*. **Eikjman Lecture Series 2**, pp 121-143.
- Quirino M R, Birman E G and Paula C R, 1995. Oral manifestations of Diabetes mellitus in Controlled and Uncontrolled Patients. **Braz Dent J**, 6:131-136
- Rafalski J.A, S.V. Tingey and J.G.K. Williams, 1991. RAPD markers – a New technology for genetic mapping and plant breeding. **Bitech News and Information**, 3 : 645-648.
- Regina T L and Widya Asmara, 2001. Molecular Typing of *Candida albicans* Isolated from Oral Cavity of Cancer Patients Using Randomly Amplified Polymorphic DNA. **Indonesian Journal of Biotechnology**, 470-479.

- Repentigny L, Aumont F, Bernard K and Belhumeur P, 2000. Characterization of Binding of *Candida albicans* to Small Intestinal Mucin and Its Role in Adherence to Mucosal Epithelial Cells. **Infection And Immunity**. 68(6) : 3172-3179.
- Ribot J L, Sand Chaffin W L, 1994. Binding of the Extracellular Matrix Component Entactin to *Candida Albicans*. **Infection and Immunity**, 62 : 4564- 4571.
- Robbins, Cotrans M D, Kumar V and Collins T, 1999. **Diabetes Mellitus**, in *Pathologic Basis of Diseases*. Sixth Ed W.B.Saunders Company, pp 913-926
- Romani L, 2002. **Overview of the Fungal Pathogens**, in *Immunology of Infectious Diseases*. ASM Press American Society for Microbiology Washington, pp 25-35
- Roy A C and Ratnam S S, 1991. The Polymerase Chain Reaction – A new Versatile Tool for DNA Cloning In Vitro. **Journal of Medical Laboratory Sciences**, 5 : 61-68.
- Ruiz P, Haasner D and Wiles M V, 1997. **Basic Principles of Polymerase Chain Reaction (PCR) Using Limited Amounts of Starting Material**, in *Methods Manual*. Immunology Academic Press Ltd San Diego, pp 285-305.
- Samaranayake L P and Macfarlane TW, 1990. **Oral Candidosis**. First Ed. Butterworth and co Ltd Publishing London Boston Singapore, pp 16-132
- Schaller M, Schafer W, Korting H C, and Hube B, 1998. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. **Molecular Microbiology**, 29 : 605-615.
- Schaller M, Korting H C, Schafer, W, Bastert J and Chen W, 1999. Secreted Aspartic Proteinase (SAP) Activity Contributes to Tissue damage in a Model of Human Oral Candidosis. **Molecular Microbiology**, 34:169-180.
- Schaller M, Schackert C, Korting H C, Januschke E and Hube B, 2000. Invasion of *Candida albicans* Correlates with Expression of Secreted Aspartic Proteinases during Experimental Infection of Human Epidermis. **J Invest Dermatol**, 114: 712-217
- Schaller M, Januschke E, Caroline S, Woerle B and Korting H C, 2001. Different Isoforms of Secreted Aspartyl Proteinases (SAP) are

- Expressed by *Candida albicans* during Oral and Cutaneous Candidosis in vivo. **J Med Microbiol**, 50 : 743-747
- Singer M. and Berg. P, 1999. **Genes and Genomes**. University Science Books, California.
- Sneller M C and Lane HC, 1996. **Immunocompromised Host**. Clinical Immunology Principles and Practice CV. Mosby, pp 579-503.
- Soedewo S F, 1986. **Pemeriksaan glukosa Darah Dan HbA1c Pada Penderita Diabetes Mellitus: Dalam Diabetes Mellitus Aspek Klinik dan Epidemiologi**. Kursus Untuk Para Dokter Puskesmas Dan Rumah Sakit. Airlangga University Press, pp 51-57
- Staib P, Kretschmar M, Nichterlein T; Hof H and Morschhauser J, 2000. Differential Activation of a *Candida albicans* Virulence Gene Family During Infection. **PNAS**,97: 6102-6107.
- Straub A, Sonja M, Nichterlein T, Hof H and Morschhauser J, 2001. Analysis of Phase-Specific Gene Expression at the single-cell level in the white Opaque Switching System of *C.albicans*. **Journal of Bacteriology**, 183 (12) : 3761-3769
- Stryer L, 1995. **Biochemistry**, 4 ed., W.H. Freeman and Company, New York.
- Sudiana IK, 1991. Pewarnaan Papanicolaou pada Sitologi. **Technik Praktis Untuk Jaringan-Sel**. 119-122
- Sukartini, 2001. Analisis Jarak Genetik (*Musa spp*) menggunakan Penanda Morfologis dan RAPD. **Tesis, Program Pasca Sarjana Universitas Brawijaya Malang**.
- Sunarjo,1992. **Sampling Pada Penelitian Epidemiologi** : Dalam Materi Kursus Epidemiologi Klinik 1. Kelompok Studi Epidemiologi Fakultas Kedokteran Unair Surabaya 27-29 Oktober, pp 59-79
- Suryohudoyo P, 2000. **Dasar Molekuler Diabetes Mellitus**. Kapita Selekta Ilmu Kedokteran Molekuler CV. Sagung Seto Jakarta, pp 48-57
- Sutjahjo A, 1997. **Terapi Kombinasi Obat Hipoglikemik Oral**. Surabaya Diabetes Update – III , Surabaya 14-15 November 1997 : 135-145.
- Tjokroprawiro A, 1997 **Diabetes UPDATE- II**. Pusat Diabetes dan Nutrisi RSUD Dr. Soetomo Fakultas Kedokteran Unair Surabaya Diabetes Update-II, pp 1-22

- Tjokroprawiro 2000. Diabetic Neuropathy from Basic to Clinic. **Surabaya Diabetes UPDATE-VIII**, Surabaya 18-19 November 2000: 109-113.
- Tjokroprawiro A, 2003. **Management of SIRS-SEPIS in Patients with Diabetes Mellitus**. The First Annual Scientific Meeting of Indonesian Society of Pathobiology, Surabaya 24-26 January 2003 : 231-234
- Tjokroprawiro A, 2003. **Diabetes Mellitus and Periodontal Disorders**. Symposium the 75 th Anniversary of Indonesian Dental Education Surabaya, 6-9 August pp 15-22
- Waugh R and W Powell, 1992. **Using RAPD Markers for Crop Improvement**. *Tibtech* 10 : 186-191
- White J J, Arheim N and Erlich H A, 1995. The Polymerase Chain Reaction. **Technical Focus**, 5:185-188.
- Widodo Imam, 2003. Penggunaan Marka Molekuler Pada Seleksi Tanaman. **Disertasi S3, Program Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor**.
- Willis A M, Coulter W A, Fulton C R, Hayes J R and Bell P M, 2001. The Influence of Antifungal Drugs on Virulence Properties of *Candida Albicans* in patients with Diabetes Mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 91:317-321
- Wijaya A, 1997. **Pemeriksaan laboratorium Untuk Diabetes Mellitus**. Surabaya Diabetes Update – III. Surabaya 14-15 Nov, pp 113-122.
- Wu T, Wright K, Hurst S and Morrison C, 2000. Enhanced Extracellular Production of Aspartyl Proteinase, a Virulence Factor by *Candida albicans* Isolate following Growth in Subinhibitory Concentrations of Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44(5): 1200-1208.
- Yokoyama K, Biswas SK, Miyaji M and Nishimura K, 2000. Identification and Phylogenetic Relationship of the Most Common Pathogenic *Candida* Species Inferred from Mitochondrial Cytochrom b Gene Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, 38(12):4503-4510.
- Zeppelin M B, Meyer I, Thomssen, R and Wurzner, 1999. HIV-Protease inhibitor reduce cell adherence of *Candida Albicans* strains by inhibition of Yeast Secreted Aspartic Proteases. **The Journal of Investigative Dermatology**, 113 : 747-751.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Pemeriksaan Serotyping dan Analisis statistik Serotyping

DM Regulasi Jelek

Serotype	Jumlah	Presentase (%)
A	9	75
B	3	25
Total	12	100

DM Regulasi Baik

Serotype	Jumlah	Presentase (%)
A	11	91,67
B	1	8,33
Total	12	100

Non DM

Serotype	Jumlah	Presentase (%)
A	9	81,82
B	2	18,18
Total	11	100

NPar Test

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
pemeriksaan serotyping	35	1.1714	.3824	1.00	2.00
tingkat regulasi	35	1.9714	.8220	1.00	3.00

Chi-Square Test

Frequencies

	pemeriksaan serotyping				tingkat regulasi			
	Category	Observed N	Expected N	Residual	Category	Observed N	Expected N	Residual
1	serotype A	29	5.8	23.2	DM regulasi jelek	12	5.8	6.2
2	serotype B	6	11.7	-5.7	DM regulasi baik	12	11.7	.3
3		0	17.5	-17.5	DM regulasi kontrol	11	17.5	-6.5
Total		35				35		

Test Statistics

	pemeriksaan serotyping	tingkat regulasi
Chi-Square ^a	.000	.000
df	2	2
Asymp. Sig.	.000	.011

a. 0 cells (.0%) have expected frequencies less than 5. The minimum expected cell frequency is 5.8.

Lampiran 2. Metode RAPD

Penentuan Jumlah Pasangan Basa DNA

Untuk menentukan jumlah pasangan basa DNA maka dilakukan penghitungan nilai Rf (*Retardation factor*) dari masing-masing pita DNA, dimana :

$$Rf = \frac{\text{Jarak pergerakan pita dari tempat awal (cm)}}{\text{Jarak pergerakan warna dari tempat awal (cm)}}$$

Tabel Nilai jumlah pasangan basa DNA marker 100 bp

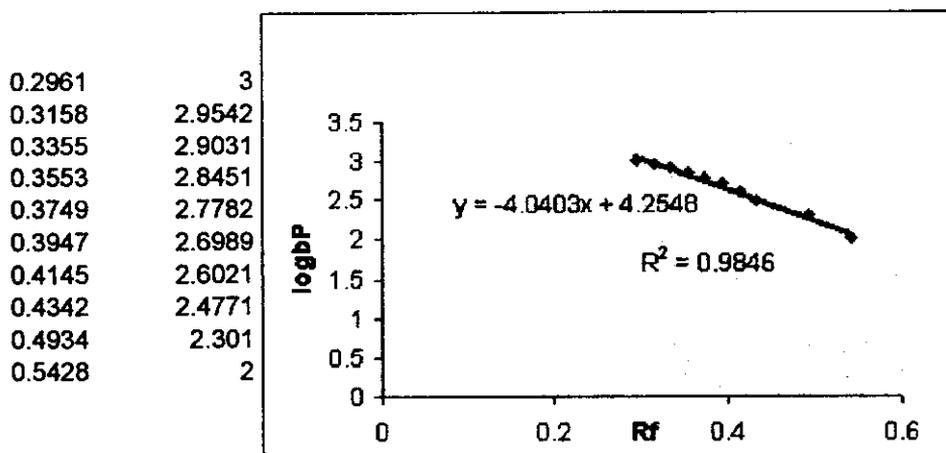
Pita marker ke	Rf	Jumlah pasangan basa (bp)	Log bp
I	0,2961	1000	3
II	0,3158	900	2,9542
III	0,3355	800	2,9031
IV	0,3553	700	2,8451
V	0,3749	600	2,7782
VI	0,3947	500	2,6989
VII	0,4145	400	2,6021
VIII	0,4342	300	2,4771
IX	0,4934	200	2,3010
X	0,5428	100	2

Persamaan regresi linier dari DNA marker :

Dimana : sumbu X = Rf ,

Sumbu y = log bp

Didapat persamaan regresi : $Y = -4,0403 X + 4,2548$

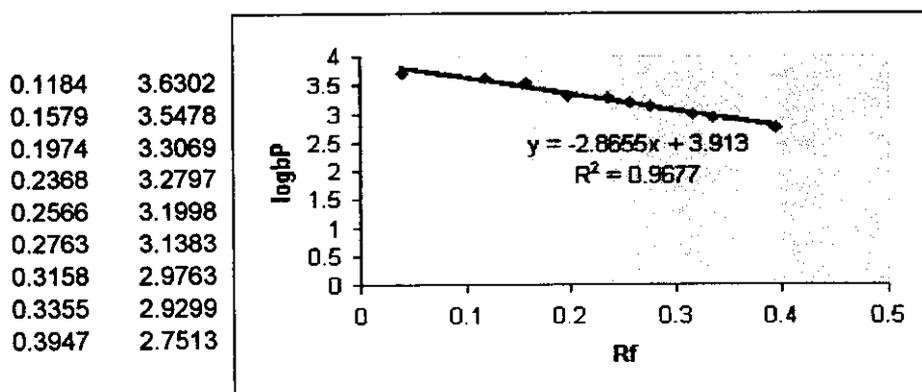


Gambar Kurva kalibrasi jumlah pasangan basa marker DNA 100 bp

Tabel Nilai jumlah pasangan basa DNA marker Hind III + EcoR1

Pita marker ke	Rf	Jumlah pasangan basa (bp)	Log bp
I	0,0395	4973	3,6966
II	0,1184	4268	3,6302
III	0,1579	3530	3,5478
IV	0,1974	2027	3,3069
V	0,2368	1904	3,2797
VI	0,2566	1584	3,1998
VII	0,2763	1375	3,1383
VIII	0,3158	947	2,9768
IX	0,3355	851	2,9299
X	0,3947	564	2,7513

Didapat persamaan regresi : $Y = -2,8655 X + 3,913$



Gambar Kurva kalibrasi jumlah pasangan basa marker DNA Hind III + EcoR1

Dari ke dua persamaan regresi tersebut diatas, maka jumlah pasangan basa fragmen DNA dapat dihitung dengan mengkonversi nilai Rf dengan persamaan regresi linier.

Contoh : Nilai Rf DNA (X) = 0,3158

$$Y = - 4,0403 \times 0,3158 + 4,2548$$

$$Y = 2,9789$$

$$\text{Anti log } Y = 952$$

Jadi jumlah pasangan basa = 952 bp

Tabel . Tipe fragmen DNA Hasil RAPD

Sampel	Tipe fragmen	Rf	Jumlah bp
1	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,2961	1160
	4	0,3158	952
	5	0,3553	659
	6	0,3947	457
2	1	0,2171	1953
	2	0,3158	952
	3	0,3553	659
	4	0,3749	549
	5	0,3947	457
	6	0,4145	380
	7	0,4342	316
	8	0,4934	182
3	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,3158	952
	4	0,3553	659
	5	0,3947	457
	6	0,4145	380
	7	0,4342	316
4	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,3158	952
	4	0,3553	659
	5	0,3947	457
	6	0,4934	182
5	1	0,3158	952
	2	0,3553	659

	3	0,3947	457
	4	0,4145	380
	5	0,5132	151
6	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,3158	952
	4	0,3553	659
	5	0,3749	549
	6	0,4934	182
7	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,3158	952
	4	0,3553	659
	5	0,3749	549
	6	0,4934	182
8	1	0,2763	1322
	2	0,3158	952
	3	0,3749	549
	4	0,4145	380
	5	0,4342	316
	6	0,5132	151
9	1	0,1974	2225
	2	0,2566	1505
	3	0,2961	1160
	4	0,3158	952
	5	0,3355	793
10	1	0,2171	1953
	2	0,2763	1322
	3	0,3553	659
	4	0,3749	549
	5	0,3947	457
	6	0,4145	380
11	1	0,2763	1322
	2	0,3158	952
	3	0,3553	659
	4	0,3749	549
	5	0,4145	380
	6	0,4934	182
12	1	0,2171	1953
	2	0,2961	1160
	3	0,3355	793
	4	0,3947	497
13	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,2961	1160
	4	0,3355	793

	5	0,3553	659
	6	0,5526	105
14	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,2961	1160
	4	0,3355	793
	5	0,3553	659
	6	0,5526	105
15	1	0,1579	2888
	2	0,2171	1953
	3	0,2961	1160
	4	0,3355	793
	5	0,3553	659
	6	0,5526	105
16	1	0,2961	1160
	2	0,3355	793
	3	0,3947	457
17	1	0,2171	1953
	2	0,2763	1322
	3	0,3158	952
	4	0,3355	793
	5	0,4342	316
18	1	0,1974	2225
	2	0,2763	1322
	3	0,2961	1160
	4	0,3158	952
	5	0,3355	793
	6	0,4145	380
19	1	0,1974	2225
	2	0,2763	1322
	3	0,2961	1160
	4	0,3158	952
20	1	0,1974	2225
	2	0,2763	1322
	3	0,2961	1160
	4	0,3158	952
21	1	0,1974	2225
	2	0,2763	1322
	3	0,2961	1160
22	1	0,1974	2225
	2	0,2763	1322
	3	0,2961	1160
23	1	0,2961	1160
	2	0,3158	952
24	1	0,2961	1160
	2	0,3158	952

	3	0,3355	793
25	1	0,1382	3288
	2	0,2368	1715
	3	0,2566	1505
	4	0,2763	1322
	5	0,3355	793
26	1	0,1579	2888
	2	0,1974	2225
	3	0,2171	1953
	4	0,2763	1322
	5	0,2961	1160
27	1	0,2171	1953
	2	0,2368	1715
	3	0,2763	1322
28	1	0,1382	3288
	2	0,1776	2535
	3	0,1974	2225
	4	0,2171	1953
	5	0,2961	1160
	6	0,3355	793
	7	0,3749	549
29	1	0,1382	3288
	2	0,1974	2225
	3	0,2368	1715
	4	0,2566	1505
	5	0,2763	1322
	6	0,3355	793
30	1	0,1579	2888
	2	0,1974	2225
	3	0,2368	1715
	4	0,2566	1505
	5	0,2961	1160
	6	0,3355	793
31	1	0,1382	3288
	2	0,1974	2225
	3	0,2171	1953
	4	0,2566	1505
	5	0,2763	1322
	6	0,5329	126
32	1	0,1382	3288
	2	0,1974	2225
	3	0,2171	1953
	4	0,2566	1505
	5	0,2763	1322
	6	0,5329	126
33	1	0,1184	3747

	2	0,1974	2225
	3	0,2763	1322
	4	0,2961	1160
	5	0,3158	952
	6	0,3355	793

Lampiran . Konstruksi Fenetik Berdasarkan Genotip

Konstruksi Fenetik dihitung berdasarkan fragmen-fragmen DNA hasil RAPD (Gambar)

Skor : 0 = tidak ada pasangan bp yang menunjukkan posisi fragmen

1 = ada pasangan bp yang menunjukkan posisi fragmen

Kelompok sampel vs karakter hasil RAPD

Kelp. Sampel	karakter																				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
A	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
B	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0
C	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan : A : Kelompok sampel DM Regulasi Baik yang positif *C.albicans*

B : Kelompok sampel DM Regulasi Jelek yang positif *C.albicans*

C : Kelompok sampel Non DM yang positif *C.albicans*

Untuk menghitung matriks similaritas maka dilakukan perhitungan dengan persamaan :

$$S_{jk} = 1 - \frac{\sum_{l=1}^n \frac{|X_{ij} - X_{ik}|}{R_l}}{n}$$

Dimana X_{ij} = karakter ke - i dari takson j

X_{ik} = karakter ke - i dari takson k

R_l = kisaran dari karakter ke - l, dari yang tertinggi dikurangi yang terendah

n = jumlah karakter

Contoh :

$$A,B = 1 - \frac{\{1+0+1+1+0+0+0+1+0+0+0+0+0+1+0+0+0+0+0+0\}}{21}$$

$$= 1 - \frac{5}{21}$$

$$= 0,762$$

$$A,C = 1 - \frac{11}{21}$$

$$= 0,476$$

$$B,C = 1 - \frac{12}{21}$$

$$= 0,428$$

Lampiran 3. Hasil Uji Statistik Eksistensi SAP

			Descriptives			
KELOMPOK			Statistic	Std. Error		
SAP1	DM tidak teregulasi (C)	Mean	26281.2891	1300.2365		
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	23384.1817		
			Upper Bound	29178.3965		
		5% Trimmed Mean	26518.0862			
		Median	27079.6900			
		Variance	18596763.630			
		Std. Deviation	4312.3965			
		Minimum	17321.49			
		Maximum	30978.74			
		Range	13657.25			
		Interquartile Range	4880.1000			
		Skewness	-1.230	.661		
		Kurtosis	.899	1.279		
		DM teregulasi (B)	DM teregulasi (B)	Mean	25259.7945	2240.1420
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	20268.4470
Upper Bound	30251.1421					
5% Trimmed Mean	25584.0701					
Median	26108.9300					
Variance	55200600.014					
Std. Deviation	7429.7106					
Minimum	11428.45					
Maximum	33254.18					
Range	21825.73					
Interquartile Range	10578.7900					
Skewness	-.933			.661		
Kurtosis	-.102			1.279		
Non-DM (A)	Non-DM (A)			Mean	39104.1936	12531.4667
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	11182.3458
		Upper Bound	67026.0415			
		5% Trimmed Mean	34169.4946			
		Median	25951.7200			
		Variance	1727414233.028			
		Std. Deviation	41562.1731			
		Minimum	6815.17			
		Maximum	160217.8			
		Range	153402.6			
		Interquartile Range	19891.8000			
		Skewness	2.918	.661		
		Kurtosis	9.155	1.279		
		SAP3	DM tidak teregulasi (C)	Mean	14793.8636	2668.7600
				95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	8847.4957
Upper Bound	20740.2315					
5% Trimmed Mean	14703.9674					

		Median		10593.4100	
		Variance		78345080.903	
		Std. Deviation		8851.2757	
		Minimum		4554.98	
		Maximum		26650.88	
		Range		22095.90	
		Interquartile Range		16555.6000	
		Skewness		.181	.661
		Kurtosis		-1.892	1.279
	DM teregulasi (B)	Mean		10319.5388	2722.1088
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	4254.3026	
			Upper Bound	16384.7751	
		5% Trimmed Mean		10205.1881	
		Median		13106.3300	
		Variance		81508636.533	
		Std. Deviation		9028.2134	
		Minimum		.00	
		Maximum		22697.39	
		Range		22697.39	
		Interquartile Range		17527.3800	
		Skewness		.057	.661
		Kurtosis		-1.774	1.279
	Non-DM (A)	Mean		11512.8573	4065.1577
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2455.1214	
			Upper Bound	20570.5931	
		5% Trimmed Mean		11073.2553	
		Median		.0000	
		Variance		181780578.960	
		Std. Deviation		13482.6028	
		Minimum		.00	
		Maximum		30938.55	
		Range		30938.55	
		Interquartile Range		25402.7800	
		Skewness		.345	.661
		Kurtosis		-2.112	1.279
JUML BAND	DM tidak teregulasi (C)	Mean		4.27	.19
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.84	
			Upper Bound	4.71	
		5% Trimmed Mean		4.30	
		Median		4.00	
		Variance		.418	
		Std. Deviation		.65	
		Minimum		3	
		Maximum		5	
		Range		2	
		Interquartile Range		1.00	
		Skewness		-.291	.661
		Kurtosis		-.208	1.279
	DM teregulasi (B)	Mean		3.55	.25
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2.99	
			Upper Bound	4.10	

	5% Trimmed Mean		3.55	
	Median		4.00	
	Variance		.673	
	Std. Deviation		.82	
	Minimum		2	
	Maximum		5	
	Range		3	
	Interquartile Range		1.00	
	Skewness		-.176	.661
	Kurtosis		.187	1.279
Non-DM (A)	Mean		4.91	.61
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	3.55	
		Upper Bound	6.27	
	5% Trimmed Mean		4.90	
	Median		5.00	
	Variance		4.091	
	Std. Deviation		2.02	
	Minimum		2	
	Maximum		8	
	Range		6	
	Interquartile Range		3.00	
	Skewness		.062	.661
	Kurtosis		-.437	1.279

Lampiran 4. Hasil Uji Statistik IL-1 β dan TNF α

Oneway _ IL1 dan TNFa

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
IL1ACONS REGULASI TBAIK (C)	11	5.7893	4.1003	1.2363	33.0346	38.5439	31.52	43.85
REGULASI E	11	3.6226	3.5381	1.0668	31.2457	35.9996	28.85	40.85
NON DIABET MELLITUS	11	1.0015	1.6707	.5037	29.8790	32.1239	28.02	33.85
Total	33	3.4711	3.7403	.6511	32.1449	34.7974	28.02	43.85
TNFACONS REGULASI TBAIK (C)	11	3.2485	17.1480	5.1703	221.7283	244.7686	211.07	267.73
REGULASI E	11	5.4303	13.0618	3.9383	206.6553	224.2053	197.73	232.40
NON DIABET MELLITUS	11	1.1273	18.0677	5.4476	188.9893	213.2653	173.73	221.73
Total	33	6.6020	20.6219	3.5898	209.2898	223.9142	173.73	267.73

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IL1ACONS	Between Groups	126.456	2	63.228	5.905	.007
	Within Groups	321.223	30	10.707		
	Total	447.679	32			
TNFACONS	Between Groups	5697.401	2	2848.700	10.803	.000
	Within Groups	7911.030	30	263.701		
	Total	13608.431	32			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variable (I) KELOMPOK (J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval		
				Lower Bound	Upper Bound	
IL1ACONS	REGULASI TIDAK BAIK (C) - REGULASI BAIK (B)	2.1666	1.3953	.281	-1.2731	5.6064
	REGULASI TIDAK BAIK (C) - NON DIABETES MELLITUS	4.7878*	1.3953	.005	1.3481	8.2276
	REGULASI BAIK (B) - REGULASI TIDAK BAIK (C)	-2.1666	1.3953	.281	-5.6064	1.2731
	REGULASI BAIK (B) - NON DIABETES MELLITUS	2.6212	1.3953	.162	-.8186	6.0609
TNFACONS	REGULASI TIDAK BAIK (C) - REGULASI BAIK (B)	-4.7878*	1.3953	.005	-8.2276	-1.3481
	REGULASI TIDAK BAIK (C) - NON DIABETES MELLITUS	-2.6212	1.3953	.162	-6.0609	.8186
	REGULASI BAIK (B) - REGULASI TIDAK BAIK (C)	17.8182*	6.9243	.039	-.7479	34.8885
	REGULASI BAIK (B) - NON DIABETES MELLITUS	32.1212*	6.9243	.000	15.0509	49.1915
IL1ACONS	REGULASI TIDAK BAIK (C) - REGULASI BAIK (B)	17.8182*	6.9243	.039	-34.8885	-.7479
	REGULASI TIDAK BAIK (C) - NON DIABETES MELLITUS	14.3030	6.9243	.114	-2.7673	31.3733
	REGULASI BAIK (B) - REGULASI TIDAK BAIK (C)	32.1212*	6.9243	.000	-49.1915	-15.0509
	REGULASI BAIK (B) - NON DIABETES MELLITUS	14.3030	6.9243	.114	-31.3733	2.7673

*.The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

IL1ACONS

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NON DIABETES MELLITUS	11	31.0015	
REGULASI BAIK (B)	11	33.6226	33.6226
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11		35.7893
Sig.		.162	.281

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.000.

TNFACONS

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NON DIABETES MELLITUS	11	201.1273	
REGULASI BAIK (B)	11	215.4303	
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11		233.2485
Sig.		.114	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.000.

Lampiran 5. Hasil uji Statistik Interaksi Serotipe Oneway

Descriptives

	N	Mean	d. Deviat	td. Error	Confidence Interva		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
IL1ACOI REGULASI T BAIK (C) REGULASI E NON DIABET MELLITUS Total	11	5.7893	4.1003	1.2363	33.0346	38.5439	31.52	43.85
	11	3.6226	3.5381	1.0668	31.2457	35.9996	28.85	40.85
	11	1.0015	1.6707	.5037	29.8790	32.1239	28.02	33.85
	33	3.4711	3.7403	.6511	32.1449	34.7974	28.02	43.85
TNFACC REGULASI T BAIK (C) REGULASI E NON DIABET MELLITUS Total	11	3.2485	17.1480	5.1703	221.7283	244.7686	211.07	267.73
	11	5.4303	13.0618	3.9383	206.6553	224.2053	197.73	232.40
	11	1.1273	18.0677	5.4476	188.9893	213.2653	173.73	221.73
	33	6.6020	20.6219	3.5898	209.2898	223.9142	173.73	267.73
SAP1 REGULASI T BAIK (C) REGULASI E NON DIABET MELLITUS Total	11	281.29	312.3965	0.2365	384.1817	178.3965	321.49	978.74
	11	259.79	429.7106	0.1420	268.4470	251.1421	428.45	254.18
	11	104.19	562.1731	531.47	182.3458	026.0415	815.17	0217.8
	33	215.09	572.3555	7.4980	502.1140	928.0708	815.17	0217.8
SAP3 REGULASI T BAIK (C) REGULASI E NON DIABET MELLITUS Total	11	793.86	851.2757	8.7600	847.4957	740.2315	554.98	650.88
	8	189.37	327.0851	0.5158	063.7695	314.9623	588.53	697.39
	5	328.29	129.1688	6.6204	201.2458	155.3262	746.25	938.55
	24	787.04	571.6980	9.6905	167.5251	106.5463	588.53	938.55
JUMLBA REGULASI T BAIK (C) REGULASI E NON DIABET MELLITUS Total	11	4.27	.65	.19	3.84	4.71	3	5
	11	3.55	.82	.25	2.99	4.10	2	5
	11	4.91	2.02	.61	3.55	6.27	2	8
	33	4.24	1.39	.24	3.75	4.74	2	8

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
IL1ACONS	3.111	2	30	.059
TNFACONS	1.165	2	30	.325
SAP1	3.178	2	30	.056
SAP3	3.957	2	21	.035
JUMLBAND	3.300	2	30	.051

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
IL1ACONS	Between Groups	126.456	2	63.228	5.905	.007
	Within Groups	321.223	30	10.707		
	Total	447.679	32			
TNFACONS	Between Groups	5697.401	2	2848.700	10.803	.000
	Within Groups	7911.030	30	263.701		
	Total	13608.431	32			
SAP1	Between Groups	1.31E+09	2	654752483.5	1.091	.349
	Within Groups	1.80E+10	30	600403865.6		
	Total	1.93E+10	32			
SAP3	Between Groups	4.62E+08	2	231223987.6	3.956	.035
	Within Groups	1.23E+09	21	58450198.95		
	Total	1.69E+09	23			
JUMLBAND	Between Groups	10.242	2	5.121	2.965	.067
	Within Groups	51.818	30	1.727		
	Total	62.061	32			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Tukey HSD

Dependent Variat	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
ILTACONS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	REGULASI BAIK	2.1666	1.3953	.281	-1.2731	5.6064
		NON DIABETES MELLITUS	4.7878*	1.3953	.005	1.3481	8.2276
	REGULASI BAIK	REGULASI TIDAI BAIK (C)	-2.1666	1.3953	.281	-5.6064	1.2731
		NON DIABETES MELLITUS	2.6212	1.3953	.162	-.8186	6.0609
	NON DIABETES MELLITUS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	-4.7878*	1.3953	.005	-8.2276	-1.3481
		REGULASI BAIK	-2.6212	1.3953	.162	-6.0609	.8186
TNFACONS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	REGULASI BAIK	17.8182*	6.9243	.039	.7479	34.8885
		NON DIABETES MELLITUS	32.1212*	6.9243	.000	15.0509	49.1915
	REGULASI BAIK	REGULASI TIDAI BAIK (C)	-17.8182*	6.9243	.039	-34.8885	-.7479
		NON DIABETES MELLITUS	14.3030	6.9243	.114	-2.7873	31.3733
	NON DIABETES MELLITUS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	-32.1212*	6.9243	.000	-49.1915	-15.0509
		REGULASI BAIK	-14.3030	6.9243	.114	-31.3733	2.7873
SAP1	REGULASI TIDAI BAIK (C)	REGULASI BAIK	021.4945	0448.17	.995	24736.1884	26779.1775
		NON DIABETES MELLITUS	2822.905	0448.17	.447	88580.5875	82934.7784
	REGULASI BAIK	REGULASI TIDAI BAIK (C)	021.4945	0448.17	.995	26779.1775	24736.1884
		NON DIABETES MELLITUS	3844.399	0448.17	.393	89602.0820	11913.2839
	NON DIABETES MELLITUS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	2822.9045	0448.17	.447	12934.7784	88580.5875
		REGULASI BAIK	3844.3991	0448.17	.393	11913.2839	89602.0820
SAP3	REGULASI TIDAI BAIK (C)	REGULASI BAIK	604.4978	552.4540	.984	-8349.7484	9558.7420
		NON DIABETES MELLITUS	0534.422*	123.5536	.047	20928.1688	-140.6759
	REGULASI BAIK	REGULASI TIDAI BAIK (C)	604.4978	552.4540	.984	-9558.7420	8349.7484
		NON DIABETES MELLITUS	1138.920*	358.4762	.047	22124.8077	-153.0325
	NON DIABETES MELLITUS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	0534.4224*	123.5536	.047	140.6759	20928.1688
		REGULASI BAIK	138.9201*	358.4762	.047	153.0325	22124.8077
JUMLBAND	REGULASI TIDAI BAIK (C)	REGULASI BAIK	.73	.56	.407	-.65	2.11
		NON DIABETES MELLITUS	-.64	.56	.500	-2.02	.75
	REGULASI BAIK	REGULASI TIDAI BAIK (C)	-.73	.56	.407	-2.11	.65
		NON DIABETES MELLITUS	-1.36	.56	.054	-2.75	1.79E-02
	NON DIABETES MELLITUS	REGULASI TIDAI BAIK (C)	.64	.56	.500	-.75	2.02
		REGULASI BAIK	1.36	.56	.054	-1.79E-02	2.75

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

IL1ACONS

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NON DIABETES MELLITUS	11	31.0015	
REGULASI BAIK (B)	11	33.6226	33.6226
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11		35.7893
Sig.		.162	.281

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.000.

TNFACONS

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
NON DIABETES MELLITUS	11	201.1273	
REGULASI BAIK (B)	11	215.4303	
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11		233.2485
Sig.		.114	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.000.

SAP1

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05
		1
REGULASI BAIK (B)	11	25259.79
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11	26281.29
NON DIABETES MELLITUS	11	39104.19
Sig.		.393

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.000.

SAP3

Tukey HSD^{a,b}

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
REGULASI BAIK (B)	8	14189.37	
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11	14793.86	
NON DIABETES MELLITUS	5		25328.29
Sig.		.988	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 7.213.
- The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

JUMLBAND

Tukey HSD^a

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05
		1
REGULASI BAIK (B)	11	3.55
REGULASI TIDAK BAIK (C)	11	4.27
NON DIABETES MELLITUS	11	4.91
Sig.		.054

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

- Uses Harmonic Mean Sample Size = 11.000.

Lampiran 6. Pemeriksaan Sitologi

Hasil *scrubing* yang telah dipulas pada object glass, difiksasi dan dicat dengan prosedur *Papanicolaou* dengan cara dimasukkan kedalam :

1. Alkohol 80% : 3-10 dip
2. Alkohol 70% : 3-10 dip
3. Alkohol 50 % : 3-10 dip
4. Aquadest : 3-10 dip
5. Harris Hematoxylin : 2-6 menit
6. Cuci dengan air mengalir : 5-10 menit
7. larutan Hcl 0,5% : 6 dip
8. Cuci dengan air mengalir : 5-10 menit
9. Alkohol 50% : 3-10 dip
10. Alkohol 70% : 3-10 dip
11. Alkohol 80 % : 3-10 dip
12. Alkohol 95 % : 3-10 dip
13. Orange G6 : 1,5-2 menit
14. Alkohol 95 % : 3-10 dip
15. Alkohol 95 % : 3-10 dip
16. EA 50 : 2,5-3,5 menit
17. Alkohol 95 % : 3-10 dip
18. Alkohol 95 % : 3-10 dip
19. Alkohol 95 % : 3-10 dip
20. Alkohol absolut : 3-10 dip
21. Alkohol absolut : 3-10 dip
22. Alkohol absolut : 3-10 dip
23. Xylol : 3-10 dip
24. Xylol : 3-10 dip
25. Xylol : 3-10 dip
26. Xylol : 3-10 dip
27. Mounting dengan DPX