

DISERTASI

IMUNOPATOGENESIS KERUSAKAN JARINGAN MUKOSA MULUT AKIBAT PAPARAN MONOMER METIL METAKRILAT



I GUSTI AJU WAHJU ARDANI

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

IMUNOPATOGENESIS KERUSAKAN JARINGAN MUKOSA MULUT AKIBAT PAPARAN MONOMER METIL METAKRILAT

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 : Kamis

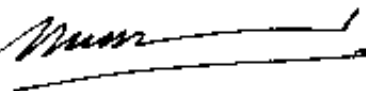
Tanggal : 4 Agustus 2005

Pukul 10.00 WIB

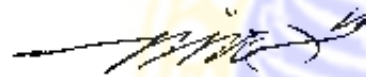
IGUSTI AJU WAHJU ARDANI
NIM. 090114570.12

DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL 15 AGUSTUS 2005


Promotor,


Prof. Dr. Moh. Rubianto, drg., M.S., Sp.Perio.
NIP : 130 675 835

Ko-Promotor I,



Widya Asmara, drh., M. S., Ph. D.
NIP: 130 779 440

Ko-Promotor II


Prof. Dr. Saut Sahat Pohan, dr., Sp.KK (K)
NIP: 130 355 355

Mengetahui,

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran


Prof. Dr. Mandojo Rukmo, drg., M.Sc., Sp.KG.
NIP: 130 675 839

**Disertasi ini telah diuji pada Ujian Disertasi Tahap I (Tertutup)
Tanggal 14 Juli 2005**

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof.Dr. Subijanto Marto Sudarmo dr., Sp.A. (K).

Anggota : 1. Prof. Dr. Moh. Rubianto, drg., M.S., Sp.Perio.
2. Prof. Dr. Saut Sahat Pohan, dr., Sp.KK.(K).
3. Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D.
4. Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., M.S.
5. Dr. Sumarno, dr., DMM., Sp.MK.
6. Dr. Mieke Sylvia M.A.R., drg., M.S., Sp.Ort.



**Sesuai Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 5316/JO3/PP/2005
Tanggal 25 Juli 2005**

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur yang sebesar-besarnya kepada kehadiran Allah S.W.T. atas segala rahmat dan kasih karuniaNya yang dilimpahkan kepada saya, sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Dengan rasa hormat atas selesainya pendidikan ini, maka perkenankan saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya yang saya haturkan kepada Promotor saya Prof.Dr. Moh. Rubianto, drg., M.S., Sp.Perio., yang telah menghantarkan saya menuju jenjang pendidikan tertinggi. Beliau senantiasa memberikan bimbingan dan pengarahan di sela waktunya yang sangat padat. Beliau memberikan dorongan semangat percaya diri sehingga saya mampu menyelesaikan pendidikan ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi tingginya juga saya haturkan kepada mantan Promotor saya almarhum Prof.Dr.Pitono Soeparto, dr., Sp.A.(K). yang tidak sempat menyaksikan saya dalam menyelesaikan pendidikan ini. Beliau telah membimbing saya dalam membantu membangun kerangka berpikir saya. Wawasan keilmuan dan sikap sebagai seorang ilmuwan sejati seperti beliau patut diteladani. Semoga Allah S.W.T. selalu melimpahkan rahmatNya dan melipat gandakan pahala kepada beliau.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya saya haturkan pula kepada Ko-Promotor I, Drh. Widya Asmara, M.S., Ph.D. yang selalu menyediakan waktu untuk membimbing saya. Beliau telah banyak membangun kerangka berpikir saya serta memberikan pengarahan yang sangat bermanfaat dalam membantu penulisan disertasi ini.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan setinggi-tingginya saya haturkan kepada Ko-Promotor II, Prof.Dr. Saut Sahat Pohan, dr., Sp.KK.(K). yang tidak pernah bosan meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan keilmuan baik secara teori maupun klinik yang berkaitan dengan penelitian saya, sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan ini.

Dengan terselesainya penulisan saya ini, perkenankan pula saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

Menteri Pendidikan Nasional melalui Tim Manajemen Program Doktor yang telah memberikan beasiswa sehingga dapat menyelesaikan pendidikan saya.

Rektor Universitas Airlangga Prof.Dr. Med. Puruhito, dr., Sp.B.TKV., atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Doktor hingga selesainya Pendidikan ini di Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof.Dr. Muh Amin, dr.,Sp.P.(K). beserta jajarannya yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Pendidikan Program Doktor di Universitas Airlangga.

Prof.Dr. Mandojo Rukmo, drg., M.Sc., Sp.KG. selaku Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga. Saya sangat berterima kasih atas dorongan dan nasehat yang sangat bermanfaat dalam penulisan disertasi ini

Prof.Dr. Hj. Juliati Hood A., dr., M.S., Sp.PA., FIAC. mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga, yang telah membantu proses kelancaran dalam pendidikan saya.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Prof.Dr. Moh. Rubianto, drg., M.S., Sp.Perio. dan mantan Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Dr. Boedihardjo, drg., M.Sc., Sp.Perio. yang telah memberi ijin dan kesempatan kepada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Doktor ini.

Ungkapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya ucapkan kepada : para Dosen Pemberi Mata Kuliah Penunjang Disertasi (MKPD) Prof.Dr. Saut Sahat Pohan, dr., Sp.KK.(K.); Prof.Dr. Suhartono Taat Putra, dr., M.S.; Prof.Dr. H. Sarmanu, drh., M.S. yang telah banyak memberikan bekal ilmu dalam penyusunan kerangka ilmiah disertasi ini.

Ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya haturkan kepada para Dosen Pemberi Mata Kuliah pada kuliah dasar semester I dan II yang telah banyak membantu membentuk kerangka berpikir saya : Prof. Purnomo Suryohudoyo, dr., Sp.BK.; Prof. Eddy Pranowo Soedibjo, dr., MPH. (alm); Prof.Dr. Pitono Soeparto, dr., Sp.A.(K). (alm.); Prof. Bambang Rahino, dr.; Prof.Dr. Koento Wibisono Siswomihardjo; Prof.Dr. Sarmanu, drh., M.S.; Prof.Dr. Zainuddin, drs., Apt.; Prof. Dr. Suhartono Taat Putra, dr., M.S.; Dr. : Ketut Sudiana, drs., M.S.; Widodo J. Pudjirahardjo, dr., M.S., MPH., Dr.PH.; Prof. Koentoro, dr., MPH., Dr.PH.; Siti Pariani, dr., MPH., Ph.D.; Prof.Dr. HJ. Glinka, SVD.; Fuad Amsyari, dr., Ph.D.

Terima kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada para penguji dalam ujian kualifikasi hingga ujian Tahap I : Prof.Dr. Pitono Soeparto, dr., Sp.A.(K).(alm); Prof. Eddy Pranowo Soedibjo, dr., MPH. (alm); Prof. Sutiman Bambang Sumitro, S.U., D.Sc.; Prof.Dr. Moh. Rubianto, drg.,M.S.,Sp.Perio.; Widya Asmara, drh., M.S., Ph.D.; Prof.Dr. Saut Sahat Pohan, dr., Sp.KK.(K); Prof.Dr. Soehartono Taat Putra, dr., M.S.; Prof. Dr. H. Sarmanu, drh., M.S.; Prof.Dr. Mandojo Rukmo, drg., M.Sc., Sp.KG.; Prof. Dr. Subijanto M.S., dr., Sp.A.(K), Dr. Mieke Sylvia M.A.R., drg., M.S., Sp.Ort.; Dr. Sumamo, dr., DMM. Sp.MK.

Tenma kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Prof Dr. Soehartono Taat Putra, dr., M.S. yang telah banyak memberikan masukan dalam menyusun kerangka berpikir disertasi saya.

Terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada Prof.Dr. H. Sarmanu, drh., M.S. sebagai konsultan statistik dan metodologi penelitian dalam penelitian disertasi saya

Tenma kasih yang sebesar-besarnya saya ucapkan kepada Kepala Laboratorium Ortodonsia, drg. Achmad Sjafei, M.S., Sp.Ort., beserta seluruh staf pengajar Laboratorium Ortodonsia yang sekaligus adalah guru saya, yang telah memberikan dukungan kepada saya dalam

menyelesaikan pendidikan ini. Tak lupa saya ucapkan banyak terima kasih kepada Prof.Dr. Nini S. Winoto, drg., M.S., Sp.Ort.; Drg Anggraini Soetamat, M.S. dan Prof.Dr. Soekotjo D.S., drg., M.Sc., Sp.Ort. atas bimbingan mereka kepada saya untuk menuju jenjang pendidikan yang lebih tinggi

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya saya sampaikan kepada kepala Laboratorium Prostodonsia drg. Pramono Ragowo Durjadibrata, M.S., Sp.Prost. beserta seluruh staf pengajar Laboratorium Prostodonsia atas kerja samanya, bantuan dan kesempatan yang telah diberikan kepada saya untuk pengambilan sampel di Laboratorium tersebut.

Terima kasih saya ucapkan kepada Kepala Laboratorium Patologi Klinik dr. Hasan Assegaff, Sp.PK.(K). yang telah memben ijn kepada saya untuk melakukan pemeriksaan laboratorium dan kepada Prof.Dr. Indro Handoyo, dr., Sp.PK.(K) sebagai konsultan pelaksanaan pemeriksaan laboratorik. Kepada Ibu Tutik dan Bapak Ketut, yang telah membantu dalam pelaksanaan teknik laboratorium penelitian ini, saya mengucapkan terima kasih.

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan kepada: Kepala laboratorium Biomedik Universitas Brawijaya, Malang Dr. Sumamo, dr., DMM., Sp.MK., yang telah mengijinkan saya dalam melakukan pemeriksaan laboratorik. Kepada Sdr. Wibi Riawan, S.Si. yang telah membantu saya dalam pemeriksaan spesimen laboratorium, saya ucapkan terima kasih.

Saya ucapkan terima kasih yang tidak terhingga kepada teman sejawat Dr. Aulanniam, drh., DES. sebagai konsultan pelaksanaan pemeriksaan laboratorium dalam penelitian disertasi saya. Adik-adik yang telah membantu saya di Laboratorium Biokimia Universitas Brawijaya : Sdri. Pahlevi, S.Pp., MP. dan Maris S.Si., M.Kes. Saya ucapkan terima kasih.

Terima kasih kepada Ketua Komisi Kode Etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof. Retno Laksminingsih Soebagyo, drg., M.S., MHPEd. (alm.) dan Dr. Istiah, drg., M.S. beserta Tim yang telah memberikan kelayakan etik untuk melakukan penelitian pada penderita dan hewan coba.

Tenma kasih yang sebesar-besarnya kepada teman-teman angkatan tahun 2001 atas kebersamaannya dalam menjalani Pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Kepada mantan ketua kelas dr. Abdurrahman, Sp.BO. (alm.) yang telah memberikan banyak dorongan dan semangat dalam menyelesaikan pendidikan Doktor, saya mengucapkan tenma kasih. Semoga beliau ditenna disisi Allah S.W.T. dan senantiasa mendapat rahmat-Nya.

Tenma kasih kepada teman-teman senior Dr. Aulanniam, drh., DES.; Dr. Indah Listiana Kriswandini, drg., M.Kes.; Dr. Sulistiana, dr., M.S.; Dr Pudji Sianto., drh., M.S.; drh. Sri Panca, M.S.; Yuswianto, drs., M.Kes. yang selalu memberikan dorongan moral dan semangat kepada saya selama menyelesaikan pendidikan Doktor.

Terima kasih yang sebesar-besarnya kepada para guru mulai taman kanak-kanak hingga pendidikan Sarjana dan Magister yang berperan serta dalam proses pendidikan saya.

Sdr. Atok Budi T.S. yang telah membantu saya dalam disain grafis disertasi saya, terima kasih sekali atas bantuannya.

Terima kasih yang tak terhingga kepada kedua orang tua saya Prof. I Gusti Nyoman Gde Ranuh, dr. Sp.A.(K). dan Ibunda Rabiatal Abdijah yang telah membesarkan dan mendidik saya dengan penuh kasih sayang. Tak lupa pula saya menyampaikan rasa hormat dan penghargaan kepada kedua almarhum mertua saya Bapak Doelyat dan Ibu Soekeni.

Tidak lupa juga saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada suami saya tercinta : drg. Irfandi Doeljat yang dengan penuh kasih sayang serta pengertian dalam memberikan ijin, dorongan, semangat, dan bimbingan yang sangat berharga selama saya menyelesaikan pendidikan Doktor.

Untuk ketiga anak-anakku tersayang : Rendy Hendrawan, Putri Melinda Iradani dan Putri Paramita Larasati, terima kasih atas pengertian dan memberikan semangat selama masa pendidikan Doktor.

Kepada kakak-kakak dan adik-adik saya : I Gusti Ngurah Indra Setiabudi Ranuh, S.H., C.N., M.Si. dan Ani Retnowati, S.H., C.N.; dr. I Gusti Made Reza Gunadi Ranuh, Sp.A.(K). dan dr. Ria Sylvia, Sp.M. serta Ir. I Gusti Bagus Kumiawan Ranuh, M.Sc. dan Dra. Nora Puspita, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dorongan moral kepada saya dalam menyelesaikan pendidikan ini. Semoga Allah S.W.T. membalas amal budi baik kalian.

Masih banyak pihak yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu yang membantu dalam terselesainya pendidikan saya. Untuk itu saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dengan tulus dan ikhlas. Semoga Allah S.W.T. senantiasa melimpahkan karunia dan rahmatNya serta melipat gandakan pahala-pahala mereka.

RINGKASAN**IMUNOPATOGENESIS
KERUSAKAN JARINGAN MUKOSA MULUT
AKIBAT PAPARAN MONOMER METIL METAKRILAT****I GUSTI AJU WAHJU ARDANI**

Monomer metil metakrilat (MMA) merupakan bahan dasar resin akrilik polimetil metakrilat (PMMA) yang digunakan secara luas di bidang kedokteran gigi, terutama untuk pembuatan piranti lepasan ortodonsia, piranti gigi tiruan, dan tumpatan gigi. Beberapa fakta klinik menunjukkan bahwa MMA berpotensi menyebabkan reaksi iritasi dan alergi pada mukosa mulut dengan gejala klinik berupa hiperemia, edema, rasa nyeri, *burning mouth*, bahkan dapat dijumpai adanya ulkus. Angka kejadian terjadinya gejala klinik pada penderita terpapar MMA adalah 0,5 - 1 %. Namun imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA sampai saat ini masih belum jelas.

Penetrasi MMA ke dalam jaringan mukosa mulut sangat dimungkinkan karena struktur kimia MMA bersifat lipofilik, sehingga MMA dapat menembus membran pertahanan jaringan mukosa mulut.

Fakta dan hasil penelitian yang telah dilakukan sebelumnya menunjukkan bahwa MMA dapat bertindak sebagai iritan dalam konsentrasi tertentu, serta sebagai imunogen atau alergen. Namun sampai saat ini imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA melalui mekanisme reaksi iritasi dan hipersensitivitas masih belum jelas.

Penelitian ini mengkaji pola respons imun sekunder terhadap MMA pada kelinci lokal dengan mengikuti pola produksi IgG anti-MMA yang diamati dalam jangka waktu tertentu. Selanjutnya, akan dikaji imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA melalui reaksi iritasi dan hipersensitivitas. Kajian imunopatogenesis tersebut dilakukan melalui deteksi konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut, serta IgE dan IgG spesifik terhadap MMA dalam serum, yang berperan dalam reaksi iritasi dan hipersensitivitas.

Sampai saat ini belum ditemukan metoda diagnostik untuk reaksi iritasi dan hipersensitivitas pada mukosa mulut penderita terpapar MMA. Diduga terdapat korelasi antara profil mediator yang memperantarai respons imun sistemik dan respons imun lokal pada jaringan mukosa mulut. Dalam penelitian ini akan dibuktikan terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hasil penelitian ini diharapkan dapat dikembangkan sebagai metoda diagnostik yang mudah untuk reaksi iritasi

dan hipersensitivitas pada penderita terpapar MMA, melalui deteksi konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma.

Rumusan masalah dalam penelitian ini adalah : 1) bagaimanakah pola respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi dengan MMA ?; 2) apakah MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral ?; 3) apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi iritasi, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ ?; 4) apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I, yang ditunjukkan dengan peningkatan IL-4 dan hasil positif IgE spesifik terhadap MMA ?; 5) apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, yang ditunjukkan dengan peningkatan IFN- γ dan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA ?; 6) apakah kerusakan jaringan mukosa mulut oleh karena terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α dan IFN- γ ?; 7) apakah terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA ?

Tujuan umum penelitian adalah mengungkap imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Sedangkan tujuan khusus penelitian ini adalah : 1) mengkaji pola respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi dengan MMA; 2) membuktikan MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral; 3) membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi iritasi, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ ; 4) membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I, yang ditunjukkan dengan peningkatan IL-4 dan hasil positif IgE spesifik terhadap MMA; 5) membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, yang ditunjukkan dengan peningkatan IFN- γ dan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA; 6) membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α dan IFN- γ ; 7) membuktikan terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Manfaat ilmiah penelitian ini adalah : 1) dihasilkan informasi ilmiah tentang reaksi iritasi dan hipersensitivitas kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA; 2) dihasilkan informasi ilmiah yang menyatakan bahwa profil sitokin IL-4, IFN- γ dan TNF- α jaringan mukosa mulut berkorelasi dengan profil sitokin tersebut dalam plasma penderita terpapar MMA. Sedangkan manfaat aplikatif penelitian ini adalah : 1) hasil penelitian ini menjadi alasan mendasar agar dicoba dikembangkan bahan baru yang bersifat hipoalergenik untuk penderita yang sensitif terhadap

MMA, sebagai bahan alternatif untuk pembuatan piranti dalam kedokteran gigi; 2) hasil penelitian ini dapat dikembangkan sebagai cara diagnostik sederhana untuk reaksi intasi dan hipersensitivitas jaringan mukosa mulut, melalui pemeriksaan darah perifer tanpa kerokan jaringan mukosa mulut.

Hipotesis penelitian adalah : 1) MMA bersifat imunogenik, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral pada penderita terpapar MMA; 2) kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi intasi, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α , tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ ; 4) kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I, yang ditunjukkan dengan peningkatan IL-4 dan hasil positif IgE spesifik terhadap MMA; 5) kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, yang ditunjukkan dengan peningkatan IFN- γ dan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA; 6) kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α dan IFN- γ ; 7) terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Penelitian ini dibagi dalam dua tahap. Penelitian Tahap I dilakukan pada hewan coba kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) dengan tujuan untuk mengetahui pola respons imun sekunder IgG anti-MMA, setelah diimunisasi dengan MMA. Penelitian Tahap I menggunakan rancangan penelitian eksperimental *posttest-only control group design*. IgG spesifik terhadap MMA yang terbentuk dideteksi dengan metoda *dot blot* dan ELISA.

Penelitian Tahap II menggunakan rancangan penelitian observasional *case-control design*. Sampel penelitian dibagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok kontrol dan kelompok kasus. Kelompok kontrol adalah penderita yang belum terpapar MMA dan tidak ada kelainan atau kerusakan jaringan mukosa mulut. Kelompok kasus adalah penderita terpapar MMA pertama kali dan menunjukkan gejala inflamasi lokal, rasa nyeri dan *burning mouth* (rasa terbakar mukosa), serta ulkus pada mukosa mulut. Jumlah sampel dalam kelompok kasus dan kontrol masing-masing 8 penderita, yang diambil dari klinik Prostodontia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Uji laboratorik dilakukan pada semua sampel dengan mengukur konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan kerokan jaringan mukosa mulut dengan menggunakan teknik *direct sandwich* ELISA. IgG dan IgE spesifik diukur dalam serum dengan menggunakan teknik ELISA tidak langsung. IgG spesifik juga dideteksi dengan metoda *dot blot*.

Hasil penelitian Tahap I adalah pola respons imun sekunder pada kelinci lokal yang diimunisasi dengan MMA menunjukkan terjadi peningkatan produksi IgG anti-MMA setelah pemberian *booster* 1 (hari ke-28 setelah imunisasi pertama) dan mencapai puncak pada hari ke-42, kemudian menurun secara bertahap sampai hari ke-49. Setelah pemberian *booster* 2 pada hari ke-52, terjadi peningkatan produksi IgG spesifik terhadap MMA yang mencapai puncak pada hari ke-80 setelah

imunisasi pertama. Titer IgG anti-MMA kemudian menurun secara bertahap sampai hari ke-87. Puncak produksi IgG anti-MMA setelah pemberian booster 2 lebih tinggi bila dibandingkan dengan setelah pemberian booster 1.

Hasil penelitian Tahap II menunjukkan bahwa MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga mampu menginduksi IgG spesifik terhadap MMA. Selanjutnya, analisis statistik dengan menggunakan uji t bebas untuk variabel IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut, menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara penderita terpapar MMA dan kontrol untuk semua variabel.

Apabila imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi iritasi, maka akan terdapat peningkatan bermakna ($p < 0,05$) TNF- α , tetapi tanpa disertai peningkatan bermakna ($p > 0,05$) IL-4 dan IFN- γ baik dalam plasma maupun jaringan mukosa mulut. Namun hasil yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan terjadi peningkatan bermakna ($p < 0,05$) IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa IgE spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA adalah negatif. IL-4 dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA meningkat secara bermakna ($p < 0,05$). Kesimpulan fakta tersebut adalah imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I yang diperantarai oleh IgE.

Imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III. Hal ini dibuktikan dengan didapatkan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA dan peningkatan bermakna ($p < 0,05$) IFN- γ dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Hasil penelitian ini menunjukkan terjadi peningkatan bermakna ($p < 0,05$) TNF- α , dan IFN- γ dalam plasma dan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA. Hal ini membuktikan bahwa imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV

Hasil uji korelasi Pearson konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA menunjukkan bahwa terdapat korelasi bermakna ($p < 0,05$) konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut.

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah MMA mampu menginduksi respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi dengan MMA. MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga mampu menginduksi respons imun humoral IgG anti-MMA. Imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi dan hipersensitivitas tipe I yang diperantarai oleh IgE, tetapi terjadi melalui

reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, tipe IV. Penelitian ini juga membuktikan bahwa terdapat korelasi bermakna antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hasil penelitian ini dapat dikembangkan sebagai metoda diagnostik reaksi iritasi dan hipersensitivitas pada mukosa mulut penderita terpapar MMA melalui pemeriksaan darah perifer.



SUMMARY

IMMUNOPHATOGENESIS OF THE ORAL EPITHELIAL MUCOSAL DESTRUCTION DUE TO MONOMER METHYL METHACRYLATE EXPOSURE

I GUSTI AJU WAHJU ARDANI

Methyl methacrylate (MMA) monomer is a basic material of polymethyl methacrylate (PMMA) acrylic resins widely used in dental medicine. It is primarily used for removable orthodontic appliances, partial and full denture appliances, and also for dental fillings. Many clinical facts showed that MMA may cause irritation and allergic reaction in oral mucosa with some clinical symptoms such as hyperemia, mucosal edema, painful oral mucosa, burning mouth, and even oral ulcers. The incidence of clinical symptom in patients exposed to MMA is 0,5 – 1 %. However, immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA has not been clear.

MMA penetration into mucosal tissue is possible, because its chemical structure is lipophylic that enable MMA to penetrate the barrier of oral mucosal tissue.

The facts and results of the previous studies showed that MMA might act as irritant in certain concentration, and also as immunogen or allergen. However, the immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction through irritation and hypersensitivity reaction in patients exposed to MMA have not been clear.

This study examined the secondary immune response in local rabbit immunized with MMA, by examining the IgG anti-MMA production pattern in certain period. Furthermore, this study also examined the immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA, by detecting the concentrations of plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , TNF- α , serum IgG and IgE specific to MMA that mediated irritation and hypersensitivity reactions.

There is no diagnostic method for oral mucosal tissue irritation and hypersensitivity reactions in patient exposed to MMA. It was suggested that there were significant correlations between plasma and oral mucosal tissue immune response mediators profile. This study examined the correlations between plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , and TNF- α concentrations in patients exposed to MMA. Hopefully, the results of this study could be developed as a simple diagnostic method for oral mucosal hypersensitivity reactions by assessing plasma IL-4, IFN- γ , and TNF- α .

Problem statements of this study are . 1) how is IgG anti-MMA secondary response pattern in local rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) immunized with MMA ?; 2) is MMA immunogenic to patients exposed to

MMA that can induce humoral immune response ?; 3) does oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happen through irritation reaction revealed by increased TNF- α without increased IL-4 and IFN- γ ?; 4) does oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happen through type I hypersensitivity reaction revealed by increased IL-4 and positive result of IgE anti-MMA ?; 5) does oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happen through type II and / or type III hypersensitivity reactions revealed by increased IFN- γ and positive result of IgG anti-MMA ?; 6) does oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happen through type IV hypersensitivity reaction revealed by increased TNF- α and IFN- γ ?; 7) is there any correlation between plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , and TNF- α in patients exposed to MMA ?

The general objective of this research is examining the immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA. The specific objectives of this research are: 1) to examine IgG anti-MMA secondary response pattern in local rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) immunized with MMA; 2) to prove that MMA is immunogenic in patient exposed to MMA, that can induce humoral immune response; 3) to prove that oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through irritation, revealed by increased TNF- α without increased IL-4 and IFN- γ ; 4) to prove that oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through type I hypersensitivity reaction, revealed by increased IL-4 and positive result of IgE anti-MMA; 5) to prove that oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through type II and / or type III hypersensitivity reactions, revealed by increased IFN- γ and positive result IgG anti-MMA; 6) to prove that oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through type IV hypersensitivity reaction, revealed by increased TNF- α and IFN- γ ; 7) to prove that plasma IL-4, IFN- γ , and TNF- α concentrations correlate to their oral mucosal tissue concentrations in patients exposed to MMA.

Theoretical benefits of this study are: 1) giving information about irritation and hypersensitivity reactions in oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA; 2) giving information that plasma cytokine profile of IL-4, IFN- γ and TNF- α correlates to its oral mucosal tissue cytokine profile. Practical benefits of this research are: 1) the results of this study can be used as a basic reasons to develop new alternative hypoallergenic material for dental material appliances, especially for sensitive patients; 2) the results of this study can be developed as a diagnostic method for oral mucosal irritation and hypersensitivity reactions in patient exposed to MMA by examining peripheral blood.

The hypotheses of this study are: 1) MMA is immunogenic in patient exposed to MMA that can induce humoral immune response; 3) oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through irritation process revealed by increased TNF- α without increased IL-4 and IFN- γ . 4) oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through type I hypersensitivity reaction revealed by increased IL-

4 and positive result of IgE anti-MMA; 5) oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through type II and / or type III hypersensitivity reaction revealed by increased IFN- γ and positive result of IgG anti-MMA; 6) oral mucosal tissue destruction in patient exposed to MMA happens through type IV hypersensitivity reaction revealed by increased TNF- α and IFN- γ ; 7) plasma IL-4, IFN- γ and TNF- α concentrations correlate to their oral mucosal tissue concentrations in patient exposed to MMA.

This study consists of two steps. The first step for examining the IgG anti-MMA secondary response pattern, was done in local rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) immunized with MMA as animal model. This experimental study used posttest-only control group design. IgG specific to MMA was detected by dot blot and ELISA.

The second step of this study used observational case control study design. Samples were divided into two groups, i.e. control group and case group. Control group was MMA unexposed patients without inflammation symptom. Case group was first MMA exposed patients with local inflammation symptoms, e.g. painful oral mucosa, burning mouth, oral mucosal ulcers. Total samples of each group were 8 patients from Airlangga University Prosthodontic Dental Clinic.

Laboratory tests for all samples were assessing plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ and TNF- α using direct sandwich ELISA technique. Serum IgG and IgE specific to MMA were assessed by indirect ELISA. Serum IgG specific to MMA was also assessed by dot blot.

The first step of this study showed that MMA induced IgG anti-MMA secondary response in local rabbit immunized with MMA. First booster (day 28 after first immunization) increased IgG anti-MMA production and achieved its peak on day 42, after that began to decrease gradually until day 49. Second booster given on day 52 increased IgG anti-MMA production and achieved its peak on day 80, and after that began to decrease gradually until day 87. The peak of IgG anti-MMA production after the second booster was higher than the first booster.

The second step of this study showed that MMA is immunogenic in patients exposed to MMA that can induce IgG specific to MMA. Furthermore, statistical independent t test of plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , and TNF- α showed that there were significant differences ($p < 0.05$) between patients exposed to MMA and controls for all variables

If immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happens through irritation, there would be significant increases ($p < 0.05$) of plasma and oral mucosal tissue TNF- α , without significant increases ($p > 0.05$) of IL-4 and IFN- γ . However, the results of this study showed that there were significant increases of plasma and oral mucosal tissue TNF- α , IL-4 and IFN- γ . It can be concluded that immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA does not happen through irritation.

This study showed that IgE anti-MMA were negative in patients exposed to MMA. Plasma and oral mucosal tissue IL-4 in patients exposed

to MMA were significantly increased ($p < 0.05$). Although, plasma and oral mucosal tissue IL-4 increased significantly, but there was no positive result of IgE specific to MMA. It can be concluded that immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA does not happen through type I hypersensitivity reaction mediated by IgE.

Immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happens through type II and / or type III hypersensitivity reactions. These are proved by positive results of IgG specific to MMA and significant increases ($p < 0.05$) of plasma and oral mucosal tissue IFN- γ in patients exposed to MMA.

The results of this study showed that there were significant increases ($p < 0.05$) of plasma and oral mucosal tissue TNF- α and IFN- γ in patients exposed to MMA. It can be concluded that oral mucosal tissue destruction happens through type IV hypersensitivity reaction.

Plasma IL-4, IFN- γ , and TNF- α concentrations significantly correlated ($p < 0.05$) to their oral mucosal tissue concentrations in patients exposed to MMA.

The conclusions of this study are MMA induced IgG anti-MMA secondary response in local rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) immunized with MMA. Furthermore, MMA is immunogenic in patients exposed to MMA that can induce IgG anti-MMA. Immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA does not happen through irritation and type I hypersensitivity reaction mediated by IgE, but happens through type II and / or type III, type IV hypersensitivity reactions. This study also proved that there is significant correlation between plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ and TNF- α concentrations in patients exposed to MMA. This result can be used to develop a diagnostic method for oral mucosal irritation and hypersensitivity reactions in patients exposed to MMA by assessing peripheral blood.

ABSTRACT

IMMUNOPHATOGENESIS OF THE ORAL EPITHELIAL MUCOSAL DESTRUCTION DUE TO MONOMER METHYL METHACRYLATE EXPOSURE

I GUSTI AJU WAHJU ARDANI

Many clinical facts showed that methyl methacrylate (MMA) widely used as dental material appliances causes irritations and allergic reactions in oral mucosa with some clinical symptoms such as hyperemia, mucosal edema, painful oral mucosa, burning mouth, and even oral ulcers. MMA penetration into mucosal tissue is possible, because its chemical structure is lipophylic that enable MMA to penetrate through barrier of oral mucosal tissue. This study showed that MMA induced IgG anti-MMA secondary response in local rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), and MMA was immunogenic in patients exposed to MMA. This study examined the immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA, by detecting the concentrations of plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , and TNF- γ with direct sandwich ELISA, and serum IgG and IgE specific to MMA with indirect ELISA. Furthermore, this study examined the correlation between plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , and TNF- α in patients exposed to MMA. The results showed that there were significant increases of plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ , and TNF- α . It can be concluded that immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA does not happen through irritation. This study proved that IgE specific to MMA in patients exposed to MMA was negative, but their plasma and oral mucosal tissue IL-4 were significantly increased ($p < 0.05$). Those facts showed that oral mucosal tissue destruction does not happen through type I hypersensitivity reaction mediated by IgE. Immunopathogenesis of oral mucosal tissue destruction in patients exposed to MMA happens through type II and / or type III hypersensitivity reactions. These are revealed by positive results of IgG specific to MMA and significant increases ($p < 0.05$) of plasma and oral mucosal tissue IFN- γ . Furthermore, there were significant increases ($p < 0.05$) of plasma and oral mucosal tissue TNF- α and IFN- γ in patients exposed to MMA. It can be concluded that oral mucosal tissue destruction happens through type IV hypersensitivity reaction. The study also proved that there were significant correlations between plasma and oral mucosal tissue IL-4, IFN- γ and TNF- α concentrations in patient exposed to MMA. This result can be used to develop diagnostic method for oral mucosal irritations and hypersensitivity reactions in patients exposed to MMA by assessing peripheral blood.

Key Words: methyl methacrylate (MMA), irritation, hypersensitivity, oral epithelial mucosal destructions.

DAFTAR ISI

	halaman
HALAMAN SAMPUL DEPAN	i
HALAMAN SAMPUL DALAM	ii
HALAMAN PRASYARAT GELAR	iii
HALAMAN PERSETUJUAN	iv
HALAMAN PENETAPAN PANITIA PENGUJI	v
UCAPAN TERIMA KASIH	vi
RINGKASAN	x
SUMMARY	xv
ABSTRACT	xix
DAFTAR ISI	xx
DAFTAR TABEL	xxv
DAFTAR GAMBAR	xxvii
DAFTAR LAMPIRAN	xxix
DAFTAR SINGKATAN	xxx
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	8
1.3.1 Tujuan umum	8
1.3.2 Tujuan khusus	8
1.4 Manfaat Penelitian	9
1.4.1 Manfaat ilmiah	9
1.4.2 Manfaat aplikatif	10
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	11
2.1 Struktur Dan Sifat Kimia Monomer Metil Metakrilat (MMA)	11
2.2 Pelepasan MMA Ke Dalam Saliva	12
2.3 Struktur Mukosa Rongga Mulut	13
2.4 Penetrasi MMA Ke Dalam Jaringan Mukosa Mulut	15
2.5 Respons Imun	16
2.5.1 APC, antigen, dan molekul kostimulator	18
2.5.2 Sel yang berfungsi dalam presentasi antigen	19
2.5.3 Perkembangan sel Th1 dan Th2	21
2.5.4 Sitokin sel, fenotip sel dan fungsi sel	23
2.5.5 Faktor yang mempengaruhi diferensiasi sel Th menjadi sel Th1 dan Th2	24
2.5.6 Sitokin	25

2.6	Potensi MMA Dalam Menimbulkan Respons Imun	26
2.7	Reaksi Hipersensitivitas	30
2.7.1	Reaksi hipersensitivitas tipe I	30
2.7.2	Reaksi hipersensitivitas tipe II	35
2.7.3	Reaksi hipersensitivitas tipe III	37
2.7.4	Reaksi hipersensitivitas tipe IV	38
2.8	Perbedaan Reaksi Kontak Alergi, Kontak Iritan, Dan Atopik Di Kulit	42
2.8.1	Kontak iritan di kulit	43
2.8.2	Kontak alergi di kulit	44
2.8.3	Reaksi atopik di kulit	47
BAB 3	KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN	49
3.1	Kerangka Konseptual	49
3.2	Hipotesis Penelitian	54
BAB 4	MATERI DAN METODE PENELITIAN	55
4.1	Rancangan Penelitian	55
4.2	Populasi, Sampel, Besar Sampel, Dan Teknik Pengambilan Sampel	58
4.2.1	Populasi	58
4.2.2	Sampel	58
4.2.3	Besar sampel	61
4.2.4	Teknik pengambilan sampel	62
4.3	Klasifikasi Variabel Dan Definisi Operasional Variabel Penelitian	62
4.3.1	Klasifikasi variabel penelitian	62
4.3.2	Definisi operasinal variabel penelitian	63
4.4	Lokasi Penelitian	64
4.5	Prosedur Pengambilan Dan Pengumpulan Data Penelitian Tahap I	64
4.5.1	Imunisasi MMA pada kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	64
4.5.2	Deteksi IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik <i>dot blot</i>	67
4.5.3	Deteksi IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik ELISA tidak langsung	68
4.6	Prosedur Pengambilan Dan Pengumpulan Data Penelitian Tahap II	71
4.6.1	Pengambilan serum dan plasma darah penderita	71
4.6.2	Pengambilan kerokan jaringan mukosa mulut	72

4.6.3	Pembuatan sediaan hapusan mukosa rongga mulut	73
4.6.4	Deteksi IgG anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan Teknik <i>Dot Blot</i>	75
4.6.5	Deteksi IgG dan IgE anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan teknik ELISA tidak langsung	76
4.6.6	Deteksi konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita dengan teknik <i>direct sandwich</i> ELISA	80
4.7	Cara Analisis Data	81
4.8	Kerangka Operasional Penelitian	82
4.8.1	Kerangka operasional penelitian Tahap I	82
4.8.2	Kerangka operasional penelitian Tahap II	83
BAB 5	HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	84
5.1	Hasil Penelitian Tahap I	84
5.1.1	Hasil deteksi IgG anti-MMA hasil induksi MMA pada kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) dengan teknik <i>dot blot</i>	84
5.1.2	Hasil deteksi IgG anti-MMA pada kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) dengan teknik ELISA	85
5.1.3	Pola respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>), yang diimunisasi dengan MMA	88
5.2	Hasil Penelitian Tahap II	88
5.2.1	Hasil identifikasi kasus penderita terpapar MMA dengan gejala inflamasi di mukosa mulut	88
5.2.2	Hasil deteksi IgG spesifik anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan teknik <i>dot blot</i>	92
5.2.3	Hasil deteksi IgG spesifik terhadap MMA pada serum penderita terpapar MMA dengan teknik ELISA tidak langsung	93
5.2.4	Hasil deteksi IgE spesifik terhadap MMA penderita terpapar MMA dengan teknik ELISA tidak langsung	95
5.2.5	Hasil deteksi konsentrasi IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA	97
5.2.6	Hasil deteksi konsentrasi IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA	100

5.2.7	Hasil deteksi konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA	104
5.3	Hasil Uji Normalitas Variabel IL-4, IFN- γ , TNF- α Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA dan Kontrol	107
5.4	Hasil Analisis Uji t Bebas Untuk Variabel IL-4, IFN- γ , TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Antara Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol	108
5.4.1	Hasil analisis uji t bebas untuk variabel IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol	108
5.4.2	Hasil analisis uji t bebas untuk variabel IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol	109
5.4.3	Hasil analisis uji t bebas untuk variabel TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol	110
5.4.4	Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi	110
5.4.5	Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I	111
5.4.6	Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III	111
5.4.7	Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV	112
5.5	Hasil Analisis Uji Korelasi Antara Konsentrasi IL-4, IFN- γ , Dan TNF- α Dalam Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA	112
BAB 6	PEMBAHASAN	114
6.1	Pola Respons Imun Sekunder IgG Anti-MMA Pada Kelinci Lokal (<i>Oryctolagus Cuniculus</i>), Yang Diimunisasi Dengan MMA	114
6.2	MMA Bersifat Imunogenik Pada Penderita Terpapar MMA, Sehingga Dapat Menginduksi Respons Imun Humoral IgG Anti-MMA	120

6.3	Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Tidak Terjadi Melalui Reaksi Iritasi	121
6.4	Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Tidak Terjadi Melalui Reaksi Hipersensitivitas Tipe I	125
6.5	Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Terjadi Melalui Reaksi Hipersensitivitas Tipe II Dan / Atau Tipe III	129
6.6	Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Terjadi Melalui Reaksi Hipersensitivitas Tipe IV	138
6.7	Terdapat Korelasi Antara Konsentrasi IL-4, IFN- γ , Dan TNF- α Dalam Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA	141
BAB 7	PENUTUP	148
7.1	Kesimpulan	148
7.2	Saran	149
	DAFTAR PUSTAKA	151
	LAMPIRAN	163

DAFTAR TABEL

		halaman
Tabel 4.1	Variasi dosis imunisasi MMA pada kelinci lokal	66
Tabel 4.2	Jadwal imunisasi kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	66
Tabel 5.1	Nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA penderita terpapar MMA	95
Tabel 5.2	Nilai absorbansi IgE spesifik penderita terpapar MMA	96
Tabel 5.3	Konsentrasi IL-4 (pg/ml) dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA	98
Tabel 5.4	Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	99
Tabel 5.5	Konsentrasi IFN- γ (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	101
Tabel 5.6	Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	103
Tabel 5.7	Konsentrasi TNF- α (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	104
Tabel 5.8	Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	106
Tabel 5.9	Hasil uji normalitas data dengan uji Kolmogorov Smirnov	108
Tabel 5.10	Hasil uji t bebas untuk variabel IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol	109
Tabel 5.11	Hasil uji t bebas untuk variabel IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol	109
Tabel 5.12	Hasil uji t bebas untuk variabel TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol	110
Tabel 5.13	Hasil uji korelasi Pearson konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA	112

Tabel L 1	Nilai absorbansi IgG anti-MMA kelinci lokal pada 405 nm	169
Tabel L 2	Nilai absorbansi hasil <i>checker board</i> IgG anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA	172
Tabel L 3	Nilai absorbansi IgG anti-MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol	173
Tabel L 4	Nilai absorbansi hasil <i>checker board</i> IgE anti-MMA	176
Tabel L 5	Nilai absorbansi IgE anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA dan kontrol	177
Tabel L 6	Nilai absorbansi kurva standar IL-4	182
Tabel L 7	Nilai absorbansi kurva standar IFN- γ	184
Tabel L 8	Nilai absorbansi kurva standar TNF- α	185
Tabel L 9	Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 plasma penderita terpapar MMA pada 450 nm	192
Tabel L 10	Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 plasma penderita kontrol pada 450 nm	192
Tabel L 11	Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ plasma penderita terpapar MMA pada 450 nm	193
Tabel L 12	Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ plasma penderita kontrol pada 450 nm	193
Tabel L 13	Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α plasma penderita terpapar MMA pada 450 nm	194
Tabel L 14	Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α plasma penderita kontrol pada 450 nm	194
Tabel L 15	Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA pada 450 nm	195
Tabel L 16	Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut penderita kontrol MMA pada 450 nm	195
Tabel L 17	Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA pada 450 nm	196
Tabel L 18	Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut penderita kontrol pada 450 nm	196
Tabel L 19	Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA pada 450 nm	197
Tabel L 20	Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α jaringan mukosa mulut penderita kontrol pada 450 nm	197

DAFTAR GAMBAR

halaman

Gambar 2.1	Struktur monomer metil metakrilat / MMA	11
Gambar 2.2	Struktur mukosa rongga mulut	15
Gambar 2.3	Signal yang mempengaruhi diferensiasi sel Th	21
Gambar 2.4	(A) Faktor transkripsi yang mempengaruhi diferensiasi <i>Thelper</i> (B) Faktor <i>Tissue-specific</i> yang mengatur diferensiasi CD4+ <i>T helper</i>	22
Gambar 2.5	Faktor transkripsi yang mengontrol diferensiasi sel Th1	25
Gambar 2.6	Pengenalan sel T dan sel B	28
Gambar 2.7	Respons imun primer dan sekunder setelah pemberian imunisasi	29
Gambar 2.8	Reaksi hipersensitivitas tipe I atau reaksi hipersensitivitas tipe cepat	31
Gambar 2.9	Dasar reaksi alergi tipe I yang diawali dengan fase sensitisasi	33
Gambar 2.10	Reaksi hipersensitivitas tipe II	37
Gambar 2.11	Reaksi hipersensitivitas tipe IV	39
Gambar 2.12	Reaksi hipersensitivitas tipe IV	41
Gambar 2.13	Sitokin dalam subset CD4+ Th1 pada reaksi hipersensitivitas IV	47
Gambar 3.1	Kerangka konseptual penelitian	53
Gambar 4.1	Skema rancangan penelitian Tahap I pada hewan coba	55
Gambar 4.2	Skema rancangan penelitian Tahap II	57
Gambar 4.3	Kerangka operasional penelitian Tahap I	82
Gambar 4.4	Kerangka operasional penelitian Tahap II	83
Gambar 5.1	Hasil <i>dot blot</i> IgG anti-MMA pada serum kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) pasca induksi MMA	85
Gambar 5.2	Titer IgG anti-MMA pada kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) dengan teknik ELISA	86
Gambar 5.3	Nilai absorbansi IgG anti-MMA kelinci lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) yang diinduksi MMA	87
Gambar 5.4	Edematus dan hiperemia mukosa mulut disertai <i>burning mouth</i>	89
Gambar 5.5	Edematus dan hiperemia mukosa mulut disertai <i>burning mouth</i>	89
Gambar 5.6	Ulkus disertai hiperemia mukosa mulut	90
Gambar 5.7	Vesikula mukosa mulut disertai rasa <i>burning mouth</i>	90

Gambar 5.8	Mukosa mulut normal	91
Gambar 5.9	A. Gambaran histopatologi hapusan mukosa mulut yang mengalami inflamasi dengan pewarnaan HE B. Gambaran histopatologi hapusan mukosa mulut normal dengan pewarnaan HE	92
Gambar 5.10	Hasil <i>dot blot</i> IgG anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA	93
Gambar 5.11	Nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol	94
Gambar 5.12	Nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol	96
Gambar 5.13	Konsentrasi IL-4 (pg/ml) plasma penderita terpapar MMA dan kontrol	98
Gambar 5.14	Konsentrasi IL-4 (pg/ml) jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	99
Gambar 5.15	Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IL-4 (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	100
Gambar 5.16	Konsentrasi IFN- γ (pg/ml) plasma penderita terpapar MMA dan kontrol	102
Gambar 5.17	Konsentrasi IFN- γ (pg/ml) jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	102
Gambar 5.18	Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IFN- γ (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	103
Gambar 5.19	Konsentrasi TNF- α (pg/ml) plasma penderita terpapar MMA dan kontrol	105
Gambar 5.20	Konsentrasi TNF- α (pg/ml) jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	106
Gambar 5.21	Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi TNF- α (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol	107
Gambar L 1	Titer IgG anti-MMA kelinci lokal dengan teknik ELISA	169
Gambar L 2	Nilai absorbansi IgG anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA	172
Gambar L 3	Nilai absorbansi IgE anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA	176
Gambar L 4	Kurva standar IL-4	182
Gambar L 5	Kurva standar IFN- γ	184
Gambar L 6	Kurva standar TNF- α	185


DAFTAR LAMPIRAN

		halaman
Lampiran 1	Uji Normalitas Data Variabel IL-4, IFN- γ , dan TNF- α	163
Lampiran 2	Analisis Deskriptif Variabel IgE dan IgG spesifik, IL-4, IFN- γ , TNF- α	164
Lampiran 3	Hasil Uji t Bebas IL-4	165
Lampiran 4	Hasil Uji t Bebas IFN- γ	166
Lampiran 5	Hasil Uji t Bebas TNF- α	167
Lampiran 6	Hasil Uji Korelasi Pearson Untuk IL-4, IFN- γ , TNF- α	168
Lampiran 7	Nilai Absorbansi Kelinci Lokal (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) Sebelum dan Sesudah Imunisasi	169
Lampiran 8	<i>Checker Board</i> IgG Anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA	170
Lampiran 9	Nilai Absorbansi IgG Anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol	173
Lampiran 10	<i>Checker Board</i> IgE Anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA	174
Lampiran 11	Nilai Absorbansi IgE Anti-MMA Pada Serum Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol	177
Lampiran 12	Kurva Standar IL-4, IFN- γ , TNF- α Dengan Teknik <i>Direct-sandwich</i> ELISA sesuai Prosedur Dari Kit Brender Med System	178
Lampiran 13	Analisis Konsentrasi IL-4 Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Plasma Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol Dengan Metode <i>Direct-sandwich</i> ELISA	186
Lampiran 14	Analisis Konsentrasi IFN- γ Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Plasma Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol Dengan Metode <i>Direct-sandwich</i> ELISA	188
Lampiran 15	Analisis Konsentrasi TNF- α Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Plasma Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol Dengan Metode <i>Direct-sandwich</i> ELISA	190
Lampiran 16	Nilai Absorbansi dan Konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α Dengan Teknik <i>Direct-sandwich</i> ELISA Sesuai Prosedur Dari Kit Brender Med System	192
Lampiran 17	Komposisi Bahan	198
Lampiran 18	Sertifikat Kelaikan Etik Penelitian	199

DAFTAR SINGKATAN

ACD	<i>Allergic Contact Dermatitis</i>
ADCC	<i>Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CGG	<i>Chicken γ-globulin</i>
CLA	<i>Cutaneous lymphocyte antigen</i>
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
CMH	<i>Cell-mediated Hypersensitivity</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DAG	<i>Diasilgliserol</i>
DTH	<i>Delayed-type Hypersensitivity</i>
DNCB	<i>Dinitrochlorobenzene</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
ECF	<i>Eosinophil chemotactic factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linkage Immunosorbent Assay</i>
GAS	<i>Gamma-Interferon Activation Site</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
HE	<i>Hemaktosin Eosin</i>
HLA	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
ICAM	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule</i>
IFA	<i>Incomplete Freund' s Adjuvant</i>
IFN	<i>Interferon</i>
Ig	<i>Immunoglobulin</i>
IL	<i>Interleukine</i>
IP ₃	<i>Inositoltrifosfat</i>
ISG	<i>Interferon-Stimulated Genes</i>
ISRE	<i>Interferon-Stimulated Response Element</i>
GAS	<i>Gamma-Interferon Activation Site</i>
JAK	<i>Janus kinases</i>
LFA-1	<i>Leukocyte Function-Associated Antigen type-1</i>
LT	<i>Lymphotoxin</i>
LT C4	<i>Leukotren C4</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
LOXs	<i>Lipoxygenases</i>
MAC	<i>Membrane attack complex</i>
M-CSF	<i>Macrofag Colony-Stimulating factor</i>
MHC	<i>Major Hitocompatibility Complex</i>
MIF	<i>Macrophage-inhibition Factor</i>
mIg	<i>Membrane immunoglobulin</i>
MMA	<i>Methyl 2-Methylpropenoate, Methacrylic Acid Methyl Esther Atau Metil Metakrilat</i>
NC	<i>Nitroselulose</i>
NF- κ B	<i>Nuclear factor-κB</i>

xxx



NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMR	<i>Nuclear Resonance Spectroscopy</i>
OVA	<i>ovalbumin</i>
OSM	<i>Onkostatim M</i>
PAF	<i>Platelet Activating Factor</i>
PBS	<i>Phosphat Buffer Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PG D2	<i>Prostaglandin D2</i>
PMN	<i>Polimorfonuklear</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
RAST	<i>Radioallergosorbent Test</i>
RIA	<i>Radioimmunoassay</i>
RIST	<i>Radioimmunosorbent Test</i>
Stat	<i>Signal Transducers And Activators Of Transcription</i>
Sel Tc	<i>Sel T cytotoxic</i>
Sel Th	<i>Sel T helper</i>
Sel NK	<i>Sel Natural Killer</i>
SRS-A	<i>Slow-Reacting and Anaphylaxis</i>
TAC	<i>T-Cell Activation Antigen</i>
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
Tc	<i>T- cytotoxic</i>
TCR	<i>T-Cell Receptor</i>
T _{CM}	<i>Central memory T cells</i>
T _{EM}	<i>Effector memory T Cells</i>
TMB	<i>Tetra Methyl Benzedyne</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRUE Test	<i>Thin-Layer Rapid Use Epicutaneous</i>
TGF	<i>Tumor Growth Factor</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
WBC	<i>Whole Blood Cells</i>

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Monomer metil metakrilat (MMA) merupakan bahan dasar resin akrilik polimetil metakrilat (PMMA) yang digunakan secara luas di bidang kedokteran gigi, terutama untuk pembuatan piranti lepasan ortodonsia, piranti gigi tiruan, dan tumpatan. Beberapa fakta klinik menunjukkan bahwa MMA berpotensi menyebabkan reaksi iritasi dan alergi pada mukosa mulut dengan gejala klinik berupa hiperemia, edema, rasa nyeri, *burning mouth*, bahkan dapat dijumpai adanya ulkus (Van Loon *et al.*, 1992; Anusavice, 1996; Richter dan Gier, 1996; Hochman dan Zalkind, 1997; Rose *et al.*, 2000; Ardani, 2003). Namun imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA sampai saat ini masih belum jelas.

Konsentrasi MMA pada saliva terdeteksi sebanyak 45 $\mu\text{l/ml}$ dan bahkan pada daerah stagnansi saliva konsentrasi MMA meningkat sampai 180 $\mu\text{l/ml}$ (Koda *et al.*, 1990; Tsuchiya *et al.*, 1994). Fakta tersebut menunjukkan bahwa MMA yang merupakan bahan dasar pembuatan lempeng atau piranti resin akrilik PMMA yang tidak berpolimerisasi sempurna, dapat merembes keluar dari lempeng.

Kemampuan penetrasi MMA ke dalam jaringan mukosa dimungkinkan karena struktur kimia MMA yang bersifat lipofilik, sehingga MMA dapat menembus membran pertahanan jaringan mukosa mulut. MMA adalah senyawa ester turunan karboksilat dan mempunyai satu



gugus metil yang memberikan sifat lipofilik (Anusavice, 1996; Yoshii, 1997).

Beberapa penelitian kultur sel menunjukkan bahwa MMA bersifat sitotoksik dan genotoksik pada kultur sel epitel dan fibroblas (Kedjarune *et al.*, 1999; Ardani, 2000; Yang *et al.*, 2003). MMA bila teroksidasi akan mengalami degradasi menjadi formaldehida, yang bersifat iritan (Ruyter, 1995). Berdasarkan fakta tersebut maka MMA dalam konsentrasi tertentu dapat pula berfungsi sebagai iritan di mukosa mulut penderita terpapar MMA. Iritasi pada mukosa mulut akan menyebabkan kerusakan jaringan yang ditandai dengan peningkatan TNF- α . Namun MMA sebagai iritan yang menyebabkan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA masih belum jelas.

Fakta klinik menunjukkan bahwa angka kejadian inflamasi lokal penderita terpapar MMA di Klinik Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga adalah antara 0,5 sampai 1 persen (Ardani, 2003). Penelitian yang dilakukan oleh Santavirta *et al.* (1991) menunjukkan bahwa kultur limfosit yang dipaparkan MMA menginduksi peningkatan ekspresi molekul MHC-kelas II dan reseptor IL-2. Hal ini menunjukkan bahwa limfosit B bertindak sebagai APC yang mampu memproses dan mempresentasikan peptida yang dimodifikasi MMA bersama molekul MHC-kelas II, sehingga terjadi aktivasi limfosit T yang ditandai dengan peningkatan ekspresi reseptor IL-2 (Austyn dan Wood, 1994; Golsby *et al.*, 2000). Hasil penelitian tersebut sesuai dengan penemuan Liu (1999)

yang menyatakan bahwa MMA memodulasi sekresi beberapa sitokin, antara lain $IL-6$, $TNF-\alpha$, dan $IFN-\gamma$ pada kultur limfosit.

Fakta klinik dan hasil penelitian pada kultur sel tersebut di atas memungkinkan MMA juga berpotensi sebagai alergen yang menyebabkan reaksi hipersensitivitas. Namun MMA sebagai alergen yang mampu menginduksi reaksi hipersensitivitas pada penderita terpapar MMA masih belum jelas.

Bila MMA bertindak sebagai alergen, maka MMA bersifat imunogenik sehingga mampu menginduksi respons imun. MMA adalah haptan yang tidak dapat menginduksi respons imun. Untuk dapat bersifat imunogenik, MMA berkonjugasi terlebih dahulu dengan protein pembawa (*carrier*), yang berasal dari dalam atau luar tubuh.

Penelitian pendahuluan pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi dengan MMA menunjukkan bahwa MMA mampu menginduksi respons imun humoral. Produksi antibodi IgG spesifik terhadap MMA dideteksi dengan metode hibridisasi *dot blot*. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa MMA bersifat imunogenik (Ardani, 2003). Namun pola respons imun pada kelinci lokal yang diimunisasi MMA masih belum jelas.

Reaksi hipersensitivitas pada dasarnya adalah reaksi inflamasi (Austyn dan Wood, 1994, Golsby *et al.*, 2000). Ada empat tipe reaksi hipersensitivitas menurut Gell dan Coombs yang dikutip oleh Golsby *et al.* (2000). Pada reaksi hipersensitivitas tipe I, antigen membentuk ikatan silang dengan IgE spesifik yang terikat pada permukaan mastosit dan

basofil, sehingga terjadi pelepasan mediator vasoaktif yang memperantarai terjadinya gejala klinik reaksi hipersensitivitas tipe I. Pembentukan IgE spesifik terhadap antigen dibutuhkan IL-4 yang disekresi oleh sel Th2 aktif (Austyn dan Wood, 1994; Golsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Pada reaksi hipersensitivitas tipe II, antibodi terhadap antigen dipermukaan sel menginduksi kerusakan sel melalui aktivasi komplemen atau *antibody dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Reaksi hipersensitivitas tipe II ini diperantarai oleh IgG spesifik, dimana pembentukan IgG spesifik membutuhkan IFN- γ yang disekresi oleh sel Th1 aktif (Austyn dan Wood, 1994; Golsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Pada reaksi hipersensitivitas tipe III, antibodi berikatan dengan antigen larut (*soluble antigen*) dan membentuk kompleks imun yang selanjutnya akan mengendap di jaringan. Kompleks imun tersebut menginduksi aktivasi komplemen yang menyebabkan proses peradangan. Reaksi hipersensitivitas tipe III ini diperantarai oleh IgG spesifik, dimana untuk produksi IgG spesifik dibutuhkan IFN- γ yang disekresi oleh sel Th1 aktif (Austyn dan Wood, 1994; Golsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Pada reaksi hipersensitivitas tipe IV, antigen akan mensensitisasi sel Th naif untuk berdiferensiasi menjadi sel Th1 aktif. Apabila sel Th1 tersebut bertemu kembali dengan antigen yang sama, maka sel tersebut akan mensekresi IFN- γ yang berfungsi mengaktifkan makrofag. Makrofag aktif akan menghasilkan TNF- α dalam jumlah yang lebih banyak sehingga

terjadi kerusakan jaringan (Goldsby *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Uji tempel pada kulit punggung merupakan upaya untuk mendeteksi MMA sebagai alergen yang menyebabkan reaksi hipersensitivitas tipe lambat (tipe IV). Penderita terpapar MMA yang disertai gejala klinik inflamasi, tidak semua mempunyai hasil uji tempel positif (Van Loon *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1996; Van Joost *et al.*, 1998; Ardani, 2003).

Lingkungan lembab memudahkan haptan menembus epidermis dan menyebabkan sensitisasi. Pada permukaan kulit yang kering tidak terlihat reaksi hipersensitivitas terhadap haptan yang dipaparkan pada kulit (Ahlfors dan Lyberg, 2001). Kondisi ini mengindikasikan bahwa hasil negatif uji tempel di kulit pada penderita terpapar MMA yang menunjukkan gejala klinik, belum dapat dipastikan penderita tersebut tidak mengalami reaksi hipersensitivitas tipe IV. Hal ini dapat disebabkan karena pada uji tempel di punggung tidak terjadi penetrasi MMA pada permukaan kulit yang kering. Dengan demikian perlu dikembangkan metoda diagnostik lain untuk reaksi hipersensitivitas jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Penelitian ini akan mengkaji pola respons imun sekunder terhadap MMA pada kelinci lokal dengan mengikuti pola produksi IgG anti-MMA yang diamati dalam jangka waktu tertentu. Selanjutnya akan dikaji imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA melalui reaksi iritasi dan hipersensitivitas. Penelitian ini dilakukan

dengan mendeteksi konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut, serta IgE dan IgG spesifik terhadap MMA dalam serum, yang berperan dalam imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut. Hal ini disebabkan respons imun lokal pada jaringan mukosa mulut tidak dapat dipisahkan dengan respons imun sistemik.

Aktivasi limfosit naif terjadi pada lingkungan mikro khusus di dalam jaringan limfoid sekunder seperti misalnya kelenjar getah bening. Limfosit aktif berdiferensiasi menjadi sel efektor dan sel memori. Sel efektor cenderung untuk *homing* pada daerah yang mengalami peradangan, sedangkan sel memori *homing* secara selektif pada tempat di mana pertama kali bertemu antigen. Sel efektor dan sel memori mengekspresi molekul adesi *Leukocyte Function-Associated Antigen type-1* (LFA-1) dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga mampu berinteraksi dengan ligan yang terdapat pada jaringan ekstralimfoid tersier (misalnya, di kulit dan mukosa) dan jaringan yang mengalami peradangan (Goldsby *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993). Dengan demikian respons imun sistemik tidak dapat dipisahkan respons imun lokal.

Sampai saat ini belum ditemukan metoda diagnostik untuk reaksi iritasi dan hipersensitivitas pada mukosa mulut penderita terpapar MMA. Diduga terdapat korelasi antara profil mediator yang memperantarai respons imun sistemik dan respons imun lokal pada jaringan mukosa mulut. Dalam penelitian ini akan dibuktikan terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hasil penelitian ini diharapkan dapat

dikembangkan sebagai metoda diagnostik yang mudah untuk reaksi iritasi dan hipersensitivitas pada penderita terpapar MMA, melalui deteksi konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam serum. Hal ini akan memudahkan para klinisi untuk melakukan diagnostik reaksi iritasi dan hipersensitivitas penderita terpapar MMA melalui pemeriksaan darah perifer.

1.2 Rumusan Masalah

Ditinjau dari latar belakang masalah di atas, maka sebagai rumusan masalah adalah :

1. Bagaimanakah pola respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi dengan MMA ?
2. Apakah MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral IgG anti-MMA ?
3. Apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi iritasi, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ ?
4. Apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I, yang ditunjukkan dengan peningkatan IL-4 dan hasil positif IgE spesifik terhadap MMA ?
5. Apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, yang ditunjukkan dengan peningkatan IFN- γ dan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA ?

6. Apakah kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α dan IFN- γ ?
7. Apakah terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan umum

Mengungkap imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

1.3.2 Tujuan khusus

Untuk dapat menjawab tujuan umum di atas, perlu dijabarkan secara rinci dengan beberapa tujuan khusus :

1. Mengkaji pola respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi dengan MMA.
2. Membuktikan MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral IgG anti-MMA.
3. Membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi iritasi, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ .
4. Membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I, yang ditunjukkan dengan peningkatan IL-4 dan hasil positif IgE spesifik terhadap MMA.

5. Membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, yang ditunjukkan dengan peningkatan $\text{IFN-}\gamma$ dan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA.
6. Membuktikan kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, yang ditunjukkan dengan peningkatan $\text{TNF-}\alpha$ dan $\text{IFN-}\gamma$.
7. Membuktikan terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, $\text{IFN-}\gamma$, dan $\text{TNF-}\alpha$ dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat ilmiah

Penelitian ini diharapkan mempunyai manfaat ilmiah sebagai berikut :

1. Dihasilkan informasi ilmiah tentang reaksi iritasi dan hipersensitivitas kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.
2. Dihasilkan informasi ilmiah yang menyatakan bahwa profil sitokin IL-4, $\text{IFN-}\gamma$ dan $\text{TNF-}\alpha$ jaringan mukosa mulut, berkorelasi dengan profil sitokin tersebut dalam plasma penderita terpapar MMA.

1.4.2 Manfaat aplikatif

Penelitian ini juga diharapkan mempunyai manfaat aplikatif sebagai berikut .

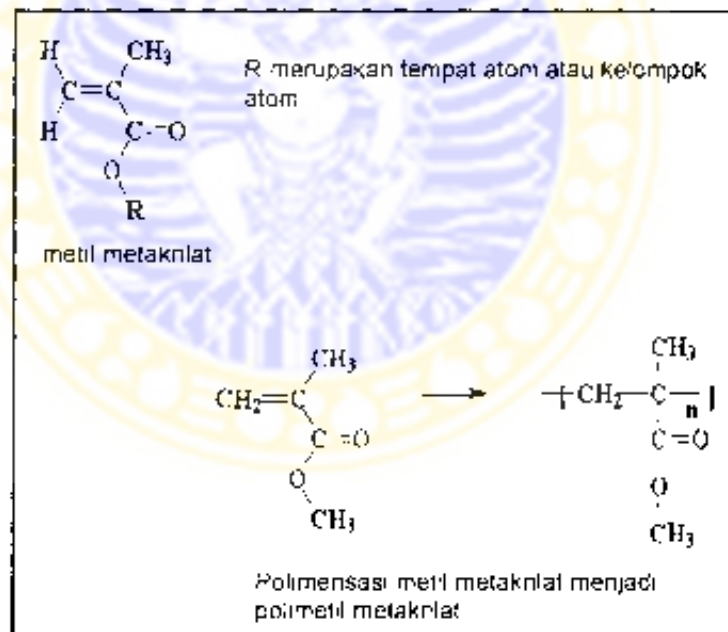
1. Hasil penelitian ini menjadi alasan mendasar agar dicoba dikembangkan bahan baru yang bersifat hipoalergenik sebagai bahan alternatif untuk pembuatan piranti dalam kedokteran gigi.
- 2 Hasil penelitian ini dapat dikembangkan sebagai cara diagnostik sederhana untuk reaksi intasi dan hipersensitivitas jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA, melalui pemeriksaan darah perifer tanpa kerokan jaringan mukosa mulut.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur dan Sifat Kimia Monomer Metil Metakrilat (MMA)

Metil metakrilat mempunyai nama lain *methyl 2-methylpropenoate*, *methacrylic acid methyl ester* atau *methyl methacrylate*, mempunyai rumus kimia $\{H_2C=C(CH_3)COOCH_3\}$, dan merupakan senyawa ester turunan senyawa karboksilat (asam metakrilat) yang mempunyai ikatan rangkap (Gambar 2.1). MMA berpotensi menjadi formaldehida apabila teroksidasi dengan oksigen dan dapat berubah menjadi asam metakrilat apabila terhidrolisis dalam kondisi tertentu seperti dalam keadaan asam atau di dalam air (Anusavice, 1996; Combe, 1992).



Gambar 2.1 : Struktur monomer metil metakrilat/MMA (Combe, 1992)

Beberapa sifat kimia yang dimiliki monomer MMA antara lain adalah mempunyai berat jenis 940 g/l, kelarutan dalam air pada suhu 20^o C sebesar 11,5 g/l, dapat menyebabkan sensitisasi, dan bersifat iritan (Anusavice, 1996; Combe, 1992).

2.2 Pelepasan MMA Ke Dalam Saliva

Secara umum, MMA tidak pernah terpolimerisasi secara sempurna menjadi resin akrilik polimetil metakrilat (PMMA) baik pada *cold-cured* maupun *heat-cured*. Monomer yang tidak ikut terpolimerisasi terjebak dan berada di dalam PMMA (Anusavice, 1996). Difusi dari MMA yang tidak terpolimerisasi merupakan faktor penting yang dapat menyebabkan iritasi atau alergi pada jaringan mulut (Baker *et al.*, 1988; Koda *et al.*, 1990; Annusavice, 1996).

Hasil kajian Lefebvre *et al.* (1992) tentang waktu dan pola pelepasan zat-zat sitotoksik dan beberapa jenis resin menunjukkan bahwa pelepasan komponen resin sitotoksik dapat berlangsung selama beberapa hari. Komponen sitotoksik yang terlepas dapat tersebar dalam saliva sehingga mampu mempengaruhi jaringan sekitarnya.

Pelepasan MMA ke dalam saliva lebih kurang sebesar 45 µg/ml dan bahkan pada tempat tertentu dimana aliran saliva stabil (daerah palatum) terdeteksi sampai 180 µg/ml (Tsuchiya *et al.*, 1994). Monomer sisa MMA masih dapat terdeteksi dalam resin akrilik, walaupun lempeng gigi tiruan sudah dipakai selama 5 tahun.



Koda *et al* (1990) membuktikan bahwa pelepasan MMA dipengaruhi oleh pH. Pelepasan MMA ke dalam saliva buatan pada pH 4,0 meningkat 1,5 kali lipat dari pada pH netral 6,8. Dijelaskan lebih lanjut, bila lempeng resin akrilik PMMA dimasukkan ke dalam saliva buatan dengan pH 6,8 selama 10 hari, konsentrasi MMA yang terlepas dalam saliva terdeteksi 10 kali lipat (Sadamori *et al.*, 1992).

2.3 Struktur Mukosa Rongga Mulut

Jaringan mukosa mulut terdiri dari dua jenis sel epitel (Bickel *et al.*, 1996; Zehnder *et al.*, 1999; Presland dan Juravic, 2002) :

1. *Masticatory epithelium.*

Masticatory epithelium adalah *keratinized stratified squamous epithelium* yang menutupi berbagai organ rongga mulut, yaitu lidah, gingiva, dan palatum keras. Epitel tersebut berfungsi dalam proses pengunyahan. Epitel ini mengalami keratinisasi dengan derajat yang berbeda tergantung pada kekuatan fisik yang diterima organ tersebut.

2. *Lining epithelium.*

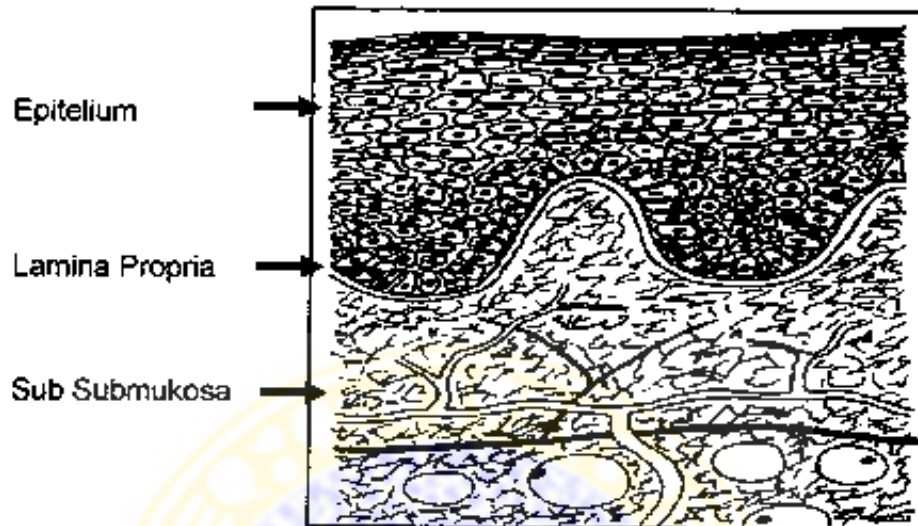
Lining epithelium adalah *non-keratinized stratified squamous epithelium* yang menutupi permukaan mukosa rongga mulut selain *masticatory epithelium*.

Lapisan terluar struktur mukosa rongga mulut terdiri dari *stratified squamous epithelium*. Lapisan dibawahnya adalah lamina propria dan

diikuti oleh submukosa yang merupakan bagian paling dalam (Gambar 2.2). Epitel mukosa bukal mempunyai lapisan sel lebih kurang 40-50 sel. Ketebalan mukosa rongga mulut bervariasi tergantung pada lokasi, misalnya mukosa bukal mempunyai ketebalan 500-800 μm , sedangkan ketebalan mukosa *hard palate* dan *soft palate*, dasar rongga mulut, ventral lidah, dan gingiva lebih kurang 100-200 μm . Komposisi epitel juga bervariasi tergantung pada lokasi di dalam rongga mulut. Epitel gingiva dan palatum keras adalah epitel mukosa yang mengalami keratinisasi mirip dengan epidermis, sedangkan palatum lunak, sublingual, dan regio bukal adalah epitel mukosa yang tidak mengalami keratinisasi. Epitel yang mengalami keratinisasi mengandung lemak netral seperti seramid dan asilseramid. Kondisi ini berhubungan dengan fungsi pertahanan dan sifat yang relatif tidak permeabel terhadap air. Permeabilitas epitel mukosa mulut di antara permeabilitas epidermis dan mukosa usus. Permeabilitas mukosa bukal diperkirakan 4 - 4000 kali permeabilitas kulit (Sjojae, 1998). Epitel yang tidak mengalami keratinisasi mengandung lemak netral yang bersifat polar, terutama kolesterol sulfat dan glikosil seramid. Kondisi ini menyebabkan sifat yang lebih permeabel dibandingkan dengan epitel yang mengalami keratinisasi (Paulsen, 1993; Sjojae, 1998; Presland dan Juravic, 2002).

Lamina propria adalah selapis tipis protein yang saling berikatan dengan kolagen tipe IV. Di atas lapisan ini, sel epitel melekat secara hemidesmosom. Semua sel epitel, baik itu sel yang berbentuk kuboid sederhana maupun *stratified squamous epithelia* pada mukosa mulut,

melekat pada lamina propria (Fawcett, 1994; Sjojaei, 1998; Presland dan Juravic, 2002).



Gambar 2.2 Struktur mukosa rongga mulut (Sjojaei, 1998)

Elemen-elemen penting lainnya di dalam jaringan mukosa mulut antara lain : 1. pembuluh kapiler; 2. akson syaraf; 3. melanosit; 4. sel asesori tipe sel glia yang menghubungkan antar reseptor sel epitel; 5. sel epitel atau keratinosit, yang mengekspresikan protein struktural, keratin, filament; 6. limfosit; 7. sel Langerhans; 8. *globular leucocytes* (Fawcett, 1994; Sjojaei, 1998; Presland dan Juravic, 2002).

2.4 Penetrasi MMA Ke Dalam Jaringan Mukosa Mulut

MMA bersifat lipofilik (non-polar), sehingga dimungkinkan MMA menembus ke dalam sel melalui membran lapis ganda lemak. Sifat lipofilik suatu bahan berlawanan dengan sifat hidrofilik. Dijelaskan lebih lanjut bahwa sifat hidrofobik yang dimiliki oleh MMA didapat dari gugus metilnya (Yoshii, 1997).

MMA yang larut dalam lemak menginduksi transisi dan rantai lemak asil pada *organized gel* menjadi *randomized liquid crystalline phase*. Studi *Differential Scanning Calorimetry* (DSC) dan *Nuclear Resonance Spectroscopy* (NMR) yang meneliti tentang interaksi antara liposom dan MMA. Penelitian ini bertujuan untuk mengklarifikasi sifat dan derajat interaksi antara liposom dan monomer, dan mempelajari mekanisme aktifitas biologis tersebut. Interaksi antara MMA dan liposom diinduksi oleh migrasi MMA secara langsung melewati lapisan lemak dengan kekuatan penggerak dari sifat hidrofobik MMA, sehingga terjadi inkorporasi MMA pada membran lemak lapis ganda (Fujisawa *et al.*, 2000). Penemuan tersebut menunjukkan bahwa MMA dapat merembes masuk ke dalam membran sel hidup dan berpotensi menginduksi terjadinya inflamasi atau alergi.

Molekul kecil larut lemak menginduksi perubahan di dalam lapisan ganda lemak dari sel hidup, sehingga menyebabkan ikatan dengan protein membran dan menyebabkan *cell injury* (jejas) (Jaruga *et al.*, 1998; Fujisawa *et al.*, 2000).

2.5 Respons Imun

Sistem imun ialah semua mekanisme yang digunakan untuk pertahanan tubuh sebagai perlindungan terhadap bahaya yang dapat ditimbulkan oleh berbagai bahan dalam lingkungan hidup. Pertahanan tersebut terdiri atas sistem imun alamiah atau nonspesifik (*natural / innate immunity*) dan didapat atau spesifik (*adaptive/acquired immunity*) (Roitt *et al.* 1993; Tizzard. 1995; Goldsby *et al.* 2000).

Sistem imun nonspesifik merupakan pertahanan tubuh terdepan dalam menghadapi serangan berbagai mikroorganisme, oleh karena dapat memberikan respon langsung terhadap antigen. Sistem tersebut disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroorganisme tertentu, tetapi ditujukan kepada semua mikroorganisme dan telah ada serta siap berfungsi sejak lahir. Sistem ini terdiri dari permukaan tubuh dan berbagai komponen dalam tubuh, antara lain sel mononuklear (monosit dan makrofag) serta sel polimorfonuklear (PMN) atau granulosit. Kedua sel tersebut tergolong fagosit dan berasal dari sel induk hematopoietik (Tizard, 1995; Goldsby *et al.*, 2000).

Sistem imun spesifik akan mengenali benda asing yang pertama kali muncul dalam tubuh, sehingga terjadi sensitisasi berbagai sel sistem imun tersebut. Bila sistem imun tersebut bertemu kembali dengan benda asing yang sama, maka benda asing tersebut akan dimusnahkan (Roitt *et al.*, 1993; Tizard, 1995). Sistem imun spesifik hanya dapat menghancurkan benda asing yang sudah dikenal sebelumnya. Sistem imun spesifik dapat bekerja tanpa bantuan sistem imun nonspesifik untuk menghancurkan benda asing yang berbahaya bagi tubuh, tetapi pada umumnya terjalin kerjasama yang baik antara limfosit dan fagosit. Antigen yang ditangkap dan diproses *Antigen Presenting Cells* (APC) dipresentasikan kepada limfosit T. APC tersebut memproduksi dan melepas sitokin seperti IL-1 yang merangsang sel T untuk berproliferasi dan berdiferensiasi. Sel T tersebut juga memproduksi sitokin tertentu, antara lain IL 2 (Roitt *et al.*, 1993, Tizard, 1995, Goldsby *et al.*, 2000).

pengaruh TCR *lineage commitment*, mungkin dengan mengontrol durasi dan kekuatan influks Ca^{2+} (Sloan-Lancaster *et al.*, 1997). Molekul kostimulator CD28 dan B7 berfungsi dalam aktivasi sel Th. Keadaan ini didukung oleh penelitian pada CD28 dan B7 *knockout mice* yang menunjukkan respons imun berkurang secara signifikan dengan gangguan respons imun yang melibatkan sel Th2 (Tizzard, 1995). Reseptor kostimulasi ketiga yaitu ICOS, secara fungsional berhubungan dengan CD28 dan ligand B7-H1, diperkirakan sebelumnya menstimulasi diferensiasi sel Th2. Diferensiasi sel Th2 lebih banyak disebabkan oleh CD28 *dependent Oxy signaling* (Akiba *et al.*, 2000). Sebaliknya, interaksi LFA-1/ILAM-1 menekan perkembangan sel Th2. Hal ini telah dibuktikan dalam penelitian yang menunjukkan bahwa *bloking* interaksi ini menghasilkan produksi yang berlebihan dari sel Th1 (Salomon dan Bluestone, 1998).

2.5.2 Sel yang berfungsi dalam presentasi antigen

Semua sel yang mengekspresi molekul MHC-kelas I atau kelas II dapat mempresentasikan peptida kepada sel T, sehingga dapat disebut sebagai APC. Sel yang mempresentasikan peptida bersama-sama dengan molekul MHC-kelas I kepada sel T CD8⁺ disebut sebagai sel target, sedangkan sel yang mempresentasikan peptida bersama-sama dengan molekul MHC-kelas II kepada sel T CD4⁺ disebut sebagai APC (Roitt *et al.*, 1993; Abbas *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000)

Berbagai macam sel dapat berfungsi sebagai APC. Hal yang membedakan sel-sel tersebut adalah kemampuan mereka untuk mengekspresi molekul MHC kelas-II dan memberikan signal kostimulasi. Beberapa jenis sel digolongkan sebagai APC professional yaitu (Hilkens *et al.*, 1997; Krasteva *et al.*, 1998; Germain 1999; Soeparto dan Sudarmo, 2003; Effendy *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000) :

1. Sel dendritik.

Sel dendritik adalah APC yang paling efektif, karena sel tersebut secara terus menerus mengekspresikan molekul MHC-kelas II dalam jumlah besar dan memiliki aktivitas kostimulator sehingga dapat mengaktifkan sel T naif.

2. Makrofag.

Sel ini harus diaktifkan melalui fagositosis mikroorganisme sebelum mengekspresi molekul MHC-kelas II atau molekul kostimulator B7 pada membran.

3. Sel B.

Sel B mengekspresi molekul MHC-kelas II secara terus menerus, tetapi harus diaktifkan terlebih dahulu sebelum mengekspresi molekul kostimulator B7.

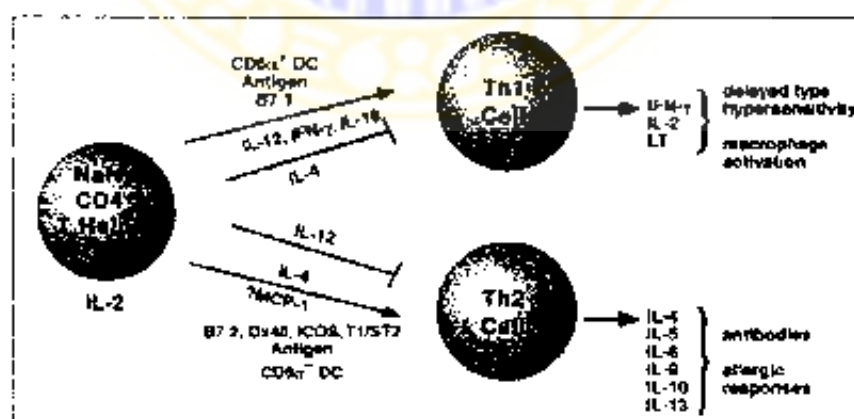
Jenis sel lain yang digolongkan sebagai APC nonprofesional, dapat diinduksi untuk mengekspresikan molekul MHC-kelas II atau suatu signal kostimulasi. Banyak dari sel tersebut berfungsi mempresentasikan antigen hanya untuk waktu yang singkat, yaitu selama respons peradangan dipertahankan (Krasteva *et al.*, 1998; Goldsby *et al.*, 2000).

Hampir semua sel berinti mengekspresikan molekul MHC-kelas 1, sehingga hampir semua sel berinti dapat berfungsi sebagai sel target yang mempresentasikan antigen endogenous kepada sel T sitotoksik (sel Tc) (Roitt *et al.*, 1993; Janeway *et al.*, 1997; Goldsby *et al.*, 2000).

2.5.3 Perkembangan sel Th1 dan Th2

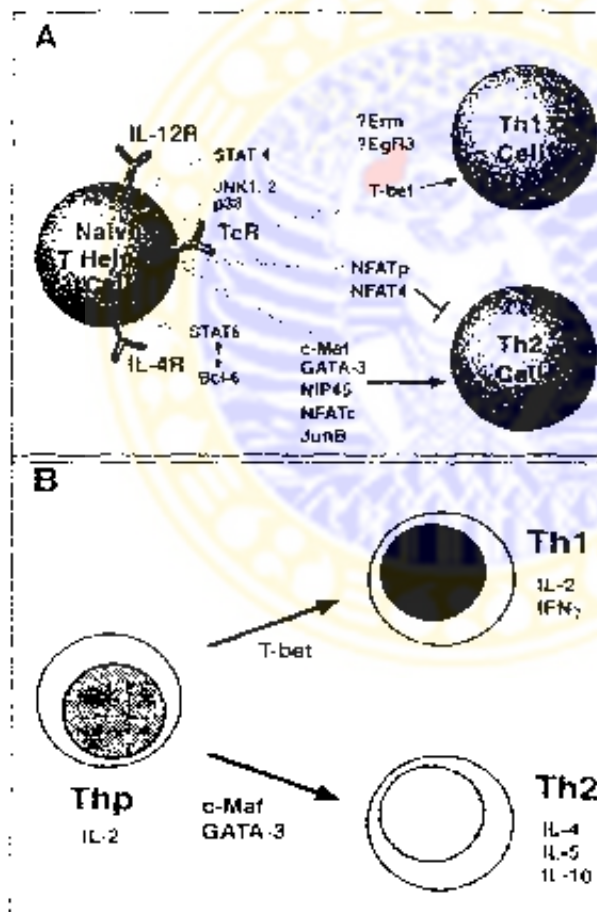
Limfosit T maupun B mendasari pola respons imun yang kompleks. Limfosit T dan B berkembang mulai dari sel prekursor nonfungsional, dan berdiferensiasi menjadi sel efektor.

Pada dekade terdahulu, Mosman dan Coffman (1989) yang dikutip oleh Glimcher dan Murphy (2000), menemukan bahwa limfosit CD4⁺ Th naif mencit, bila menerima stimulus antigenik akan berdiferensiasi menjadi 2 subset yang berbeda. Hal ini ditentukan berdasarkan fungsi dan profil sitokin yang unik untuk masing-masing subset (Gambar 2.3). Subset sel Th1 dan Th2 bertanggung jawab untuk imunitas seluler dan respons imun humoral (O'Garra, 1998; Glimcher dan Murphy, 2000; Farrar *et al.*, 2002).



Gambar 2.3 Signal yang mempengaruhi diferensiasi sel Th (Glimcher dan Murphy, 2000)

Sitokin adalah polipeptida kecil yang mirip hormon, mempunyai aktivitas pleotropik pada berbagai macam tipe sel. Sel T tidak mentranskripsi gen sitokin secara terus menerus, tetapi secara cepat diinduksi selama proses aktivasi melalui reseptor sel T (TCR) dan molekul kostimulator (Lenschow *et al* , 1996; Glimcher dan Murphy, 2000; Farrar *et al* 2002). Telah banyak kemajuan yang dicapai untuk identifikasi jalur signaling dan faktor transkripsi, yang mengontrol diferensiasi sel: Th1 dan Th2 seperti pada skema dalam Gambar 2.4.



Gambar 2.4
(A) Faktor transkripsi yang mempengaruhi diferensiasi *Thelper*
(B) Faktor *Tissue-specific* yang mengatur diferensiasi $CD4^+$ *T helper*
 (Glimcher dan Murphy 2000)

Gambar 2.4 menunjukkan bahwa sudah diketahui berbagai signal yang mengatur jalur sel Th dengan lokus khusus pada 3 *subset-specific transcription factors* : T-bet, GATA-3, dan c-Maf, yang bertanggung jawab untuk diferensiasi menjadi sel Th1 dan Th2 (Gambar 2.4).

2.5.4 Sitokin sel, fenotip sel dan fungsi sel

Perbedaan fungsi antara subset sel Th dapat dijelaskan berdasarkan aktivitas sitokin yang dihasilkan oleh setiap subset. Sitokin sel Th1 yang penting adalah IFN- γ dan IL-2. Sitokin tersebut memperantarai respons hipersensitivitas tipe lambat dan aktivasi makrofag. Sitokin yang dihasilkan sel Th2 adalah IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, dan IL-13. Sitokin tersebut mendukung perkembangan sel B dalam memproduksi antibodi yang penting dalam memperantarai respons alergi (Paul dan Seder 1994). Produksi IL-2, IL-4, dan IFN- γ secara simultan dapat diobservasi pada sel Th manusia. Permukaan sel mengekspresi antigen yang unik, dan telah diidentifikasi ekspresi antigen pada permukaan sel Th1 dan Th2. Sel Th1 mengekspresikan reseptor rantai β IFN- γ , reseptor rantai β IL-12, reseptor IL-18. *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) Marker yang diekspresikan oleh sel Th2 adalah IL-1 like molecules. Molekul T1/ST2 adalah marker yang stabil untuk sel Th2 *in vivo* yang mungkin penting dalam menginduksi respons sel Th2. Antibodi terhadap T1/ST2 menekan inflamasi eosinofilik pada saluran nafas dan menekan sitokin sel Th2 secara *in vivo* (Löhning *et al.* 1998).

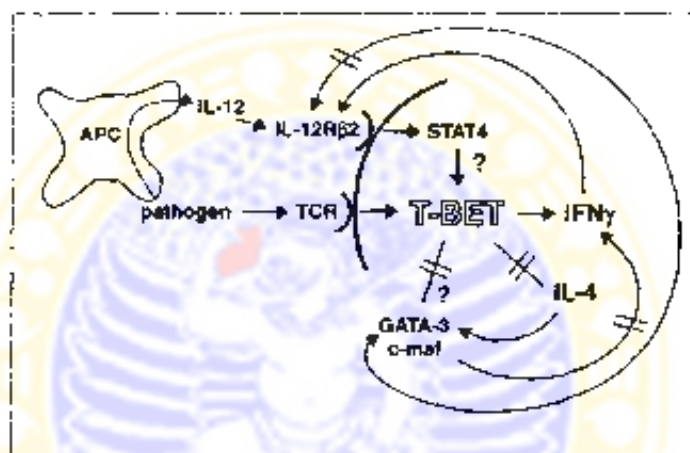
Ekspresi *marker* pada sel efektor Th1 dan Th2 mungkin merupakan konsekuensi dan peran ligan atau lingkungan sitokin. Antigen permukaan selama diferensiasi sel Th1 atau Th2 masih belum diketahui. Cara terbaik untuk membedakan fenotip dua subset ini berdasarkan pada profil sitokin yang unik dengan pewarnaan selular untuk IFN- γ dan IL-4 (Ouyang *et al.*, 2000).

2.5.5 Faktor yang mempengaruhi diferensiasi sel Th menjadi sel Th1 dan Th2

Sel Th CD4⁺ setelah berdiferensiasi dan bermigrasi dari timus ke organ limfoid perifer disebut sel Th naif. Sel Th naif secara fungsional belum matang dan hanya mampu mensekresi IL-2. Sel Th naif yang berdiferensiasi menjadi sel Th1 mengekspresi gen IFN- γ dan yang berdiferensiasi menjadi sel Th2 mengekspresi gen IL-4 (Kamogawa *et al.*, 1993; Abbas *et al.*, 2000). Aktivasi dan diferensiasi di perifer memerlukan paling sedikit dua signal yang terpisah. Signal pertama dikirim oleh TCR/CD3, setelah interaksi dengan antigen/MHC pada APC. Signal kedua dihasilkan oleh molekul kostimulator atau molekul asesori yang berinteraksi dengan reseptor *ligand* yaitu CD28/B7, OX40 dan LFA-1/ICAM. Respons imun yang dibangkitkan akan didominasi oleh sel Th1 atau sel Th2, jelas dipengaruhi oleh keadaan atau kondisi kedua signal tersebut (Abbas *et al.*, 2000; Farrar *et al.*, 2002).

Diferensiasi sel Th diatur oleh sejumlah molekul dari *signal transducer and activator of transcription (Stat) family*. Telah dipelajari kemampuan perkembangan sel Th pada mencit, dengan menghilangkan

Stat 4 dan *Stat 6* pada limfosit. Limfosit yang tidak memiliki *Stat 4* dan *Stat 6*, gagal untuk berdiferensiasi ke arah sel Th2. Meskipun limfosit *Stat 4* dan *Stat 6* *-/-* menghasilkan sedikit IFN- γ pada kultur jaringan, limfosit dapat diaktivasi untuk berdiferensiasi menjadi sel Th1. Limfosit *Stat 4* dan *Stat 6* *-/-* secara *in vivo* pada mencit mampu membentuk sejumlah respons Th1 yang memperantarai respons hipersensitivitas tipe lambat (Coccia *et al.*, 1999 dan Zhang *et al.*, 2000).



Gambar 2.5 Faktor transkripsi yang mengontrol diferensiasi sel Th1 (Glimcher dan Murphy, 2000)

2.5.6 Sitokin

Sitokin memainkan peran penting dalam polarisasi sel Th. Sitokin yang mengendalikan diferensiasi sel Th1 adalah IL-12, sedangkan yang mengendalikan diferensiasi sel Th2 adalah IL-4. Sitokin yang mendorong diferensiasi subset sel Th1 menghambat pembentukan subset sel Th2, dan sebaliknya (Scott, 1991). Kejadian ini adalah tahap yang penting karena sekali terbentuk sel Th1 tidak dapat diubah menjadi sel Th2, dan sebaliknya (Scott 1991). Persyaratan dari kedua sitokin tersebut telah

ditunjukkan oleh mencit yang tidak mempunyai fenotip sitokin, reseptor sitokin atau molekul efektor. IL-12 yang disekresi oleh APC, mengaktifkan jalur signal *Stat 4*. Mencit dengan IL-12 (-) atau *Stat 4* (-) tidak mempunyai sel Th1 (Kaplan *et al.*, 1999). Dua sitokin yang lain yang mempengaruhi perkembangan Th1 adalah IL-18 yang mempunyai reseptor yang berkaitan dengan IL-1 *receptor family* dan IFN- γ (Cerretti *et al.*, 1992). IFN- γ mengaktifkan jalur *Stat 1* (Meraz, 1996). Mencit dengan IL-18 (-) atau *Stat 1* (-) mempunyai gangguan pada respons sel Th1 secara *in vivo*. Tetapi mencit dengan IL-4 (-) dan reseptor IL-4 (+) atau *Stat 6* (-) menunjukkan adanya perkembangan sel Th2 dalam respons terhadap stimuli (Kuhn *et al.*, 1991). Kondisi ini disebabkan oleh fungsi biologis sitokin lain yaitu IL-13, yang dapat berfungsi seperti IL-4. IL-13 mampu mendorong perkembangan sel Th2 dan sintesis IgE dalam kondisi yang tidak tergantung pada IL-4 pada mencit (Farrar *et al.*, 2002).

2.6. Potensi MMA Dalam Menimbulkan Respons Imun

Monomer MMA merupakan haptén. Haptén dapat menimbulkan respons imun, bila terlebih dahulu secara kimiawi berikatan atau berkonjugasi dengan makromolekul pembawa (*carrier*) atau dengan protein tubuh. Contoh protein pembawa adalah protein heterologus seperti *bovine serum albumin* (BSA), *ovalbumin* (OVA), atau *chicken γ -globulin* (CGG), dan eritrosit heterologus (Austyn dan Wood, 1994; Tizard, 1995).

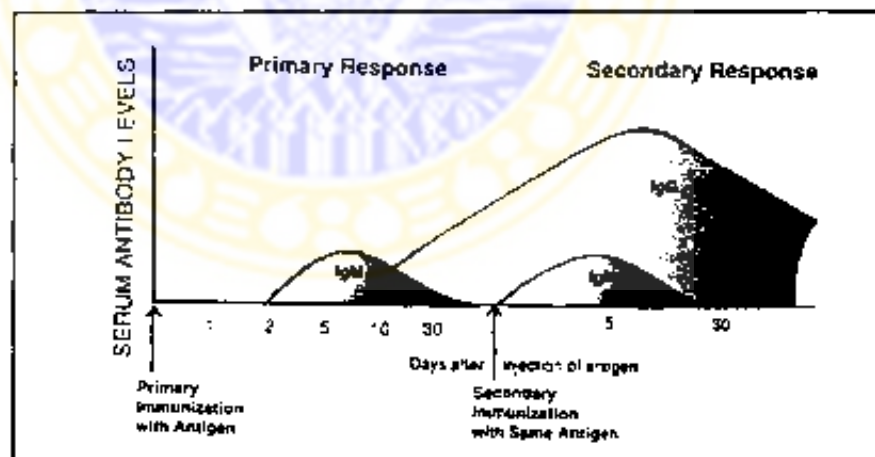
Haptén adalah molekul organik kecil yang bersifat antigenik, tetapi tidak bersifat imunogenik (Golsby *et al.*, 2000). Ikatan kimia antara haptén

dengan protein pembawa (*carrier protein*) membentuk konjugat *hapten-carrier* (*hapten-carrier conjugate*), sehingga mempunyai sifat imunogenik. Senyawa tersebut mampu menginduksi respons imun humoral maupun seluler (Austyn dan Wood, 1994; Krasteva *et al.*, 1998; Golsby *et al.*, 2000).

Antigenesitas adalah kemampuan antigen sederhana untuk berinteraksi spesifik dengan antibodi bebas dan / atau dengan reseptor pada limfosit. Sel B mengenal sisi kecil yang disebut sebagai determinan antigenik atau epitop pada permukaan kompleks imunogen. Faktor yang mempengaruhi imunogenisitas yaitu keasingan, besar molekul, dan komposisi kimia serta kompleksitas dan kepekaan terhadap pemrosesan dan presentasi antigen oleh APC. Sel imun tidak akan berinteraksi atau mengenali seluruh molekul imunogen, tetapi limfosit mengenal sisi yang mempunyai ciri tersendiri pada makromolekul yang disebut determinan antigenik (Roitt *et al.*, 1993; Golsby *et al.*, 2000).

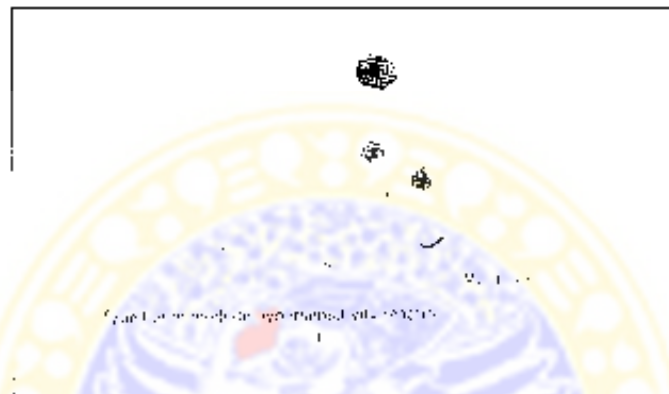
Respons imun yang terinduksi oleh hapten bersama-sama protein pembawa dikenal sebagai *hapten-carrier responses* (Austyn dan Wood, 1994). Pada kasus respons *hapten-carrier*, dapat diprediksi bahwa APC mengenal kompleks *hapten-carrier* melalui hapten (Krasteva *et al.*, 1998). Proses selanjutnya, kompleks *hapten-carrier* di dalam APC mengalami pemrosesan dan menghasilkan derivat peptida dari *carrier* yang dapat berikatan dengan molekul MHC, untuk kemudian dipresentasikan kepada sel T (Austyn dan Wood, 1994; Krasteva *et al.*, 1998).

Teori imunisasi (Clancy, 1998) menyatakan bahwa pemberian antigen pada imunisasi pertama akan menginduksi respons antibodi yang dapat diukur dalam serum setelah *lag period* sekitar 6 sampai 12 hari (Gambar 2.7). Isotipe antibodi yang dihasilkan selama respons primer pada umumnya adalah IgM, kemudian antibodi yang dihasilkan menurun segera setelah mencapai puncak, dan terjadi pembentukan sel B memori. Pemberian antigen yang sama untuk ke dua kalinya pada *booster* akan menginduksi respons antibodi dalam serum yang dapat diukur dalam beberapa hari setelah paparan antigen tersebut. Isotipe antibodi yang diproduksi terutama adalah IgG. Antibodi dalam serum dipertahankan dalam waktu yang lama yaitu dari beberapa minggu sampai beberapa bulan setelah paparan antigen, serta mempunyai afinitas yang sangat tinggi (Austyn dan Wood, 1994; Tizard *et al.*, 1995; Clancy, 1998; Parslow *et al.*, 2002).



Gambar 2.7 Respons imun primer dan sekunder setelah pemberian imunisasi (Clancy, 1998)

parah, syok anafilaktik dapat terjadi apabila penyebaran aktivasi mastosit secara luas menyebabkan vasodilatasi dan penurunan tekanan darah, konstriksi jalan nafas, pembengkakan epiglottis, dan mati lemas. Seringkali, ekspresi reaksi hipersensitivitas tipe I terjadi terlokalisasi pada kulit (*hives* atau vesikula dan eksema) (Arshad, 2002; Kraneveld *et al.*, 2001; Goldsby *et al.*, 2000).



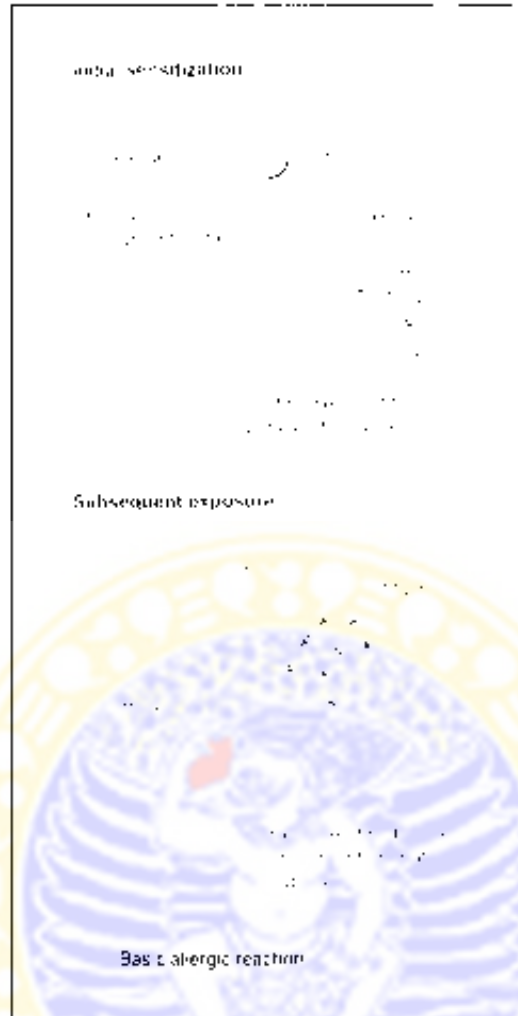
Gambar 2.8 Reaksi Hipersensitivitas tipe 1 atau reaksi hipersensitivitas tipe cepat (Arshad, 2002)

Keterangan : Degranulasi mastosit terjadi karena ikatan silang dua antibodi IgE pada permukaan sel oleh alergen

Tahapan terjadinya reaksi alergi yang diperantarai IgE terjadi melalui fase sensitisasi dan fase aktivasi mastosit. Sensitisasi adalah pertemuan awal alergen dengan sistem imun yang menyebabkan produksi IgE. Banyak alergen dapat mendorong pelepasan IL-4 oleh sel organ non-limfoid seperti mastosit dan basofil. IL-4 lebih mengarahkan perkembangan sel Th menjadi sel Th2. Subset sel Th2 menyediakan sitokin IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, serta IL13 yang dibutuhkan untuk sintesis IgE. Produksi IgE dapat menekan pembentukan IFN- γ yang dihasilkan oleh sel Th1 (Arshad, 2002; Whoolhiser *et al.*, 2001; Kay, 2001; Goldsby *et al.*, 2000).

Aktivasi mastosit terjadi dengan cara pengikatan IgE pada permukaan mastosit melalui reseptor Fc. Ikatan tersebut dapat bertahan sampai beberapa bulan. Bila terjadi kembali paparan alergen, maka alergen akan mengadakan ikatan silang dengan IgE pada permukaan mastosit atau basofil yang telah mengalami sensitisasi. Pada saat itu Ca^{2+} akan masuk ke dalam sel, dan mastosit terinduksi untuk mengalami degranulasi dan melepaskan beberapa mediator utama, antara lain histamin, heparin, leukotrin, tromboksan, prostaglandin, dan sitokin. Degranulasi mastosit tidak hanya terjadi melalui ikatan silang IgE tetapi juga dapat melalui IgG1 (Arshad, 2002; Whoolhiser *et al.*, 2001; Kay, 2001; Goldsby *et al.*, 2000)

Pada reaksi hipersensitivitas tipe I disamping terjadi aktivasi mastosit oleh IgE, dapat juga terjadi melalui aktivasi eosinofil. Eosinofil adalah tipe sel yang banyak dijumpai pada infiltrasi sel radang selama respons hipersensitivitas tipe I fase lambat. Pengumpulan eosinofil terjadi karena aktivitas faktor kemotaktik eosinofil (*eosinophil chemotactic factor / ECF*) yang dikeluarkan oleh mastosit selama reaksi awal. Berbagai macam sitokin yang dilepaskan di tempat tersebut, termasuk IL-3, IL-5, dan GM-CSF berperan dalam pertumbuhan dan diferensiasi eosinofil. Eosinofil mengekspresi reseptor Fc untuk IgG dan IgE yang dapat berikatan dengan alergen. Ikatan silang antibodi pada permukaan eosinofil oleh alergen akan menyebabkan degranulasi dan pelepasan mediator inflamasi termasuk *platelet activating factor (PAF)* dan leukotrin (Koueilova *et al.*, 2004; Arshad, 2002; Kraneveld *et al.*, 2002; Rothenberg, 1998).



Gambar 2.9 Dasar reaksi alergi tipe I yang diawali dengan fase sensitisasi (Arshad, 2002)

Meskipun eosinofil menyebabkan kerusakan jaringan, eosinofil juga penting untuk menghentikan reaksi inflamasi. Eosinofil mensekresi faktor yang merusak produk inflamasi mastosit seperti histaminase yang mendegradasi histamin, dan oksigen radikal yang merusak *slow-reactive substance of anaphylaxis* (SRS-A) (Rothenberg, 1998; Goldsby *et al.*, 2000; Malaviya dan Uckun, 2002).

Reaksi inflamasi juga diredam oleh mekanisme umpan balik negatif, dimana histamin yang dihasilkan oleh mastosit berikatan dengan reseptor histamin pada mastosit yang ada disekitarnya, sehingga terjadi hambatan proses degranulasi.

Faktor yang berperan di dalam reaksi hipersensitivitas tipe I (Parslow *et al.*, 2001; Leung, 1996; Roitt *et al.*, 1993) :

a. Peningkatan serum IgE total.

Serum IgE total dapat diukur dengan *radioimmunosorbent test* (RIST).

b. Genotip HLA.

Penderita alergi cenderung memproduksi antibodi IgE terhadap satu atau beberapa antigen. Kondisi ini menunjukkan terdapat hubungan antara produksi IgE terhadap alergen yang diberikan dan genotip pada HLA-DR.

c. Penyimpangan respons imun.

Penyimpangan respons imun sel Th1 akan menginduksi ke arah respons sel Th2 yang memperantarai reaksi hipersensitivitas tipe I.

d. Polutan lingkungan.

Polutan lingkungan antara lain adalah sulfur dioksida, nitrogen oksida, debu disel (*diesel exhaust particulates / DEP*), dan asap. Polutan tersebut dapat meningkatkan permeabilitas mukosa dan meningkatkan masuknya alergen, sehingga meningkatkan respons pembentukan antibodi. DEP dapat bertindak sebagai adjuvan yang kuat untuk produksi IgE.

Uji klinik yang dilakukan untuk mengetahui respons hipersensitivitas tipe I antara lain adalah (Arshad 2002; Parslow *et al.*, 2001; Leung, 1996; Roitt *et al.*, 1993) :

a. *Skin prick test.*

Alergen dimasukan intradermal. Bila penderita alergi (hipersensitivitas tipe I) terhadap alergen tersebut, maka akan terjadi pelepasan mediator oleh mastosit yang menyebabkan terbentuk *wheat-and-flare reaction* (bentukan kecil berdiameter berkisar antara 5-7 mm dengan tepi yang jelas, disertai edema lokal dan gatal). Reaksi tersebut terjadi 15 menit setelah alergen masuk. Respons lambat terjadi setelah 5 jam dengan gambaran khas seperti diatas, tetapi lebih besar dan sangat nyeri

b. *Skin patch test.*

Aplikasi alergen, misalnya debu rumah tangga, dioleskan pada kulit. *Skin patch test* tidak berpengaruh di tempat aplikasi (hasil negatif) pada penderita ekzema atopik.

2.7.2 Raksi hipersensitivitas tipe II

Reaksi hipersensitivitas tipe II diperantarai oleh antibodi IgM dan IgG terhadap antigen ekstraseluler pada permukaan sel. Antibodi yang berikatan dengan antigen pada permukaan sel dapat menyebabkan kerusakan sel melalui aktivasi sistem komplemen, yang selanjutnya menyebabkan terbentuk pori pada membrane sel (*membrane attack complex / MAC*). MAC adalah bagian akhir dari aktivasi komplemen yang

melibatkan C5b, C6, C7, C8, dan C9. Komponen tersebut akan berinteraksi secara berurutan untuk membentuk struktur makromolekuler yang merupakan pori. Pori yang terbentuk akan menyebabkan lisis sel target (Abbas, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Aktivasi komplemen melalui jalur klasik menyebabkan pembentukan anafilatoksin C3a dan C5a yang menarik netrofil dan makrofag ke tempat tersebut, serta menstimulasi mastosit dan basofil untuk menghasilkan amin vasoaktif yang menarik dan mengaktivasi sel efektor lainnya (Abbas, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Aktivasi komplemen juga menyebabkan deposisi molekul C3b pada membran sel target, sehingga akan terjadi proses opsonisasi yang memudahkan fagositosis sel target oleh sel fagositik. Sel efektor (sel fagosit) berikatan dengan kompleks antigen-antibodi atau C3b dan C4b pada permukaan sel, yang akan menstimulasi sel fagosit untuk menghasilkan leukotrin dan prostaglandin (contoh : LTB_4 dan PGE_2), serta meningkatkan aktivitas lisosomal (Abbas, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Antibodi juga dapat memperantarai destruksi sel melalui *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Dalam proses ini, sel sitotoksik yang memiliki reseptor Fc berikatan dengan daerah Fc dari antibodi yang melekat pada sel target, dan menyebabkan kerusakan sel. Sel yang dapat berfungsi sebagai *killer cells* pada ADCC adalah sel *natural killer* (sel NK), makrofag, monosit, netrofil, dan eosinofil (Abbas, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

janjian, sehingga terjadi pelepasan enzim lisosom pada permukaan jaringan tersebut sehingga terjadi kerusakan jaringan (Tizard *et al.*, 1995; Abbas, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Parslow *et al.*, 2001).

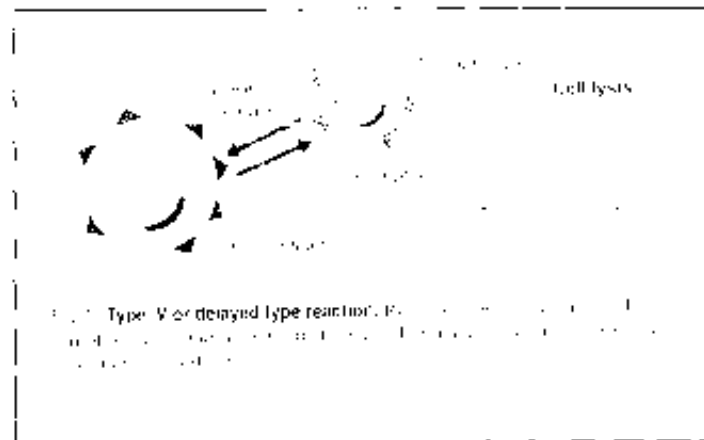
2.7.4 Reaksi hipersensitivitas tipe IV

Reaksi hipersensitivitas tipe IV dikenal pula sebagai *delayed-type hypersensitivity* (DTH) or *cell-mediated hypersensitivity*. Antibodi tidak mempunyai peranan pada reaksi ini, tetapi diperantarai oleh sel Th1 yang telah disensitisasi sebelumnya oleh antigen. Sel Th1 berfungsi bersama-sama dengan sel jenis lain terutama makrofag (Black, 2005; Goldsby *et al.*, 2000; Tizard *et al.*, 1995; Roitt *et al.*, 1993; Ptak *et al.*, 1991).

Perkembangan respons DTH membutuhkan fase sensitisasi awal selama 1-2 minggu setelah kontak primer dengan antigen. Selama periode ini, sel Th diaktivasi dan berproliferasi secara klonal oleh antigen yang dipresentasikan bersama dengan molekul MHC kelas II pada permukaan APC. Berbagai macam APC yang terlibat pada respons DTH antara lain adalah sel Langerhans dan makrofag. Sel Langerhans adalah sel dendritik yang dijumpai pada epidermis. APC menangkap antigen yang masuk melalui kulit dan membawa ke jaringan limfoid regional, dimana sel T diaktivasi oleh antigen. Pada beberapa spesies termasuk manusia, sel endotel vaskuler mengekspresi molekul MHC-kelas II dan juga berfungsi sebagai APC dalam respons DTH. Sel yang pada umumnya diaktifkan pada fase sensitisasi adalah sel Th1, tetapi sel T CD8+ juga dapat

aktivasi makrofag serta sel inflamasi nonspesifik. Sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 aktif adalah IL-2, IL-3, IFN- γ , TNF- β , GM-CSF. Khemokin yang dihasilkan oleh sel Th1 aktif adalah IL-8, MCAF, MIF. Makrofag berfungsi sebagai sel efektor utama dalam respons DTH. Sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1 aktif akan menginduksi monosit darah untuk melekat pada sel endotel vaskuler dan bermigrasi ke jaringan sekitarnya. Selama proses ini, monosit berdiferensiasi menjadi makrofag aktif. Makrofag aktif mensekresi TNF- α dalam jumlah besar serta memiliki kemampuan fagositosis yang lebih tinggi dan memiliki kemampuan yang meningkat untuk membunuh mikroorganisme melalui berbagai macam mediator sitotoksik. Keadaan ini dapat menyebabkan kerusakan jaringan. Selanjutnya makrofag aktif mengekspresi molekul MHC-kelas II dan molekul adesi dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga dapat berfungsi sebagai APC dengan lebih efektif (Goldsby *et al.*, 2000).

Respons DTH pada umumnya akan mencapai puncak pada 48-72 jam setelah kontak sekunder. Respons lambat ini disebabkan karena dibutuhkan waktu agar sitokin dapat menginduksi influks lokal dari makrofag serta aktivasi makrofag. Setelah respons DTH dimulai, terjadi suatu kerja sama yang kompleks dari sel nonspesifik dan mediator, sehingga menyebabkan proses amplifikasi (Gambar 2.11). Sebagai contoh reaksi hipersensitivitas IV adalah kontak alergi di kulit (Goldsby *et al.*, 2000; Leung, 1996; Guin, 1995).



Gambar 2.12 : Reaksi hipersensitivitas tipe IV (Arshad, 2002)

Keterangan : Reseptor permukaan sel T sitotoksik yang tersensitisasi mengenal antigen pada sel target, melepaskan mediator/sitokin yang mengakibatkan sel lisis

Hipersensitivitas tipe lambat oleh karena induksi alergen spesifik pada kontak epikutaneus dapat berkembang menjadi sensitivitas spesifik (Leung, 1996). Jadassohn pertama kali menggambarkan dermatitis kontak iritasi pada tahun 1895, dan mengembangkan *patch test* (uji tempel) di Amerika pada dekade 1930. *Finn chamber* dirancang untuk metoda standar *patch test* pada individu terhadap jenis bahan kimia pada lapisan epikutan yang tipis (*thin-layer rapid use epicutaneous / TRUE test*). Test ini layak dipakai sejak tahun 1990 (Leung, 1996; Guin, 1995).

Bahan kimia pada umumnya mampu menimbulkan dermatitis kontak bila mempunyai berat molekul lebih kurang 500 D. Hampir 3000 bahan kimia tercatat sebagai penyebab kontak alergi, dimana molekul kimia kecil yang bertanggung jawab sebagai penyebab harus berikatan dengan protein pembawa pada sel Langerhans di dalam lapisan suprabasilar dari epidermis. Sel Langerhans berfungsi sebagai APC di

dalam kulit. Sel Langerhans akan mempresentasikan antigen bersama molekul MHC-kelas II kepada sel T CD4+. Selanjutnya terjadi aktivasi sel T CD4+ yang mensekresi IFN- γ . Keadaan tersebut memicu aktivasi makrofag yang kemudian akan menyebabkan reaksi hipersensitivitas tipe IV yang dapat diamati pada kulit (Parslow *et al.*, 2001; Roitt *et al.*, 1993; Guin, 1995).

2.8 Perbedaan Reaksi Kontak Alergi, Kontak Iritan Dan Atopik Di Kulit

Salah satu reaksi hipersensitivitas tipe lambat di kulit yaitu reaksi kontak alergi. Reaksi kontak alergi ini dibedakan dengan kontak iritan di kulit. Peran sitokin sangat menarik untuk diteliti dalam patomekanisme yang diperantarai oleh sel (*cell-mediated*) pada kontak alergi di kulit. Patomekanisme kontak iritasi di kulit bersifat *nonimunologik* dan dikenal sebagai *non-immunologic irritant contact* (Effendy *et al.*, 2000; Leung, 1996; Guin, 1995).

Beberapa substansi tertentu merupakan penyebab iritasi dan inflamasi pada individu yang terkena. Tipe stimulus eksogenus dapat mempengaruhi reaksi tersebut. Aplikasi topikal bahan kimia tertentu akan menginduksi iritasi, tetapi dengan *tape stripping* pada kulit belum memperlihatkan infiltrasi sel inflamasi selama 24 jam pertama. Setelah itu mulai dijumpai infiltrasi sel radang pada tempat tersebut (Leung, 1996).

Epidermis kaya akan sumber sitokin dan faktor pertumbuhan (Zehnder *et al.*, 1999; Enk dan Katz, 1992). Keratinosit merupakan masa sel utama pada epidermis manusia. Keratinosit tidak hanya berfungsi

sebagai target iritan (Kermani *et al.*, 2000; Enk dan Katz, 1992), tetapi juga bertindak sebagai *signal transducer* yang mampu mengubah stimulus eksogenus menjadi produksi sitokin, molekul adesi dan faktor khemotaktik. Keratinosit yang tidak distimulasi mensekresi sitokin primer dalam jumlah rendah, seperti IL-1 (IL-1 α dan IL-1 β) dan TNF- α . Meskipun demikian, dalam respons terhadap stimuli eksogenus, keratinosit yang sudah diaktifkan dapat memproduksi berbagai sitokin inflamasi (Takanami-Ohnishi *et al.*, 2002; Kermani *et al.*, 2000; Yawalkar *et al.*, 2000).

Data yang telah ada menunjukkan bahwa keratinosit tidak hanya terlibat di dalam kontak alergi tetapi juga dalam kontak iritan di kulit, melalui sintesis dan pelepasan sitokin inflamasi, khemokin dan faktor pertumbuhan (Zehnder *et al.*, 1999; Presland dan Jurevic, 2002). Meskipun ada perbedaan jalur antara reaksi alergi dan iritasi, keterkaitan tingkat molekuler pada jaringan tampaknya ada. Ini mungkin sebagai alasan mengapa sejumlah sitokin epidermal yang mirip terlibat dalam respons reaksi alergi dan iritasi.

2.8.1 Kontak iritan di kulit

Kontak iritan dapat terjadi di kulit oleh karena kontak dengan bahan kimia tertentu. Terjadinya kontak iritan tergantung pada dosis bahan tersebut, tetapi tidak tergantung pada sifat antigenesitas yang dimiliki. Kerusakan jaringan yang terjadi akan merangsang sistem imun alamiah sehingga terbentuk IL-1 dan TNF- α , yang merupakan sitokin primer yang

memegang peranan penting dalam proses peradangan. Kerusakan jaringan menyebabkan aktivasi jalur *nuclear factor-κB* (NF-κB) melalui reseptor sitokin IL-1, TNF-α atau *Toll-like receptor*. Keadaan ini akan menyebabkan transkripsi dari banyak gen yang mengandung daerah κB pada promotor mereka di berbagai macam sel kulit. Pada sel endotel akan diproduksi molekul adesi selektin-E, ICAM-1 dan VCAM-1, sehingga akan memudahkan ekstravasasi sel radang ke jaringan. Selanjutnya, keadaan tersebut akan menimbulkan reaksi radang (Pohan, 2004; Goldsby *et al.*, 2000; Robert dan Kupper, 1999).

2.8.2 Kontak alergi di kulit

Kontak alergi diawali dengan reaksi epidemal yang dikarakteristikan sebagai ekzema di tempat kontak dengan alergen. Reaksi ini biasanya terjadi maksimal 48-72 jam setelah kontak alergen (Leung, 1996). Kontak alergi, seringkali didiagnosis melalui *patch test*. Hapten tidak dengan sendirinya bersifat imunogenik, meskipun demikian hapten dapat berpenetrasi ke dalam epidermis dan berkonjugasi dengan protein normal tubuh. Pengenalan sel T dengan konjugat tersebut adalah spesifik untuk hapten/pembawa. Banyak individu mengalami kontak alergi di kulit bila terpapar dengan *dinitrochlorobenzene* (DNCB) melalui imunitas selular (Effendy *et al.*, 2000; Austyn dan Wood, 1994).

Kontak alergi di kulit merupakan alergi yang diperantarai oleh sel Th1 yang disensitisasi oleh kontak dengan hapten bahan kimia. *Patch test*

adalah uji sensitivitas kulit yang sangat efisien untuk mengetahui alergen penyebab (Effendy *et al.*, 2000).

Patogenesis kontak alergi di kulit meliputi tiga fase yaitu fase sensitisasi (pengenalan), fase elisitasi, dan fase penekanan inflamasi (Akiba *et al.*, 2002; Effendy *et al.*, 2000; Leung, 1996; Guin, 1995).

Pada fase sensitisasi atau fase pengenalan, hapten terlebih dahulu berikatan dengan protein pembawa untuk dapat menjadi alergen. Alergen akan difagosit oleh sel Langerhans kulit dan diproses agar menjadi lebih poten. Fungsi sel Langerhans adalah menyajikan alergen pada permukaan sel bersama dengan molekul MHC-kelas II. Dengan dipresentasikan bersama MHC-kelas II, maka antigen dapat dikenali oleh sel Th. Pada dermatitis kontak alergi, peran MHC-kelas II dan sel Th lebih dominan (Pohan, 2004; Akiba *et al.*, 2002; Effendy *et al.*, 2000; Leung, 1996; Guin, 1995).

Sel Langerhans akan masuk dalam saluran getah bening dan berhenti di kelenjar getah bening. Antigen akan diperkenalkan kepada sel T di tempat ini. Proses pengenalan antigen oleh sel Th adalah sebagai berikut (Pohan, 2004; Akiba *et al.*, 2002, Effendy *et al.*, 2000) :

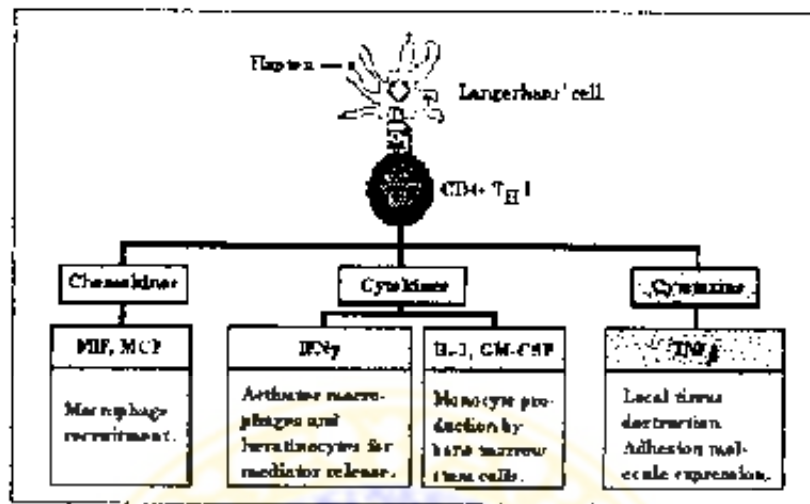
- a. Sel T mengikat peptida yang dipresentasikan bersama molekul MHC-kelas II oleh sel Langerhans.
- b. Sel Langerhans akan mensekresi IL-1 yang akan merangsang sel Th (*sensitized T-cell*) untuk berproliferasi. Sel Th mensekresi IL-2 dan reseptor IL-2, sehingga terbentuk klon sel Th spesifik. Sel Th spesifik ini merupakan sel Th yang sudah siap untuk mengenal antigen pada

paparan berikutnya, sehingga timbul gejala alergi. Proses pengenalan hapten sampai proliferasi sel Th, terjadi selama lebih kurang 72 jam.

Pada fase elisitasi, sel Th1 akan mensekresi beberapa sitokin, antara lain IL-3, IL-4, IFN- γ , GM-CSF. GM-CSF berfungsi untuk aktivasi sel Langerhans, sedangkan IFN- γ berperan dalam inflamasi dan mengaktifkan keratinosit. Beberapa kejadian pada fase elisitasi adalah (Akiba *et al.*, 2002; Goldsby *et al.*, 2000; Effendy *et al.*, 2000) :

- a. Terjadi ekspresi molekul adesi yaitu ICAM-1 yang berfungsi untuk mengikat LFA-1 dari lekosit, sehingga sel radang akan menuju ke jaringan.
- b. Keratinosit akan mensekresi IL-1 dan IL-6.

Ada dua teori yang mendasari terjadinya peradangan pada fase ini. Teori pertama, IL-1 akan merangsang keratinosit sehingga mengeluarkan ekosanoid yaitu molekul yang setara dengan sitokin. Ekosanoid bersama-sama sitokin merangsang mastosit atau basofil mengeluarkan histamin, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas dan vasodilatasi pembuluh darah. Teori ke dua, IL-1 merangsang membran keratinosit, sehingga mengaktifkan fosforilasi pada membran keratinosit, sehingga memecah asam arakhidonat menjadi prostaglandin dan leukotrin, serta merangsang sel radang.



Gambar 2.13 Sitokin dalam subset CD4+Th1 pada reaksi hipersensitivitas tipe IV (Gell dan Coombs, 2003)

Reaksi hipersensitivitas akan diakhiri dengan penekanan reaksi inflamasi pada kondisi tertentu. Pada fase ini terjadi supresi inflamasi pada kontak alergi yang diperantarai oleh prostaglandin E (dari makrofag dan keratinosit) dan TGF- β (dari keratinosit dan limfosit T), serta sitokin yang berhubungan dengan produksi dan aktivitas IL-1 dan IL-2 (Goldsby *et al.*, 2000).

2.8.3 Reaksi atopik di kulit

Reaksi atopik di kulit ditandai dengan pembentukan IgE spesifik terhadap antigen, yang disertai dengan produksi sitokin sel Th2. Pada reaksi atopik, sel Th spesifik terhadap alergen akan diinduksi untuk berkembang menjadi sel Th *cutaneous lymphocyte antigen* positif (CLA+)

yang selanjutnya akan menghasilkan sitokin sel Th2. Sel tersebut akan bermigrasi ke kulit dan bertemu kembali dengan antigen spesifik setelah pertemuan pertama dengan antigen pada kelenjar getah bening regional. Sel Th2 memori spesifik terhadap alergen akan dijumpai dalam darah penderita dermatitis atopik, tetapi tidak dijumpai pada darah individu normal. Sitokin sel Th2 akan mendorong pertumbuhan dan aktivasi eosinofil (IL-5), *isotype switching* antibodi dari IgM ke IgE (IL-4 dan IL-13), serta penurunan imunitas seluler (IL-10). Pembentukan IgE spesifik terhadap antigen akan menyebabkan proses peradangan dan kerusakan jaringan melalui reaksi hipersensitivitas tipe I (Pohan, 2004; Robert dan Kupper, 1999).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual

Penelitian ini mengkaji imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA melalui reaksi iritasi dan hipersensitivitas. Kerangka konseptual penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1.

Monomer MMA dapat teroksidasi membentuk formaldehida yang dapat bersifat iritan bagi jaringan mukosa mulut. Iritasi karena paparan MMA pada mukosa mulut akan menyebabkan kerusakan jaringan melalui respons imun alamiah, yang ditandai dengan peningkatan TNF- α . Sitokin ini mengaktifasi NF- κ B, sehingga terjadi peningkatan produksi selektin-E, ICAM-1, dan VCAM-1. Peningkatan kemokin tersebut akan menyebabkan infiltrasi sel radang dengan akibat terjadi proses peradangan dan kerusakan jaringan mukosa mulut yang dapat menimbulkan gejala klinik.

Monomer MMA adalah hapten dengan berat molekul rendah, yang mempunyai ikatan rangkap dan mampu menangkap hidrogen dari gugus NH protein tubuh atau protein asing sebagai pembawa (*carrier*). MMA menjadi imunogenik melalui ikatan secara non-kovalen dengan residu asam amino protein pembawa. Ikatan MMA dengan protein pembawa menyebabkan perubahan konformasi protein tersebut, sehingga dapat diproses dan dipresentasikan oleh APC bersama molekul MHC-kelas II kepada sel Th naif. Sel Th naif selanjutnya akan berproliferasi dan

berdiferensiasi menjadi sel Th1 dengan pengaruh IL-12, dan menjadi sel Th2 dengan pengaruh IL-13.

Aktivasi sel Th2 oleh MMA yang dipresentasikan bersama MHC-kelas II akan menyebabkan produksi IL-4. Selanjutnya IL-4 akan memfasilitasi *isotype switching* pada sel B ke arah pembentukan IgE spesifik. IgE spesifik yang terbentuk akan terikat pada permukaan dan dan basofil melalui reseptor Fcε. Bila terjadi paparan MMA kembali, maka akan terjadi ikatan silang imunogen dengan IgE spesifik di permukaan dan dan basofil. Keadaan ini akan menyebabkan pelepasan mediator vasoaktif amin, yang akan menyebabkan kontraksi otot polos, peningkatan permeabilitas vaskuler, dan vasodilatasi sehingga terjadi peradangan. Reaksi ini dikenal sebagai reaksi hipersensitivitas tipe I.

Paparan MMA juga dapat menginduksi produksi IgG spesifik terhadap MMA. Pembentukan IgG spesifik diperlukan IFN-γ yang dihasilkan oleh sel Th1 aktif. IgG tersebut dapat berikatan dengan MMA yang terdapat pada permukaan sel mukosa mulut, sehingga menyebabkan kerusakan jaringan melalui mekanisme ADCC atau melalui aktivasi komplemen. Reaksi ini disebut reaksi hipersensitivitas tipe II.

Apabila MMA yang larut pada cairan jaringan mukosa mulut berikatan dengan IgG spesifik, maka akan terbentuk kompleks antigen-antibodi. Kompleks imun yang terbentuk dapat mengendap pada jaringan mukosa mulut dan mengaktifkan komplemen. Aktivasi komplemen akan menyebabkan reaksi radang yang diperantarai oleh netrofil yang

menginfiltrasi jaringan mukosa mulut. Reaksi tersebut dikenal sebagai reaksi hipersensitivitas tipe III.

Reaksi hipersensitivitas tipe IV, merupakan respons imun seluler yang diperantarai oleh sel T setelah adanya paparan MMA pada penderita yang sudah tersensitisasi. Pada fase sensitisasi MMA akan dipresentasikan oleh sel dendritik / APC / keratinosit, kepada sel Th naif yang spesifik terhadap MMA. Sel Th naif tersebut akan mengalami proliferasi dan diferensiasi menjadi sel Th1 aktif. Fase berikutnya adalah fase elisitasi, di mana pada fase ini sel Th1 aktif akan mensekresi berbagai sitokin dan khemokin, antara lain IFN- γ , IL-2, IL-3, GM-CSF, IL-8, MCAF, dan MIF. Faktor tersebut akan menarik dan mengaktifasi makrofag serta sel radang nonspesifik lain (PMN). Makrofag aktif akan lebih efektif dalam mempresentasikan antigen, serta mensekresi TNF- α dalam jumlah yang lebih banyak sehingga menimbulkan kerusakan jaringan mukosa mulut.

Paparan MMA pada mukosa mulut penderita, diduga dapat menimbulkan reaksi hipersensitivitas tipe I, tipe II, tipe III, dan tipe IV. Keseluruhan reaksi hipersensitivitas yang terjadi menyebabkan kerusakan jaringan, dan selanjutnya menimbulkan gejala klinik inflamasi jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Aktivasi limfosit naif terjadi pada lingkungan mikro khusus di dalam kelenjar getah bening. Limfosit aktif berdiferensiasi menjadi sel efektor dan sel memori. Sel efektor dan sel memori mengekspresi molekul adesi LFA-1 dalam jumlah yang lebih banyak, sehingga mampu berinteraksi

dengan ligan yang terdapat pada jaringan ekstralimfoid tersier pada mukosa mulut yang mengalami peradangan. Diduga terdapat korelasi antara profil mediator yang memperantarai respons imun sistemik dan respons imun lokal pada jaringan mukosa mulut. Dalam penelitian ini akan dibuktikan terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut.



3.2 Hipotesis Penelitian

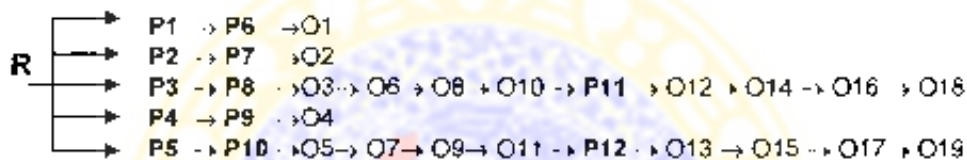
Setelah dibuat kerangka konsep penelitian maka dibuat hipotesis penelitian sebagai berikut :

1. MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral IgG anti-MMA.
2. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui iritasi, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ .
3. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I, yang ditunjukkan dengan peningkatan IL-4 dan hasil positif IgE spesifik terhadap MMA.
4. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, yang ditunjukkan dengan peningkatan IFN- γ dan hasil positif IgG spesifik terhadap MMA.
5. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, yang ditunjukkan dengan peningkatan TNF- α dan IFN- γ .
6. Terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dibagi dalam dua tahap. Tahap I pada hewan coba kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*), dengan menggunakan rancangan penelitian eksperimental *posttest-only control group design* (Zainuddin, 2000) Populasi bersifat homogen di mana karakteristik antar unit populasi adalah sama, sehingga tidak dilakukan *pretest*. Skema rancangan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1.



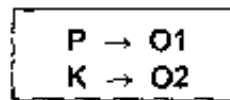
Gambar 4.1 Skema rancangan penelitian Tahap I pada hewan coba

Keterangan :

- R = randomisasi
- P1 = hari ke-1 disuntik 0.75 % MMA dalam PBS + CFA
- P2 = hari ke-1 disuntik 0.50 % MMA dalam PBS + CFA
- P3 = hari ke-1 disuntik 0.75 % MMA dalam BSA 1% + CFA
- P4 = hari ke-1 disuntik 0.50 % MMA dalam BSA 1% + CFA
- P5 = hari ke-1 disuntik PBS + CFA (**Kontrol**)
- P6 = hari ke 14 disuntik 0.75 % MMA dalam PBS + IFA
- P7 = hari ke 14 disuntik 0.50 % MMA dalam PBS + IFA
- P8 = hari ke 14 disuntik 0.75 % MMA dalam BSA 1% + IFA
- P9 = hari ke 14 disuntik 0.50 % MMA dalam BSA 1% + IFA
- P10 = hari ke 14 disuntik PBS + IFA (**Kontrol**)
- P11 = hari ke 52 disuntik 0.75 % MMA dalam BSA 1% + IFA
- P12 = hari ke 52 disuntik PBS + IFA (**Kontrol**)
- O1-O5 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda *dot blot* dan ELISA pada hari ke-28
- O6-O7 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-35
- O8-O9 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-42
- O10-O11 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-49
- O12-O13 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-66
- O14-O15 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-73
- O16-O17 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-80
- O18-O19 = pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metoda ELISA pada hari ke-87

Penelitian Tahap I bertujuan untuk mengkaji pola respons imun sekunder hewan coba kelinci lokal yang diimunisasi dengan MMA. Penelitian ini menggunakan empat ekor kelinci yang diimunisasi MMA dengan berbagai macam dosis ditambah ajuvan pada hari ke-1 dan 14 sebagai imunisasi pertama dan *booster* pertama, untuk mencari dosis optimal. Kelinci yang mempunyai nilai absorbansi IgG anti-MMA tertinggi diimunisasi kembali pada hari ke-52 sebagai *booster* ke dua. Kelinci kontrol disuntik dengan PBS ditambah ajuvan pada hari ke-1, 14, dan 52. Pemeriksaan darah pertama untuk semua kelinci dilakukan pada hari ke-28. Pada pemeriksaan ini dilakukan *dot blot* untuk deteksi IgG anti-MMA. Titer IgG tertinggi ditemukan pada kelinci dengan perlakuan P3 dan P8, sehingga pemeriksaan darah selanjutnya hanya dilakukan pada kelinci tersebut dan kelinci kontrol. Pemeriksaan dilakukan pada kelinci tersebut dan kontrol pada hari ke 28, 35, 42, 49, 66, 73, 80, 87, dengan menggunakan teknik ELISA untuk mendeteksi IgG anti-MMA (lihat Tabel 4.2 dan Gambar 4.1). Untuk mengetahui pola respons imun sekunder terhadap MMA, hasil ELISA yang diperoleh dibandingkan antara kelinci yang diimunisasi dengan MMA dan kelinci kontrol.

Penelitian Tahap II menggunakan rancangan penelitian observasional *case-control design*. Skema rancangan penelitian Tahap II dapat dilihat pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Skema rancangan penelitian Tahap II

Keterangan :

- P = kelompok kasus
- K = kelompok kontrol
- O1 dan O2 = pemeriksaan IgG spesifik dalam serum dengan *dot blot*, IgG & IgE spesifik terhadap MMA dalam serum, serta IL-4, IFN- γ , TNF- α dalam plasma dan kerokan jaringan

Penelitian Tahap II bertujuan untuk membuktikan sifat imunogenisitas MMA pada penderita terpapar MMA, serta reaksi intasi dan reaksi hipersensitivitas tipe I, II, III, dan tipe IV sebagai penyebab kerusakan jaringan mukosa mulut. Di samping itu, penelitian Tahap II juga bertujuan untuk membuktikan terdapat korelasi antara sitokin IL-4, IFN- γ , TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Sampel penelitian dibagi dalam dua kelompok, yaitu kelompok kasus dan kelompok kontrol. Kelompok kasus adalah penderita di Klinik Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang terpapar MMA pertama kali dan menunjukkan gejala inflamasi lokal berupa rasa nyeri, *burning mouth*, serta ulkus mukosa mulut. Kelompok kontrol adalah penderita di Klinik Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang belum pernah terpapar MMA dan tidak menunjukkan gejala inflamasi lokal.

Pada kelompok kasus dan kelompok kontrol dilakukan pemeriksaan IgG & IgE spesifik terhadap MMA pada serum, dan IL-4,

IFN- γ , TNF- α dalam plasma dan kerokan jaringan mukosa mulut. Hasil yang diperoleh dari kelompok kasus dibandingkan dengan kelompok kontrol dengan menggunakan uji t bebas untuk membuktikan kerusakan jaringan pada mukosa mulut penderita terpapar MMA, disebabkan oleh reaksi iritasi dan hipersensitivitas tipe I, II, III, dan tipe IV. Selanjutnya dilakukan uji korelasi Pearson antara sitokin IL-4, IFN- γ , TNF- α dalam plasma dan kerokan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

4.2 Populasi, Sampel, Besar Sampel, dan Teknik Pengambilan Sampel

4.2.1 Populasi

Populasi untuk penelitian Tahap I adalah kelinci lokal Kota Batu (*Oryctolagus cuniculus*). Populasi untuk penelitian Tahap II adalah penderita yang datang di Klinik Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

4.2.2 Sampel

Sampel untuk penelitian Tahap I adalah kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) umur 3 – 4 bulan yang mendapat makanan sama serta dipelihara di tempat yang sama. Sebelum proses penelitian, dilakukan aklimatisasi terlebih dahulu selama 2 minggu.

Kriteria inklusi :

1. Sehat selama proses aklimatisasi, yang dilihat dari bulu yang halus dan licin serta mobilitas normal.
2. Berat badan 3 - 4 kg.
3. Jantan.

Kriteria eksklusi :

1. Sakit selama proses aklimatisasi, terlihat dari bulu yang kasar dan sedikit tegak serta mobilitas berkurang.
2. Berat badan kurang dari 3 kg atau lebih dari 4 kg.
3. Betina.

Kriteria drop out :

1. Menderita penyakit lain selama proses penelitian
2. Mati selama proses penelitian.

Sampel penelitian Tahap II adalah penderita terpapar MMA pertama kali yang menunjukkan gejala klinik (kelompok kasus), dan penderita kontrol (kelompok kontrol) yang tidak terpapar MMA serta menunjukkan gejala klinik. Setiap penderita yang digunakan sebagai sampel baik pada kelompok kasus dan kontrol mengisi *inform consent*, yang menyatakan penderita secara sukarela bersedia diberikan perlakuan untuk keperluan penelitian (pengambilan darah dan kerokan jaringan mukosa mulut)

Kriteria inklusi kelompok kasus

1. Penderita yang terpapar MMA pertama kali, yaitu penderita yang memakai gigi tiruan lepasan resin akrilik *heat-cured*. Gigi tiruan dalam kondisi *well-fitting* di dalam mulut.
2. Usia antara 35 tahun sampai 60 tahun dengan berat badan normal. Rentang usia 35 sampai 60 tahun dianggap memiliki respons imun yang relatif sama.
3. Mempunyai kelainan mukosa berupa hiperemia, rasa nyen, *burning mouth*, dan ulkus mukosa mulut.
4. Mengalami peradangan lokal di mukosa mulut 10 - 14 hari setelah terpapar MMA. Hal ini disebabkan karena gejala klinik inflamasi lokal mukosa mulut baru terjadi 10 - 14 setelah paparan pertama MMA.
5. Tidak terjadi iritasi mekanik karena penggunaan gigi tiruan resin akrilik seperti oleh karena iritasi mekanik sayap gigi tiruan yang terlalu panjang atau tekanan gigi tiruan oleh karena gigi tiruan tidak *well-* di dalam mulut.
6. Tidak dalam pengobatan kortikosteroid atau obat alergi lain.
7. Sehat dalam anamnesa.

Kriteria eksklusi kelompok kasus :

1. Menderita penyakit lain.
2. Terjadi iritasi mekanik karena penggunaan gigi tiruan resin akrilik *heat-cured* yang tidak *well-fitting*.
3. Memperoleh pengobatan kortikosteroid atau obat alergi lain

Kriteria inklusi kelompok kontrol :

1. Penderita tidak terpapar MMA.
2. Usia antara 35 tahun sampai 60 tahun dengan berat badan normal. Rentang usia 35 sampai 60 tahun dianggap memiliki respons imun yang relatif sama.
3. Tidak mempunyai kelainan mukosa berupa hiperemia, rasa nyeri, *burning mouth*, dan ulkus mukosa mulut.
4. Tidak dalam pengobatan kortikosteroid atau obat alergi lain.
5. Sehat dalam anamnesa.

Kriteria eksklusi kelompok kontrol :

1. Terjadi peradangan mukosa mulut.
2. Memperoleh pengobatan kortikosteroid atau obat alergi lain.

4.2.3 Besar sampel

Besar sampel yang digunakan dalam penelitian tahap I adalah satu ekor kelinci untuk masing-masing perlakuan imunisasi MMA dengan variasi dosis, serta satu ekor kelinci sebagai kontrol. Hal ini disebabkan penelitian tersebut merupakan penelitian eksperimental, dimana populasi bersifat homogen (*spesies, umur, berat badan, makanan, dan perawatan dikendalikan sama*).

Besar sampel pada penelitian Tahap II adalah total sampel (*sensus*), yaitu semua penderita terpapar MMA dengan gejala klinik inflamasi lokal mukosa rongga mulut yang memenuhi kriteria inklusi sampel. Penderita kasus dicari mulai bulan September 2003 sampai

September 2004 dan diperoleh berjumlah delapan penderita kasus, sehingga jumlah kontrol juga delapan penderita.

4.2.4 Teknik pengambilan sampel

Teknik pengambilan sampel penelitian Tahap I dilakukan dengan teknik *simple random sampling* untuk menentukan kelinci perlakuan dan kelinci kontrol (Zainuddin, 2000).

Teknik pengambilan sampel penelitian Tahap II, dilakukan dengan cara mengambil seluruh penderita yang datang di Klinik Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang terpapar MMA pertama kali dan menunjukkan gejala klinik sebagai kelompok kasus. Sebagai kelompok kontrol, diambil penderita yang tidak terpapar MMA dan tidak ada gejala klinik. Penelitian dilakukan mulai bulan September 2003 sampai September 2004.

4.3 Klasifikasi Variabel Dan Definisi Operasional Variabel Penelitian

4.3.1 Klasifikasi variabel penelitian

Klasifikasi variabel penelitian Tahap I :

1. Variabel bebas adalah monomer MMA.
2. Variabel terganggu adalah : IgG spesifik terhadap MMA
3. Variabel kendali adalah umur, jenis kelamin, makanan, status kesehatan perawatan.

Klasifikasi variabel penelitian Tahap II :

1. Variabel bebas adalah : monomer MMA.
2. Variabel tergantung adalah : IgG dan IgE spesifik, IL-4, IFN- γ , dan TNF- α .
4. Variabel kendali adalah : umur, status kesehatan, dan tidak sedang dalam pengobatan dengan kortikosteroid atau obat antialergi lainnya.

4.3.2 Definisi operasional variabel penelitian

1. Penderita terpapar MMA adalah penderita yang pertama kali menggunakan gigi tiruan lepasan resin akrilik *heat-cured* dengan bahan dasar MMA, yang sesuai dengan kriteria inklusi sampel.
2. Konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α diperoleh dari nilai absorbansi pemeriksaan sitokin tersebut dengan metoda ELISA yang kemudian dikonversikan dengan kurva standar. Satuan konsentrasi sitokin yang diperoleh adalah pg/ml.
3. Nilai absorbansi IgG spesifik dan IgE spesifik adalah nilai absorbansi hasil ELISA penentuan antibodi spesifik terhadap MMA.
4. Hasil positif IgG dan IgE spesifik terhadap MMA adalah bila mempunyai nilai absorbansi paling sedikit dua kali rerata nilai absorbansi penderita kontrol (Al-Marini *et al.*, 2001).

4.4 Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Klinik Prostodonsia Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran, dan Laboratorium Biokimia Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya Malang.

4.5 Prosedur Pengambilan Dan Pengumpulan Data Penelitian Tahap I

4.5.1 Imunisasi MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*)

a. Unit sampel :

Kelinci lokal yang diperoleh dari peternak kota Batu-Malang.

b. Alat yang diperlukan :

1. Ependorf.
2. Spuit suntik 2 ml.
3. Vibrator.

c. Bahan yang diperlukan :

1. *Complete Freund's Adjuvant* (CFA).
2. *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA)
3. MMA (Sigma dengan konsentrasi 99,9 %)
4. BSA 1 % dalam PBS.
5. Alkohol 70 %

d. Teknik pelaksanaan :

Imunisasi diberikan dengan variasi dosis MMA. Pada imunisasi pertama kelompok kelinci perlakuan disuntik MMA yang dilarutkan dalam PBS / BSA dan ditambahkan CFA secara subkutan. Variasi dosis dan pelarut MMA dapat dilihat pada Tabel 4.1. Setelah dua minggu diberikan imunisasi ke dua (*booster 1*) dengan MMA dalam PBS / BSA ditambah IFA. Jadwal imunisasi dapat dilihat pada Tabel 4.2. Perbandingan MMA dan CFA / IFA adalah 1 : 1, dengan jumlah total campuran antigen dan adjuvan yang diimunisasikan sebanyak 200 μ l. Injeksi diberikan secara subkutan pada bagian punggung di beberapa sisi, dengan dosis terbagi. Pada hari ke-28 dilakukan pemeriksaan IgG anti-MMA dengan metode *dot blot* dan ELISA pada semua kelinci perlakuan dan kontrol. Pada kelinci perlakuan yang mempunyai nilai absorbansi IgG anti-MMA paling tinggi, diberikan imunisasi ke tiga (*booster 2*) dengan MMA dalam BSA ditambah IFA pada hari ke-52. Kelinci kontrol diimunisasi dengan PBS dan IFA pada hari ke-52. Pada kelinci perlakuan dan kontrol, selanjutnya dilakukan pemeriksaan darah setiap minggu. Jadwal pengambilan darah dapat dilihat pada Tabel 4.2

Darah diambil melalui pembuluh vena auricularis telinga kelinci (Harlow dan Lane, 1988). Sampel darah, didiamkan selama sepuluh menit pada suhu ruang. Darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm pada suhu ruang selama 20 menit. Presipitat dibuang, supernatan sebagai

serum dipindahkan ke dalam ependorf dan disimpan pada suhu -20°C sampai siap diperiksa di laboratorium.

Tabel 4.1 Variasi dosis imunisasi MMA pada kelinci lokal

No.	Kelinci	Dosis MMA
1.	A	0.75 % MMA dalam PBS (v/v dari MMA stock)
2.	B	0.50 % MMA dalam PBS (v/v dari MMA stock)
3.	C	0.75 % MMA dalam BSA 1% (v/v dari MMA stock)
4.	D	0.50 % MMA dalam BSA 1% (v/v dari MMA stock)
5.	Kontrol	PBS + ajuvan

Tabel 4.2 Jadwal imunisasi kelinci lokal (*Oryctolagus Cuniculus*)

Hari Ke-	Kegiatan
1	Imunisasi 1 (MMA + CFA)
14	Imunisasi 2 (MMA + IFA 1) sebagai <i>Booster 1</i>
28	Pengambilan darah 1
35	Pengambilan darah 2
42	Pengambilan darah 3
49	Pengambilan darah 4
52	Imunisasi 3 (MMA + IFA 2) sebagai <i>Booster 2</i>
66	Pengambilan darah 5
73	Pengambilan darah 6
80	Pengambilan darah 7
87	Pengambilan darah 8

Keterangan: kelinci A, B, dan D hanya dilakukan imunisasi pertama dan ke dua, serta pengambilan darah pada hari ke- 28 saja

4.5.2 Deteksi IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik *dot blot*

a. Bahan yang diperlukan :

1. PBS skim milk 5 % dan 1 % (*blocking buffer*).
2. 0,05 % PBS-Tween 20.
3. Anti-Rabbit IgG AP Conjugate dalam PBS : 1/1000.
4. Substrat *Western Blue*.
5. Serum kelinci mengandung antibodi anti-MMA diencerkan dalam PBS : 1/100 dan 1/ 200.
6. Antigen MMA dalam PBS : 1/50.

b. Alat yang diperlukan :

1. Membran nitroselulose (NC).
2. *Dot Blotter* aparat.

c. Teknik pemeriksaan IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik *dot blot* :

Pemeriksaan IgG anti MMA dengan teknik *dot blot* dilakukan dengan modifikasi metoda De Maio (1994). Tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Sebanyak 20 μ l MMA (1 : 50) dalam PBS diteteskan pada membran NC yang telah dibasahi dengan PBS.
2. Membran yang berisi antigen (MMA) ini kemudian *di-blocking* dengan *blocking buffer* selama 1 jam dan selanjutnya dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 (3 menit diulang 3 kali)

3. Hasil yang didapat diinkubasi dengan 20 μ l serum kelinci yang mengandung antibodi anti-MMA dalam PBS-*Skim Milk* 1% dengan pengenceran (1/100 dan 1/200) dan selama 2 jam.
4. Dilakukan pencucian dengan 0,05 % PBS-Tween 20 selama 3 menit dan diulang 3 kali.
5. Hasil yang didapatkan diinkubasi dengan 20 μ l antibodi sekunder (Anti-*rabbit IgG AP Conjugate*) dalam PBS 1 : 1000 selama 1 jam.
6. Dicuci dengan 0,05 % PBS-Tween 20 selama 3 menit dan diulang 3 kali.
7. Dilakukan inkubasi dalam substrat 20 μ l *Western Blue* dan dikeringkan pada suhu kamar.
8. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi biru.

4.5.3 Deteksi IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik ELISA tidak langsung

a. Bahan yang digunakan :

1. Bufer karbonat-bikarbonat (*coating buffer*).
2. 0,05% PBS-Tween 20.
3. *Blocking buffer* BSA 1%.
4. BSA grade 5.
5. Konjugat AP anti-*rabbit IgG*.
6. Substrat pNPP dalam dietanolamin 10%.
7. NaOH 3M (*stop reaction*).

b. Alat yang digunakan :

1. ELISA reader sistem BIO-RAD pada 405 nm.
2. ELISA plate 96 well.

c. Pemeriksaan IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik ELISA tidak langsung :

Pemeriksaan IgG anti-MMA dengan teknik ELISA tidak langsung dilakukan dengan modifikasi metoda Crowther (1995). Tahapan pemeriksaan adalah sebagai berikut :

1. Antigen MMA dilarutkan dalam bufer karbonat-bikarbonat (*coating buffer*) dengan pengenceran 1/50, dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, selanjutnya diinkubasi pada suhu 4^o C selama satu malam. Untuk kontrol dipakai sumuran yang tidak berisi antigen / tanpa *coating* MMA.
2. *Microplate* dicuci dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
3. *Blocking buffer* dimasukkan pada *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam.
4. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
5. Serum kelinci yang mengandung antibodi anti-MMA dilarutkan dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan seri pengenceran yaitu 1/10, 1/20, 1/40, dan 1/80. dimasukkan dalam *microplate* masing-masing 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam.

6. *Microplate* dicuci dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
7. Antibodi anti-*rabbit* IgG berlabel fosfatase alkali dilarutkan dalam TBS dengan pengenceran 1/ 2500. dimasukkan pada *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran. Diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam.
8. *Microplate* dicuci dengan PBS-Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
9. Substrat *p*-NPP dalam dietanolamin 10 % dimasukkan pada *microplate* masing-masing sebanyak 50 μ l tiap sumuran. Diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap.
10. Ditambahkan NaOH 3M (*stop reaction*) sebanyak 50 μ l tiap sumuran.
11. Dibaca menggunakan ELISA reader dengan panjang gelombang 405 nm.

Pemeriksaan IgG anti-MMA pada kelinci lokal dengan teknik ELISA tidak langsung. Dilakukan pemeriksaan ELISA IgG anti-MMA pada serum kelinci A, B, C, D, dan kontrol yang diambil pada hari ke-28 dengan pengenceran serum 1/10, 1/20, 1/40, dan 1/80 untuk mencari pengenceran serum optimal. Dilakukan pemeriksaan ELISA IgG anti-MMA serum kelinci C dan kontrol yang diambil pada hari ke- 28, 35, 42, 49, 66, 73, 80, dan 87 dengan pengenceran serum 1/20.

4.6 Prosedur Pengambilan Dan Pengumpulan Data Penelitian Tahap II

4.6.1 Pengambilan serum dan plasma darah penderita

a. Alat yang diperlukan :

1. Disposable spuit 5 ml.
2. Tabung heparin 5 ml.
3. Sentrifuge.
4. Ependorf

b. Teknik pengambilan serum dan plasma darah :

Pengambilan darah dilakukan segera setelah ditemukan gejala klinik, yang muncul pada hari ke-10 sampai ke-14 setelah terpapar MMA. Darah diambil sebanyak 5 ml dari vena cubiti. Dua ml darah ditampung dalam tabung dan dibiarkan 15 menit sehingga serum terpisah. Darah disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Serum yang terbentuk dituang ke dalam ependorf dan diberi label. Serum disimpan pada suhu -20°C sampai saat dilakukan uji ELISA tidak langsung untuk pemeriksaan IgG dan IgE spesifik terhadap MMA serta uji *dot blot* untuk IgG spesifik terhadap MMA.

Darah sebanyak 3 ml ditampung dalam tabung heparin dan digoyangkan. Darah disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Plasma yang terbentuk dituang ke dalam ependorf dan diberi label. Plasma disimpan pada suhu -20°C sampai saat dilakukan uji *direct sandwich* ELISA untuk pemeriksaan IL-4, IFN- γ , dan TNF- α .

4.6.2 Pengambilan kerokan jaringan mukosa mulut

a. Alat yang diperlukan :

1. Spatula tumpul.
2. Ependorf.

b. Bahan yang diperlukan :

1. Alkohol 70%.
2. PBS satu kali.
3. Bahan antiseptik (Betadin dan alkohol).
4. Anastesi topikal.

c. Teknik pengambilan kerokan jaringan :

Teknik pengambilan mukosa mulut dilakukan dengan modifikasi metoda Zehnder *et al.* (1999) dan Bickel *et al.* (1996), dengan cara sebagai berikut :

1. Mula-mula mulut penderita dibuka dan ditahan dengan *mouth holder*.
2. Setelah itu dilakukan pengerokan jaringan epitel mukosa mulut lapis demi lapis secara perlahan, tidak sampai timbul perdarahan (lebih kurang 400 μm). Hal ini disebabkan karena tebal epitel mukosa mulut 500-600 μm , sehingga kerokan tersebut tidak merusak lamina propria (membrana basalis). Pengambilan jaringan dilakukan seluas permukaan jaringan yang mengalami peradangan.
3. Hasil kerokan ditimbang kemudian diambil 100 mg jaringan mukosa mulut.

4. Hasil kerokan yang telah ditimbang, dikoleksi dan dimasukkan ke dalam tabung yang sudah berisi PBS 1 % sebanyak 2 ml, kemudian ditambah 0,1 % PBS-Na Azida.
5. Sampel disimpan dalam suhu -20° C sampai saat akan dilakukan pemeriksaan laboratorik.

4.6.3 Pembuatan sediaan hapusan mukosa rongga mulut

a. Bahan yang diperlukan :

1. Metanol.
2. Alkohol 100 %, 96 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 %.
3. Mayer hemaktoksin.
4. Eosin.
5. Entelan.

b. Alat yang diperlukan :

1. Gelas obyek.
2. Gelas penutup.
3. Mikroskop cahaya.

c. Teknik pembuatan sediaan :

Dibuat sediaan histopatologi dari kerokan jaringan mukosa mulut dengan pewarnaan hematoksin eosin (HE). Dibuat hapusan jaringan mukosa mulut pada gelas obyek, dan diangin-anginkan selama 30 menit.

Kemudian difiksasi dengan metanol selama 10 menit. Dianginkan kembali selama 30 menit dan disimpan pada suhu 4^oC sampai siap diwarnai.

Pewarnaan HE dilakukan dengan modifikasi cara Allen (1994). Teknik pewarnaan HE pada sediaan hapusan jaringan mukosa mulut adalah sebagai berikut :

1. Dilakukan rehidrasi dengan menggunakan alkohol bertingkat (100 %, 96 %, 85 %, 70 %, 50 %, 30 %) selama masing-masing 10 menit.
2. Sediaan diinkubasi ke dalam Mayer hematoksilin selama 5 menit.
3. Sediaan dicuci dengan air kran yang mengalir selama 10 menit dan dibilas dengan air destilasi.
4. Dilakukan dehidrasi dengan alkohol bertingkat (30 %, 50 %, 70 %) selama masing-masing 5 menit.
5. Sediaan diinkubasi ke dalam eosin selama 3 menit dan dibilas dengan alkohol 30 % selama 3 menit.
6. Sediaan dicuci dengan air destilasi dan dikeringkan dengan dianginkan.
7. Sediaan di-*mounting* dengan entelan.
8. Sediaan diamati di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 200 kali dan 400 kali.

4.6.4 Deteksi IgG anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan Teknik *Dot Blot*

a. Bahan yang diperlukan :

1. PBS skim milk 5 % dan 1 % (*blocking buffer*).
2. Serum penderita yang mengandung antibodi anti-MMA dalam PBS Skim 1 % : 1/50.
3. 0,05 % PBS-Tween 20.
4. *Horse Radish Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to human IgG* dalam PBS : 1/2500.
5. Antigen MMA dalam PBS skim 5 % : 1/50.
6. Subtrat *Tetra Methyl Benzedyne* (TMB).

b. Alat yang diperlukan :

1. Membran nitroselulose (NC).
2. *Dot Blotter* aparat.

c. Pemeriksaan IgG anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan teknik *dot blot* :

Pemeriksaan IgG anti MMA dengan teknik *dot blot* dilakukan dengan modifikasi metoda De Maio (1994). Tahapan yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Antigen dalam *blocking buffer* PBS skim milk 5 % dengan pengenceran 1/50 ditotolkan pada membran NC yang dirangkaikan pada *dot blotter* dan dibiarkan selama 30 menit.
2. Dicuci tiga kali dengan PBS Tween 20.

3. Diberi serum penderita yang mengandung antibodi anti-MMA dengan pengenceran 1/50 dan diinkubasi selama 2 jam
4. Dicuci dengan PBS Tween 20 tiga kali.
5. Diberi antibodi sekunder *Horse Radish Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to human IgG* yang diencerkan dengan PBS dengan perbandingan 1 : 2500 dan diinkubasi 30 menit
6. Ditambah substrat TMB dan diinkubasi selama 30 menit dalam ruang gelap.
7. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi merah.

4.6.5 Deteksi IgG dan IgE anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan teknik ELISA tidak langsung

a. Bahan yang diperlukan :

1. Antigen (MMA, Merck)
Untuk *coating*, MMA dilarutkan dalam bufer bikarbonat (*coating buffer*) dengan pengenceran 1/50.
2. *Coating buffer* pH 9,6.
Coating buffer mengandung : 0,159 gr Na_2CO_3 , 0,293 gr Na H CO_3 , 0,02 gr NaN_3 dilarutkan dalam aquadest steril sampai 100 ml pada pH 9,6. Disimpan dalam suhu ruang.
3. *Blocking buffer* BSA 1 % (BSA 1% dalam PBS)
Ditimbang 0,04 gr BSA dilarutkan dalam 4 ml PBS. Siap untuk *blocking*. Membuat stok PBS 1 liter mengandung NaCl , KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KCl , NaN_3 ditambah aquadest sampai 1 liter. Digunakan untuk mengencerkan antibodi primer.

4. PBS-Tween 20.

Tween-20 dengan pengenceran 0,05 %. digunakan untuk setiap tahap pencucian.

5. *Tris Buffer Saline* (TBS).

Untuk mengencerkan antibodi sekunder digunakan TBS.

6. Antibodi primer (serum sampel).

Antibodi primer dari serum sampel dilarutkan ke dalam *blocking buffer* -BSA 1% dengan pengenceran 1/50.

7. Macam antibodi sekunder yang diperlukan yaitu :

a. *Horse Radish Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to human IgG (whole molecule)* (Catalog #: 55220, ICN Pharmaceuticals, Inc).

b. *Horse Radish Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to human IgE (ε chain)* (Catalog #: 55218, ICN Pharmaceuticals, Inc).

8. Substrat *Tetra Methyl Benzidine* (TMB).

TMB mengandung : dietanolamin 2,425 ml, aquades 20 ml, Na₂SO₄ 0,005 gr, Mg Cl₂ 6H₂O 0,0025 gr. Disimpan dalam botol coklat dan dibungkus aluminium foil oleh karena tidak tahan sinar ultraviolet.

Antibodi sekunder berlabel HRP dilarutkan dalam TBS 1/2500

9. NaOH 3 M pH 9,8 (*stop reaction*).

Mula-mula ditimbang NaOH sebanyak 6 gram kemudian dilarutkan dalam 50 ml aquades, maka diperoleh NaOH 3 M.

b. Alat yang diperlukan :

1. ELISA plate 96 well (Nunc).
2. Kertas absorban.
3. Mikropipet.
4. *Yellow tips* dan *blue tips*.
5. Ependorf.
6. ELISA reader sistem BIO-RAD pada 450 nm.

c. Pemeriksaan IgG dan IgE spesifik terhadap MMA dengan teknik ELISA tidak langsung :

Pemeriksaan IgG anti-MMA dengan teknik ELISA tidak langsung dilakukan dengan modifikasi metoda Crowther (1995).

Pertama-tama dilakukan *checker board* untuk menentukan pengenceran serum paling optimal untuk pemeriksaan. Diukur pada panjang gelombang 450 nm berdasarkan nilai absorbansi (lihat Lampiran 8 dan 10).

Tahapan pemeriksaan IgG dan IgE spesifik terhadap MMA adalah sebagai berikut :

1. Antigen MMA dilarutkan dalam bufer karbonat-bikarbonat (*coating buffer*) dengan pengenceran 1/50, dan dimasukkan dalam *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, selanjutnya diinkubasi pada suhu 4° C selama satu malam.
2. *Microplate* dicuci dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.

3. *Blocking buffer* dimasukkan pada *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam.
4. *Microplate* dicuci kembali dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
5. Serum penderita dilarutkan dalam *blocking buffer* BSA 1% dengan pengenceran 1/50, dimasukkan dalam *microplate* masing-masing 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 2 jam.
6. *Microplate* dicuci dengan PBS Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
7. Antibodi *Horse Radish Peroxidase-conjugated goat IgG fraction to human IgG* untuk IgG spesifik (IgE untuk IgE spesifik) dilarutkan dalam TBS dengan pengenceran 1/2500, dimasukkan pada *microplate* sebanyak 50 μ l tiap sumuran, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama satu jam.
8. *Microplate* dicuci dengan PBS-Tween-20 sebanyak 4 kali masing-masing 3 menit.
9. Substrat *p-NPP* dalam dietanolamin 10 % dimasukkan pada *microplate* masing-masing sebanyak 50 μ l tiap sumuran. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit dalam ruang gelap.
10. Ditambahkan NaOH 3M (*stop reaction*) sebanyak 50 μ l tiap sumuran.
11. Setelah itu diukur nilai absorbansi dengan menggunakan ELISA reader pada panjang gelombang 450 nm.

12. Nilai positif IgG dan IgE spesifik terhadap MMA, apabila nilai absorbansi yang diperoleh dua kali atau lebih dari rerata nilai absorbansi kontrol.

4.6.6 Deteksi konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita dengan teknik *direct sandwich* ELISA

a. Alat yang diperlukan :

1. ELISA plate (Nunc).
2. Kertas absorban.
3. Mikropipet.
4. *Yellow tip* dan *blue tip*.
5. Ependorf.

b. Bahan yang diperlukan :

1. Plasma darah dan kerokan jaringan mukosa mulut.
2. Kit : human IL-4 ELISA (Cat no. BMS225/2, Bender Medsystems).
3. Kit : human IFN- γ ELISA (Cat no. BMS225/2, Bender Medsystems).
Setiap Kit berisi : Wash Buffer, Sample Dilluent, Biotin-Conjugate , Streptavidin-HRP, TMB Subtrate Solution, dan Stop Solution.
4. Kit : human TNF- α ELISA (Cat no. BMS225/2, Bender Medsystems).

c. Pemeriksaan konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut dengan teknik *direct sandwich* ELISA :

Tahapan dan cara kerja pemeriksaan konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut dengan teknik *direct sandwich* ELISA dilakukan sesuai prosedur Kit (Bender Medsystems) dapat dilihat pada Lampiran 13, 14, dan 15.

Dibuat kurva standar setiap sitokin dan diperoleh nilai absorbansi yang diukur pada panjang gelombang 450 nm untuk setiap konsentrasi sitokin yang sudah ditentukan (kit). Berdasarkan kurva standar dapat ditentukan konsentrasi sitokin dalam pg/ml penderita terpapar MMA maupun penderita kontrol.

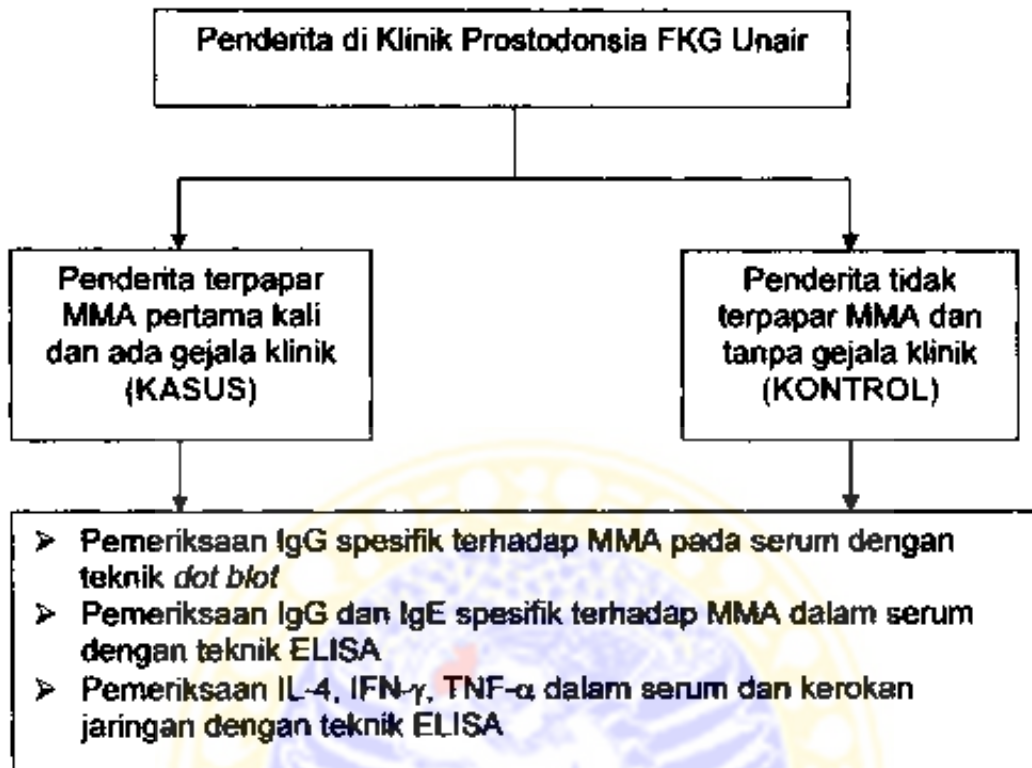
4.7 Cara Analisis Data

Dilakukan penghitungan rerata dan simpang baku data hasil pengukuran konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan kerokan jaringan mukosa, yang dilanjutkan dengan uji normalitas.

Untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa antara penderita terpapar MMA dan kontrol, dilakukan uji t bebas.

Untuk mengetahui apakah terdapat korelasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α antara plasma dan jaringan mukosa penderita terpapar MMA, dilakukan uji korelasi Pearson.

4.8.2 Kerangka operasional penelitian Tahap II



Gambar 4.4 Kerangka operasional penelitian Tahap II

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Bagian ini memuat hasil penelitian dan analisis data hasil penelitian yang disajikan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang disusun sesuai rancangan pelaksanaan penelitian yang terdiri dari Tahap I dan Tahap II.

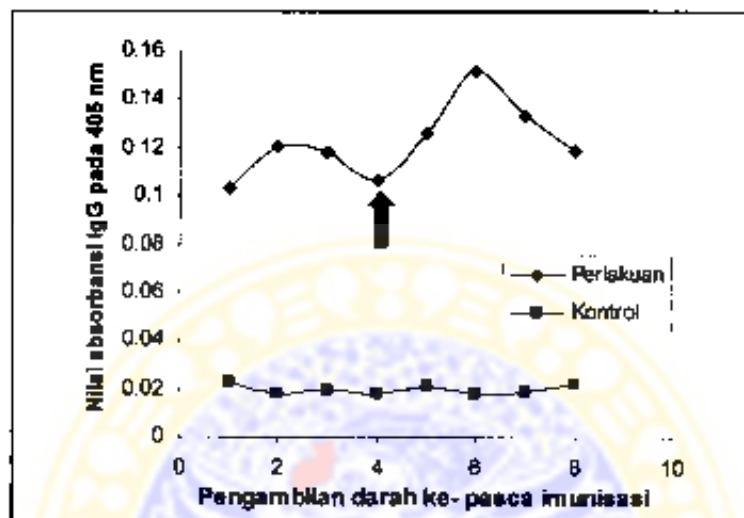
5.1 Hasil Penelitian Tahap I

5.1.1 Hasil deteksi IgG anti-MMA hasil induksi MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) dengan teknik *dot blot*

Imunoglobulin G anti-MMA pada kelinci lokal yang diinduksi dengan MMA, dideteksi dengan teknik *dot blot*. Gambar 5.1 menunjukkan hasil reaksi hibridisasi antara MMA dengan IgG anti-MMA kelinci lokal yang diinduksi dengan MMA. Hasil positif ditandai dengan perubahan warna biru pada membran NC.

Gambar 5.1 menunjukkan imunisasi dengan variasi dosis dan pelarut tidak menyebabkan perbedaan nyata dalam gradasi warna hasil reaksi hibridisasi *dot blot* pada keempat kelinci lokal. Pengenceran 1/100 serum kelinci lokal yang mengandung IgG anti-MMA menunjukkan gradasi warna biru yang lebih tajam bila dibandingkan dengan pengenceran serum 1/200.

ke-3 (*booster 2*) nilai absorbansi IgG anti-MMA lebih tinggi dibandingkan dengan pasca imunisasi 2 (*booster 1*). Imunisasi ke-3 dilakukan pada saat produksi IgG mulai menurun yaitu pada hari ke-52 pasca imunisasi pertama.



Gambar 5.3 Nilai absorbansi IgG Anti-MMA kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*) yang diinduksi MMA

Keterangan : ↑ dilakukan *booster*

Gambar 5.3 menggambarkan bahwa pada hari ke-42 pasca imunisasi pertama IgG anti-MMA mencapai titer tertinggi dan mulai menurun sampai hari ke-49. Selanjutnya dilakukan *booster 2* yang ditunjukkan dengan panah merah. IgG anti-MMA mengalami kenaikan secara gradual dan mencapai puncak pada hari ke-80 pasca imunisasi pertama.

5.1.3 Pola respons imun sekunder IgG anti-MMA pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*), yang diimunisasi dengan MMA

Hasil penelitian menunjukkan bahwa MMA mampu menginduksi produksi IgG anti-MMA pada kelinci lokal yang dapat dideteksi dengan teknik *dot blot* dan ELISA. Pola respons imun sekunder pada kelinci lokal yang diimunisasi dengan MMA menunjukkan terjadi peningkatan produksi IgG anti-MMA setelah pemberian *booster* 1 (hari ke-28) dan mencapai puncak pada hari ke-42 dan mulai menurun sampai hari ke-49. Setelah pemberian *booster* 2 pada hari ke-52, terjadi peningkatan produksi IgG spesifik terhadap MMA yang mencapai puncak pada hari ke-80 setelah imunisasi pertama. Titer IgG anti-MMA kemudian mulai menurun secara bertahap sampai hari ke-87. Puncak produksi IgG anti-MMA setelah pemberian *booster* 2 lebih tinggi bila dibandingkan dengan setelah pemberian *booster* 1.

5.2 Hasil Penelitian Tahap II

5.2.1 Hasil identifikasi kasus penderita terpapar MMA dengan gejala inflamasi di mukosa mulut

Hasil anamnesa penderita terpapar MMA yang menunjukkan gejala klinik inflamasi lokal pada mukosa mulut 10 sampai 14 hari setelah paparan menyatakan semua penderita tidak memiliki penyakit lain dan dalam kondisi sehat. Hal ini mengindikasikan bahwa semua sampel mempunyai sistem imun dalam batas normal.

Beberapa gejala klinik yang berhasil diidentifikasi sebagai gejala inflamasi mukosa mulut pada penderita terpapar MMA, yaitu edematus,

hiperemia mukosa, *burning mouth*, serta ulkus, yang dapat dilihat pada Gambar 5.4 sampai 5.8.



Gambar 5. 4 Edematus dan hiperemia mukosa mulut disertai *burning mouth*

Keterangan : → edematus dan hiperemia

Gambaran mukosa yang mengalami proses peradangan lokal berupa edematus dan hiperemia disertai *burning mouth* dapat dilihat pada Gambar 5.4 dan 5.5.



Gambar 5.5 Edematus dan hiperemia mukosa mulut disertai *burning mouth*

Keterangan : → edematus dan hiperemia

Gambaran lain dari reaksi inflamasi mukosa mulut berupa ulkus yang disertai hiperemia dapat dilihat pada Gambar 5.6.



Gambar 5.6 Ulkus disertai hiperemia mukosa mulut

Keterangan : → ulkus mukosa mulut

Gambaran vesikula mukosa mulut yang disertai rasa *burning mouth* pada proses peradangan lokal dapat dilihat pada Gambar 5.7.



Gambar 5.7 Vesikula mukosa mulut disertai rasa *burning mouth*

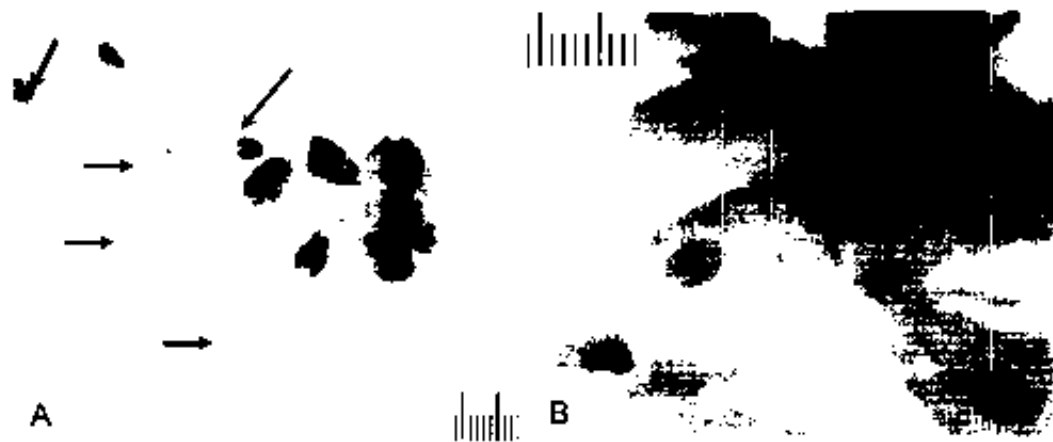
Keterangan : vesikula

Gambaran mukosa mulut normal dapat dilihat pada Gambar 5.8.



Gambar 5.8 Mukosa mulut normal

Gambaran histopatologi hapusan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA yang mengalami peradangan dengan pewarnaan hemaktosilin eosin (HE), dapat dilihat pada Gambar 5.9 A. Dalam gambaran histopatologi tersebut nampak infiltrasi sel radang, misalnya PMN, limfosit, dan makrofag. Gambaran histopatologi hapusan mukosa mulut normal dengan pewarnaan HE tidak nampak adanya infiltrasi sel radang (lihat Gambar 5.9 B).

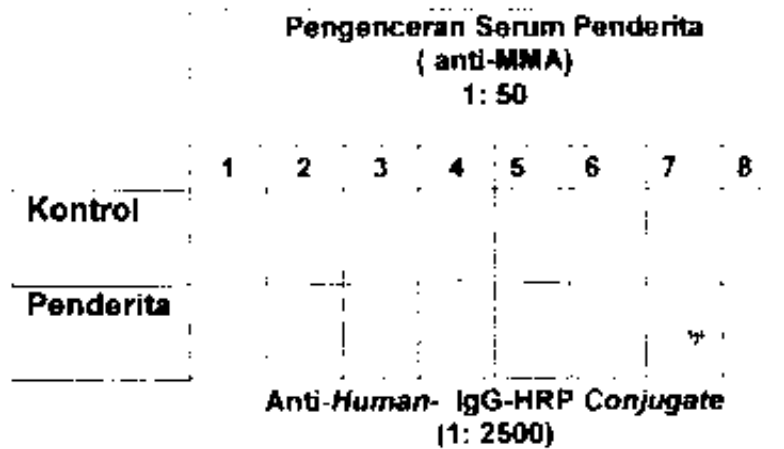


Gambar 5.9 A. Gambaran histopatologi hapusan mukosa mulut yang mengalami inflamasi dengan pewarnaan HE. Tampak sel radang PMN, limfosit, dan makrofag
 B. Gambaran histopatologi hapusan mukosa mulut normal dengan pewarnaan HE. Tidak tampak sel radang.

Keterangan : → sel PMN
 → sel epitel mukosa mulut
 → makrofag
 → limfosit
 1 skala = 2 μ m

5.2.2 Hasil deteksi IgG spesifik anti-MMA pada penderita terpapar MMA dengan teknik *dot blot*

Deteksi IgG anti-MMA juga dilakukan pada penderita terpapar MMA dengan teknik *dot blot*. Hasil *dot blot* menunjukkan bahwa semua serum yang berasal dari penderita terpapar MMA, menunjukkan hasil positif warna merah (Gambar 5.10). Hal ini menunjukkan bahwa di dalam serum sampel penderita terpapar MMA mengandung IgG anti-MMA.



Gambar 5.10 Hasil *dot blot* IgG anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA

Keterangan : positif warna merah pada membran NC, Antigen 1/50

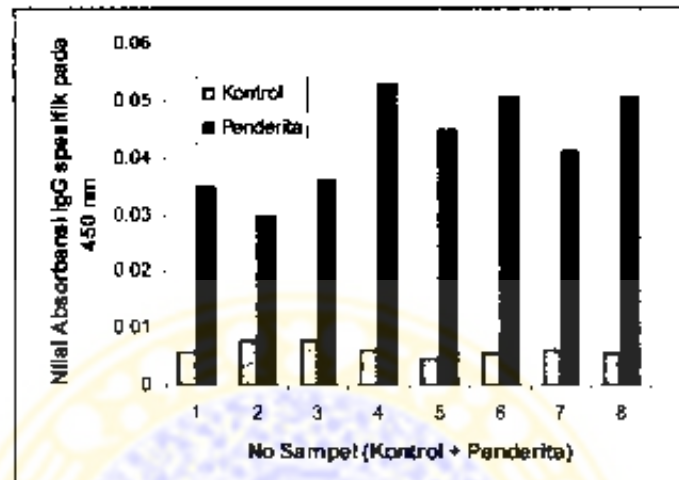
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral yang dapat dideteksi dengan teknik *dot blot*.

5.2.3 Hasil deteksi IgG spesifik terhadap MMA pada serum penderita terpapar MMA dengan teknik ELISA tidak langsung

Deteksi IgG spesifik terhadap MMA pada serum penderita terpapar MMA yang dikumpulkan dari 8 penderita, dilakukan dengan teknik ELISA tidak langsung.

Hasil pemeriksaan nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA dapat dilihat dalam Gambar 5.11. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa penderita yang terpapar MMA mempunyai nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA lebih besar daripada penderita kontrol. Nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA

dari 8 penderita terpapar MMA bervariasi dari 0,0350 - 0,0360 (Gambar 5.11 dan Tabel 5.2).



Gambar 5.11 Nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol

Keterangan : Pengenceran serum 1: 50

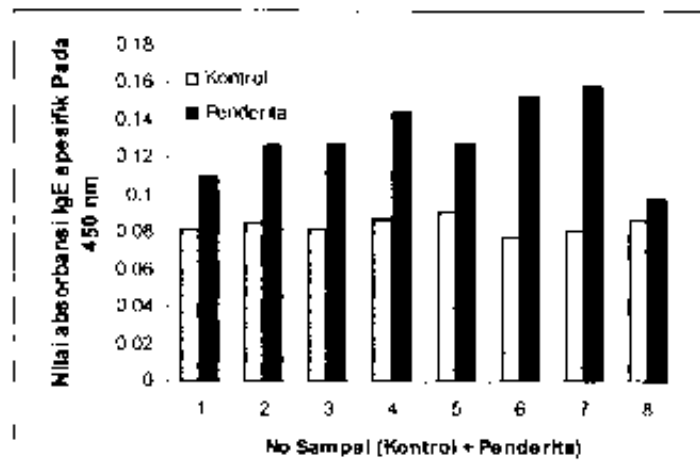
Rerata nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA pada kontrol adalah 0,01. Nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA untuk masing-masing kontrol dapat dilihat dalam Lampiran 9. Hasil positif untuk IgG spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA adalah dua kali rerata nilai absorbansi kontrol. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa semua penderita terpapar MMA mempunyai hasil positif untuk IgG spesifik terhadap MMA (Tabel 5.1).

Tabel 5.1 Nilai absorbansi IgG spesifik terhadap MMA penderita terpapar MMA

No	Nilai absorbansi IgG spesifik penderita pada 450 nm	Rerata kontrol	Batas nilai Positif	Penderita Pos/Neg
1	0,0350	0,01	0,02	Pos
2	0,0300	0,01	0,02	Pos
3	0,0360	0,01	0,02	Pos
4	0,0530	0,01	0,02	Pos
5	0,0450	0,01	0,02	Pos
6	0,0510	0,01	0,02	Pos
7	0,0410	0,01	0,02	Pos
8	0,0510	0,01	0,02	Pos

5.2.4 Hasil deteksi IgE spesifik terhadap MMA penderita terpapar MMA dengan teknik ELISA tidak langsung

Hasil pemeriksaan nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 5.12. Nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA untuk masing-masing kontrol dapat dilihat dalam Lampiran 11. Nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA dari 8 penderita bervariasi antara 0,0991 - 0,1590. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa penderita terpapar MMA mempunyai nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA lebih besar daripada kontrol.



Gambar 5.12 Nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol

Keterangan : Pengenceran serum 1/50

Penjabaran secara rinci hasil nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA penderita terpapar MMA dapat dilihat dalam Tabel 5.2.

Tabel 5.2 Nilai absorbansi IgE spesifik penderita terpapar MMA

No	Nilai absorbansi IgE spesifik penderita pada 450 nm	Rerata kontrol	Batas nilai Positif	Penderita Pos/Neg
1	0,1110	0,13	0,26	Neg
2	0,1270	0,13	0,26	Neg
3	0,1280	0,13	0,26	Neg
4	0,1450	0,13	0,26	Neg
5	0,1280	0,13	0,26	Neg
6	0,1540	0,13	0,26	Neg
7	0,1590	0,13	0,26	Neg
8	0,0991	0,13	0,26	Neg

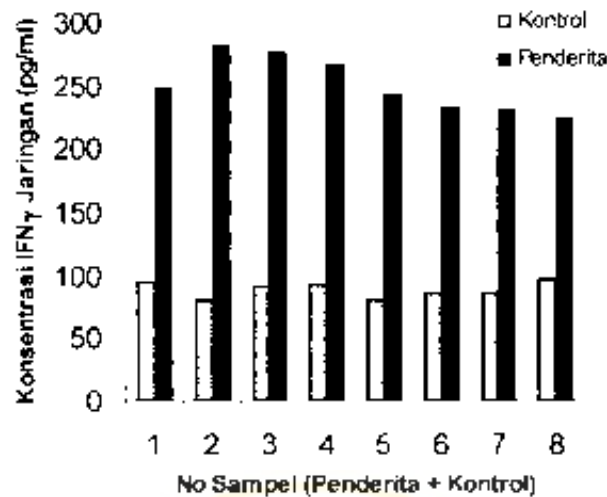
Rerata nilai absorbansi IgE spesifik terhadap MMA pada kontrol adalah 0,13. Hasil positif untuk IgE spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA adalah dua kali rerata nilai absorbansi kontrol. Hasil yang didapat menunjukkan bahwa semua penderita terpapar MMA mempunyai hasil negatif untuk IgE spesifik terhadap MMA.

5.2.5 Hasil deteksi konsentrasi IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA

Hasil pemeriksaan IL-4 penderita terpapar MMA dapat dilihat pada Tabel 5.3, Gambar 5.13 dan 5.14. Hasil pemeriksaan IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA lebih tinggi daripada kontrol (Tabel 5.3).

Pemeriksaan IL-4 didahului dengan penentuan kurva standar sehingga diperoleh persamaan garis $y = 0,0023 x$. Rumus persamaan garis tersebut dipakai untuk mengukur konsentrasi IL-4 kelompok penderita terpapar MMA maupun kontrol (Lampiran12).

Konsentrasi IL-4 yang berasal dari kerokan jaringan mukosa mulut lebih tinggi bila dibandingkan dengan plasma penderita terpapar MMA. Konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut berkisar antara 189,13 – 253,04 pg/ml, sedangkan konsentrasi IL-4 plasma penderita terpapar MMA berkisar antara 58,70 – 83,48 pg/ml (Tabel 5.3).



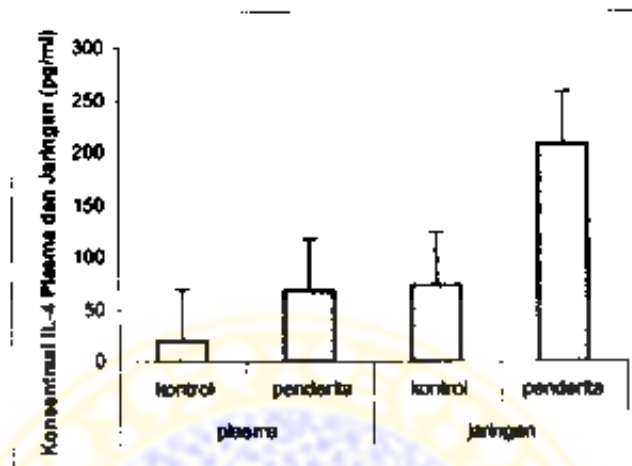
Gambar 5.14 Konsentrasi IL-4 (pg/ml) jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

Hasil analisis deskriptif nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.4. Rerata konsentrasi IL-4 dalam plasma dan jaringan mukosa penderita terpapar MMA lebih tinggi dibanding dengan kontrol. Konsentrasi IL-4 pada jaringan mukosa mulut lebih tinggi dibanding dengan plasma, baik pada penderita terpapar MMA maupun kontrol.

Tabel 5.4 Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

	Kelompok	Rerata (pg/ml)	Simpang baku (pg/ml)	n
Konsentrasi IL-4 Plasma	Kontrol	20,32	5,18	8
	Penderita	67,30	10,46	8
Konsentrasi IL-4 Jaringan	Kontrol	73,59	6,79	8
	Penderita	208,97	20,00	8

Visualisasi nilai rerata dan simpang baku untuk konsentrasi IL-4 dapat dilihat pada Gambar 5.15.



Gambar 5.15 Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IL-4 (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

5.2.6 Hasil deteksi konsentrasi IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA

Hasil pemeriksaan IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.5, Gambar 5.16 dan 5.17. Konsentrasi IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut lebih tinggi pada penderita terpapar MMA daripada kontrol.

Pemeriksaan IFN- γ didahului dengan penentuan kurva standar dengan persamaan garis $y = 0,0021 x$. Persamaan ini dipakai untuk mengukur konsentrasi IFN- γ kelompok penderita terpapar MMA maupun kontrol (Lampiran12).

Tabel 5.5 Konsentrasi IFN- γ (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

No.	Plasma		Jaringan Mukosa Mulut	
	Kontrol	Penderita	Kontrol	Penderita
1	54,76	84,76	94,29	248,57
2	52,38	81,83	80,00	282,86
3	55,24	95,71	91,90	275,71
4	53,33	94,29	93,33	266,67
5	52,86	82,86	80,00	242,86
6	57,17	80,48	86,67	233,33
7	53,81	78,10	87,62	232,38
8	50,00	79,05	98,57	223,81

Konsentrasi IFN- γ yang berasal dari kerokan jaringan mukosa mulut lebih tinggi bila dibandingkan dengan plasma penderita terpapar MMA. Konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA berkisar antara 223,81 – 282,86 pg/ml, sedangkan konsentrasi IFN- γ plasma penderita terpapar MMA berkisar antara 78,10 – 95,71 pg/ml (Tabel 5.5).

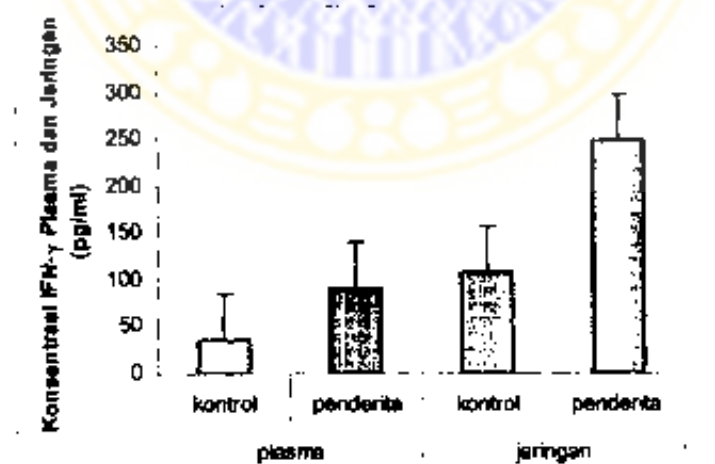
Pada kelompok kontrol konsentrasi IFN- γ yang berasal dari kerokan jaringan mukosa mulut lebih tinggi bila dibandingkan dengan plasma. Konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut kelompok kontrol berkisar antara 80,00 – 98,57 pg/ml, sedangkan konsentrasi IFN- γ plasma kontrol berkisar antara 50,00 - 57,17 pg/ml (Tabel 5.5)

dibanding dengan kontrol. Konsentrasi IFN- γ pada jaringan mukosa mulut lebih tinggi dibanding dengan plasma, baik pada penderita terpapar MMA maupun kontrol.

Tabel 5.6 Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

	Kelompok	Rerata (pg/ml)	Simpang baku (pg/ml)	n
Konsentrasi IFN- γ Plasma	Kontrol	35,52	2,93	8
	Penderita	90,77	20,46	8
Konsentrasi IFN- γ Jaringan	Kontrol	107,51	3,91	8
	Penderita	247,95	18,43	8

Visualisasi nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 5.18.



Gambar 5.18 Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi IFN- γ (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

5.2.7 Hasil deteksi konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA

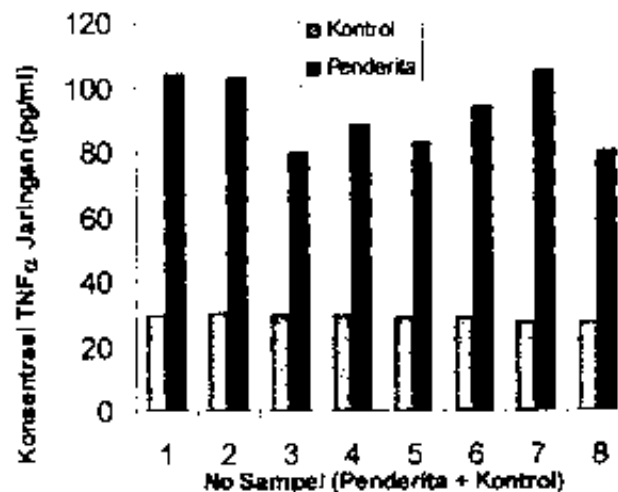
Hasil pemeriksaan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.7, Gambar 5.19 dan 5.20. Konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut lebih tinggi pada penderita terpapar MMA daripada kontrol.

Pemeriksaan TNF- α didahului dengan penentuan kurva standar yang menghasilkan persamaan garis $y = 0,0025 x$. Rumus persamaan garis tersebut dipakai untuk mengukur konsentrasi TNF- α (pg/ml) sampel penderita terpapar MMA maupun kontrol (Lampiran 12).

Nilai konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dijabarkan dalam Tabel 5.7.

Tabel 5.7 Konsentrasi TNF- α (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

No.	Plasma		Jaringan Mukosa Mulut	
	Kontrol	Penderita	Kontrol	Penderita
1	11,30	23,67	29,47	103,85
2	9,16	23,98	29,93	102,93
3	9,93	23,67	29,32	80,18
4	11,94	24,43	29,78	88,42
5	10,59	28,41	28,71	83,38
6	10,38	29,17	29,02	93,92
7	9,16	28,41	27,49	105,53
8	9,16	28,86	27,95	80,79



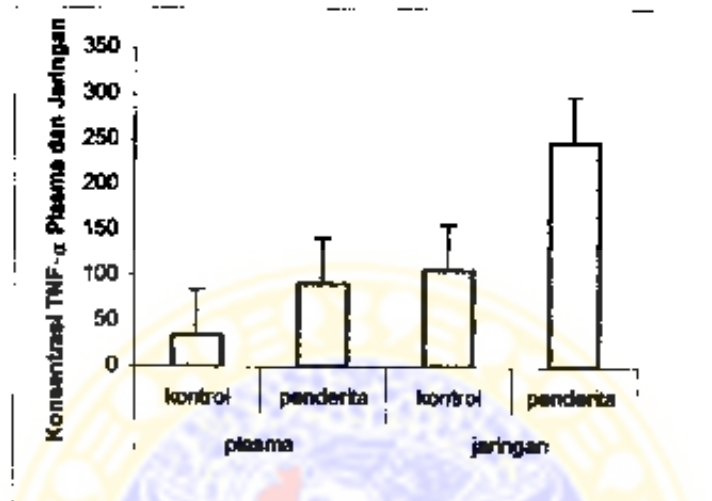
Gambar 5.20 Konsentrasi TNF- α (pg/ml) jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

Hasil analisis deskriptif nilai rerata dan simpang baku konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.8. Rerata konsentrasi TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa penderita terpapar MMA lebih tinggi dibanding dengan kontrol. Konsentrasi TNF- α pada jaringan mukosa mulut lebih tinggi dibanding dengan plasma, baik pada penderita terpapar MMA maupun kontrol.

Tabel 5.8 Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

	Kelompok	Rerata (pg/ml)	Simpang baku (pg/ml)	n
Konsentrasi TNF- α Plasma	Kontrol	35,52	2,92	8
	Penderita	90,77	20,45	8
Konsentrasi TNF- α Jaringan	Kontrol	107,51	3,91	8
	Penderita	247,95	18,43	8

Visualisasi nilai rerata dan simpang baku konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Gambar 5.21.



Gambar 5.21 Nilai rerata dan simpang baku konsentrasi TNF- α (pg/ml) plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol

5.3 Hasil Uji Normalitas Variabel IL-4, IFN- γ , TNF- α Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA dan Kontrol

Sebelum dilakukan analisis statistik parametrik variabel IL-4, IFN- γ , dan TNF- α , terlebih dahulu dilakukan uji normalitas data. Hasil uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* menunjukkan bahwa IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA dan kontrol berdistribusi normal ($p > 0,05$). Hasil lengkapnya dapat dilihat pada Tabel 5.9.

Tabel 5.9 Hasil uji normalitas data dengan uji *Kolmogorov Smirnov*

	Plasma IL-4	Jaringan IL-4	Plasma IFN- γ	Jaringan IFN- γ	Plasma TNF- α	Jaringan TNF- α
Rerata	43,81 pg/ml	141,27 pg/ml	63,15 pg/ml	177,73 pg/ml	63,15 pg/ml	177,73 pg/ml
Simpang baku	25,53 pg/ml	71,38 pg/ml	31,83 pg/ml	73,65 pg/ml	31,83 pg/ml	73,65 pg/ml
p	0,19	0,14	0,19	0,08	0,19	0,08

Keterangan: $p > 0,05$ tidak signifikan, sehingga data berdistribusi normal

5.4 Hasil Analisis Uji t Bebas Untuk Variabel IL-4, IFN- γ , Dan TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Antara Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut dibandingkan antara penderita terpapar MMA dan kontrol, dengan menggunakan uji t bebas. Hal ini disebabkan karena data berskala rasio dan berdistribusi normal (Tabel 5.9).

5.4.1 Hasil analisis uji t bebas untuk variabel IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol

Hasil uji t bebas untuk variabel IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut, menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara penderita terpapar MMA dan kontrol. Hasil uji t bebas tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.10

Tabel 5.10 Hasil uji t bebas untuk variabel IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol

	Plasma		Jaringan	
	Kontrol	Terpapar	Kontrol	Terpapar
Rerata	20,32	67,30	73,59	208,97
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
Simpang baku	5,18	10,46	6,79	20,00
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
t hitung	11,379		18,123	
p	0,01 *		0,01 *	

Keterangan : signifikan bila $p < 0,05$

* = signifikan

5.4.2 Hasil analisis uji t bebas untuk variabel IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol

Hasil uji t bebas untuk variabel IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut, menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara penderita terpapar MMA dan kontrol. Hasil uji t bebas tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.11.

Tabel 5.11 Hasil uji t bebas untuk variabel IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol

	Plasma		Jaringan	
	Kontrol	Terpapar	Kontrol	Terpapar
Rerata	35,52	90,77	107,51	247,95
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
Simpang baku	2,93	20,46	3,91	18,43
	pg/ml	pg/ml	pg/ml	pg/ml
t hitung	12,378		20,012	
p	0,01 *		0,01 *	

Keterangan : signifikan bila $p < 0,05$

* = signifikan

5.4.3 Hasil analisis uji t bebas untuk variabel TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol

Hasil uji t bebas untuk variabel TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut, menunjukkan terdapat perbedaan bermakna ($p < 0,05$) antara penderita terpapar MMA dan kontrol. Hasil uji t bebas tersebut dapat dilihat pada Tabel 5.12

Tabel 5.12 Hasil uji t bebas untuk variabel TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut antara penderita terpapar MMA dan kontrol

	Plasma		Jaringan	
	Kontrol	Terpapar	Kontrol	Terpapar
Rerata	35,52 pg/ml	90,77 pg/ml	107,51 pg/ml	247,95 pg/ml
Simpang baku	2,92 pg/ml	20,45 pg/ml	3,91 pg/ml	18,43 pg/ml
t hitung	16,371		16,744	
p	0,01 *		0,01 *	

Keterangan: signifikan bila $p < 0,05$

* = signifikan

5.4.4 Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi

Apabila kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi iritasi, maka akan terjadi peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) TNF- α tanpa disertai peningkatan yang bermakna ($p > 0,05$) IL-4 dan IFN- γ pada plasma maupun jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA.

Hasil yang diperoleh penelitian ini, menunjukkan terjadi peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) IL-4, IFN- γ , TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA (Tabel 5.4, 5.6, 5.8, 5.10.

5.11, 5.12). Hal ini membuktikan bahwa kerusakan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi intasi.

5.4.5 Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I

Hasil penelitian yang diperoleh menunjukkan bahwa IgE spesifik terhadap MMA pada penderita terpapar MMA adalah negatif (Tabel 5.2). Konsentrasi IL-4 dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA meningkat secara bermakna ($p < 0,05$) (Tabel 5.4 dan 5.10).

Peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) IL-4 dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA, tidak disertai hasil positif IgE spesifik terhadap MMA. Hal ini menunjukkan bahwa kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I yang diperantarai oleh IgE spesifik.

5.4.6 Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III

Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III. Hal ini dibuktikan dengan terdapat hasil positif IgG spesifik terhadap MMA (Tabel 5.1) dan peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) IFN- γ plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA (Tabel 5.6 dan 5.11).

5.4.7 Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV

Penelitian ini membuktikan bahwa kerusakan jaringan mukosa mulut disebabkan oleh reaksi hipersensitivitas tipe IV. Hal ini disebabkan karena hasil penelitian menunjukkan terjadi peningkatan bermakna ($p < 0,05$) TNF- α dan IFN- γ dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA (Tabel 5.6, 5.8, 5.11, 5.12)

5.5 Hasil Analisis Uji Korelasi Antara Konsentrasi IL-4, IFN- γ , Dan TNF- α Dalam Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA

Hasil uji korelasi Pearson konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA menunjukkan bahwa terdapat korelasi bermakna ($p < 0,05$) antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA (Tabel 5.13).

Tabel 5.13 Hasil uji korelasi Pearson konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA

	IL-4 Jaringan	IFN- γ Jaringan	TNF- α Jaringan
IL-4 Plasma	Sig= 0,01* r = 0,966		
IFN- γ Plasma		Sig= 0,01* r = 0,973	
TNF- α Plasma			Sig= 0,01* r = 0,945

Keterangan : * signifikan bila $p < 0,05$
 ** signifikan

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa terdapat korelasi bermakna antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA (Tabel 5.13)



BAB 6 PEMBAHASAN

Pengkajian tentang respons imun sekunder pada kelinci lokal Batu (*Oryctolagus cuniculus*) yang diimunisasi oleh MMA dilakukan dengan cara deteksi IgG anti-MMA. Teknik yang digunakan untuk mendeteksi IgG spesifik terhadap MMA pada kelinci dilakukan dengan teknik *dot blot* dan ELISA.

Pemeriksaan IgG dan IgE spesifik terhadap MMA serta sitokin (IL-4, IFN- γ , TNF- α) pada penderita terpapar MMA dilakukan menggunakan analisis kuantitatif dengan teknik ELISA. Sensitisasi dan elisitasi hipersensitivitas karena paparan MMA terjadi di mukosa mulut, sehingga analisis kuantitatif sitokin selain dilakukan pada plasma darah perifer, juga dilakukan pada kerokan jaringan mukosa mulut. Pemeriksaan IgG dan IgE spesifik terhadap MMA hanya dilakukan pada serum penderita.

6.1 Pola Respons Imun Sekunder IgG Anti-MMA Pada Kelinci Lokal (*Oryctolagus cuniculus*) Yang Diimunisasi Dengan MMA

Imunoglobulin G anti-MMA pada kelinci lokal yang diimunisasi dengan MMA dideteksi dengan teknik *dot blot* (Gambar 5.1) dan ELISA (Gambar 5.2 dan 5.3). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa serum semua kelinci yang diperiksa pada hari ke-28 pasca imunisasi pertama, mengandung IgG anti-MMA. MMA yang ditotolkan pada membran NC bertindak sebagai epitop atau sebagai determinan antigenik yang berinteraksi spesifik dengan antibodi hasil imunisasi. Hasil positif *dot blot* ditandai dengan munculnya warna biru.

Pada kelinci yang diimunisasi dengan MMA dalam PBS (kelinci A dan B) juga menunjukkan hasil positif pada *dot blot* dan ELISA. Hal ini disebabkan karena MMA berkonjugasi dengan protein tubuh yang berfungsi sebagai protein pembawa (*carrier*). Konjugasi MMA dengan protein tubuh akan menyebabkan perubahan konformasi protein tubuh tersebut, sehingga dapat dikenali oleh sel T. Konjugat MMA-protein dapat ditangkap dan diproses oleh APC, yang kemudian dipresentasikan bersama MHC-kelas II kepada sel Th. Sel Th aktif akan mensekresi IL-2. Sel B spesifik terhadap MMA mengenal MMA melalui reseptor imunoglobulin yang terdapat di permukaan sel. IL-2 yang diproduksi sel Th diperlukan untuk proliferasi dan diferensiasi sel B spesifik terhadap MMA menjadi sel plasma. Selanjutnya sel plasma mensekresi IgG spesifik terhadap MMA (Krasteva *et al.*, 1998; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Produksi IgG anti-MMA juga terjadi setelah imunisasi MMA dan BSA yang berfungsi sebagai protein pembawa (*carrier*). Produksi IgG anti-MMA terjadi melalui mekanisme sebagai berikut : MMA-BSA difagositosis oleh sel dendritik yang berperan sebagai APC dan diproses untuk dipresentasikan bersama dengan molekul MHC-kelas II kepada sel Th. Sel Th yang diaktivasi melalui pengenalan kompleks peptida BSA-MHC-kelas II melalui reseptor sel T (TCR), akan mensekresi IL-2. Sitokin tersebut diperlukan untuk proliferasi dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma, yang mensekresi IgG spesifik terhadap MMA (Krasteva *et al.*, 1998; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Hasil *dot blot* dan ELISA menunjukkan titer IgG anti-MMA paling tinggi pada kelinci C yang diimunisasi dengan 0,75 % MMA dalam BSA 1 % (Gambar 5.1 dan 5.2). Hal ini disebabkan karena BSA sebagai protein pembawa adalah protein asing, sehingga lebih mudah dikenali oleh sistem imun dan menimbulkan respons imun sekunder yang lebih kuat bila dibandingkan dengan protein tubuh. Titer IgG anti-MMA lebih tinggi pada kelinci C yang diimunisasi dengan 0,75 % MMA dalam BSA 1 % dibandingkan dengan kelinci D yang diimunisasi dengan 0,50 % MMA dalam BSA 1 %. Hal ini disebabkan karena dosis MMA yang lebih tinggi akan menginduksi lebih banyak sel imun, sehingga akan menimbulkan respons imun sekunder yang lebih kuat.

Sel B mengenal determinan antigenik melalui immunoglobulin membran (mig), dan antigen diinternalisasi serta diproses di dalam sel (lihat Gambar 2.6). Peptida yang berikatan dengan MHC-kelas II di permukaan sel B dipresentasikan kepada sel Th spesifik. Proses ini merupakan syarat yang diperlukan untuk menimbulkan respons antibodi. Pada respons *haptent-carrier*, sel B spesifik terhadap haptent mengenal kompleks tersebut melalui haptent, karena haptent tidak dapat dipresentasikan bersama molekul MHC. Proses selanjutnya, kompleks *haptent-carrier* diproses di dalam sel B menjadi derivat peptida *carrier* yang dapat berikatan dengan molekul MHC untuk dipresentasikan kepada sel T (Austyn dan Wood, 1994). Kontak langsung sel T dan sel B (*cognate interaction*) terjadi jika sel T spesifik mengenali kompleks peptida-MHC di

permukaan membran sel B (Goldsby *et al.*, 2000; Røtt *et al.*, 1993; Austyn dan Wood, 1994).

Imunisasi dengan ajuvan saja pada kelinci kontrol, dalam penelitian ini menunjukkan hasil negatif pada pemeriksaan *dot blot* dan ELISA (Gambar 5.1 dan 5.2). Hal ini membuktikan tidak terbentuk IgG spesifik terhadap MMA, yang disebabkan karena tidak terdapat MMA sebagai epitop yang dikenali oleh reseptor imunoglobulin sel B spesifik terhadap MMA.

Hasil penelitian ini mendukung penelitian Liu *et al.* (1999), yang menunjukkan bahwa MMA memicu respons imun. Dalam penelitian tersebut MMA terbukti menginduksi pembentukan beberapa sitokin, seperti IL-6, $\text{IFN-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ pada kultur sel darah (*whole blood culture / WBC*) subyek sehat. Kultur sel yang dipakai dalam penelitian, sebelumnya disensitisasi menggunakan beberapa mitogen dan kemudian diberi paparan MMA. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa kultur yang sebelumnya tidak disensitisasi, tidak menghasilkan sitokin. Kesimpulan hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa MMA mampu menginduksi respons imun dengan syarat terjadi sensitisasi terlebih dahulu (Liu *et al.* 1999).

Imunoglobulin G anti-MMA dari kelinci lokal diperiksa dengan uji ELISA tidak langsung pada hari ke-28, 35, 42, 49, 66, 73, 80, 87 untuk mendeteksi pola respons imun sekunder setelah dilakukan *booster* pertama (hari ke-14) dan *booster* ke dua (hari ke-52) (lihat Gambar 5.3). Nilai absorbansi IgG yang terukur dengan metode ELISA tidak langsung,

6.2 MMA Bersifat Imunogenik Pada Penderita Terpapar MMA, Sehingga Dapat Menginduksi Respons Imun Humoral IgG Anti-MMA

Imunoglobulin G anti-MMA pada penderita terpapar MMA dideteksi dengan teknik *dot blot* (Gambar 5.10) dan ELISA (Gambar 5.11). MMA yang ditotolkan pada membran NC bertindak sebagai epitop atau sebagai determinan antigenik yang berinteraksi spesifik dengan antibodi hasil imunisasi, yang ditunjukkan dengan reaksi hibridisasi MMA dengan IgG anti-MMA pada *dot blot* yang ditandai dengan munculnya warna merah. Hasil deteksi IgG anti-MMA dengan teknik ELISA pada penderita terpapar MMA, semua penderita menunjukkan hasil positif (dua kali nilai absorbansi kontrol) (lihat Gambar 5.11 dan Tabel 5.1). Keseluruhan hasil penelitian yang didapat menunjukkan bahwa serum penderita terpapar MMA mengandung IgG anti-MMA.

Penelitian yang dilakukan oleh Fujisawa dan Masuhara (1981) yang dikutip oleh Fujisawa *et al.* (2000) menunjukkan bahwa interaksi antara MMA dan liposom diinduksi oleh migrasi secara langsung MMA melewati lapisan lemak dengan kekuatan penggerak interaksi hidrofobik. Penemuan ini menunjukkan bahwa MMA dapat masuk melalui membran sel hidup, sehingga MMA berpotensi menginduksi terjadinya respons imun.

Metil metakrilat dapat berikatan dengan protein tubuh penderita yang berperan sebagai protein pembawa (*carrier*). Konjugasi MMA dengan protein tubuh terjadi melalui ikatan non-kovalen dengan residu asam amino yang bersifat hidrofobik, seperti alanin, leusin, tirosin,

fenilalanin, dan valin (Roitt *et al.*, 1993). Hasil konjugasi tersebut membentuk modifikasi konformasi protein tubuh yang berfungsi sebagai *carrier*, sehingga dapat dikenali oleh sel Th. Kondisi ini dapat menyebabkan induksi pembentukan IgG spesifik terhadap MMA melalui mekanisme yang sama dengan pembentukan IgG anti-MMA pada kelinci lokal (Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993; Austyn dan Wood, 1994).

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah MMA bersifat imunogenik sehingga dapat menginduksi respons imun humoral pada penderita terpapar MMA, yang ditunjukkan dengan hasil positif IgG anti-MMA. Sifat imunogenesitas yang dimiliki MMA, memungkinkan MMA untuk menginduksi reaksi hipersensitivitas.

6.3 Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Tidak Terjadi Melalui Reaksi Iritasi

Hasil penelitian yang didapat menunjukkan terjadi peningkatan yang bermakna ($p < 0,05$) konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA (Tabel 5.3 - 5.8 dan 5.10, 5.11, 5.12). Selain itu hasil penelitian ini juga menunjukkan hasil positif untuk IgG spesifik terhadap MMA (Tabel 5.1 dan Gambar 5.11). Hal ini menunjukkan bahwa imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi. Kondisi tersebut disebabkan karena pada reaksi iritasi terjadi peningkatan TNF- α tanpa disertai peningkatan IL-4 dan IFN- γ , serta tidak terjadi pembentukan IgG spesifik terhadap MMA. Hal ini dikonfirmasi dengan fakta klinik yang menunjukkan bahwa gejala klinik penderita terpapar MMA hanya terjadi

pada 0,5 sampai 1 % penderita, serta gejala klinik inflamasi lokal baru muncul 10 sampai 14 hari setelah terpapar MMA.

Kontak intan dapat terjadi di kulit oleh karena kontak dengan bahan kimia tertentu. Kontak intan yang terjadi tergantung pada dosis bahan tersebut, tetapi tidak tergantung pada sifat antigenesitas yang dimiliki. Bahan intan merusak lemak epidemis (lemak antar sel keratinosit), kemudian masuk ke dalam keratinosit sehingga merusak lisosom, mitokondria, serta komponen inti yang akhirnya akan mengakibatkan kerusakan keratinosit. Bahan intan juga menyebabkan kerusakan membran keratinosit sehingga mengaktifkan fosfolipase, sehingga terbentuk asam arakhidonat, diasilgliserol (DAG), dan inositoltrifosfat (IP₃). Asam arakhidonat akan diubah menjadi leukotrin dan prostaglandin. DAG akan mempengaruhi ekspresi gen yang membentuk IL-1 (Pohan, 2004, Effendy *et al.*, 2000, Goldsby *et al.*, 2000).

Keratinosit juga mengekspresi ICAM-1 yang akan berikatan dengan leukosit yang mengekspresi LFA-1 di permukaannya. Leukosit akan tertarik dan terikat pada ICAM-1 di endotel pembuluh darah dan akhirnya akan menuju ke jaringan kulit sehingga terjadi peradangan (Pohan, 2004; Effendy *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Luster, 1988).

Keratinosit juga mensekresi TNF- α , IL-6, IL-1 β , dan GM-CSF. TNF- α merangsang pembentukan ICAM-1 dan berperan penting pada timbulnya reaksi radang. Prostaglandin dan leukotrin juga bersifat sebagai kemoatraktan yang menarik netrofil dan limfosit serta mengaktifasi mastosit, sehingga terbentuk histamin yang akan menyebabkan

vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah (Pohan, 2004; Effendy *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000).

Reaksi iritasi adalah respons imun alamiah (non-spesifik) yang terjadi tanpa proses pengenalan secara spesifik terhadap antigen oleh sel T, sehingga tidak terjadi peningkatan produksi IL-4 dan IFN- γ yang dihasilkan oleh sel T aktif. Berbeda dengan reaksi hipersensitivitas, reaksi iritasi akan mengakibatkan jejas secara langsung pada penderita terpapar MMA. Faktor yang penting lain yang membedakan reaksi iritasi dengan reaksi hipersensitivitas adalah tidak terbentuk IgG spesifik terhadap MMA, karena pada reaksi iritasi tidak terjadi respons imun humoral spesifik terhadap MMA. Selanjutnya, apabila imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA disebabkan oleh reaksi iritasi, maka angka kejadian timbulnya gejala klinik akan menjadi jauh lebih besar dan 0,5 - 1 % dari penderita terpapar MMA.

Beberapa substansi tertentu merupakan penyebab iritasi dan inflamasi pada individu yang terkena. Tipe stimulus eksogenus dapat mempengaruhi reaksi tersebut. Aplikasi topikal bahan kimia tertentu akan menginduksi iritasi, tetapi dengan *tape stripping* pada kulit belum memperlihatkan infiltrasi sel inflamasi selama 24 jam pertama. Setelah itu mulai dijumpai infiltrasi sel radang pada tempat tersebut (Leung, 1996).

Bila imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA disebabkan oleh reaksi iritasi, maka gejala klinik pada mukosa mulut penderita terpapar MMA akan timbul dalam waktu yang lebih cepat dari 10-14 hari setelah terpapar MMA.



Hasil penelitian yang dilakukan oleh Fujisawa *et al.* (1991) menunjukkan bahwa monomer MMA mampu berinteraksi dengan fosfatidilkholin / kolesterol liposom pada membran sel. Hasil ini ditunjang oleh penelitian Jaruga *et al.* (1998) yang menunjukkan bahwa molekul kecil larut dalam lemak mampu menginduksi perubahan dalam lapisan lemak ganda sel hidup, sehingga menyebabkan gangguan fungsi pada ikatan membran-protein dan menyebabkan jejas. Tetapi pembentukan jejas karena paparan MMA sangat bergantung pada dosis MMA yang dipaparkan (Robert dan Kupper, 1999).

Walaupun MMA dalam dosis tertentu bersifat sitotoksik dan genotoksik pada kultur sel epitel dan fibroblas (Kedjarune *et al.*, 1999; Ardani, 2000; Yang *et al.*, 2003), namun dalam penelitian ini imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terbukti terjadi melalui reaksi intasi. Hal ini disebabkan karena dosis paparan MMA tidak mencukupi untuk menimbulkan jejas yang dapat diamati pada hasil pemeriksaan laboratorik. Oleh karena itu imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA, dimungkinkan terjadi melalui reaksi hipersensitivitas.

6.4 Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Tidak Terjadi Melalui Reaksi Hipersensitivitas Tipe I

Hasil pemeriksaan konsentrasi IL-4 penderita terpapar MMA dan kontrol dapat dilihat pada Tabel 5.3 dan 5.4, Gambar 5.13 dan 5.14. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa konsentrasi IL-4 plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA lebih tinggi ($p < 0,05$) bila dibandingkan dengan penderita kontrol (Tabel 5.10). Konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut lebih tinggi bila dibandingkan dengan plasma penderita terpapar MMA dan kontrol (Tabel 5.10). Hal ini disebabkan karena proses peradangan terjadi pada jaringan mukosa mulut, sehingga IL-4 akan terkumpul di daerah yang mengalami peradangan.

Hasil pemeriksaan IgE spesifik terhadap MMA serum menunjukkan hasil negatif (Tabel 5.2, Gambar 5.12). Hal ini disebabkan karena peningkatan konsentrasi IL-4 yang terjadi tidak mencukupi untuk menginduksi *isotype switching* pada sel B ke arah produksi IgE.

Pemeriksaan IgE spesifik terhadap MMA dalam penelitian ini dilakukan dalam serum. Hal ini disebabkan karena MMA yang terpapar secara lokal (menempel pada mukosa mulut) akan berpenetrasi ke dalam jaringan epitel mukosa mulut. MMA selanjutnya akan memasuki kelenjar getah bening regional melalui aferen limfatik secara langsung, atau dibawa oleh APC. Respons imun humoral terhadap MMA yang telah berkonjugasi dengan protein tubuh terutama terjadi pada kelenjar getah bening regional, selain yang terbentuk secara lokal pada jaringan mukosa mulut, dan kemudian baru akan dialirkan ke tempat di mana terdapat paparan MMA dan terjadi proses peradangan. Kondisi tersebut

menyebabkan antibodi yang disekresi dapat terdeteksi secara sistemik (Abbas *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000).

Penelitian ini tidak memeriksa IgE spesifik terhadap MMA di jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hal ini disebabkan karena jumlah spesimen yang dapat dikumpulkan dari sampel penderita sesuai dengan kode etik yang berlaku di Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, tidak mencukupi untuk pemeriksaan IgE spesifik terhadap MMA. Di samping itu pemeriksaan IgE spesifik dalam serum dianggap sudah menggambarkan kondisi respons imun humoral penderita.

Secara umum, reaksi mukosa mulut terhadap *antigen challenge* sama dengan yang terjadi di kulit. Hal ini disebabkan struktur anatomis mukosa mulut hampir sama dengan kulit. Lapisan terluar mukosa mulut dan kulit adalah *stratified squamous epithelium*, tetapi keratinisasi pada kulit lebih tebal. Pada mukosa mulut lapisan dibawah epitel adalah *basement membrane* (lamina propria) yang diikuti dengan jaringan submukosa. Pada kulit juga terdapat lapisan *basement membrane* dan diikuti oleh lapisan dermis yang mirip dengan mukosa mulut (Ahlfors dan Lyberg, 2001).

Interleukin-4 adalah glikoprotein 18-20 kD yang dihasilkan oleh sel Th2, sel NK, mastosit, dan basofil (Glimcher dan Murphy, 2002; Soeparto dan Sudarmo, 2003). Seperti sitokin lainnya, IL-4 menunjukkan efek pleotropik, tetapi lebih mendorong ke arah perkembangan sel Th2 dan meningkatkan ekspresi CD23 (Fc ϵ RII) pada mastosit dan MHC-kelas II

pada makrofag dan sel B (Glimcher dan Murphy, 2002; Bacharier dan Geha, 2001).

Interleukin-4 terutama disekresi sel Th2 setelah terjadi proses pengenalan antigen-MHC-kelas II pada permukaan sel B melalui reseptor sel T (TCR). Sel Th2 mensekresi IL-4 dan IL-13, serta mengekspresi ligan CD40 (CD40L, CD154). Ikatan IL-4 pada reseptor sel B mengirimkan signal pertama untuk *isotype switching* yang menginduksi transkripsi lokus gen rantai berat C ϵ . CD40L adalah glikoprotein membran tipe 239 kD yang tidak dijumpai pada sel Th naif dalam kondisi istirahat (Shen dan Statvnezer, 2001; Kruse *et al.*, 1999). Ekspresi sementara CD40L setelah aktivasi sel Th membuat sel Th menjadi berkompeten penuh untuk menginduksi *isotype switching* ke arah pembentukan IgE (Shen dan Statvnezer, 2001).

Molekul CD40-L menginduksi oligomerisasi CD40 pada sel B untuk mengirim signal ke dua yang memicu *deletional switch recombination* ke arah pembentukan IgE. Ligasi CD40 pada permukaan sel B menghasilkan peningkatan banyak molekul permukaan. Ekspresi molekul B7 (CD80) pada sel B meningkat setelah aktivasi CD40, dan berfungsi sebagai reseptor untuk CD28, yang merupakan molekul kostimulator pada permukaan sel T. Pengaturan ulang yang simultan dari reseptor sel T dan CD28 menghasilkan aktivasi sel Th2 yang optimal dan sekresi sitokin, termasuk IL-4 (Shen dan Statvnezer, 2001).

Sel Th2 mensekresi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, dan IL-13, yang memicu ke arah respons imun humoral termasuk *isotype switching* ke arah

pembentukan IgE dan perkembangan penyakit alergi (hipersensitivitas tipe I). Sitokin yang dihasilkan oleh sel Th1, khususnya IFN- γ , menghambat produksi sitokin sel Th2, dan sebaliknya sitokin yang dihasilkan sel Th2 menghambat produksi sitokin sel Th1. Kondisi tersebut konsisten dengan paradigma yang menyatakan IL-4 menginduksi ϵ *germ line transcription* untuk menghasilkan IgE, sedangkan IFN- γ menekan induksi IL-4. Interferon- γ menginduksi γ *germ line transcription* untuk menghasilkan IgG, sedangkan IL-4 menekan induksi IFN- γ (Shen *et al.*, 2001; Biedermann *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 1999).

Imunoglobulin E spesifik terhadap MMA akan memperantarai reaksi hipersensitivitas tipe I (reaksi hipersensitivitas tipe cepat). IgE spesifik yang terbentuk akan berikatan dengan reseptor Fc pada permukaan mastosit dan basofil. Bila konjugat MMA-peptida berikatan silang dengan IgE tersebut, maka akan terjadi pelepasan mediator vasoaktif amin dari mastosit, sehingga terjadi peningkatan permeabilitas vaskuler dan vasodilatasi, serta selanjutnya terjadi edema dan proses peradangan (Roitt *et al.*, 1993; Goldsby *et al.*, 2000).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa IgE spesifik terhadap MMA adalah negatif pada penderita terpapar MMA (Tabel 5.2). Hal ini menunjukkan bahwa imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terbukti terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I yang diperantarai oleh IgE. Walaupun terjadi peningkatan IL-4 pada penderita terpapar MMA, namun konsentrasi tersebut tidak mencukupi untuk mendorong *isotype switching* sel B ke

arah pembentukan IgE, sehingga didapatkan hasil IgE spesifik terhadap MMA yang negatif.

6.5 Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Terjadi Melalui Reaksi Hipersensitivitas Tipe II Dan / Atau Tipe III

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA mempunyai konsentrasi IFN- γ lebih tinggi daripada kontrol (Tabel 5.5, 5.6, 5.11, Gambar 5.16, 5.17, 5.18). Konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA jauh lebih tinggi dibandingkan dengan plasma. Hal ini disebabkan sensitisasi oleh MMA terjadi secara lokal di jaringan mukosa dan tempat elisitasi juga terjadi terutama di tempat sensitisasi.

Peningkatan IFN- γ pada penderita terpapar MMA membantu sintesis IgG spesifik terhadap MMA. Kondisi ini disebabkan karena peningkatan IFN- γ yang disintesis oleh sel Th1 aktif, memicu *isotype switching* sel B yang mengenal MMA untuk mensekresi IgG spesifik.

Pembentukan IgG spesifik terhadap MMA dibuktikan dengan metode *dot blot*, di mana serum direaksikan dengan MMA yang di-coating pada membran NC. Konsentrasi antibodi penderita secara kuantitatif tidak dapat diketahui, namun secara semikuantitatif dapat diamati dengan adanya perubahan gradasi warna merah (Gambar 5.10).

Hasil pemeriksaan IgG spesifik terhadap MMA dengan teknik ELISA pada penderita terpapar MMA, menunjukkan bahwa nilai absorbansi penderita terpapar MMA lebih besar dibandingkan dengan

pendenta kontrol (Gambar 5.11). Nilai absorbansi IgG spesifik 8 penderita terpapar MMA bervariasi dari 0,0350 - 0,0360 (Tabel 5.1).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa sensitisasi MMA secara lokal di mukosa mulut dapat menginduksi respons imun IgG spesifik terhadap MMA yang dapat terdeteksi pada serum semua penderita terpapar MMA.

Antigen yang dipaparkan pada mukosa mulut, memasuki kelenjar getah bening regional melalui aferen limfatik secara langsung atau dibawa oleh APC. Sedangkan limfosit memasuki kelenjar getah bening regional melalui aferen limfatik atau aliran darah dengan cara ekstravasasi lewat *high endothelial venules* (HEV) pada *venula post* kapiler. Inisiasi dari aktivasi sel B dan sel T terjadi pada daerah parakorteks kelenjar getah bening. Daerah tersebut mengandung banyak sel T, makrofag, dan sel dendritik. Sel dendritik pada daerah parakorteks mengekspresi molekul MHC-kelas II dalam jumlah banyak dan memiliki jonjot-jonjot yang panjang, sehingga dapat melakukan kontak dengan lebih kurang 200 sel Th (Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Selama 1 sampai 2 hari setelah paparan antigen, antigen dipresentasikan oleh makrofag dan sel dendritik kepada sel T naif sehingga terjadi aktivasi dan proliferasi yang ekstensif dari sel Th di dalam parakorteks kelenjar getah bening. Sel Th aktif akan mensekresi IL-2 yang dibutuhkan untuk proliferasi dan diferensiasi sel T dan sel B. Sel B naif yang berasal dari daerah korteks yang kaya dengan sel B, akan bermigrasi ke daerah yang kaya dengan sel T. Sel B yang telah berikatan

dengan antigen melalui imunoglobulin pada membran sel akan menginternalisasi antigen tersebut, untuk dipresentasikan bersama molekul MHC-kelas II. Setelah memasuki daerah sel T, sel B yang mempresentasikan antigen dapat berinteraksi dengan sel Th spesifik dan membentuk konjugat sel T-B melalui interaksi CD40 pada sel B dan CD40L pada T. Kondisi ini mengakibatkan aktivasi sel B. Setelah terjadi aktivasi sel B akan terbentuk suatu fokus kecil dari sel B yang berproliferasi, dimana pada tepinya terbentuk daerah yang kaya sel T dan mencapai ukuran maksimum 3 – 4 hari setelah paparan antigen. Sel B di dalam fokus tersebut berdiferensiasi menjadi sel plasma dan mensekresi antibodi spesifik terhadap antigen. Sebagian besar antibodi yang terbentuk pada respons imun primer berasal dari sel plasma dalam fokus tersebut (Goldsby *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Beberapa hari setelah pembentukan fokus pada kelenjar getah bening, sebagian sel B aktif dan sel T aktif akan bermigrasi ke folikel primer. Folikel tersebut akan berkembang menjadi folikel sekunder yang menyediakan lingkungan mikro yang sesuai untuk interaksi antara sel T, sel B, dan sel dendritik. Pada saat proliferasi sel berjalan terus, sel B aktif bersama dengan sel Th aktif akan bermigrasi ke pusat folikel sekunder dan membentuk *germinal center*. Perkembangan *germinal center* ini tergantung pada interaksi sel B dan sel Th dalam fokus, yang membutuhkan ikatan antara CD40 dan CD40L. Di dalam *germinal center* sel B mengalami diferensiasi dalam tiga hal, yaitu maturasi afinitas, *class switching* serta pembentukan sel plasma yang membentuk antibodi

spesifik dan sel memori (Goldsby *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Aktivasi sel limfosit naif terjadi di jaringan di limfoid sekunder (jaringan kelenjar getah bening regional). Limfosit efektor dan memori dapat melakukan *homing* pada jaringan limfoid tersier atau jaringan yang mengalami inflamasi (Goldsby *et al.*, 2000).

Penelitian ini tidak memeriksa IgG spesifik terhadap MMA di jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hal ini disebabkan karena jumlah spesimen yang dapat dikumpulkan dari sampel penderita sesuai dengan kode etik yang berlaku di Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, tidak mencukupi untuk pemeriksaan IgG spesifik terhadap MMA. Disamping itu pemeriksaan IgG spesifik dalam serum dianggap sudah menggambarkan kondisi respons imun humoral penderita.

Limfosit T CD4⁺ bersifat heterogenus dan dibagi dalam dua sub tipe berdasarkan pola produksi sitokin. Sel Th1 menghasilkan terutama IL-2, TNF- α , dan IFN- γ , di mana sitokin tersebut memicu ke arah pembentukan IgG spesifik terhadap MMA (Golsby *et al.*, 2000; Austyn dan Wood, 1994).

Interferon- γ memiliki peran sentral pada banyak proses pengaturan sistem imun, termasuk regulasi dari fagosit mononuklear, *class switching* pada sel B ke arah pembentukan IgG, serta mendorong perkembangan sel Th1 atau menghambat perkembangan subset sel Th2 (Goldsby *et al.*, 2000; Krakauer *et al.*, 1999; Hamblin, 1993; Janeway, 1997).

Interferon- γ menyebabkan gangguan pada subset sel Th2, sehingga kurang responsif terhadap sitokin yang mendorong diferensiasi sel Th ke subset sel Th2. IL-4 meningkatkan perkembangan sel Th2 dengan cara menekan ekspresi subunit β dari reseptor IL-12, sehingga membuat sel T menjadi tidak responsif terhadap IL-12 yang mendorong perkembangan sel Th1. Sebaliknya IFN- γ meningkatkan ekspresi subunit β dari reseptor IL-12, sehingga membuat sel Th menjadi lebih responsif terhadap IL-12 yang mendorong diferensiasi ke arah sel Th1 (Goldsby *et al.*, 2000; Krakauer *et al.*, 1999; Hamblin, 1993; Janeway, 1997).

Paparan MMA pada jaringan mukosa mulut penderita, dapat menyebabkan MMA menempel pada permukaan sel pada jaringan mukosa mulut. Selanjutnya MMA tersebut dapat dikenali oleh IgG spesifik sehingga terjadi reaksi antigen-antibodi. Kompleks antigen-antibodi yang terbentuk dapat menginduksi komplemen jalur klasik, sehingga terjadi lisis sel melalui pembentukan *membrane attack complex* (MAC) dengan akibat terjadi kerusakan jaringan (Goldsby *et al.*, 2000).

Aktivasi komplemen melalui jalur klasik dimulai dengan pembentukan kompleks antigen-antibodi yang larut (*soluble immune complex*) atau pengikatan antibodi dengan antigen pada permukaan target. Kelas IgM dan subkelas IgG tertentu (IgG1, IgG2 dan IgG3 pada manusia) dapat mengaktifkan komplemen jalur klasik. Tahap awal aktivasi komplemen melibatkan C1, C2, C3, dan C4 yang terdapat pada plasma dalam bentuk inaktif. Ikatan antibodi dengan antigen menginduksi perubahan konformasional pada bagian Fc sehingga tempat pengikatan

untuk komponen C1 menjadi terpapar. C1 dalam serum membentuk kompleks makromolekuler yang terdiri dari satu molekul C1q ditambah dua molekul C1r dan C1s yang berikatan bersama-sama membentuk C1q₂s₂, yang distabilisasi oleh ion Ca²⁺. Molekul C1q terdiri dari 18 rantai polipeptida yang berhubungan satu sama lain membentuk 6 lengan *triple helix* yang mirip kolagen, dimana setiap ujung berikatan dengan tempat pengikatan C1q pada domain C_{H2} dari molekul antibodi (Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Setiap molekul C1 harus berikatan dengan paling sedikit dua Fc antibodi melalui C1q untuk membentuk interaksi C1-antibodi yang stabil. Pengikatan C1q dengan Fc antibodi menginduksi perubahan konformasional pada C1r yang mengubah C1r menjadi enzim protease serin aktif (C1r̄), yang memecah C1s menjadi enzim aktif yang hampir sama (C1s̄). Enzim tersebut memiliki dua substrat, yaitu C4 dan C2. C4 adalah suatu glikoprotein yang terdiri dari tiga rantai polipeptida α, β, dan γ. C4 diaktivasi pada saat C1s̄ menghidrolisa suatu fragmen kecil (C4a) dari amino terminal rantai α, dan memaparkan suatu tempat pengikatan pada fragmen yang lebih besar (C4b). Fragmen C4b melekat pada permukaan target berdekatan dengan C1, dan selanjutnya proenzim C2 melekat pada C4b di tempat pengikatan yang terpapar, dimana C2 kemudian dipecah oleh C1s̄, dan selanjutnya fragmen yang lebih kecil (C2b) berdifusi keluar. Kompleks C4b2a disebut C3 konvertase, yang berfungsi sebagai enzim yang memecah proenzim C3 menjadi bentuk enzim aktif. Fragmen yang lebih kecil dari hasil pemecahan C4 (C4a),

adalah suatu anafilatoksin yang merupakan mediator inflamasi (Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Komponen C3 terdiri dari dua rantai polipeptida α dan β . Hidrolisa fragmen kecil C3a dari amino terminal rantai α oleh C3 konvertase menghasilkan C3b. Satu molekul C3 konvertase menghasilkan lebih dari 200 molekul C3b, sehingga terjadi proses amplifikasi dalam tahap ini. Beberapa molekul C3b berikatan dengan $\overline{C4b2a}$ untuk membentuk kompleks trimolekuler $\overline{C4b2a3b}$ yang disebut C5 konvertase. Komponen C3b dari kompleks tersebut berikatan dengan C5 dan merubah konformasinya sehingga dapat memecah C5 menjadi C5a yang berdifusi keluar, dan C5b yang berikatan dengan C6 dan memulai pembentukan MAC. C5a berfungsi sebagai anafilatoksin. Beberapa C3b berdifusi keluar dan melapisi kompleks imun serta partikel antigen untuk berfungsi sebagai opsonin (Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Bagian akhir dari aktivasi komplemen melibatkan C5b, C6, C7, C8, dan C9 yang berinteraksi secara berurutan membentuk struktur makromolekuler yang disebut MAC. Kompleks ini memisahkan fosfolipida dan membentuk suatu saluran transmembran pada sel target yang menyebabkan ion dan molekul kecil dapat berdifusi secara bebas melalui saluran tersebut (Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Pengikatan IgG spesifik pada permukaan sel target dapat pula menginduksi reaksi ADCC. Sejumlah sel yang memiliki potensi sitotoksik memiliki potensi untuk mengekspresi reseptor pada membran sel untuk daerah Fc dari molekul antibodi. Bila antibodi secara spesifik berikatan

dengan suatu target, sel yang memiliki reseptor tersebut dapat berikatan dengan bagian Fc antibodi. Dengan demikian sel target yang berikatan yang dengan antibodi dapat mengalami lisis. Walaupun sel sitotoksik tersebut tidak spesifik terhadap antigen, spesifitas antibodi mengarahkan mereka kepada sel target spesifik. Sitotoksitas jenis ini disebut ADCC (Abbas *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

Sel yang dapat memperantarai ADCC adalah sel NK, makrofag, monosit, netrofil, dan eosinofil. Pembunuhan sel target melalui proses ADCC tidak melibatkan komplemen, tetapi melibatkan suatu mekanisme sitotoksik. Apabila makrofag, netrofil, atau sel eosinofil berikatan dengan suatu sel target melalui reseptor Fc, maka mereka menjadi lebih aktif secara metabolik, dengan akibat terjadi peningkatan enzim litik dalam granula atau lisosom sitoplasmik. Pelepasan enzim litik tersebut pada tempat kontak yang diperantarai oleh Fc menyebabkan kerusakan sel target. Selanjutnya monosit, makrofag, sel NK aktif mensekresi TNF- α yang dapat bersifat sitotoksik pada sel target. Karena sel NK dan eosinofil mempunyai perforin dalam granula sitoplasmik, pembunuhan sel target dapat juga disebabkan kerusakan membran yang diperantarai oleh perforin (Abbas *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000).

Kerusakan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA yang diperantarai oleh aktivasi komplemen jalur klasik dan proses ADCC karena ikatan antigen-antibodi spesifik terhadap MMA dikenal sebagai reaksi hipersensitivitas tipe II (Abbas *et al.*, 2000; Goldsby *et al.*, 2000; Roitt *et al.*, 1993).

cairan tubuh, kemudian baru mengendap di permukaan jaringan. Untuk membedakan keduanya perlu dilakukan deteksi kompleks imun yang larut dalam cairan jaringan mukosa mulut. Dalam penelitian ini tidak dapat melakukan pemeriksaan tersebut karena keterbatasan spesimen yang dapat diambil sesuai dengan kode etik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

6.6 Kerusakan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Terjadi Melalui Reaksi Hipersensitivitas Tipe IV

Hasil pemeriksaan TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut pada penderita terpapar MMA dapat dilihat pada Tabel 5.7 dan 5.8, serta Gambar 5.19 dan 5.20. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penderita terpapar MMA mempunyai konsentrasi TNF- α plasma dan jaringan mukosa mulut lebih tinggi bila dibandingkan dengan penderita kontrol. Konsentrasi TNF- α jaringan mukosa mulut penderita berkisar antara 80,18-105,53 pg/ml, sedangkan konsentrasi TNF- α plasma penderita berkisar antara 23,67-29,17 pg/ml.

Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA mempunyai konsentrasi IFN- γ lebih tinggi daripada penderita kontrol (Tabel 5.5, 5.6, 5.12, Gambar 5.16 dan 5.17) Tetapi pada penderita terpapar MMA konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut jauh lebih tinggi dibandingkan dengan plasma

Menurut Ahlfors dan Lyberg (2001), epitel mukosa mulut manusia, tikus, dan mencit mempunyai kapasitas sebagai APC, tetapi yang

terutama berfungsi sebagai APC adalah sel Langerhans. Lebih lanjut dijelaskan bahwa sensitisasi ulang oleh hapten pada penderita yang pernah tersensitisasi dengan hapten yang sama, menyebabkan pembentukan infiltrat seluler pada mukosa mulut, dengan intensitas maksimum 24-48 jam setelah paparan. Infiltrat tersebut terutama mengandung sel T dan makrofag seperti yang dijumpai di kulit (model hewan coba). Hal ini menunjukkan bahwa terjadi reaksi sensitivitas kontak setelah paparan hapten. Namun perubahan ini (pada 24-48 jam) belum terdeteksi pada serum dengan teknik ELISA (Ahlfors dan Lyberg, 2001; Effendy *et al.*, 2000).

Secara umum, reaksi mukosa mulut terhadap *antigen challenge* sama dengan di kulit. Mukosa mulut ektodermal dan kulit menunjukkan gambaran yang sama di dalam memberikan reaksi hipersensitivitas tipe IV (Ahlfors dan Lyberg, 2001; Effendy *et al.*, 2000; Bickel *et al.*, 1996).

Paparan MMA pada mukosa mulut penderita akan menyebabkan aktivasi APC misalnya sel dendritik, sel Langerhans, dan keratinosit. APC akan mempresentasikan peptida yang dimodifikasi MMA bersama molekul MHC-kelas II, sehingga akan mengaktifkan sel Th1. Selanjutnya, sel Th1 yang aktif akan berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel Th 1 aktif. Sel Th1 aktif mensekresi sitokin IFN- γ , TNF- β , IL-2, dan GM-CSF, dan juga mensekresi khemokin IL-8, MCAF, MIF. Sitokin dan khemokin yang diproduksi oleh sel Th1 aktif tersebut akan mengaktifkan makrofag, sehingga terjadi peningkatan ekspresi molekul MHC-kelas II, reseptor TNF, peningkatan produksi radikal oksigen dan nitrik oksida. Makrofag

aktif akan menyebabkan kerusakan jaringan. Reaksi ini disebut reaksi hipersensitivitas tipe IV (Goldsby *et al.*, 2000).

Keratinosit epidermal sebelum terstimulasi, mensekresi sitokin primer dalam jumlah rendah, misalnya IL-1 (IL-1 α dan IL-1 β) dan TNF- α , yang merupakan sitokin inflamasi. Apabila mendapat stimuli eksogenus, keratinosit menjadi aktif dan memproduksi lebih banyak sitokin inflamasi. Keratinosit terlibat pada reaksi alergi kontak dan iritasi kontak, melalui pelepasan sitokin inflamasi, kemokin, dan faktor pertumbuhan (Effendy *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 1999; Bickel *et al.*, 1996). Meskipun ada perbedaan jalur antara reaksi alergik dan iritasi, namun terdapat keterkaitan diantara kedua proses tersebut pada tingkat molekuler.

Eksperimen hewan coba yang dilakukan oleh Ahlfors dan Lyberg, (2001) menunjukkan bahwa sensitisasi hapten pada jaringan mukosa mulut ektodermal dapat mengarah ke reaksi hipersensitivitas terhadap antigen. Respons hipersensitivitas kontak di mukosa mulut mirip dengan yang dijumpai di kulit bila ditinjau baik dari segi fenotip sel maupun sitokinnya. Perbedaan reaksi pada mukosa mulut dan kulit terletak pada waktu dalam mencapai puncak inflamasi dan intensitas inflamasi (Effendy *et al.*, 2000; Ahlfors dan Lyberg, 2001).

Diketahui bahwa TNF- α penting untuk pengumpulan leukosit dan ekspresi molekul adesi dalam proses peradangan. Bersama-sama dengan IL-4, TNF- α menginduksi ekspresi VCAM-1, yang diperlukan untuk

pengumpulan sel T dan eosinofil ke arah jaringan yang mengalami inflamasi (Bennet *et al.*, 1997).

Tumor Necrosis Factor- α dan *IFN- γ* adalah sitokin yang memperantara peradangan. Sitokin tersebut menghubungkan sel Th1 dengan fenomena peradangan pada reaksi hipersensitivitas tipe lambat (Kermani *et al.*, 2000; Effendy *et al.*, 2000; Ahlfors dan Lyberg, 2001).

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV. Hal ini disebabkan karena pada penderita terpapar MMA terjadi peningkatan konsentrasi *TNF- α* dan *IFN- γ* dalam plasma dan jaringan mukosa mulut, dimana kedua sitokin tersebut memegang peranan penting pada reaksi hipersensitivitas tipe IV.

6.7 Terdapat Korelasi Antara Konsentrasi IL-4, IFN- γ , Dan TNF- α , Dalam Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA

Analisis sitokin dilakukan pada plasma dan kerokan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Keratinosit dalam kondisi basal menghasilkan sitokin dalam jumlah rendah, misalnya IL-1 dan *TNF- α* . Apabila terjadi peradangan produksi sitokin tersebut akan meningkat (Effendy *et al.*, 2000; Zehnder *et al.*, 1999; Bickel *et al.*, 1996). Pada proses peradangan sel radang dan limfosit T melakukan migrasi dan ekstrasvasasi ke tempat yang mengalami peradangan serta menghasilkan berbagai macam sitokin, antara lain IL-4 dan *IFN- γ* (Von Andrian *et al.*

2000). Dengan demikian IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dapat dideteksi pada hasil kerokan jaringan mukosa mulut.

Hasil penelitian yang didapat menunjukkan terdapat korelasi yang bermakna konsentrasi IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hal ini menunjukkan bahwa profil sitokin IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma berhubungan dengan profil sitokin tersebut pada jaringan mukosa mulut (Tabel 5.13).

Sel T CD4⁺ meninggalkan timus dan memasuki sirkulasi sebagai sel istirahat pada fase G₀ dari siklus sel. Sel T naif yang belum bertemu antigen ditandai dengan inti yang memiliki kromatin padat, sedikit sitoplasma, dan sedikit aktivitas transkripsi. Sel T naif senantiasa melakukan resirkulasi antara darah dan sistem limfatik. Selama resirkulasi, sel T naif memasuki jaringan limfoid sekunder, seperti misalnya kelenjar getah bening. Bila sel T naif tidak bertemu antigen dalam kelenjar getah bening, sel T tersebut akan keluar melalui eferen limfatik dan akhirnya masuk ke *ductus thoracicus* dan bergabung dengan aliran darah (Pohan, 2003; Goldsby *et al.*, 2000; Andrian dan Mackay, 2000).

Sel T naif diperkirakan melakukan resirkulasi dari aliran darah ke kelenjar getah bening dan kembali lagi ke aliran darah setiap 12 sampai 24 jam. Hanya sekitar satu dari 10⁵ sel T naif spesifik terhadap antigen tertentu, sehingga proses resirkulasi yang terjadi akan meningkatkan kesempatan sel T naif untuk bertemu dengan antigen yang sesuai. Sel T

naif pada umumnya hanya hidup selama 5 sampai 7 minggu bila tidak diaktivasi oleh antigen (Goldsby *et al.*, 2000).

Pada saat sel T naif bertemu dengan antigen yang dipresentasikan bersama MHC ditambah dengan molekul kostimulasi, sel T tersebut akan menjadi aktif serta berkembang menjadi sel T aktif dan sel T memori. Sel T memori memiliki nilai ambang yang lebih rendah untuk dapat diaktivasi oleh antigen. Kondisi tersebut menyebabkan APC non-profesional seperti misalnya, sel B, makrofag, dan sel epitel mampu untuk mempresentasikan antigen dan memulai respons imun sekunder. Sel T memori aktif kemudian akan menghasilkan sitokin efektor, seperti misalnya IL-4, IL-10, dan IFN- γ (Hudak *et al.*, 2002).

Suatu model yang terdiri dari empat tahap, menjelaskan bagaimana lekosit keluar dari darah ke organ limfoid dan ekstra limfoid. Empat tahap dari model tersebut adalah : 1). Lekosit darah menggelinding di sepanjang endotel vaskuler; 2). Aktivasi di dalam lekosit; 3). Adesi lekosit tergantung integrin pada endotel vaskuler; 4). Diapedesis lekosit ke jaringan sekitarnya yang diperantarai oleh gradien kemoatraktan yang diekspresi oleh jaringan. Molekul yang berperan pada setiap tahap selama sel T memori melakukan *homing* ke beberapa organ adalah berbeda, dan sel T memori dengan jenis yang berbeda mempunyai pola *homing* yang berbeda (Hudak *et al.*, 2002; Goldsby *et al.*, 2000).

Ada dua jenis sel T memori dalam darah perifer yang telah dikenal yaitu sel T memori sentral (T_{CM} / *Central Memory T cells*) yang mengekspresi selektin-L (CD62L) dan reseptor kemokin CCR7 yang

berfungsi untuk perjalanan yang efektif melalui jaringan limfoid sekunder. Sel T memori yang lain adalah sel T memori efektor (T_{EM} / *Effector memory T cells*) yang tidak memiliki reseptor untuk migrasi tersebut, sehingga akan dikeluarkan dari kelenjar getah bening dan limpa, tetapi dapat memasuki daerah inflamasi di perifer dan mengalami *homing* pada jaringan tersebut. Untuk *homing* pada kulit sel T memori efektor memiliki *skin-homing receptor cutaneous lymphocyte antigen (CLA)*, sedangkan untuk *homing* pada usus memiliki *gut-homing receptor $\alpha 4\beta 7$* (Schaerli *et al.*, 2004; Hudak *et al.*, 2002; Pohan, 2003; Robert dan Kupper, 1999).

Sel T naif mengekspresi sedikit molekul yang diperlukan untuk migrasi, misalnya CD62L, CCR7, dan LFA-1 dan sedikit melakukan *homing* pada organ limfoid. Bila sel dendritik sebagai APC menangkap antigen pada permukaan kulit, maka antigen tersebut akan dipresentasikan kepada sel T naif dalam jaringan limfoid. Sel T naif tersebut akan berdiferensiasi menjadi sel T memori yang mampu untuk melakukan *homing* pada jaringan di mana antigen tersebut berasal (Pohan, 2003; Baekkevold *et al.*, 2005).

Reseptor kemokin CCR4 diekspresi oleh semua sel Th kulit maupun di dalam darah manusia, tetapi jarang ditemui pada sel Th intestinal. Ligan kemokin untuk CCR4 adalah CCL17 yang diekspresi oleh permukaan dalam vena kulit manusia, tetapi tidak diekspresi oleh vena intestinal. Interaksi CCR4 – CCL17 berperan untuk *homing* sel Th di kulit melalui adesi pada endotel (Baekkevold *et al.*, 2005; Schaerli *et al.*, 2004. Pohan. 2003).

Sel T memori CLA⁺ terutama melakukan *homing* pada daerah kulit dan banyak dijumpai pada lesi kulit yang mengalami peradangan. Antigen CLA adalah suatu glikosilasi pasca translasi dari *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1), yang memungkinkan sel T memori yang akan melakukan *homing* di kulit menggelanding pada endotel dermal superfisial yang mengekspresi selektin-E (CD6E) selama proses peradangan pada kulit. Kondisi ini merupakan tahap pertama dalam ekstravasasi leukosit (Hudak *et al.*, 2002; Robert dan Kupper, 1999).

Sel T memori CLA⁺ mengekspresi integrin CD11a/CD18 (α L β 2, LFA-1) dan CD49d/CD29 (α 4 β 1) yang mengikat endotel yang mengalami peradangan dan mengekspresi ICAM-1 dan VCAM-1. Kondisi ini memperantarai adesi pada tahap 3 dari ekstravasasi leukosit. Sel T memori CLA⁺ juga mengekspresi reseptor kemokin CCR10 yang memiliki ligan CCL27. CCL27 hanya diekspresi keratinosit. Diduga interaksi CCL27 dengan CCR10 pada sel T memori kulit memegang peranan penting pada tahap 2 dan tahap 4 dari ekstravasasi leukosit dalam proses *homing* sel T memori (Hudak *et al.*, 2002; Pohan, 2003; Robert dan Kupper, 1999).

Sel T memori CLA⁺ melakukan *homing* pada lesi kulit yang mengalami peradangan melalui pengikatan selektin-E yang diekspresi oleh vena dermal superfisial. Sel tersebut membentuk jenis sel hematopoietik utama pada lesi kulit dan aferen limfatik yang mengalirkan cairan getah bening dari kulit, walaupun sel tersebut sedikit dijumpai dalam darah. Memori imunologik terhadap antigen kulit terutama dibawa oleh populasi sel tersebut, sedangkan untuk antigen sistemik dibawa oleh

sel T memori CLA⁻. Sel T memori CLA⁺ membentuk sitokin sel Th1 (IFN- γ), dan sitokin sel Th2 (IL-4 dan IL-5) yang berperan dalam mengendalikan respons imun yang terjadi. Atas dasar ini dapat disimpulkan bahwa sel T memori CLA⁺ berperan secara bermakna dalam respons hospes terhadap antigen kulit (Pohan, 2003; Hudak *et al.*, 2002; Robert dan Kupper, 1999).

Selektin-E tidak dijumpai atau sangat sedikit ditemukan dalam kondisi normal tetapi jumlahnya meningkat pada sel endotel yang mengalami peradangan. Sel T CLA⁺ yang berikatan dengan selektin E pada permukaan endotel akan menyebabkan lekosit menggelanding lambat. Selektin-E meningkat tidak hanya di kulit, tetapi juga pada organ lain yang mengalami peradangan. Tetapi sel T CLA⁺ terutama dijumpai pada kulit yang mengalami peradangan. Integrin pada lekosit mengikat ICAM-1 dan VCAM-1 pada permukaan endotel dan memperantarai tahap ke tiga (adesi) dari proses ekstravasasi lekosit. Tetapi ligan integrin ditemukan pada banyak organ sehingga tidak spesifik pada kulit. Oleh karena itu diduga tahap ke-dua atau tahap ke-empat (khemotraktan) yang menyebabkan *homing* spesifik dari sel T CLA⁺ pada kulit. CCL27 adalah satu-satunya khemokin spesifik pada kulit yang telah diketahui. Interaksi sel T memori CLA⁺ / CCR10⁺ dengan CCL27 merupakan tahap spesifik yang memudahkan masuknya sel T CLA⁺ ke kulit (Schaerli *et al.*, 2004; Pohan, 2003; Hudak *et al.*, 2002; Robert dan Kupper, 1999).

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah profil sitokin IL-4, IFN- γ , dan TNF- α dalam plasma berhubungan dengan profil sitokin tersebut pada jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hal

ini disebabkan karena respons imun yang terjadi secara sistemik berhubungan dengan respons imun yang terjadi di jaringan perifer, seperti yang telah dijelaskan di atas.

Mengingat profil sitokin dalam plasma berhubungan dengan jaringan mukosa mulut, maka diagnostik terjadinya reaksi hipersensitivitas dan intasi pada mukosa mulut dimungkinkan dilakukan melalui pemeriksaan darah perifer. Cara diagnostik tersebut akan memudahkan para klinisi dalam melakukan diagnostik, karena tidak diperlukan pengambilan jaringan mukosa mulut untuk melakukan pemeriksaan laboratorium.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Kesimpulan hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Pola respons imun sekunder kelinci lokal setelah diimunisasi dengan MMA adalah terjadi peningkatan produksi IgG anti-MMA setelah pemberian *booster* 1 dan 2 dalam jangka waktu 4 minggu. Produksi antibodi mencapai puncak yang lebih tinggi setelah pemberian *booster* 2 bila dibandingkan dengan setelah pemberian *booster* 1.
2. MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral IgG anti-MMA.
3. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi, karena terjadi peningkatan TNF- α yang disertai dengan peningkatan IL-4 dan IFN- γ , serta hasil positif IgG spesifik terhadap MMA.
4. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe I yang diperantarai oleh IgE, karena peningkatan IL-4 tanpa disertai hasil positif IgE spesifik terhadap MMA.
5. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III, karena terjadi peningkatan IFN- γ yang disertai hasil positif IgG spesifik terhadap MMA.

6. Kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA terjadi melalui reaksi hipersensitivitas tipe IV, karena terjadi peningkatan TNF- α dan IFN- γ .
7. Terdapat korelasi antara konsentrasi IL-4, IFN- γ , TNF- α dalam plasma dan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA. Hal ini disebabkan karena respons imun sistemik berhubungan dengan respons imun lokal di jaringan mukosa mulut

Kesimpulan keseluruhan hasil penelitian ini menunjukkan MMA mampu menginduksi respons imun sekunder pada kelinci lokal (*Oryctolagus cuniculus*). Penelitian ini juga membuktikan MMA bersifat imunogenik pada penderita terpapar MMA, sehingga mampu menginduksi pembentukan IgG anti-MMA. Imunopatogenesis kerusakan jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA tidak terjadi melalui reaksi iritasi dan hipersensitivitas tipe I, tetapi melalui reaksi hipersensitivitas tipe II dan / atau tipe III serta tipe IV. Terdapat korelasi profil IL-4, IFN- γ , TNF- α pada jaringan mukosa mulut dan plasma penderita terpapar MMA.

7.2 Saran

Saran untuk dilakukan lebih lanjut adalah

1. Mengembangkan metoda diagnostik untuk reaksi iritasi dan hipersensitivitas jaringan mukosa mulut melalui pemeriksaan sitokin darah perifer.

2. Dilakukan penelitian tentang peran faktor genetika penderita pada reaksi hipersensitivitas terhadap MMA.
3. Masih perlu dikembangkan bahan baru sebagai bahan alternatif untuk pembuatan piranti dalam kedokteran gigi yang bersifat hipoalergenik bagi penderita sensitif terhadap MMA.
4. Piranti di Kedokteran Gigi yang mengandung bahan dasar monomer MMA tidak digunakan untuk penderita yang sensitif terhadap MMA.



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS, 2000. Cellular And Molecular Immunology 4th ed. London-Toronto: WB Saunders Co.
- Ada G, 2001. Vaccines and Vaccination. *New Engl J Med*, 345 : 1042-1053.
- Ahlfors EE and Lyberg T, 2001. Contact Sensitivity Reactions In The Oral Mucosa. *Acta Odontol Scand*, 59 : 248-254.
- Anderson DF, Zhang S, Bradding P, Mc Gill JL, Holgate ST, and Roche WR, 2001 The Relative Contribution Of Mast Cell Subsets To Conjunctival Th2-Like Cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 42 : 995-1001.
- Akdis CA, Akdis M, Simon D, Dibbert B, Weber M, Gratzl S, Kreyden O, Disch R, Wüthrich B, Blaser K, and Simon HU, 1999. T Cells And T Cell-Derived Cytokines As Pathogenic Factors In The Nonallergic Form Of Atopic Dermatitis. *J Invest Dermatol*, 113 : 628-634.
- Akiba H, Miyahira Y, Atsuta M, Takeda K, Nohara C, Futagawa T, Matsuda H, Aoki T, Yagita H, and Okumura K, 2000. Critical Contribution Of OX40 Ligand To T Helper Cell Type 2 Differentiation In Experimental Leishmaniasis. *J Exp Med*, 191 : 375-380.
- Akiba H, Kehren J, Duchzeau MT, Krasteva M, Horrand F, Kaiserlian D, Kaneko, and Nicolas JF, 2002. Skin Inflammation During Contact Hipersensitivity Is Mediated By Early Recruitment Of CD8+ cytotoxic 1 Cells Inducing Keratinocyte Apoptosis. *J Immunol*, 88 : 3079-3087.
- Allen TC. 1994. Hematoxylin and Eosin. In (Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH, eds). *Laboratory Methods In Histotechnology*. Washington : American Registry of Pathology, pp 53-58.
- Al-Manri A, Tibor A, Mertens P, De Bolle X, Michel P, Godfroid J, Watravens K, and Letesson J, 2001. Induction Of Immune Response In BALB/c Mice With A DNA Vaccine Encoding Bacterioferritin Or P39 Of *Brucella* spp. *Infect Immun* 69 : 6264-6270
- Anusavice KJ, 1996. Phillip's Science Of Dental Material. 6thed. Philadelphia : WB Saunders Co, pp 75-80 and 250 -252.

- Ardani W IGA, 2000. Penurunan Aktivitas Enzim Mitokondrial Dehidrogenase Dari Epitel Mukosa Rongga Mulut Karena Pengaruh Monomer Sisa Resin Akrilik *Cold Curing*. Tesis. Pascasarjana Unair.
- Ardani W IGA, 2002. Penurunan *Optical Density* DNA Pada Epitel Mukosa Rongga Mulut Karena Pemakaian Resin Akrilik *Cold Curing*. Kongres III Konsorsium Bioteknologi Indonesia (KBI) Dan Seminar Bioteknologi 2002.
- Ardani W IGA, 2003. Laporan Penderita Yang Datang Di Klinik Ortodonsia FKG Unair Dari Tahun 1995 Sampai Tahun 2000, Surabaya.
- Ardani W IGA, 2003. Pembakuan Antibodi Poliklonal Terhadap Monomer Metil Metakrilat. Laporan Penelitian Dosen Muda. Lemlit 2003.
- Ardani W IGA, 2004. *Methyl Methacrylate* Dapat Membangkitkan Respons Imun. Pertemuan Ilmiah Tahunan Nasional *Basic Science I*. UNIBRAW Malang.
- Arshad SH, 2002. Allergy. Churchill Livingstone. New York-Philadelphia-Toronto, pp 2-31.
- Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, and Cantor H, 2000. *Eta-1 (Osteopontin): An Early Component Of Type-1 (Cell-Mediated) Immunity*. Science, 287: 860-864.
- Austyn J and Wood KJ, 1994. Principles of Cellular and Molecular Immunology. New York Tokyo : Oxford University Press.
- Baekkevold ES, Wurbel MA, Kivisackk P, Wain CM, Power CA, Haraldsen G, and Campell JJ, 2004. A Role For CCR4 In Development Of Mature Circulating Cutaneous T Helper Memory Cell Populations. J Exp Med, 201 : 1045-1051.
- Baker S, Brooks SC, and Walker DM, 1988. The Release of Residual Monomeric Methyl Methacrylate From Acrylic Appliance In Human Mouth : An Assay For Monomer In Saliva. J Dent Res, 67 : 1295-1299.
- Bachaner LB and Geha RS, 2000. Molecular Mechanisms Of IgE Regulation. J Allergy Clin Immunol, 105 : 547-558.
- Belyakov IM, Hammond SA, Ahlers JD, Glenn GM, and Berzofsky JA, 2004. Transcutaneous Immunization Induces Mucosal CTLs And Protective Immunity By Migration Of Primed Skin Dendritic Cells. J Clin Invest, 113 : 998-1007.

- Bennett BL, Cruz R, Lacson RG, and Maning AM, 1997. Interleukin-4 Suppression Of Tumor Necrosis Factor α -stimulated E-Selectin Gene Transcription Is Mediated by STAT6 Antagonism of NF- κ B. *The Society For Biochemistry And Molecular Biology*, 15 : 10212-10219.
- Beresford WA, 2000. *Histology Full-Text*. Anatomy Department, West Virginia University, Morgantown, USA.
- Bickel M, Nothen, Freiburghaus K, and Shire D, 1996. Chemokine Expression In Human Oral Keratinocyte Cell Lines An Keratinized Mucosa. *J Dent Res*, 75: 1827-1834.
- Black CA, 2005. Delayed Type Hypersensitivity : Current Theories With An Historic Perspective. *Dermatology Onllyne Journal*, 5 : 7.
- Carter LL and Murphy KM, 1999. Lineage-Specific Requirement For Signal Transducer And Activator Of Transcription (Stat)4 In Interferon Production from CD4+ Versus CD8+ T Cells. *J Exp Med*, 189 : 1355-1360.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van NN, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, and Cannizzaro LA, 1992. Molecular Cloning Of The Interleukin-1 β Converting Enzyme. *Science*, 256 : 97-100.
- Clancy J, 1998. *Basic Concepts In Immunology : a Student's Survival Guide*. New York- Singapore : The McGraw-Hill Co, pp 91-99.
- Coccia EM, Passini N, Battistini A, Pini C, Sinigaglia F, and Rogge L, 1999. Interleukin-12 Induces Expression Of Interferon Regulatory Factor-1 Via Signal Transducer And Activator of Transcription-4 In Human T Helper Type 1 Cells. *J Biol Chem*, 274 : 6698-6703.
- Combe EC, 1992. *Notes And Dental Material*. 6th ed. Edinburg London New York : Churchill Livingstone, pp 26-31.
- Constant S and Bottomly K, 1997. Induction Of Th1 And Th2 CD4⁺ T Cell Responses: The Alternative Approaches. *Annu. Rev. Immunol*, 15 : 297-322.
- Deichman KA, Starke B, Schlenther S, Heinzmann A, Sparholt SH, Foster J, and Kuer J, 1999. Linkage And Association Studies Of Atopy And The Chromosome 11q13 Region. *J Med Genet*, 36 : 379 –82.
- Delves PJ and Roitt IV, 2000. The Immune System – Second Of Two Parts. *New Engl J Med*, 343 : 108 – 117.

- De Maio A, 1994. Protein Blotting. In (Dunbar BS, ed). Protein Blotting A Practical Approach. Oxford : IRL Press, pp 11-31.
- Dubois B, Chapat L, Goubier A, Papiernik M, Nicolas JP, and Kaiserlian D, 2003. Innate CD4+CD25+ regulatory T Cells Are Require For Oral Tolerance An Inhibition Of CD8+ T Cells Mediating Skin Inflammation. *Blood*, 102 : 3295-3301.
- Effendy I, Loeffler H, and Mainbach HI, 2000. Epidermal Cytokine In Murine Cutaneous Irritant Responses. *J Appl Toxicol*, 20 : 335-341.
- Engeman TM, Gorbachev, Gladue RP, Heeger PS, and Fairchild RL, 2000. Inhibition Of Functional T Cell Priming And Contact Hypersensitivity Responses By Treatment With Anti-Secondary Lymphoid Chemokine Antibody During Hapten Sensitization. *J Immunol*, 164 : 5207-5214.
- Enk AH and Katz SI, 1992. Early Molecular Events In The Induction Phase Of Contact Sensitivity. *Proc Natl Acad Sci*, 89 :1398-1402.
- Farrar JD, Asnagli H, and Murphy KM, 2002. T Helper Subset Development : Roles If Instruction, Selection, And Transcription. *J Clin Invest*, 109 : 431-435.
- Fawcett DW, 1994. Text Book of Histology, 2nd ed. USA : Chapman And Hall Inc, pp 51- 70.
- Freeman GJ, Borriello F, Hodes RJ, Reiser H, Hathcock KS, Laszlo G, McKnight AJ, Kim J, Du L, and Lombard DB, 1993. Uncovering Of Functional Alternative CTLA-4 Counter-Receptor In B7-Deficient Mice. *Science*, 262 : 907-909.
- Fujisawa S, Atsuni T, Kadoma Y, 2000. Cytotoxicity Of Methyl Methacrylate (MMA) And Related Compounds And Their Interaction With Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) Liposomes As Model For Biomembranes. *Oral Diseases*, 6 : 215-221.
- Gell and Coombs, 2003. Gell and Coombs Classification of Hipersensitive reaction. www.mednet.2003.org.
- Germain RN, 1999. Antigen Processing And Presentation. In (Paul WE, ed). *Fundamental Immunology*. 4th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, pp 287-340.
- Glimcher LH and Murphy KM, 2000. Lineage Commitment In The Immune System: The T Helper Lymphocyte Grows Up. *Gene And Development*, 14 : 1693-1711.

- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000. *Kuby. Immunology*. 4th ed. WH Freeman & Co. New York.
- Gu L, Tseng S, Hornel RM, Tam C, Loda M, and Rollins BJ, 2000. Control Of Th2 Polarization By The Chemokine Monocyte Chemoattractant Protein-1. *Nature*, 404 : 407-411.
- Guin JD, 1995. *Practical Contact Dermatitis A Handbook For The Practitioner*. McGraw-Hill, Inc. New York-Toronto, pp 397-432.
- Hamblin AS, 1993. *Cytokines And Cytokine Receptors*. Oxford : IRL Press At Oxford University Press, pp 1-77.
- Herbs MM, Prescott J, Pimer A D-N, and Schountz T, 2002. Sequence And Expression Analysis Of Deer Mouse Interferon-Gamma, Interleukin 10, Tumor Necrosis Factor, And Lymphotoxin Alpha. *Cytokine*, 17 : 203-213.
- Hershey GKK, Esswein LA, Thomas ML, and Chatila TL, 1997. The Association Of Atopy With A Gain-Of-Function Mutation In The Subunit Of The Interleukin-4 Receptor. *NEMJ*, 337 : 1720-25.
- Hochman N and Zalkind M, 1997. Hypersensitivity To Methyl Methacrylate : Mode Of Treatment. *J Prosthet Dent* , 77 : 93-96.
- Hudak S, Hagen M, Liu Y, Catron D, Oldham E, McEvoy LM, and Bowman EP, 2002. Immune Surveillance And Effector Functions Of CCR10+ Skin Homing T Cells. *J of Immunol*, 169 : 1189-1196.
- Immervol T, Loesgen S, Dutsch G, Gohlke H, Herbon N, Klugbauer S, Demple A, and Bickeboller H, 2001. Fine Mapping And Single Nucleotide Polymorphism Association Results Oc Candidate Genes For Asthma And Related Phenotypes. *Hum Mutat*, 18 : 327-336.
- InoGratzl S, Palca A, Schmitz M, Simon HU, 2000. Treatment with IFN Corticosteroid-unresponsive Asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105 : 1035-1036.
- Iwasaki A and Kelsall, 1999. Freshly Isolated Peyer's Patch, But Not Spleen Dendritic Cells Produce Interleukin 10 and Induce The Differentiation Of T helper Type 2 Cells. *J Exp Med*, 190 : 229-240.
- Janeway CA, Travers P, Hunt S, and Walport M, 1997. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. 3rded. London : Current Biology Limited, pp 42-420.
- Kay AB, 2001. Allergy and Allergic Diseases. First of Two Parts. *N Engl J Med*, 344 : 30-37

- Kamogawa Y, Minasi LE, Carding SR, Bottomly K, and Flavell RA, 1993. The Relationship Of IL-4- And IFN γ -Producing T Cells Studied By Lineage Ablation Of IL-4-producing Cells. *Cell*, 75 : 985-995.
- Kaplan MH, Wurster AL, and Grusby MJ, 1998. A Signal Transducer And Activator of Transcription (Stat) 4-independent Pathway For The Development Of T Helper Type 1 Cells. *J Exp Med*, 188 : 1191-1196.
- Kaplan MH, Wurster AL, Smiley ST, and Grusby MJ, 1999. Stat6-Dependent And-Independent Pathways For IL-4 Production. *J Immunol*, 163 : 6536-6540.
- Kedjarune U, Charoenworakul N, and Koontongkaew S, 1999. Release Of Methyl Methacrylate From Heat-Cured And Autopolymerized Resins : Cytotoxicity Testing Related To Residual Monomer. *Aust Dent J*, 44 : 25-30.
- Koch P, Baum HP, and John S, 1996. Purpuric Patch Test Reaction And Venulitis Due To Methyl Methacrylate In Dental Prosthesis. *Contact Dermatitis*, 34 : 213-215.
- Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, and Kawano J, 1990. Leachability Of Denture-Base Acrylic Resins In Artificial Saliva. *Dent Mater*, 6 : 13-15.
- Kondo N, Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Kasaharak, and Morimoto N, 2001. Reduced Interferon-Gamma Production And Mutation Of The Interleukine-12 Receptorbeta (2) Chain Gene In Atopic Subjects. *Int Arch Allergy Immunol*, 124 : 117-120.
- Koueilova R, Hogg KC, Kalaeova L, and Mountford AP, 2004. Carcinial Dermatitis Caused By Bird Schistomes Compises Both Immediate and Late Phase Cutaneous Hypersensitivity Reaction. *J Immunol*, 172 : 3766-3774.
- Koutis D and Freeman S, 2001. Allergic Contact Stomatitis Caused By Acrylic Monomer In A Denture. *Australas J Dermatol*, 42 : 203-206.
- Krakauer T, Vilcek J, and Oppenheim JJ, 1999. Proinflammatory Cytokines: TNF And IL-1 Families, Chemokines, TGF- β , And Others. In (Paul WE, ed). *Fundamental Immunology*. 4thed. Philadelphia : Lippincott-Raven Publishers, pp 775-811.
- Kraneveld AD, Vander Kleij HPM, Kool M, Van Houwelingen AH, Weitenberg ACD, Redegeld FAM, and Nijkam FD, 2002. Key Role For Mast Cells In Nonatopic Asthma. *J Immunol*, 169 : 2044-2053.

- Krasteva M, Kehren J, Horand F, Akiba H, Choquet G, Ducluzeau MT, Tedone R, Garrigue JL, Kaiserlian D, and Nicolas JF, 1998. Dual Role Of Dendritic Cells In The Induction And Down Regulation Of Antigen-Specific Cutaneous Inflammation. *J Immunol*, 160 : 1181-1190.
- Kehren J, Desvignes C, Krasteva M, Ducluzeau MT, Assossou O, Horand F, Hahne M, Kagi D, Kaiserlian D, and Nicolas JF, 1999. Cytotoxicity Is Mandatory For CD8+ T Cell-Mediated Contact Hypersensitivity. *J Exp Med*, 189 : 779-786.
- Kruse S, Forster J, Kuehr J, and Deichman KA, 1999. Characterization Of The Membrane-Bound And A Soluble Form Of Human IL-4 Receptor . Produced By Alternative Splicing. *International Immunology*, 12 : 1965-1970.
- Kuhn R, Rajewsky K, and Muller W, 1991. Generation And Analysis Of Interleukin-4 Deficient Mice. *Science*, 254 : 707-710.
- Leung DYM, 1996. *Atopic Dermatitis : From Pathogenesis To Treatment*. Springer-Verlag, New York, pp 113-143.
- Lefebvre CA, Schuster GS, Richardson DW, and Barron DJ, 1992. The Cytotoxic Effects Of Denture Base Resin Sealants. *Int J Prosthodont*, 5 : 558-562.
- Lawlor GJ and Fischer TJ, 1988. *Manual Of Allergy And Immunology*. Boston : Little Brown and Company, pp 29.
- Lehninger AL, Nelson DL, and Cox MM, 1993. *Principles Of Biochemistry*. 2nd ed. New York : Worth Publishers, pp 543-593.
- Lemeshow S, Hosmer DW, Klar J, Lwanga KS, 1990. *Adequacy Of Sample Size In Health Studies*. New York : John & Sons.
- Lenschow DJ, Walunas TL, and Bluestone JA, 1996. CD28/B7 System Of T Cell Costimulation. *Annu Rev Immunol*, 14 : 233.
- Liu Y, Loftenius A, El Gazali G, Troye-Blomberg M, Ma S, and Ekstrand, 1999. Differential Regulation Of In Vitro Cytokine Production By Human Blood Cells In Response To Methyl Methacrylate. *J Toxicol Environ Health A*, 56 : 165-182.
- Liversidge J, Dick A, Daniels G, and Dawson R. 2000. Induction Or Suppression Of A B Cell-Specific Response To Self Antigen In Vivo Is Dependent Upon Dendritic Cell Activation Via The TNF- α Receptor At The Time Of Antigen Uptake. *Eur J Immunol*, 30 : 2268-2280.

- Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan, JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, and Kamradt T, 1998. T1/ST2 Is Preferentially Expressed On Murine Th2 Cells, Independent Of Interleukin 4, Interleukin 5, And Interleukin 10, And Important For Th2 Effector Function. *Proc Natl Acad Sci*, 95 : 6930-6935.
- Luster AD, 1998. Chemokines – Chemotactic Cytokines That Mediate Inflammation. *New Engl J Med*, 343 : 436-445.
- Malaviya R and Uckun FM, 2002 Role of Stat6 in IgE Receptor/Fc ϵ R1-Mediated Late Fase Allergic Responses of Mast Cells. *J Immunol*, 168 : 421-426.
- Mazzoni A, Young HA, Spitzer JH, Visintin A , and Segal DM, 2001. Histamine Regulates Cytokine Production In Maturing Dendritic Cells, Resulting in Altered T Cell Polarization. *J Clin Invest*, 108 : 1865-1873.
- Mac Cabe JF and Basker RM. 1976. Tissue Sensitivity To Acrylic Resins. A Method Of Measuring The Residual Monomer Content And Its Clinical Application. *Br Dent J*, 140 : 347-350.
- Maldonado-Lopez R, DeSmedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, and Moser M, 1999. CD8 α :+ And CD8 α : β subclasses Of Dendritic Cells Direct The Development Of Distinct T Helper Cells In Vivo. *J Exp Med*, 189 : 587-592.
- Marez T, Shirali P, Hildebrand HF, Haguenoer JM, 1991. Increased Frequency Of Sister Chromatid Exchange In Workers Exposed To High Doses Of Methylmethacrylate. *Mutagenesis*, 6 : 127-129.
- Meraz MA, White JM, Sheehan KC, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, Kaplan DH, Riley JK, Greenlund AC, Campbell D, 1996. Targeted Disruption Of The Stat1 Gene In Mice Reveals Unexpected Physiologic Specificity In The JAK-STAT Signaling Pathway. *Cell* 84 : 431-442.
- Minty A, Chalon P, Derocq J-M, Dumont X, Guillemot J-C, Kaghad M, Labit C, Leplatois P, Liauzun P, and Miloux B, 1993. Interleukin-13 Is A New Human Lymphokine Regulating Inflammatory And Immune Responses. *Nature*, 362 : 248-250.
- O'Garra A. 1998. Cytokines Induce The Development Of Functionally Heterogeneous T Helper Cell Subsets. *Immunity*, 8 : 275-283.
- Orchansky PL, Kwan R, Lee F, Schrader JW, 1999. Characterization of the Cytoplasmic Domain Of Interleukin-13 Receptor- α . *J Biol Chem*, 274 : 2018-2025.

- Ouyang W, Jacobson NG, Bhattacharya D, Gorham JD, Fenoglio D, Sha WC, Murphy TL, and Murphy KM, 1999. The Ets Transcription Factor ERM Is Th1-specific And Induced By IL-12 Through A Stat4-dependent Pathway. *Proc Natl Acad Sci*, 96 : 3888-3893.
- Parslow TG, Sties DP, Terr AI, and Imboden JB, 2001. *Medical Immunology*. 3rd ed. New York : Lange Medical Book.
- Paul WE and Seder RA, 1994. Lymphocyte Responses And Cytokines. *Cell*, 76 : 241-251.
- Paulsen DF, 1993. *Basic Histology*. 2nded. Prentice-Hall Interbational Inc. Lange Medical Book USA, pp 43-69.
- Pohan SS, 2004. Hubungan Antara Dermatitis Atopik, Dermatitis Kontak Alergik Dan Dermatitis Kontak Iritan. In (Soegiarto G, Baskoro A, Endaryanto A, eds). *National Immunology Week*. Surabaya, pp 58-64.
- Pohan SS, 2003. Mekanisme Respons Imun Pada Dermatitis Kontak Alergik. *MDVI*, 30 : 181-184.
- Ptak W, Herzog WR, and Askemase, 1991. Delayed-type Hypersensitivity Initiation By Early-acting Cells That Are Mismatched Or MHC Incompatible With Late-acting, Delayed-Type Hypersensitivity Effector T Cells.
- Richter G and Geier J, 1996. Dental Materials-Problem Substances In Allergologic Diagnosis I : Analysis Of Test Results In Patients With Mouth Mucosa/Dental Material Problems. *Hautarz*, 47 : 839-843.
- Rincon M, Anguita J, Nakamura T, Fikrig E, and Flavell RA, 1997. Interleukin (IL)-6 Directs The Differentiation Of IL-4-Producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med*, 185 : 461-469.
- Plitz T, Saint-Mezard P, Satho M, Herren S, Waltzinger C, Bittencourt MC, Kosco-Vilbois MH, and Chvatchko Y, 2003. IL-18 Binding Protein Protects Against Contact Hypersensitivity. *J Immunol*, 171 : 1164-1171.
- Presland RB and Jurevic RJ, 2002. Making Sense Of The Epithelial Barrier: What Molecular Biology And Genetics Tell Us About The Functions Of Oral Mucosal And Epidermal Tissues. *J Dent Educ*, 66 : 564-574.
- Robert C and Kupper TS, 1999. Inflammatory Skin Diseases, T Cells, And Immune Surveillance. *New Engl J Med*. 341 : 1817-1828.

- Roitt I, Brostoff J, and Male D, 1998. Immunology. 3th ed, Oxford : Mosby, pp 301-352.
- Rose EC, Bumann J, Jonas IE, and Kappert HF, 2000. Contribution To The Biological Assessment Of Orthodontic Acrylic Materials. Measurement Of Their Residual Monomer Output And Cytotoxicity. *J Orofac Orthop*, 61 : 246-257.
- Rothenberg ME, 1998. Eosinophilia. *N Engl J Med*, 338 : 1592-1600.
- Ruyter IE. 1995. Physical and Chemical Aspects Related To Substances Related From Polymer Materials In An Aqueous Environment. *Adv Dent Res*, 9 : 344-347.
- Sadamori S, Kotani H, and Hamada T, 1992. The Usage Period Of Denture And Their Residual Monomer Contents. *J Prosthet Dent*, 68 : 374-376.
- Salomon B and Bluestone JA, 1998. LFA-1 Interaction With ICAM-1 And ICAM-2 Regulates Th2 Cytokine Production. *J Immunol*, 161 : 5138-5142.
- Santavirta S, Kontinen YT, Bergroth V, and Gronblad M, 1991. Lack Of Immune Response To Methyl Methacrylate In Lymphocyte Cultures. *Acta Orthop Scand*, 62 : 29-32.
- Schaerli P, Ebert L, Willmann K, Blaser A, Roos RS, Loetscher P, and Moser B, 2004. A Skin-selective Homing Mechanism For Human Immune Surveillance T Cells. *J Exp Med*, 199 : 1265-1275.
- Schlesselman JJ, 1982. Case-Control Studies Design, Conduct, Analysis. Oxford University Press-New York, pp 145-150.
- Scott P, 1991. IFN- γ Modulates The Early Development Of Th1 And Th2 Response In A Murine Model Of Cutaneous Leishmaniasis. *J Immunol*, 147 : 3149.
- Seder RA, Gazzinelli R, Sher A, and Paul WE, 1993. IL-12 Acts Directly On CD4⁺ T Cells To Enhance Priming For IFN- γ Production And Diminishes IL-4 Inhibition Of Such Priming. *Proc Natl Acad Sci*, 90 : 10188-10192.
- Shojaei. 1998. Buccal Mucosa As A Route For Systemic Drug delivery : A Review. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 1 : 15-30.
- Sloan-Lancaster J, Steinberg TH, and Allen PM, 1997. Selective Loss Of The Calcium Ion Signaling Pathway In T Cells Maturing Toward A T Helper 2 Phenotype. *J Immunol*, 159 : 1160-1168.

- Soeparto P, Sudarmo SM, dan Judajana FM, 2003. *Gangguan Sistem Imun Mukosa Internal*. Gramik FK Unair-RSUD Dr. Soetomo.
- Thomas GP, Adrian JC, Banks KE, and Robinson JA. 1985. *Biocompatibility Evaluation Of Resins In Hamsters*. *J Prosthet Dent*. 53 : 428-430.
- Tizzard IR, 1995. *Immunology*. Aunders College Publishing Philadelphia Sydney. pp 155-453.
- Tsuchiya H, Hoshino Y, Tajima K, and Takagi N. 1994. *Leaching And Cytotoxicity Of Formaldehyde And Methyl Methacrylate From Acrylic Resin Denture Base Materials*. *J Prosthet Dent*. 71 : 618-624
- Vallittu PK 1996. *The Effect Of Surface Treatment Of Denture Acrylic Resin On The Residual Monomer Content And Its Release Into Water*. *Odontol Scand*, 54 : 188-192.
- Van Joost T, van Ulsen J, van Loon LA. 1998. *Contact Allergy To Denture Materials In The Burning Mouth Syndrome*. *Contact Dermatitis*, 18 : 97-99.
- Van Loon LAJ, Bos JD, and Davidson CL. 1992. *Clinical Evaluation of Fifty-six Patients Referred With Symptoms Tentatively Related To Allergic Contact Stomatitis*. *Oral Surg Med and Oral Pathol*, 74 : 572-575.
- Von Andrian UH, 2000. *T-Cell Function And Migration – Two Sides Of The Same Coin*. *New Engl J Med*, 343 : 1020-1034.
- Wang HY, Shelburne CP, Zamorano J, Kelly AE, Ryan JJ, and Keegan AD, 1999. *Cutting Edge : Effect Of An Allergy-Associated Mutation In The Human IL-4R α (Q576R) On Human IL-4-Induced Signal Transduction*. *J Immunol*, 162 : 4358-4389.
- Yamazaki F, Aragane Y, Maeda A, Matsushita K, Ueno K, Yudate T, Kawada A, and Tezuka T, 2002. *Overactivation Of IL-4 Induced Activator Protein-1 In Atopic Dermatitis*. *J Dermatol Sci*, 28 : 227-233.
- Yang HW, Chou LS, Chou MY, Chang YC. 2003. *Assessment Of Genetic Damage By Methyl Methacrylate Employing In Vitro Mammalian Test System*. *Biomaterials*, 24 : 2909-2914.
- Yawalkar N, Egli F, Brand CU, Pichler WJ, and Braathen, 2000. *Antigen-presenting Cells And Keratinocyte Express Interleukin-12 In Allergic Contact Dermatitis*. *Contact dermatitis*, 42 : 18-22.

- Youn J, Chen J, Goenka S, Aronica MA, Mora AL, Correa V, Sheller JR, and Boothby M, 1998. In Vivo Function Of An Interleukin 2 Receptor β Chain (IL-2R β)/IL-4R α Cytokine Receptor Chimera Potentiates Allergic Airway Disease. *J Exp Med*, 188 : 1803-1816.
- Young AJ, Marston WL, and Dudler L, 2000. Subset –Specific Regulation Of The Lymphatic Exit Of Recirculating Lymphocytes In Vivo. *J Immunol*, 165 : 3168-3174.
- Yoshii E, 1997. Cytotoxic Effects Of Acrylates And Methacrylates : Relationship Of Monomer Structures And Cytotoxicity. *J Biomed Mater Res*, 37 : 517-524.
- Waaga AM, Gasser M, Van Holthe JEK, Najafian N, Moeller A, Vella JP, Chandraker KLWA, Khoury SJ, Sayegh MH, 2001. Regulatory Function Of Self-Restricted MHC Class II Allopeptide-Specific Th2 Clones In Vivo. *J Clin Invest*, 107 : 909-916.
- Wolhiser MR, Okayama Y, Gilfillan AM, and Metcalfe DD, 2001. IgG-Dependent Activation Of Human Mast Cells Following Up-Regulation Of Fc α R1 By IFN- α . *Eur J Immunol*, 31: 3298-3307.
- Zafropoulos GG, Apostolopoulos AX, and Patramamil, 1985. Study Of The Antigenic Properties Of Methyl Methacrylate Using The Leukocyte-migration inhibition Test. *Dent Mater*, 1 : 200-204.
- Zainuddin M, 2000. Metodologi Penelitian. Surabaya : Universitas Airlangga, hal 23-57.
- Zehnder M, Greenspans JS, Greenspan D, and Bickel M, 1999. Chemokine Gene Expression In Human Oral Mucosa. *Eur J Oral Sci* 107 : 231-235.
- Zhang S, Lukacs NW, Lawless VA, Kunkel SL, and Kaplan MH, 2000. Cutting Edge: Differential Expression of Chemokines in Th1 and Th2 Cells Is Dependent on Stat6 But Not Stat4. *The Journal of Immunology*, 165:10-14.

Lampiran 1 : Hasil Uji Normalitas Variabel IL-4, IFN- γ , TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Sebelum dilakukan analisis statistik parametrik dilakukan uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* data dua kelompok penelitian yaitu kelompok penderita terpapar MMA dan kelompok kontrol yang tidak terpapar MMA.

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Konsentrasi plasma tnp	Konsent-Ja- rangan tnp	Konsentrasi plasma tnp	Konsentrasi jaringan tnp	Konsentrasi plasma tnp	Konsentrasi jaringan tnp
N		18	18	18	18	18	18
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	63.1485	177.7319	63.1485	177.7319	63.1485	177.7319
	Std. Deviation	31.6347	73.6525	31.6347	73.6525	31.6347	73.6525
Most Extreme Differences	Absolute	.271	.314	.271	.314	.272	.287
	Positive	.271	.314	.271	.314	.272	.287
	Negative	-.178	-.296	-.178	-.296	-.214	-.249
Kolmogorov-Smirnov Z		1.085	1.257	1.085	1.257	1.088	1.150
Asymp. Sig. (2-tailed)		.150	.080	.150	.080	.187	.142

^a Test distribution is Normal.
^b Calculated from data.

Keterangan : Jar = jaringan
 $p > 0,05$ tidak signifikan, arti : data antara kelompok kontrol dan kelompok penderita berdistribusi normal

Hasil uji normalitas *Kolmogorov Smirnov* secara keseluruhan menunjukkan bahwa lima variabel berskala rasio (IL-4, IFN- γ , dan TNF- α) berdistribusi normal ($p > 0,05$).

Lampiran 2 : Analisis Deskriptif Variabel IgE, IgG Anti-MMA Dalam Serum, IL-4, IFN- γ , TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Descriptive Statistics

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Konsentrasi plasma il4p	16	10.43	83.48	43.8119	25.5348
Konsentrasi jaringan il4j	16	64.35	253.04	141.2775	71.3843
Konsentrasi plasma ifn γ	16	50.00	95.71	69.1644	16.6920
Konsent-Jaringan ifn γ	16	80.00	282.86	169.9106	84.9622
Konsentrasi plasma tnfa	16	9.16	29.17	18.2700	8.5337
Konsentrasi jaringan tnfa	16	27.49	105.53	60.6668	33.5557
Valid N (listwise)	16				



Lampiran 3 : Hasil Uji t Bebas Untuk IL-4 Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi jaringan il4j	kontrol	8	73.5675	6.7885	2.3994
	pasien	8	208.9675	20.0086	7.0741
Konsentrasi plasma il4p	kontrol	8	20.3250	5.1812	1.8318
	pasien	8	67.2988	10.4631	3.6993

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t Test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Konsentrasi jaringan il4j	Equal variances assumed	2.434	.140	-18.123	14	.000	-135.3800	7.4882	-151.4018	-119.3582
	Equal variances not assumed			-18.123	3.580	.000	-135.3800	7.4882	-152.4020	-118.3580
Konsentrasi plasma il4p	Equal variances assumed	4.331	.044	-11.573	14	.000	-45.9737	4.1280	-56.6274	-35.3201
	Equal variances not assumed			-11.573	10.338	.000	-46.9737	4.1280	-56.1426	-37.8048

Lampiran 4 : Hasil Uji t Bebas Untuk IFN- γ Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi plasma ifn γ	kontrol	8	53.6938	2.1322	.7538
	pasien	8	84.6350	6.7408	2.3032
Konsent-Jaringan ifn γ	kontrol	8	89.0475	6.7193	2.3756
	pasien	8	250.7738	21.8474	7.7242

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t Test for Equality of Means					95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi plasma ifn γ	Equal variances assumed	8.821	.002	-12.378	14	.000	-30.9413	2.4896	-36.3024	-25.5801
	Equal variances not assumed			-12.378	8.321	.000	-30.9413	2.4985	-36.0264	-25.7271
Konsent-Jaringan ifn γ	Equal variances assumed	12.005	.004	-20.012	14	.000	-161.7263	8.0813	-179.2698	-144.1928
	Equal variances not assumed			-20.012	8.713	.000	-161.7263	8.0813	-180.2406	-143.2120

Lampiran 5 : Hasil Uji t Bebas Untuk TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Group Statistics

	Kelompok	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Konsentrasi plasma tnfp	Kontrol	8	10.2150	1.0574	.3738
	pasien	8	26.3250	2.5747	.9103
Konsentrasi jaringan tnfp	Kontrol	8	28.9588	.8660	.3062
	pasien	8	92.3750	10.6771	3.7749

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			95% Confidence Interval of the Difference			
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Konsentrasi plasma tnfp	Equal variances assumed	43.667	.000	-18.371	14	.000	-16.1100	.8841	-17.7936	-14.6264
	Equal variances not assumed			-18.371	9.296	.000	-16.1100	.8841	-17.1263	-15.0937
Konsentrasi jaringan tnfp	Equal variances assumed	37.377	.000	-18.744	14	.000	-63.4160	3.3871	-71.5769	-55.2551
	Equal variances not assumed			-18.744	7.692	.000	-63.4160	3.7873	-72.3463	-54.4857

Lampiran 6 : Hasil Uji Korelasi Pearson Untuk IL-4,IFN- γ , TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol

Correlations

		Konsentrasi plasma IL4	Konsentrasi jaringan IL4	Konsentrasi plasma IFN γ	Konsentrasi jaringan IFN γ	Konsentrasi plasma TNF α	Konsentrasi jaringan TNF α
Konsentrasi plasma IL4	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	1.000 0.000 16	.995 0.000 16	.978 0.000 16	.969 0.000 16	.895 0.000 16	.894 0.000 16
Konsentrasi jaringan IL4	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	.995 0.000 16	1.000 0.000 16	.964 0.000 16	.961 0.000 16	.838** 0.000 16	.922** 0.000 16
Konsentrasi plasma IFN γ	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	.978 0.000 16	.964 0.000 16	1.000 0.000 16	.873** 0.000 16	.895** 0.000 16	.905** 0.000 16
Konsentrasi jaringan IFN γ	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	.969 0.000 16	.961 0.000 16	.873** 0.000 16	1.000 0.000 16	.928** 0.000 16	.951** 0.000 16
Konsentrasi plasma TNF α	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	.895 0.000 16	.838** 0.000 16	.895** 0.000 16	.928** 0.000 16	1.000 0.000 16	.945** 0.000 16
Konsentrasi jaringan TNF α	Pearson Correlation Sig. (2-tailed) N	.894 0.000 16	.922** 0.000 16	.905** 0.000 16	.951** 0.000 16	.945** 0.000 16	1.000 0.000 16

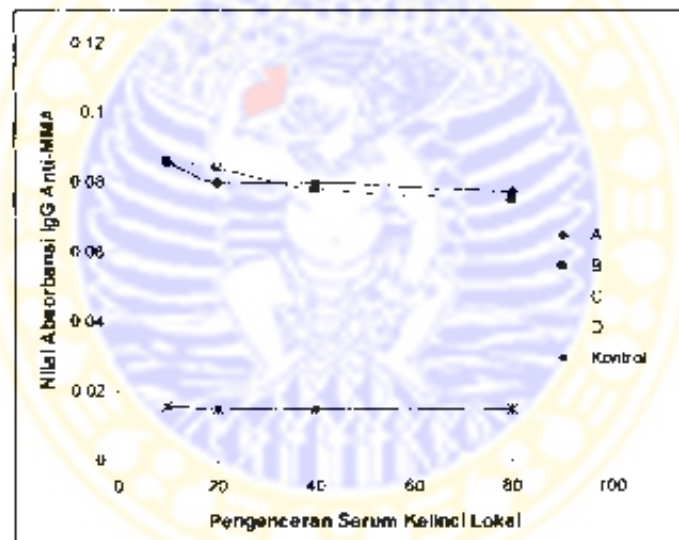
** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 7: Nilai Absorbansi IgG Anti-MMA Kelinci Lokal (*Oryctolagus cuniculus*) Sebelum dan Sesudah Immunisasi

Tabel L1 Nilai absorbansi IgG anti-MMA kelinci lokal pada 405 nm

No.	Kelinci Lokal	Pengenceran serum kelinci lokal			
		1/10	1/20	1/40	1/80
1	A	0,086	0,08	0,08	0,077
2	B	0,086	0,084	0,078	0,075
3	C	0,114	0,111	0,105	0,102
4	D	0,097	0,085	0,081	0,080
5	Kontrol	0,016	0,015	0,015	0,014

Keterangan : pengenceran antigen 1/50



Gambar L1 Titer IgG anti-MMA kelinci lokal dengan teknik ELISA

Keterangan : Pencenceran antigen 1/50

Lampiran 8 : *Checker Board* IgG Anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA

A. Persiapan bahan :

1. Antigen : MMA + *coating buffer* BSA 0,1 %

1/50 : 40 *well* X 50 μ l = 2000 μ l

40 μ l MMA + *coating buffer* –BSA 0,1 % 1960 μ l

1/100: 40 *well* X 50 μ l = 2000 μ l

20 μ l MMA + *coating buffer* –BSA 0,1 % 1980 μ l

2. Antibodi primer sampel

1/50 : masing-masing 4 *well* X 50 μ l = 250 μ l

20 μ l serum + 245 μ l BSA 0.1 %

3. Antibodi primer untuk *checker board* :

1/20 : 12,5 μ l serum + 237,5 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/40: 6,25 μ l serum + 243,8 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/80 : 3,13 μ l serum + 246,9 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/160: 1,6 μ l serum + 248,4 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/320 : 0,78 μ l serum + 249,22 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/640: 0,4 μ l serum + 249,6 μ l BSA 1 % = 250 μ l

4. Kebutuhan BSA

Untuk Blocking : 0,05 gr

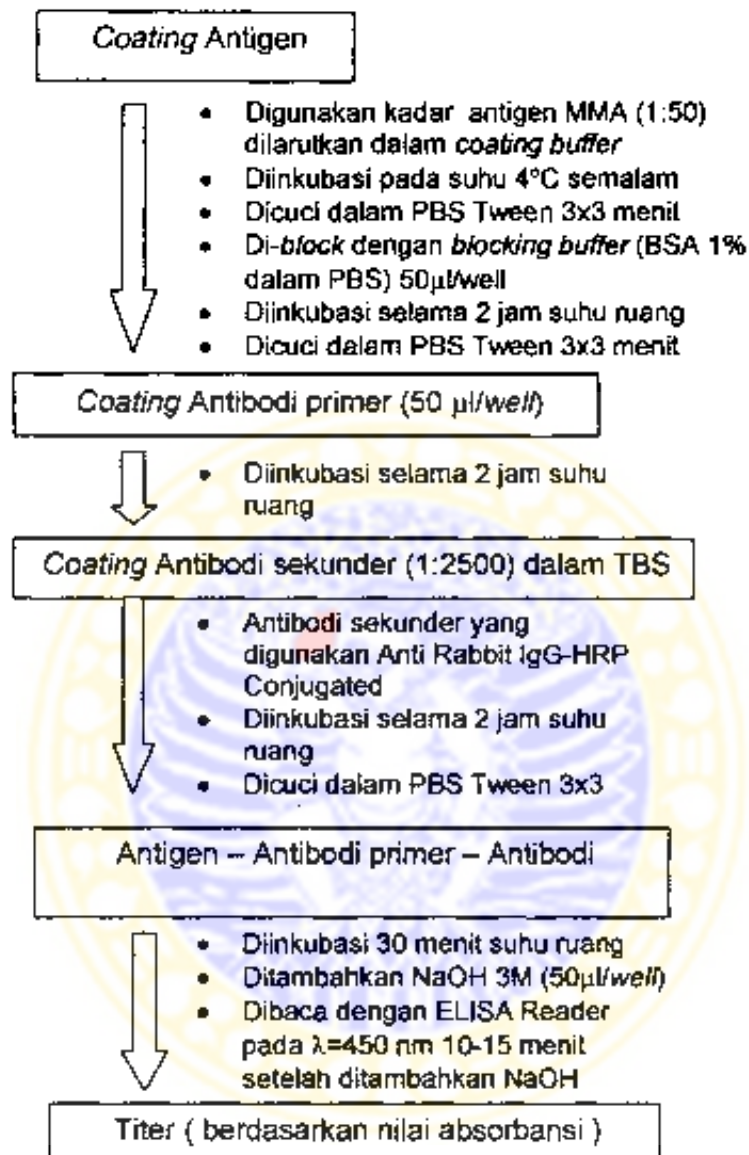
Untuk Sampel : 0,04 gr

Untuk *Checker Board* : 0,03 gr

5. Antibodi sekunder : IgG . 1 : 2500

- 6 Substrat TMB

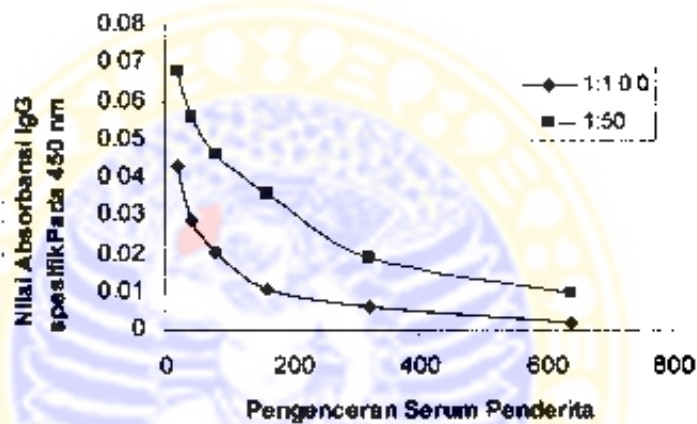
B. Cara Penelitian *checker Board* metode ELISA tidak langsung untuk IgG anti-MMA Pada Serum Penderita Terpapar MMA



C. Hasil *Checker Board* IgG Anti-MMA Pada Serum Penderita Terpapar MMA

Tabel L2 Nilai absorbansi hasil *checker board* IgG anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA

Antigen	Pengenceran Serum Penderita					
	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
1 : 50	0,068	0,056	0,046	0,036	0,019	0,010
1 : 100	0,043	0,029	0,021	0,011	0,006	0,002



Gambar L2 Nilai absorbansi IgG anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA

Lampiran 9 : Nilai Absorbansi IgG Anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol**Tabel L3** Nilai absorbansi IgG anti-MMA pada penderita terpapar MMA dan kontrol

No. sampel	Nilai Absorbansi IgG pada 450 nm	
	Kontrol	Penderita
1	0,0060	0,0350
2	0,0080	0,0300
3	0,0078	0,0360
4	0,0064	0,0530
5	0,0048	0,0450
6	0,0056	0,0510
7	0,0062	0,0410
8	0,0058	0,0510

Lampiran 10 : **Checker Board IgE Anti-MMA Pada Serum Penderita Terpapar MMA**

A. Persiapan bahan :

1. Antigen : MMA + *coating buffer* BSA 0,1 %

1/50 : 40 *well* X 50 μ l = 2000 μ l

40 μ l MMA + *coating buffer* –BSA 0.1 % 1960 μ l

1/100: 40 *well* X 50 μ l = 2000 μ l

20 μ l MMA + *coating buffer* –BSA 0,1 % 1980 μ l

2. Antibodi primer sampel

1/50 : masing-masing 4 *well* X 50 μ l = 250 μ l

20 μ l serum + 245 μ l BSA 0,1 %

3. Antibodi primer untuk *checker board*.

1/20 : 12,5 μ l serum + 237,5 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/40: 6,25 μ l serum + 243,8 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/80 : 3,13 μ l serum + 246,9 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/160: 1,6 μ l serum + 248,4 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/320 : 0,78 μ l serum + 249,22 μ l BSA 1 % = 250 μ l

1/640: 0,4 μ l serum + 249,6 μ l BSA 1 % = 250 μ l

4. Kebutuhan BSA

Untuk Blocking : 0.05 gr

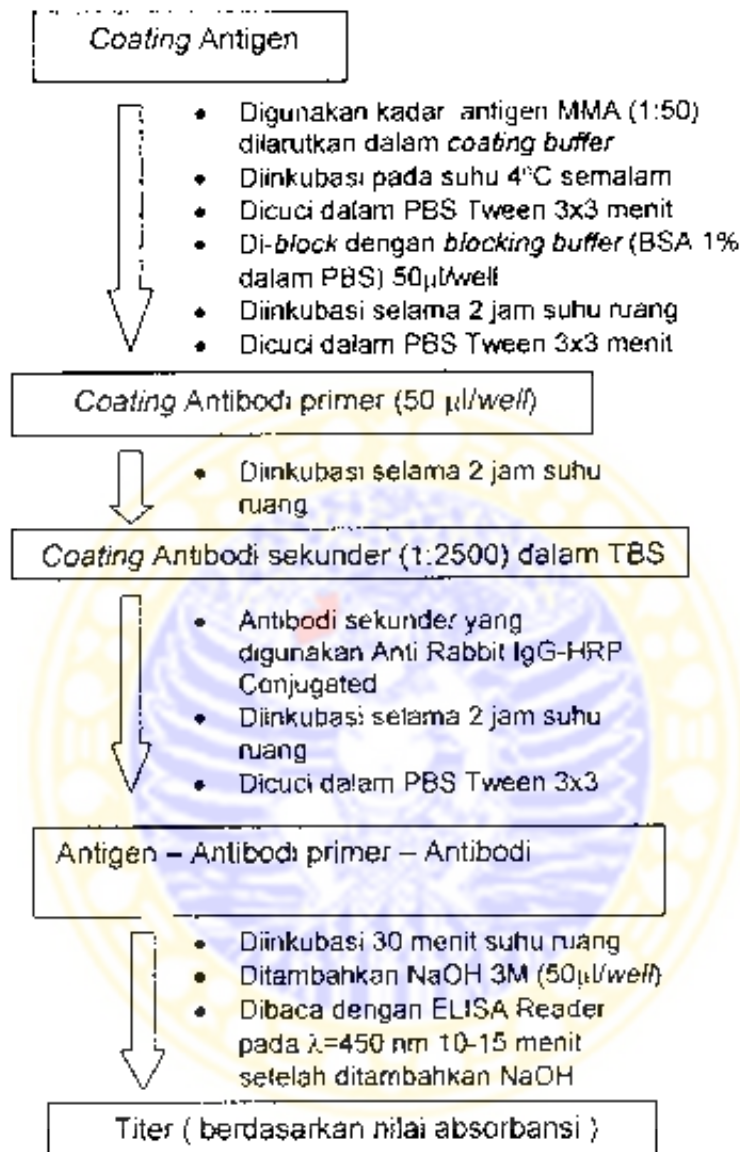
Untuk Sampel : 0.04 gr

Untuk Checker Board : 0,03 gr

5. Antibodi sekunder : IgE 1 : 2500

6. Substrat TMB

B. Cara penelitian *checker Board* metode ELISA tidak langsung untuk IgE anti-MMA Pada serum Penderita Terpapar MMA



Lampiran 11 : Nilai Absorbansi IgE Anti-MMA Pada Serum Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol**Tabel L5** Nilai absorbansi IgE Anti-MMA pada serum penderita terpapar MMA dan kontrol

No.	Nilai Absorbansi IgE Anti-MMA Pada 450 nm	
	Kontrol	Penderita
1	0,0820	0,1110
2	0,0860	0,1270
3	0,0820	0,1280
4	0,0880	0,1450
5	0,0920	0,1280
6	0,0780	0,1540
7	0,0820	0,1590
8	0,0880	0,0991

Lampiran 12 : Kurva Standar IL-4, IFN- γ , TNF- α Dengan Teknik *Direct-sandwich* ELISA sesuai Prosedur Dari Kit Brender Med System

A. Cara penentuan kurva standar IL-4 dengan teknik *direct-sandwich* ELISA prosedur dari Kit Brender Med System

Persiapan Bahan yang diperlukan :

1. Persiapan *Wash buffer* :

- a. Tuangkan 50 ml *wash buffer concentrate* ke dalam 1000 ml gelas ukur.
- b. Ditambahkan *deionized water* sampai 1000 ml.
- c. dipindah ke dalam botol steril dan simpan pada suhu 2 sampai 25 °C. Dibuat sesuai kebutuhan, seperti pada tabel di bawah :

Jumlah strips	<i>Wash buffer concentrate</i> (ml)	<i>Distiled water</i> (ml)
1-6	0,030	475
1-12	0,060	950

2. Persiapan *Assay buffer* :

- a. Tambahkan *assay buffer concentrate* (5,0 ml) ke dalam 95 ml *distilled* atau *deionized water* dan vampur perlahan agar tidak timbul gelembung
- b. Simpan pada suhu 2 sampai 8 °C. Dibuat sesuai kebutuhan, seperti pada tabel di bawah :

Jumlah strips	<i>Assay buffer concentrate</i> (ml)	<i>Distiled water</i> (ml)
1-6	2,5	475,
1-12	5,0	95,0

3. Persiapan *Biotin-conjugate*

- a. Buat *assay buffer* (reagen B) dalam 1 : 100 ke dalam botol plastik bersih. Dibuat sesuai kebutuhan, seperti pada tabel di bawah .

Jumlah <i>strips</i>	<i>Biotin-conjugate</i> (ml)	<i>Assay buffer</i> (ml)
1-6	0,03	2,97
1-12	0,06	5,94

- b. Sebelum melarutkan *conjugate concentration*, tambahkan *Green-dye* perbandingan 1 : 100 ke dalam *assay buffer* untuk pembuatan tahapan akhir larutan *conjugate*, seperti pada table di bawah :

3ml <i>Assay buffer</i>	30 μ l <i>Green-Dye</i>
6 ml <i>Assay buffer</i>	60 μ l <i>Green-Dye</i>
12 ml <i>Assay buffer</i>	120 μ l <i>Green-Dye</i>

4. Persiapan *Streptavidin*-HRP

- a. Larutan konsentrat *Streptavidin*- HRP dilarutkan dalam 1 : 2000 *assay buffer* sesuai kebutuhan, seperti pada tabel di bawah .

Jumlah <i>strips</i>	<i>Streptavidin</i> -HRP (ml)	<i>Assay buffer</i> (ml)
1-6	0,030	6
1-12	0,060	12

- b. Sebelum melarutkan *Streptavidin*-HRP *concentrate*, tambahkan *Red dye-dye* dengan perbandingan 1 : 250 ke dalam *assay buffer* untuk pembuatan tahapan akhir larutan *Streptavidin*-HRP. seperti pada tabel di bawah :

6 ml <i>Assay buffer</i>	24 μ l <i>Red-Dye</i>
12 ml <i>Assay buffer</i>	48 μ l <i>Red-Dye</i>

5. Persiapan TMB *Substrate Solution*

- a. Buat dalam volume yang sama *substrate solution I* dan *substrate solution II* dan aduk perlahan.
- b. TMB *substrate* dibuat beberapa saat bila akan digunakan. Dibuat sesuai kebutuhan seperti pada tabel di bawah :

Jumlah strips	Substrate Solution (ml)	Substrate Solution (ml)
1-6	3,0	3,0
1-12	6,0	12

6. Persiapan sampel :

Sampel dipersiapkan dengan menambahkan *Blue-dye* 1 : 250 dalam *assay buffer* seperti pada table di bawah :

5 ml <i>Assay buffer</i>	20 μ l <i>Blue-Dye</i>
12 ml <i>Assay buffer</i>	48 μ l <i>Blue-Dye</i>

7. Pembuatan Kurva Standar IL-4

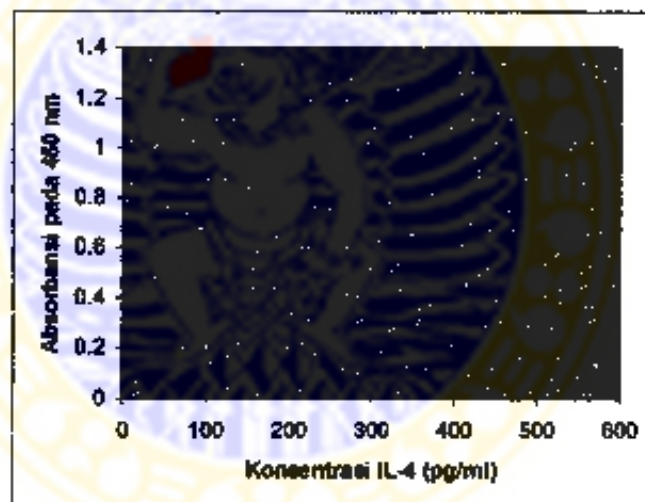
- a. Buka ekstra *microwell strips* yang sudah di-coating dengan antibodi monoklonal (*murine*) dan pisahkan dari *microwell strips* untuk analisa IL-4 sampel human IL-4, kemudian sisanya tutup rapat dalam aluminium foil, simpan pada suhu 2 sampai -8 °C.
- b. Cuci *microwell strips* dua kali dengan 300 μ l *wash buffer*. Dituang pada permukaan kertas absorben dan dibiarkan sampai 15 menit.
- c. Tambahkan 100 μ l *assay buffer* dalam dua *well* standar. Siapkan larutan standar, dengan memipet 100 μ l larutan standar IL- 4, dalam dua *well* A1 dan A2. Campur dengan memipet berulang-ulang.

- d. Kemudian pindahkan 100 μ l ke dalam well B1 dan B2 secara berurutan. Lakukan sampai well terakhir pada well G1 dan G2.
- e. Lanjutkan cara ini sebanyak lima kali, membentuk dua baris larutan standar IL-4 dengan rentang 500 sampai 7,8 pg/ml.
- f. Well H1 dan H2 adalah blanko.
- g. Tambahkan 50 μ l *Biotin-conjugate* ke semua sumuran.
- h. Tutup *microwell* dan inkubasi selama dua jam pada suhu ruang (16 $^{\circ}$ C sampai 25 $^{\circ}$ C).
- i. Dikосongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
- j. Tambahkan 100 μ l *Streptavidin-HRP* ke semua sumuran.
- k. Tutup *microwell* dan inkubasi satu jam pada suhu ruang (18 $^{\circ}$ C sampai 25 $^{\circ}$ C).
- l. Siapkan *TMB Substrate Solution* beberapa menit sebelum digunakan
- m. Dikосongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
- n. Tambahkan 100 μ l campuran *TMB Substrate Solution* semua sumuran termasuk sumuran untuk blanko.
- o. Inkubasi selama 10 - 20 menit pada suhu ruang (18 $^{\circ}$ C sampai 25 $^{\circ}$ C).
- p. Tambahkan 100 μ l *Stop Solution* ke semua sumuran termasuk sumuran blanko.

- q. Dibaca dengan ELISA reader dan diukur intensitas warna pada panjang gelombang 450 nm.

Tabel L6 Nilai absorbansi kurva standar IL-4

No.	Konsentrasi IL-4 (pg/ml)	Nilai Absorbansi Pada 450 nm
1	500	1.057
2	250	0.709
3	125	0.386
4	63	0.187
5	32	0.171
6	16	0.1
7	8	0.063



Gambar L4 Kurva standar IL-4

8. Penghitungan Kurva Standar IL-4

- a. Dibuat garis regresi dari nilai absorbansi yang diperoleh berdasarkan konsentrasi standar yang sudah ditentukan yaitu antara 500 sampai 8 (pg/ml).

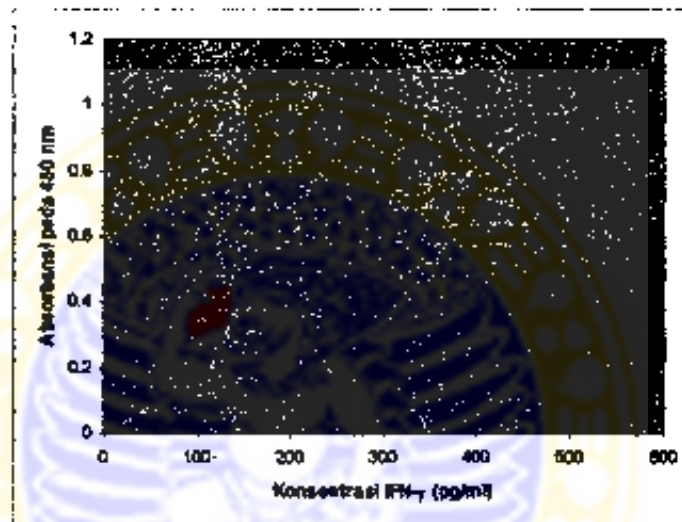
- b. Dari garis regresi dihitung dengan rumus regresi diperoleh persamaan regresi.
- c. Persamaan garis kurva standar IL-4 : $y = 0,0023 x$
- d. Selanjutnya akan digunakan untuk menentukan konsentrasi IL-4 dari plasma sampel dan kontrol.

B. Cara penentuan kurva standar IFN- γ dengan teknik *direct-sandwich* ELISA sesuai prosedur dari Kit Brender Med System

1. Persiapan bahan yang diperlukan, sama dengan untuk tahapan analisis IFN- γ dan persiapan penentuan kurva standar IFN- γ sama dengan analisis dan penentuan kurva standar IL-4. Kecuali ada satu persiapan yang berbeda yaitu :
 - I : 100 μ l IFN- γ standar (200 ng/ml) + 900 μ l Assay buffer = 20 ng/ml
 - II : 10 μ l *predilution* I (20 ng/ml) + 990 μ l Assay buffer = 0,2 ng/ml
2. Cara untuk menentukan kurva standar IFN- γ sama dengan penentuan kurva standar IL-4.
3. Diperoleh Persamaan garis kurva standar IFN- γ : $Y = 0,0021 x$.
Selanjutnya akan digunakan untuk menentukan konsentrasi IL-4 dari plasma sampel dan kontrol.

Tabel L7 Nilai absorbansi kurva standar IFN- γ

No.	Konsentrasi IFN- γ (pg/ml)	Nilai Absorbansi Pada 450 nm
1	500	1.003
2	250	0.821
3	125	0.64
4	63	0.385
5	32	0.307
6	16	0.257
7	8	0.212

Gambar L5 Kurva standar IFN- γ

C. Cara penentuan kurva standar TNF- α dengan teknik *direct-sandwich* ELISA sesuai prosedur dari Kit Brender Med System

1. Persiapan bahan yang diperlukan, sama dengan untuk tahapan analisis TNF- α dan persiapan penentuan kurva standar TNF- α sama dengan analisis dan penentuan kurva standar IL-4. Kecuali ada satu persiapan yang berbeda yaitu :

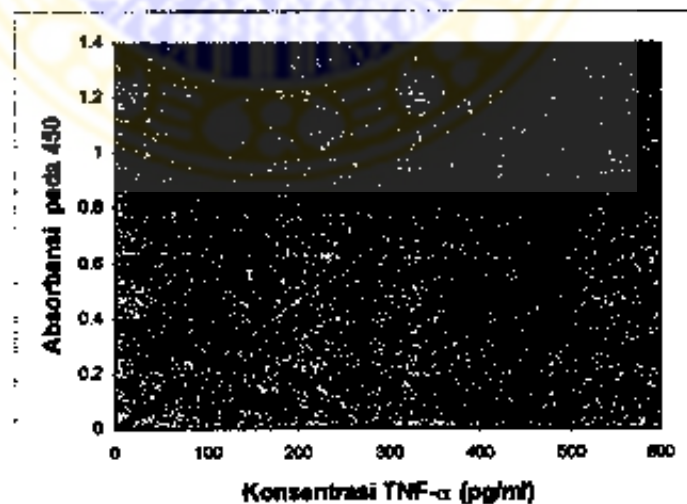
I: $100 \mu\text{l TNF-}\alpha$ standar (200 ng/ml) + 900 $\mu\text{l Assay buffer}$ = 20 ng/ml

II: 10 $\mu\text{l predilution I}$ (20 ng/ml) + 990 $\mu\text{l Assay buffer}$ = 0,2 ng/ml

2. Cara untuk menentukan kurva standar TNF- α sama dengan penentuan kurva standar IL-4.
3. Diperoleh Persamaan garis kurva standar TNF- α : $y = 0,0025 x$. Selanjutnya akan digunakan untuk menentukan konsentrasi IL-4 dari plasma sampel dan kontrol.

Tabel L8 Nilai absorbensi kurva standar TNF- α

No.	Konsentrasi TNF- α (pg/ml)	Nilai Absorbansi Pada 450 nm
1	500	1.267
2	250	0.588
3	125	0.217
4	63	0.125
5	32	0.059
6	16	0.022
7	8	0.013



Gambar L6 Kurva standar TNF- α

Lampiran 13 : Analisis Konsentrasi IL-4 Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Plasma Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol Dengan Metode *Direct-sandwich* ELISA

A. Analisis konsentrasi IL-4 plasma penderita terpapar MMA dan kontrol dengan metode *direct-sandwich* ELISA

1. Tambahkan 100 μ l *assay buffer* ke dalam dua *well* kosong.
2. Tambahkan 50 μ l *assay buffer* ke dalam dua *well* sampel
3. Tambahkan 50 μ l setiap plasma sampel ke dalam dua *well* sampel.
4. Tambahkan 50 μ l larutan *biotin-conjugate* (antibodi anti-IL-4 yang dikonjugasikan dengan biotin) ke dalam dua *well* sampel.
5. Tutup *microwell* dan inkubasi selama dua jam pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C).
6. Dikосongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
7. Tambahkan 100 μ l *Streptavidin*-HRP ke semua sumuran.
8. Tutup *microwell* dan inkubasi satu jam pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C).
9. Siapkan TMB *Substrate Solution* beberapa menit sebelum digunakan.
10. Dikосongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*
11. Tambahkan 100 μ l campuran TMB *Substrate Solution* semua sumuran termasuk sumuran untuk blanko.
12. Inkubasi selama 10 - 20 menit pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C)

13. Tambahkan 100 μ l *Stop Solution* ke semua sumuran termasuk sumuran blanko.
14. Dibaca dengan *ELISA reader* dan diukur intensitas warna pada panjang gelombang 450 nm.

B. Analisis konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut plasma penderita terpapar MMA dan kontrol dengan metode *direct-sandwich* ELISA

Jaringan mukosa mulut sebanyak 100 mg dimasukkan dalam 2 ml PBS, kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Diambil 50 μ l supernatan yang diperoleh untuk setiap pengukuran, dan dilakukan pemeriksaan *direct-sandwich* ELISA untuk mengukur konsentrasi IL-4 dengan metode yang sama dengan pengukuran IL-4 pada plasma.

Lampiran 14 : Analisis Konsentrasi IFN- γ Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Plasma Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol Dengan Metode *Direct-sandwich* ELISA

A. Analisis konsentrasi IFN- γ plasma penderita terpapar MMA dan kontrol dengan metode *direct-sandwich* ELISA

1. Tambahkan 100 μ l *assay buffer* ke dalam dua *well* kosong.
2. Tambahkan 50 μ l *assay buffer* ke dalam dua *well* sampel .
3. Tambahkan 50 μ l setiap plasma sampel ke dalam dua *well* sampel .
4. Tambahkan 50 μ l larutan *biotin-conjugate* (antibodi anti-IFN- γ yang dikonjugasikan dengan biotin) ke dalam dua *well* sampel .
5. Tutup *microwell* dan inkubasi selama dua jam pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C).
6. Dikosongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
7. Tambahkan 100 μ l *Streptavidin-HRP* ke semua sumuran.
8. Tutup *microwell* dan inkubasi satu jam pada suhu ruang (16^o C sampai 25^o C).
9. Siapkan *TMB Substrate Solution* beberapa menit sebelum digunakan.
10. Dikosongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
11. Tambahkan 100 μ l campuran *TMB Substrate Solution* semua sumuran termasuk sumuran untuk blanko.
12. Inkubasi selama 10 - 20 menit pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C).

13. Tambahkan 100 μ l *Stop Solution* ke semua sumuran termasuk sumuran blanko.
14. Dibaca dengan *ELISA reader* dan diukur intensitas warna pada panjang gelombang 450 nm.

B. Analisis konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut plasma penderita terpapar MMA dan kontrol dengan metode *direct-sandwich* ELISA

Jaringan mukosa mulut sebanyak 100 mg dimasukkan dalam 2 ml PBS, kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Diambil 50 μ l supernatan yang diperoleh untuk setiap pengukuran, dan dilakukan pemeriksaan *direct-sandwich* ELISA untuk mengukur konsentrasi IFN- γ dengan metode yang sama dengan pengukuran IFN- γ pada plasma.

Lampiran 15 : Analisis Konsentrasi TNF- α Plasma dan Jaringan Mukosa Mulut Plasma Penderita Terpapar MMA Dan Kontrol Dengan Metode *Direct-sandwich* ELISA

A. Analisis konsentrasi TNF- α plasma penderita terpapar MMA dan kontrol dengan metode *direct-sandwich* ELISA

1. Tambahkan 100 μ l *assay buffer* ke dalam dua *well* kosong.
2. Tambahkan 50 μ l *assay buffer* ke dalam dua *well* sampel .
3. Tambahkan 50 μ l setiap plasma sampel ke dalam dua *well* sampel .
4. Tambahkan 50 μ l larutan *biotin-conjugate* (antibodi anti-TNF- α yang dikonjugasikan dengan biotin) ke dalam dua *well* sampel.
5. Tutup *microwell* dan inkubasi selama dua jam pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C).
6. Dikongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
7. Tambahkan 100 μ l *Streptavidin*-HRP ke semua sumuran.
8. Tutup *microwell* dan inkubasi satu jam pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C)
9. Siapkan TMB *Substrate Solution* beberapa menit sebelum digunakan
10. Dikongkan dan dicuci empat kali semua sumuran dengan *Wash Buffer*.
11. Tambahkan 100 μ l campuran TMB *Substrate Solution* semua sumuran termasuk sumuran untuk blanko
12. Inkubasi selama 10 - 20 menit pada suhu ruang (18^o C sampai 25^o C)

13. Tambahkan 100 μ l *Stop Solution* ke semua sumuran termasuk sumuran blanko.
14. Dibaca dengan ELISA *reader* dan diukur intensitas warna pada panjang gelombang 450 nm.

B. Analisis konsentrasi TNF- α jaringan mukosa mulut plasma penderita terpapar MMA dan kontrol dengan metode *direct-sandwich* ELISA

Jaringan mukosa mulut sebanyak 100 mg dimasukkan dalam 2 ml PBS, kemudian disentrifugasi 3000 rpm selama 10 menit. Diambil 50 μ l supernatan yang diperoleh untuk setiap pengukuran, dan dilakukan pemeriksaan *direct-sandwich* ELISA untuk mengukur konsentrasi TNF- α dengan metode yang sama dengan pengukuran TNF- α pada plasma.

Lampiran 16 . Nilai Absorbansi dan Konsentrasi IL-4, IFN- γ , TNF- α Plasma Dan Jaringan Mukosa Mulut Dengan Teknik *Direct-sandwich* ELISA Sesuai Prosedur Dari Kit Brender Med System

Tabel L9 Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 plasma penderita terpapar MMA pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0.0023x$
1	0,135	58,70
2	0,153	66,65
3	0,192	83,48
4	0,189	82,17
5	0,161	70,00
6	0,138	60,00
7	0,134	58,26
8	0,136	59,13

Tabel L10 Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 plasma penderita kontrol pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0.0023x$
1	0,024	10,43
2	0,034	14,78
3	0,056	24,35
4	0,055	23,91
5	0,057	24,78
6	0,048	20,87
7	0,046	20,00
8	0,054	23,48

Tabel L11 Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ plasma penderita terpapar MMA pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0021x$
1	0,178	84,76
2	0,172	81,83
3	0,201	95,71
4	0,198	94,29
5	0,174	82,86
6	0,169	80,48
7	0,164	78,10
8	0,166	79,05

Tabel L12 Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ plasma penderita kontrol pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0021x$
1	0,115	54,76
2	0,109	52,38
3	0,116	55,24
4	0,112	53,33
5	0,111	52,86
6	0,120	57,17
7	0,113	53,81
8	0,105	50,00

Tabel L13 Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α plasma penderita terpapar MMA pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0025x$
1	0,059	23,67
2	0,600	23,98
3	0,059	23,67
4	0,061	24,43
5	0,071	28,41
6	0,073	29,17
7	0,071	28,41
8	0,072	28,86

Tabel L14 Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α plasma penderita kontrol pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0025x$
1	0,028	11,30
2	0,023	9,16
3	0,025	9,93
4	0,030	11,94
5	0,027	10,69
6	0,026	10,38
7	0,023	9,16
8	0,023	9,16

Tabel L15 Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0023x$
1	0,148	64,35
2	0,168	73,04
3	0,170	73,91
4	0,160	69,57
5	0,159	69,13
6	0,165	71,74
7	0,190	82,61
8	0,194	84,35

Tabel L16 Nilai absorbansi dan konsentrasi IL-4 jaringan mukosa mulut penderita kontrol pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0023x$
1	0,435	189,13
2	0,495	215,22
3	0,582	253,05
4	0,465	202,17
5	0,460	200,00
6	0,485	210,87
7	0,441	191,74
8	0,482	209,57

Tabel L17 Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0021x$
1	0,522	248,57
2	0,594	282,86
3	0,579	275,71
4	0,560	266,67
5	0,510	242,86
6	0,490	233,33
7	0,488	232,38
8	0,470	223,81

Tabel L18 Nilai absorbansi dan konsentrasi IFN- γ jaringan mukosa mulut penderita kontrol pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0021x$
1	0,198	94,29
2	0,168	80,00
3	0,193	91,90
4	0,194	93,33
5	0,168	80,00
6	0,162	86,67
7	0,184	87,62
8	0,207	98,57

Tabel L19 Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α jaringan mukosa mulut penderita terpapar MMA pada 450 nm

No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0025x$
1	0,260	103,65
2	0,260	102,93
3	0,200	80,18
4	0,220	88,42
5	0,021	83,38
6	0,240	93,92
7	0,260	105,53
8	0,200	80,79

Tabel L20 Nilai absorbansi dan konsentrasi TNF- α jaringan mukosa mulut penderita kontrol pada 450 nm

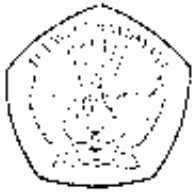
No.	Nilai absorbansi	Konsentrasi : $Y = 0,0025x$
1	0,074	29,47
2	0,075	29,93
3	0,073	29,32
4	0,075	29,78
5	0,072	28,71
6	0,073	29,02
7	0,069	27,49
8	0,070	27,95

Lampiran 17 : Komposisi Bahan

Nama Larutan	Bahan	Jumlah
<i>Phospat Buffer Saline</i> (PBS) pH 7,4	KCL	0,2 g
	KH ₂ PO ₄	0,2 g
	NaCL	8 g
	NaHPO ₄ ·7 H ₂ O	2,16 g
	Akuades	Sampai 1000 ml
PBS Tween-20 0,05% pH 7,4	Tween-20	500 µl
	PBS	Sampai 1000 ml
<i>Blocking Buffer</i> pH 7,4	PBS Tween-20	20 ml
	0,05% BSA	0,6 g
Bufer karbonat-bikarbonat (<i>Coating Buffer</i>) pH 9,6 (Simpan pada suhu ruang maksimal 2 minggu)	Na ₂ CO ₃	1,59 g
	NaHCO ₃	2,93 g
	NaN ₃	0,2 g
	Akuades	Sampai 1000 ml
<i>Tris Buffer Saline</i> (TBS) Tween- 20 pH 8	Tris-base	2,4 g
	NaCL	8 g
	KCL	0,2 g
	Tween-20	0,5 ml
	Akuabidest	Sampai 1000 ml
Substrat <i>p</i> -NPP (<i>para</i> - Nithrophenyl Phosphat)	<i>p</i> -NPP	5 mg
	<i>Buffer</i> <i>diethanolamine</i>	5 ml
NaOH 3M (<i>Stop reaction</i>)	NaOH	6 g
	Akuades	Sampai 50 ml

Lampiran 18 : Sertifikat Kelaikan Etik Penelitian





SURAT KETERANGAN
KELAIKAN ETIK PENELITIAN

Nomor : 17/SK/LE/2003

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama Peneliti Utama : IGA WAHJU ARDANI, drg,M.Kes
Judul Penelitian : Efek Monomer Metil Metakrilat Terhadap Kerusakan Jaringan
Epitel Mukosa Mulut

Setelah mempelajari lembar isian panitia penelitian dan prosedur operasional pengambilan data, maka diputuskan penelitian tersebut :

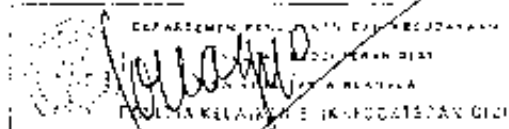
- a. Laik etik
b. Laik etik dengan usulan perbaikan :
.....
.....
c. Tidak laik etik

Catatan :

Panitia akan memantau prosedur operasional pengambilan data dari penelitian tersebut

Surabaya, 6 Oktober 2003

Ketua,



Prof. Retno Laksminingsih Soebagyó, drg.,MHPed.

NIP. 130206163