

ADLN - Perpustakaan Universitas Airlangga
ANALISIS MOLEKULER EKSPRESI ANOMALI PROTEIN MUKOSA MULUT
DAN PROFIL SUBKLAS ANTIBODI PADA RECURRENT APHTHOUS
STOMATITIS (RAS)

44
Diah Savitri Ernawati
Ernawati
a

DISERTASI

**ANALISIS MOLEKULER EKSPRESI ANOMALI PROTEIN MUKOSA MULUT
DAN PROFIL SUBKLAS ANTIBODI PADA RECURRENT APHTHOUS
STOMATITIS (RAS)**



**MILIT
PERPUSTAKAAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA**

**DIAH SAVITRI ERNAWATI
090114542 D**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**ANALISIS MOLEKULER EKSPRESI ANOMALI PROTEIN MUKOSA MULUT
DAN PROFIL SUBKLAS ANTIBODI PADA *RECURRENT APHTHOUS
STOMATITIS (RAS)***



**DIAH SAVITRI ERNAWATI
090114542 D**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

**ANALISIS MOLEKULER ANOMALI PROTEIN MUKOSA MULUT DAN PROFIL
SUBKLAS ANTIBODI PADA *RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS (RAS)***

DISERTASI

**Untuk memperoleh Gelar Doktor
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran
Pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga dan dipertahankan di
hadapan Panitia Ujian Doktor Terbuka**

**Diah Savitri Ernawati
090114520 D**

**PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2005**

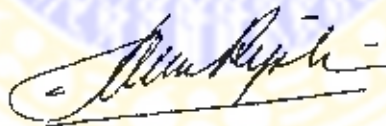
DISERTASI INI TELAH DISETUJUI
TANGGAL Juni 2005

Promotor,



Prof Dr Yoes Prijatna Dachlan dr MSc
NIP : 130 359 278

Kopromotor,



Prof Dr Siti Soemarijah drg Sp PM
NIP : 130 238 895

Telah diuji pada Ujian Doktor Tahap I (Tertutup)

Tanggal 4 April 2005

PANITIA PENGUJI DISERTASI

Ketua : Prof. Soetjipto, dr., M.S., Ph.D.

Anggota :

1. Prof.Dr.H.Yoes Prijatna Dachlan, dr.,M.Sc.
2. Prof.Dr.Siti Soemarijah, drg.,Sp.PM
3. Prof.H.Kuntoro, dr.,MPH.,Dr.PH.
4. Widya Asmara, drh.,M.S.,Ph.D.
5. Prof.Dr.Subianto Martosudarmo, dr.,Sp.A.K (K).
6. Fedik A.Rantam, drh.,Ph.D
7. Dr.Latief Mooduto, drg.,M.S.,Sp.KG

**Ditetapkan dengan Surat Keputusan
Rektor Universitas Airlangga
Nomor : 2480/JO3/PP/2005
Tanggal 8 April 2005**

UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama saya panjatkan puji dan syukur kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-NYA, sehingga saya mendapatkan petunjuk dan kemampuan untuk menyelesaikan penelitian dan penulisan disertasi ini.

Pada kesempatan ini perkenankan saya menyampaikan rasa hormat dan terimakasih yang setulusnya kepada yang terhormat :

Almarhum Prof Dr Pitono Soeparto dr SpAK, atas kesediaan beliau menjadi Promotor, ditengah kesibukan beliau yang begitu padat masih berkenan meluangkan waktu untuk membimbing, memberikan petunjuk dengan penuh kesabaran. Sebagai seorang pembimbing yang sarat dengan tugas, beliau selalu memberikan dorongan dan dukungan moril sehingga saya dapat menempuh program doktor ini dan akhirnya dapat menyelesaikan disertasi ini.

Prof Dr Yoes Prijatna Dachlan dr MSc, atas kesediaan beliau sebagai promotor untuk menggantikan Prof Dr Pitono Soeparto dr SpAK (Almarhum), ditengah kesibukan beliau yang begitu padat masih berkenan meluangkan waktu untuk mengarahkan dan membahas substansi secara komprehensif

Prof Dr Siti Soemarijah drg Sp PM, atas kesediaan beliau sebagai Ko-promotor yang dengan penuh pengertian, perhatian dan kesabaran telah banyak memberikan dorongan, arahan, saran serta koreksi sehingga disertasi ini terselesaikan.

Pemerintah Republik Indonesia, khususnya Menteri Pendidikan Nasional dan Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti program pendidikan doktor.

Rektor Universitas Airlangga, Prof H Dr Med Puruhito dr SpB.TKV juga mantan rektor Universitas Airlangga Prof H Soedarto dr DTM&H PhD atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan kepada saya sebagai mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya. Prof Dr Mohammad Amin, dr Sp P(K), juga mantan direktur Program Pascasarjana Unair, Prof. Dr H Soedijono Tirtowidardjo dr Sp THT (K), karena telah

memberikan kesempatan kepada saya menjadi mahasiswa Program Pascasarjana Universitas Airlangga, dan fasilitas untuk menyelesaikan studi program doktor.

Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Mandojo Rukmo drg MS SpKG dan mantan Ketua Program Studi Ilmu Kedokteran Program Pascasarjana Universitas Airlangga, Prof Dr Hj Juliati Hood Alsagaff dr MS Sp PA. FIAC, atas perhatian, arahan dan kemudahan dalam penyelesaian administrasi sehingga sangat memperlancar studi saya.

Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Prof Dr Moh Rubianto drg MS Sp Perio dan mantan Dekan FKG Universitas Airlangga, Dr Boediardjo drg MSc yang telah memberi ijin dan kesempatan untuk mengikuti program pendidikan doktor.

Para Dosen pemberi Mata Kuliah Penunjang Disertasi (MKPD) Prof Soetjipto, dr MS PhD; Prof Dr Subijanto Marto Sudarmo dr Sp AK ; Prof Kuntoro dr MPH Dr PH, yang telah memberi banyak asupan pemikiran penyusunan kerangka ilmiah dalam penyusunan disertasi ini.

Para Pembimbing dan Penguji mulai ujian kualifikasi, ujian proposal : Almarhum Prof Dr Pitono Soeparto dr Sp AK; Prof Dr Siti Soemarijah drg Sp PM: Prof Dr Hj Juliati Hood Alsagaff dr MS SpPA FIAC; Prof Soetjipto dr MS PhD; Prof Kuntoro dr MPH Dr PH; Widya Asmara drh PhD; Fedik A Rantam drh PhD; Dr Boediardjo drg MSc, atas dukungan dan asupan dalam pemikiran dan penulisan disertasi ini.

Staf pengajar pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga pada semester I sampai semester III angkatan tahun 2001-2002 : Prof H Bambang Rahino Setokoesoemo, dr Prof Eddy Pranowo Soedibyso dr MPH (Alm); Prof Dr Koento Wibisono Siswomihardjo; Prof Dr Muhammad Zainuddin, Apt; Widodo j Pudjirahardjo, dr MS MPH Dr PH; Fuad Amsyari dr MPH PhD; Prof Dr Pitono Soeparto dr SpAK; Prof Dr Suhartono Taat Putra dr MS; Prof Dr J Glinka SVD; Siti Pariani dr MS MSc PhD; Dr L Dyson MA; Prof. Kuntoro dr MPH Dr PH; Prof Purnomo Suryohudoyo dr SpBK

Prof Dr Hj Juliati Hood Alsagaff dr MS Sp PA FIAC, atas perhatian, dorongan, arahan, serta kemudahan dalam penyelesaian administrasi sehingga dapat menyelesaikan program doktor.

Ketua *Tropical Disease Center (TDC)* Universitas Airlangga, Prof Dr Yoes Prijatna Dachlan dr MSc, yang telah memberi ijin untuk melakukan penelitian di *Tropical Disease Center*.

Ketua Kelompok Studi *Tissue Culture Tropical Disease Center* Universitas Airlangga Fedik A Rantam drh Ph.D yang telah membantu sarana dan prasarana dalam pelaksanaan penelitian ini. Ibu Helen Susilowati, yang telah membantu sebagai teknisi elektroforesis di Tissue Culture-TDC. Ibu Indah, Bapak M.Chusen serta Bapak Surip yang telah membantu dalam pelaksanaan penelitian ini.

Prof Kuntoro dr MPH Dr PH yang banyak membantu dan memberikan konsultasi metodologi penelitian sehingga penelitian ini dapat diselesaikan dan dilaporkan.

Prof Soetjipto dr MS PhD yang banyak memberi masukan, tambahan referensi yang berharga untuk penelitian saya.

Prof Dr Subijanto Marto Sudarmo dr Sp AK (K) yang telah membimbing saya dan memberi banyak tambahan ilmu dan masukan di bidang imunologi mukosa.

Prof Retno Lakminingsih Soebagyo drg MHPed (Almarhumah) yang telah memberikan masukan dan arahan dalam penyusunan protokol penelitian untuk *Etika Penelitian (Ethical Clearance)*.

Kepala Laboratorium Rekayasa Genetika Universitas Gadjah Mada Yogyakarta, Widya Asmara drh MS PhD yang selalu menyediakan waktu dan memberikan wawasan pengetahuan di bidang biologi molekuler melalui diskusi serta memberikan ide dan arahan dalam membuat konsep penelitian.

Soemarsih Soentoro drg (Almarhumah) mantan Dekan dan mantan Kepala Laboratorium Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Unair yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menjadi staf pengajar di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga.

Isidora Karsini Soewondo drg MS SpPM Ketua Bagian Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, yang memberi dorongan dan semangat kepada saya untuk mengikuti program magister dan doktor di Fakultas Pascasarjana Universitas Airlangga

Teman-teman sejawat di Bagian Oral Medicine Fakultas Kedokteran Gigi Unair. Prof Dr Hadi Soenartyo drg MSc SpPM.; M.Yusri drg MS SpPM; Mintarsih Djamhari, drg MS SpPM; Hening Tutihendrarti Drg MS; Dr Iwan Hernawan drg MS; Bagus Soebadi drg MHPed SpPM; Prijo Hadi drg MS SpPM; Kus Harijanti drg M.Kes SpPM; Adiaستی E.P drg M.Kes; Desy drg atas pengertian dan kerjasamanya sehingga disertasi ini dapat diselesaikan.

Terima kasih kepada teman-teman satu angkatan tahun 2001/20002 dalam menjalani Pendidikan Program Doktor di Pascasarjana Universitas Airlangga.

Para penderita yang dengan sabar telah menyatakan persetujuan untuk berperan serta pada penelitian ini. Tanpa kesediaan mereka tentu penelitian ini tidak terlaksana.

Rekan-rekan di Gramik Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya yang telah membantu saya dalam mendapatkan informasi ilmiah melalui internet : Sri Mustaina Dra Mkes; Atika, S Si, M Si; Endah Kusumawardhani S.Kom dan Dra Nuning

Teman-teman angkatan tahun 1979 FKG Unair, Sidarningsih drg Mkes; Sujati drg Mkes; Otty Ratna W drg Mkes; Betty Puspitawati drg MARS; Susi Kristiani drg Mkes; Bambang Suchahyo drg Sp (Ortho); Dr Retno Pudji Rahayu drg MS yang telah memberikan semangat dan dorongan kepada saya untuk dapat menyelesaikan Pendidikan Program Doktor di Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Sahabat saya sejawat Regina TC Tandelilin drg MSc dan Keluarga; Dr Isdwiranto dr Sp.BS dan Keluarga, serta Abdurrahman dr., SpBO (Alm) beserta keluarga yang selalu memberikan dukungan moril dalam menyelesaikan disertasi ini.

Kepada semua staf sekretariat Program Pascasarjana Universitas Airlangga, khususnya Ibu Siswati, Bapak Kumaidi, Bapak Rochyani, Ibu Lilik, Bapak Alex, Bapak Tomo, Bapak Supariyanto, Ibu Nur, Ibu Lis, Bapak Djumadi; Ibu As dan semua karyawan yang telah membantu proses kelancaran selama saya menempuh studi.

Ibu Sumilah dan Ibu Farida selaku Analis dan sekaligus teknisi yang dengan sabar dan tekun membantu saya dalam penelitian ini, juga kepada Ibu Win, Ibu Etti, Bapak Daud yang telah membantu saya dalam pengumpulan sampel di Klinik Oral Medicine FKG Unair.

Kepada semua teman sejawat, pegawai, Guru Besar dan Pimpinan di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga yang telah mendorong dan mendukung Pendidikan saya.

Kepada kedua orang tua saya Soehardi Markamin (Alm) dan ibu R.Kartini, (Almarhumah), atas segala bimbingan dan doa restu serta didikan yang tidak pernah saya peroleh di pendidikan formal mulai saya dilahirkan, sehingga saya dapat menyelesaikan pendidikan program doktor, semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu melimpahkan kasih sayang kepada kedua orang tua saya sebagaimana beliau berdua telah memberikan kasih sayang dalam membesarkan dan mendidik saya. Saya selalu mendoakan semoga Tuhan Yang Maha Esa selalu mengampuni segala dosa, menerima semua amal ibadah dan arwah beliau di sisi NYA.

Kedua mertua saya, Bapak R.Soebagio dan ibu R.A. Iswati, yang telah memberikan doa restu kepada saya sekeluarga. Sembah bakti saya haturkan atas segala kasih sayang dan didikannya yang tidak pernah berhenti untuk mendoakan, mendukung dan mendorong saya agar dapat menyelesaikan pendidikan dengan lancar pada Program Doktor Pascasarjana Universitas Airlangga.

Semua saudara kandung saya tercinta dan semua saudara ipar saya beserta keluarga terima kasih atas dorongan, semangat dan doa restunya sehingga pendidikan S3 ini dapat saya selesaikan.

Kepada ketiga anak saya tercinta : Dian Paramita Kartikasari, Dimas Radityo Satrio Nugroho dan Ivan Rakhmadi Nugroho, mama sangat bersyukur dan bangga mempunyai anak seperti kalian yang selalu memberi dorongan, semangat dan doa serta pengertian walaupun terpaksa sering harus mama tinggalkan, namun kalian tetap mandiri, mempunyai semangat juang yang tinggi dalam menjalani hidup, sehingga cita-cita dan studi kalian tetap berjalan dengan baik, semoga Tuhan selalu melimpahi kasih karunia yang besar pada kalian.

Rasa hormat dan terima kasih yang tidak terhingga kepada suami tercinta, Widodo Budi Nugroho, Ir MT, yang telah dengan setia mendampingi saya selama 20 tahun, baik dalam duka maupun suka, dan dengan tulus ikhlas telah memberi ijin, dorongan, semangat, terutama membantu mendidik dan mengawasi semua anak sehingga anak pertama dapat diterima di Perguruan Tinggi, semoga berkah Tuhan selalu menyertai kita sekeluarga.

Semua pihak dan handai taulan serta para sejawat yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, baik secara langsung maupun tidak langsung yang telah membantu dalam penyusunan disertasi ini).

Sebagai manusia biasa tidak lepas dari khilaf serta kesalahan baik tutur kata maupun tindakan kepada siapa saja terutama dalam masa pendidikan S3, saya dengan tulus hati mohon maaf sebesar-besarnya.

RINGKASAN

Analisis Molekuler Ekspresi Anomali Protein Mukosa Mulut dan Profil Subklas Antibodi Pada *Recurrent Aphthous Stomatitis*(RAS)

Diah Savitri Ernawati

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) merupakan salah satu kelainan pada mukosa mulut yang ditandai adanya ulser yang rekuren. Lesi ini seringkali ditemukan di rongga mulut serta telah diteliti oleh banyak ahli, tetapi etiologi RAS secara molekuler sampai saat ini belum diketahui dengan pasti. Adanya ekspresi anomali protein mukosa mulut merupakan salah satu faktor yang dapat memodulasi reaksi lokal, sehingga dapat berperan sebagai salah satu faktor pemicu timbulnya RAS.

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengungkap secara molekuler salah satu etiopatogenesis RAS melalui analisis ekspresi anomali protein pada mukosa mulut serta profil subklas antibodi dan gambaran klinis RAS. Tujuan khusus dari penelitian ini adalah untuk : 1) Mengkarakterisasi anomali protein spesifik RAS (predominan) yang terekspresi pada penderita RAS. 2) Menganalisis ekspresi anomali protein mukosa mulut dengan gambaran klinis RAS. 3) Menentukan profil subklas antibodi dengan gambaran klinis RAS. 4) Membuktikan antibodi monoklonal spesifik anomali protein mempunyai sensitivitas dan spesifisitas terhadap RAS.

Manfaat penelitian ini secara teoritis adalah memberi informasi tentang etiopatogenesis timbulnya RAS secara molekuler, melalui analisis ekspresi anomali protein anomali pada sel epitel mukosa mulut yang mempunyai sifat antigenik, sehingga dapat menginduksi antibodi humoral dan seluler. Oleh karena itu hasil penelitian ini dapat digunakan untuk mengembangkan IPTEK di bidang *Oral immunology*. Berdasar pada hasil penelitian diatas secara praktis dapat digunakan sebagai petanda untuk menentukan tipe RAS mayor, minor dan remisi sehingga tatalaksana penanganan RAS menjadi lebih sempurna. Selain

itu juga dengan ditemukannya anomali protein spesifik *RAS* yang mempunyai sifat reaktif terhadap antibodi, maka dapat digunakan sebagai bahan alternatif/ indikator dini untuk pencegahan atau pengobatan. Juga dapat digunakan sebagai salah satu marker dan kit diagnostik.

Penelitian ini merupakan penelitian observasional eksploratif dan analitik dengan menggunakan rancangan *cross sectional*, yang pelaksanaannya di bagi menjadi tahap pertama yaitu karakterisasi secara klinis penderita *RAS*, sehingga dapat ditentukan tipe *RAS*, kemudian di lakukan koleksi sampel. Tahap ke dua adalah mengkarakterisasi anomali protein yang diekspresikan oleh penderita *RAS*. Tahap ke tiga adalah analisis profil antibodi subklas pada serum penderita *RAS*. Tahap ke empat adalah analisis spesifisitas dan sensitivitas antibodi monoklonal spesifik *RAS*.

Karakterisasi klinis di lakukan dengan cara wawancara dan pemeriksaan klinis serta pengisian formulir kuesioner. Kasus *RAS* banyak ditemukan pada usia 10-59 tahun, dan paling banyak ditemukan pada wanita sebesar 85,7 % dari kasus *RAS* dan pria 12 penderita atau 34,2 %. Berdasarkan usia yang paling banyak menderita *RAS* adalah antara usia 20-29 tahun, dengan frekuensi kekambuhan setiap tahun 3-12 kali.

Karakterisasi anomali protein yang di ekspresikan pada permukaan epitel mukosa mulut di lakukan dengan analisis SDS-PAGE 12% dan *Western blot* dari sampel hasil swab protein mukosa mulut dan serum, diambil dari 15 penderita *RAS* mayor, 20 penderita *RAS* minor, 15 penderita *RAS* fase remisi dan 15 penderita bukan *RAS* (kontrol), ditemukan beberapa protein yang kurang spesifik oleh karena itu diperlukan pemurnian dengan *sephadex G 125* kromatografi. Hasil kromatografi protein dari pasien *RAS* ditemukan beberapa protein yang berbeda, tetapi menunjukkan kemurnian yang cukup baik. Hal ini dapat dilihat pada pita yang muncul setelah dilakukan pewarnaan *silver nitrat* (AgNO_3) terlihat hanya satu pita yang muncul pada setiap lajur.

Hasil karakterisasi protein setelah dimurnikan untuk menghilangkan kontaminan pada fraksi protein yang berasal dari kasus *RAS* mayor ditemukan 5 pita dengan berat molekul 87 kDa, 65 kDa, 30 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Begitu

juga fraksi protein dari kasus RAS minor ditemukan beberapa macam protein yang mempunyai berat molekul sama dengan kasus RAS mayor, hanya protein yang mempunyai berat molekul 30 kDa tidak ditemukan pada kasus RAS minor, demikian juga pada kasus RAS remisi.

Hasil analisis protein dengan *western blot* menunjukkan, bahwa tidak semua protein dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal anti *whole protein* pada serum kelinci. Gambaran pita protein yang dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal adalah fraksi protein yang berasal dari kasus RAS mayor dan ditemukan empat macam pita protein dengan berat molekul 20 kDa, 25 kDa, 65 kDa dan 87 kDa. Sedang protein yang berasal dari fraksi protein kasus RAS minor hanya ditemukan dua macam pita protein yaitu protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa. Walaupun sangat tipis, tetapi fraksi protein yang berasal dari kasus RAS remisi ditemukan dua macam protein yang mempunyai berat molekul beda dengan kasus RAS minor yaitu ditemukan protein dengan berat molekul 65 kDa dan 87 kDa. Hasil ini menunjukkan bahwa protein yang tampak setelah dilakukan analisis *Western blot* mempunyai arti penting dalam respon imun, terutama daya reaktivitas protein terhadap antibodi.

Pemurnian protein predominan dengan elusi menunjukkan tingkat kemurnian yang tinggi, dan ditemukan satu pita protein dengan berat molekul 65 kDa yang mempunyai sifat reaktivitas tinggi dan kemungkinan protein ini yang mempunyai peranan penting dalam menginduksi antibodi pertamakali. Untuk mengetahui homogenitas molekul protein yang terkandung dalam protein mukosa mulut RAS dilakukan analisis menggunakan *scan densitometri*, didapatkan grafik satu puncak dengan ketinggian 522.5 mm dan luas area 39678.9 mm, ini menunjukkan suatu molekul protein dominan yang spesifik pada penderita RAS dan mempunyai sifat stabil. Juga dapat dibuktikan bahwa protein tersebut mampu menginduksi respon imun seluler dan terbukti dengan uji natif imunofloresen tampak sel T aktif.

Hasil uji analisis subklas imunoglobulin dari serum pasien menunjukkan kesamaan dan sangat signifikan dengan imunoglobulin yang disekresikan oleh sel hibrid, jika dibandingkan dengan kontrol. IgG2a mempunyai titer yang paling tinggi dengan pengenceran 10^5 jika dibandingkan imunoglobulin lainnya.

Hasil analisis varians (Anova) satu jalur menunjukkan profil subklas antibodi IgG2a, IgG3 dan IgA pada serum penderita RAS menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding kontrol ($p < 0.05$). Analisis varians satu jalur profil subklas antibodi IgG2a, IgG3 dan IgA pada *whole protein* maupun protein elusi penderita RAS menunjukkan perbedaan yang sangat signifikan ($p < 0.05$). Hasil uji LSD kadar IgG2a, IgG3 dan IgA pada serum penderita antara RAS mayor dan minor tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan, demikian juga untuk kadar kadar IgG2a, IgG3 dan IgA pada *whole protein* dan protein elusi penderita RAS mayor, minor maupun remisi

Penelitian tahap ke empat adalah *typing* imunoglobulin serta uji spesifisitas dan sensitivitas antibodi monoklonal spesifik anomali protein. Antibodi monoklonal anti anomali protein dengan berat molekul 65 kDa dilakukan dengan cara hibridisasi sel limfosit dan sel mieloma. Hasil hibridisasi sel limfosit dan sel mieloma ditemukan beberapa macam *subtyping* antibodi monoklonal IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, *kappa chain* dan *lambda chain*. Hasil identifikasi tipe (*isotyping*) antibodi monoklonal terhadap klon sel hibrid dengan menggunakan uji ELISA ditemukan urutan titer yang tinggi yaitu mulai IgG2a, *kappa chain* (κ -chain), IgG3, IgG2b, IgG1, IgA, IgM dan *lambda chain* (λ -chain).

Uji sensitivitas dan spesifisitas subklas antibodi monoklonal IgG2a menunjukkan bahwa IgG2a mempunyai tingkat sensitivitas yang tinggi (94,3%) terhadap anomali protein mukosa mulut penderita RAS (mayor, minor dan remisi), sedang tingkat spesifisitasnya adalah 86,7%. Untuk antibodi monoklonal subklas IgA mempunyai tingkat sensitivitas 88,6% dan spesifisitasnya 80%. Untuk subklas antibodi monoklonal IgG3 mempunyai tingkat sensitivitasnya 91,4% dan spesifisitas 93,3%.

Semua hasil dari rangkaian tahapan penelitian telah di temukan protein anomali predominan yang di ekspresikan pada penderita RAS dengan berat

molekul (BM) 65 kDa. Anomali protein dominan spesifik *RAS* bersifat antigenik. Ekspresi anomali protein mukosa mulut pada penderita *RAS* tipe mayor secara kualitatif ditemukan beberapa pita protein dengan BM 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Untuk *RAS* minor ditemukan dua macam pita protein dengan BM 65 kDa dan 25 kDa sedang pada *RAS* remisi ditemukan dua pita protein masing-masing dengan BM 87 kDa dan 65 kDa. Profil subklas antibodi IgG2a dan IgG3 serta Ig A pada *RAS* mayor, *RAS* minor serta remisi mempunyai titer yang lebih tinggi dibanding penderita kontrol (normal). Antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA spesifik protein 65 kDa mempunyai spesifisitas dan sensitivitas tinggi.

Sebagai saran masih perlu dilakukan penelitian lanjutan peranan protein dominan lainnya seperti protein 87 kDa, 30 kDa, 25 kDa, sehingga ditemukan etiopatogenesis *RAS* secara molekuler yang komprehensif. Selain itu juga perlu dilakukan uji lapangan (*field trial*) dari antibodi monoklonal hasil hibridisasi terhadap pasien *RAS* sebagai kit diagnostik.

SUMMARY

THE MOLECULAR ANALYSIS ON THE EXPRESSION OF PROTEIN ANOMALY IN ORAL MUCOSA AND THE PROFILE OF ANTIBODY SUBCLASSES IN RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Diah Savitri Ernawati

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) is one of the abnormalities in oral mucosa, characterized by the presence of recurrent ulcer. The lesion, which is frequently found in oral cavity, has long been investigated by many researchers. However, the molecular etiology of RAS remains unclear. The expression of protein anomaly in oral mucosa is one of the factors that may modulate local reaction and plays role as a one of triggering factors in the emergence of RAS.

The general objective of this study was to disclose one of the etiopathogenesis of RAS at molecular level by analyzing the expression of protein anomaly in oral mucosa and the profile of antibody subclasses with the clinical presentation of RAS. The particular objectives of this study were as follows: 1) To characterize RAS-specific (predominant) protein resulting from the expression in RAS patients. 2) To analyze the expression of oral mucosa protein anomaly with the clinical presentation of RAS. 3) To determine the profile of antibody subclasses with the clinical presentation of RAS. 4) To prove that protein anomaly-specific monoclonal antibody has sensitivity and specificity against RAS. The theoretical benefit of this study were that it can provide information on the etiopathogenesis of RAS at molecular level through the analysis of protein anomaly expression in oral mucosal epithelial cells, which has antigenic characteristics, so that it can induce humoral and cellular immune response. Therefore, the results of this study can be used to develop science and technology in oral immunology. The practical benefit of this study was that the results can be used as marker to determine RAS types as major, minor, or remission, to improve RAS management. In addition, the antibody-reactive RAS-

specific protein anomaly can also be used as alternative material or early indicator for prevention and treatment, as a marker and diagnostic kit.

This was an explorative and analytic observational study using cross-sectional design. The implementation of this study was divided into four steps. The preparatory step consisted of the clinical characterization of patients with RAS to determine RAS type and sample collecting. The second was the characterization of protein anomaly expressed in RAS patients' oral mucosa. The third step was the analysis of subclass antibody profile in RAS patients' serum. The final step was the analysis of RAS-specific monoclonal antibody specificity and sensitivity.

Clinical characteristics was carried out by interview, clinical examination, and filling the questionnaire. RAS cases were mostly found in patients aged 10 - 59 years, most were female (65,7 %) from RAS cases, while male patients were only 34,2 %. Based on age, most patients were 20 - 29 years old, with recurrent frequency 3 - 12 times annually.

The characterization of protein anomaly expressed on the surface of oral mucosa epithelial cells was undertaken using 12% SDS-PAGE and Westem blot to samples taking from serum and oral mucosa protein swab from 15 patients with major RAS, 20 patients with minor RAS, and 15 non-RAS patients (control). The results revealed some less-specific protein, requiring purification by means of sephadex G 125. The results of protein chromatography from RAS patients showed some different proteins, but with sufficient purity, as proved from appearing bands after staining with silver nitrate (AgNO_3), in which only one band appeared in each line.

The results of characterization of protein, which had been purified to eradicate contaminants, showed that protein fractions from major RAS cases had 5 bands with molecular weights of 87, 65, 30, 25, and 20 kDa. Protein fractions from minor RAS cases revealed several types with the same molecular weights as those from major RAS cases, except protein with molecular weight of 30 kDa. Similar findings were also found in remission RAS cases.

The results of protein analysis using Westernblot showed that not all protein could react with anti-whole protein polyclonal antibody in rabbit serum. Protein bands that could react with polyclonal antibody were those from major RAS cases, in which there were four protein bands with molecular weights of 20, 25, 65, and 87 kDa. From protein of minor RAS cases, only two bands were found with molecular weights of 65 and 25 kDa. Although very thin, protein fractions from remission RAS cases revealed two proteins different from those in minor cases. They were those with molecular weights of 65 and 87 kDa. These results indicated that protein appeared after Westernblot analysis had an important role in immune response, particularly in protein reactivity against antibody.

Predominant protein purification using Elusion showed a high purity level, and one band with molecular weight of 65 kDa had a high reactivity and an important role in the first induction of antibody. To identify the homogeneity of protein molecules contained in RAS patients' oral mucosa protein, densitometry scan was carried out, revealing one-peak graph with a height of 522.5 mm and width of 39678.9 mm. This indicated a stable predominant specific protein molecule in RAS patients, which was able to induce cellular immune response as proved from immunofluorescence native test that revealed active T cells.

The results of immunoglobulin subclass analysis from patients' serum showed significant similarities to those with immunoglobulins secreted by hybrid cells, as compared to control. The results of one-way variance analysis (Anova), which showed the profile of antibody subclasses IgG2a, IgG3 and IgA in the serum of RAS patients, indicated significant difference from that of control ($p < 0.05$). The results of LSD test showed that IgG2a, IgG3 and IgA levels in the serum of major and minor RAS patients were not significantly different, and neither were the levels of IgG2a, IgG3 dan IgA in whole-protein and eluted protein in major, minor, as well as remission RAS patients.

The fourth stage of this study was immunoglobulin typing and protein anomaly specific monoclonal antibody specificity and sensitivity test. Anti protein anomaly monoclonal antibody with molecular weight of 65 kDa was identified

with hybridization of lymphocytes and myeloma cells. The results revealed monoclonal antibody subtypes, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, κ -chain and λ -chain. The results of monoclonal antibody typing on hybrid cell clones using ELISA showed the highest titer of IgG2a, followed with μ -chain, IgG3, IgG2b, IgG1, IgA, IgM and λ -chain.

The sensitivity and specificity test of monoclonal antibody subclass IgG2a showed that it has a high sensitivity level (94.3%) against oral mucosa anomaly protein in major, minor, and remission RAS patients, while its specificity was 86.7%. For monoclonal antibody subclass IgA, the sensitivity level was 88.6% and specificity level was 80%, and that of IgG was 91.4% and 93.3%, respectively.

From the steps taken in this study, predominant protein anomaly expressed in RAS patients had been successfully characterized. The protein was the one with molecular weight of 65 kDa. RAS-specific predominant protein anomaly has an antigenic characteristic. The expression of oral mucosa protein in patients with major, minor, and remission RAS had no significant difference. In major RAS, there were qualitatively several proteins bands with 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa and 20 kDa molecular weights. In minor RAS, there were protein bands with 65 kDa and 25 kDa molecular weights, and in remission RAS two protein bands of 87 kDa and 65 kDa were found. The profile of IgG2a, IgG3, and IgG3 antibody subclasses in major, minor, and remission RAS had higher antibody titer than those in control (normal) patients. The production of monoclonal antibody against RAS anomaly protein of 65 kDa induced monoclonal antibody subclasses IgG2a, IgG3 and IgA that had specificity and sensitivity against RAS-specific protein anomaly.

It is suggested to perform further studies on the role of other predominant proteins, such as those with molecular weight of 87 and 25 kDa, to find comprehensive molecular etiopathogenesis of RAS. Field trial of monoclonal antibody resulting from hybridization of RAS patients as diagnostic kit should also be investigated.

ABSTRACT

THE MOLECULAR ANALYSIS ON THE EXPRESSION OF PROTEIN ANOMALY IN ORAL MUCOSA AND THE PROFILE OF ANTIBODY SUBCLASSES IN RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Diah Savitri Ernawati

The general purpose of this study was to disclose one of the etiopathogenesis of recurrent aphthous stomatitis (RAS) at molecular level by analyzing the expression of protein anomaly in oral mucosa, and the profile of antibody subclasses in clinical presentation of RAS.

This was a cross-sectional explorative and analytic observational study. Samples, who met inclusion and exclusion criteria, were taken from total population. Samples of protein swab obtained from oral mucosa, and serum were taken from 15 patients with major RAS, 20 patients with minor RAS, and 15 were control. The characterization of protein anomaly expressed on the surface of oral mucosa epithelium was carried out using SDS-PAGE 12% and Westernblot methods.

The result of oral mucosal protein anomaly expression analysis in patients with major RAS using SDS-PAGE 12% revealed five protein bands with molecular weights of 87, 65, 30, 25, and 20 kDa. In minor RAS cases with protein anomaly expression, there were four proteins with molecular weights of 87, 65, 25, and 20 kDa, and the protein in remission RAS had four protein bands with molecular weights of 87, 65, 25, and 20 kDa. The band disappearances, by using western blot test, of 30 kDa of major cases, 87 and 20 kDa of minor cases and 20 and 25 kDa of remission cases, indicated that those patients were not reacted with polyclonal antibodies of rabbit serum, there fore they had no role in the induction of RAS.

One-way variance analysis (Anova) revealed that the profile of antibody subclasses of IgG2a, IgG3 and IgA in RAS patients' serum had significant difference compared to control ($p < 0.05$). Likewise, one-way variance analysis of

the antibody subclasses of IgG2a, IgG3 and IgA in whole-protein or eluted protein in RAS patients revealed highly significant differences ($p < 0.05$).

The results of LSD test no significant differences were observed in IgG2a, IgG3 and IgA levels between serum patients of major and minor RAS types, as well as in IgG2a, IgG3 and IgA levels in whole protein compared to eluted protein. Sensitivity and specificity test on IgG2a showed that this antibody had a high sensitivity level (94.3%) towards oral mucosal protein anomaly in RAS patients (major, minor, and remission), while the specificity level was 86.7%. For IgA monoclonal antibody, the sensitivity level was 88.6%, and the specificity was 80%. Finally IgG3 the sensitivity was 91.4% and specificity 93.3%.

In conclusion, the antigenic protein expressed in oral mucosa of major, minor, and remission RAS was predominantly 65 kDa molecular weight. Based on antibody level, IgG2a, IgG3 and IgA in mayor, minor and remission have significant higher compared to control. IgG2a, IgG3 and IgA MoAb have a high specificity and sensitivity to a protein anomaly of 65 kDa.

Keywords: RAS; predominant protein; protein anomaly 65 kDa; profile of antibody subclasses; sensitivity and specificity

DAFTAR ISI**Halaman**

HALAMAN SAMPUL DEPAN.....	i
HALAMAN SAMPUL DALAM.....	ii
HALAMAN PRASYARAT GELAR.....	iii
HALAMAN PERSETUJUAN.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN.....	xi
SUMMARY.....	xix
ABSTRACT.....	xxiii
DAFTAR ISI.....	xxv
DAFTAR TABEL.....	xxx
DAFTAR GAMBAR.....	xxx1
DAFTAR BAGAN.....	xxxii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xxxiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xxxv

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	6
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus.....	6
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Teoritis.....	6
1.4.2 Manfaat Praktis.....	6

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1	Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS).....	7
2.1.1	Epidemiologi Recurrent Aphthous Stomatitis.....	7
2.1.2	Etiologi dan Patofisiologi RAS.....	9
2.1.2.1	Faktor Internal.....	9
2.1.2.1.1	Genetik.....	10
2.1.2.1.2	Hormonal.....	10
2.1.2.1.3	Nutrisi.....	11
2.1.2.1.4	Stres.....	11
2.1.2.2	Faktor Eksternal.....	13
2.1.2.2.1	Faktor Lingkungan.....	13
2.1.2.2.2	Alergi Makanan.....	14
2.1.3	Manifestasi Klinis Recurrent Aphthous Stomatitis.....	15
2.1.3.1	Recurrent Aphthous Minor.....	15
2.1.3.2	Recurrent Aphthous Major.....	16
2.1.3.3	Recurrent Aphthous Stomatitis Herpetiform.....	16
2.1.4	Lokasi RAS.....	17
2.1.5	Diagnosis dan Terapi.....	19
2.2	Sistem Imun mukosa.....	19
2.2.1	Sitokin dalam sistem imun mukosa.....	22
2.2.2	Sitokin yang menginduksi isotyping switching	23
2.2.3	Sistem Imunitas Rongga Mulut.....	24
2.3	Mekanisme Immunologik Pada Kerusakan Jaringan.....	23
2.3.1	Peran sistem imunitas rongga mulut.....	26
2.3.2	Mekanisme Immunologi Kerusakan jaringan.....	29
2.4	Respons Imun.....	31
2.4.1	Respons Imun Humoral.....	33
2.4.2	Sintesis Antibodi.....	35
2.4.3	Antibodi.....	35
2.4.4	Respons Antibodi Terhadap Antigen.....	39

2.4.5	Profil Subklas antibodi.....	41
2.5	Protein Anomali Mukosa Mulut.....	47
2.6	Struktur Protein.....	50
2.6.1	Karakteristik Protein.....	50
2.6.2	Reaksi dan Sifat Umum protein.....	51
2.6.3	Ikatan Kimia Yang Berperan dalam molekul Protein.....	52
2.6.4	Urutan Asam amino menentukan konformasi	53
2.7	Antibodi Monoklonal.....	55
2.7.1	Prinsip Teori Dasar Hibridoma.....	56
2.7.2	Cara Fusi sel Somatik.....	57
2.7.3	Isolasi dan Sifat sel Limfosit B.....	58
2.7.4	Kultivasi sel Dan Biologi Sel Kultur.....	61
2.7.5	Imunisasi.....	64
2.7.6	Imunisasi dengan menggunakan ajuvan.....	67
2.7.7	Dosis Imunisasi.....	68
2.7.8	Produksi Hibridoma.....	69
2.7.9	Preparasi Limfosit.....	70
2.7.10	Dasar Hibridisasi & Produksi Antibodi Monoklonal.....	72
2.7.11	Tanpa Sekresi Immunoglobulin.....	72
2.7.12	Defek Enzim untuk Seleksi.....	72
2.7.13	Sifat Fusi yang baik.....	73
2.7.14	Kualitas Hibridoma.....	73
2.7.15	Prinsip Seleksi.....	74
2.7.16	Aplikasi Antibodi Monoklonal.....	79
2.7.17	Penggunaan Antibodi Monoklonal.....	80

BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL

3.1	Kerangka Konseptual.....	82
3.2	Bagan Kerangka Konseptual.....	86

BAB 4 MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1	Jenis Penelitian.....	87
4.2	Populasi, sampel dan Teknik.....	87
4.2.1	Populasi penelitian.....	88
4.2.2	Sampel Penelitian.....	88
4.2.3	Teknik Pengambilan sampel.....	88
4.3	Definisi operasional variabel.....	89
4.4	Bahan Penelitian.....	90
4.4.1	Bahan Penelitian	90
4.4.2	Bahan Kimia.....	90
4.4.3	Instrumen Penelitian	91
4.5	Lokasi dan waktu penelitian.....	91
4.6	Prosedur penelitian.....	91
4.6.1	Tahap Persiapan Penelitian	91
	Menentukan karakteristik Klinis Penderita RAS.....	91
	Pengumpulan sampel protein mukosa mulut.....	92
	Metode Kolom kromatografi.....	93
	Produksi Antibodi Poliklonal.....	93
	Metode pembuatan Antibodi poliklonal.....	93
4.6.2	Tahap Penelitian.....	94
	Tahap 1 Karakterisasi protein spesifik RAS.....	94
	SDS-PAGE.....	95
	Stratifying westernblot.....	96
	Metode Densitometri.....	96
	Tahap 2 Purifikasi Protein Predominan.....	96
	Tahap 3 Produksi Antibodi Monoklonal.....	98
	Kultur sel.....	95
	Imunisasi.....	95
	Fusi.....	95
	Kloning.....	97
	Pemanenen imunoglobulin	104

	Identifikasi imunoglobulin.....	105
	Tahap 4 uji sensitivitas dan spesifisitas	106
	Uji Spesifisitas.....	106
	Uji Sensitivitas.....	106
4.7	Analisis Data.....	107
4.8	Kerangka Operasional Penelitian.....	109

BAB 5 HASIL PENELITIAN

5.1	Karakteristik Klinik RAS.....	110
5.2	Karakterisasi Protein.....	114
5.3.	Pemurnian Protein Predominan.....	117
5.3.1	Karakterisasi Protein Spesifik RAS.....	120
	Analisis Densitometri.....	120
5.4.	Pembuatan Antibodi Monoklonal.....	122
5.4.1	Profil Antibodi Monoklonal pada serum.....	127
5.4.2	Profil Antibodi Monoklonal pada <i>Whole</i> protein.....	129
5.4.3	Uji Sensitivitas dan Spesifisitas.....	133

BAB 6. PEMBAHASAN

6.1	Karakteristik Klinik RAS.....	139
6.2	Analisis Ekspresi Protein anomali.....	141
6.3	Respons imun humoral dan seluler terhadap protein anomali spesifik RAS.....	144
6.3.1	Respon Imun Humoral.....	144
6.3.2	Respons Imun Seluler.....	147
6.4.	Profil antibodi subklas pada RAS	148
6.5	Antibodi Monoklonal anti protein Anomali.....	154
6.6	Fenomena protein anomali 65 kDa.....	156

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1	Kesimpulan.....	156
7.2	Saran.....	158

**HASIL PUBLIKASI
DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN**



DAFTAR GAMBAR

2.1 Gambar lapisan Barrier protektif mukosa mulut.....	26
2.2 Respon Antibodi Primer dan Sekunder.....	40
2.3 Skema sintesa asam nukleat dan prinsip seleksi.....	75
2.4 Skema pemindahan grup metil untuk sintesis nukleat acid.....	76
5.1 Gambaran klinis ulser pada penderita RAS.....	112
5.2 Protein hasil kolom kromatografi.....	113
5.3 Analisis Berat Molekul Fraksi Protein dengan SDS-PAGE.....	115
5.4 Analisis Berat Molekul hasil Kromatografi.....	115
5.5 Analisis protein dengan Westernblot.....	116
5.6 Analisis Berat Molekul dengan SDS-PAGE 12%.....	118
5.7 Analisis Protein spesifik dan Predominan.....	119
5.8 Densitogram Penentuan Panjang Gelombang.....	121
5.9 Analisis Kemurnian Protein 65 kDa.....	121
5.10 Respon Imun Seluler dengan Native Immunofluoresen.....	122
5.11 Hasil Klon Sel Hibrid.....	123
5.12 Identifikasi Immunoglobulin subklas.....	124
5.13 Grafik Titer Immunoglobulin dari Supernatan.....	125
5.14 Grafik Titer Immunoglobulin dari serum penderita RAS.....	125
5.15 Analisis straining blotting.....	126
5.16 Profil Kadar Subklas Antibodi.....	130
5.17 Profil Kadar Subklas antibodi Whole Protein.....	130
5.18 Profil Kadar Subklas Antibodi Protein Elusi.....	132

DAFTAR TABEL

5.1.	Distribusi umur pada penderita RAS.....	111
5.4.1	Hasil Anova Kadar Subklas Antibodi pada serum.....	127
5.4.2	Hasil Uji LSD Kadar IgG2a,IgG3 dan IgA pada serum	129
5.4.3	Hasil Anova Kadar Subklas Antibodi <i>whole protein</i>	129
5.4.4	Hasil Uji LSD kadar IgG2a,IgG3,IgA <i>whole protein</i>	130
5.4.5	Hasil Uji Sensitivitas dan Spesifisitas IgG2a.....	134
5.4.6	Hasil Uji Sensitivitas dan Spesifisitas IgG3.....	135
5.4.7	Hasil Uji sensitivitas dan Spesifisitas IgA.....	136

DAFTAR BAGAN

3.1 Kerangka Konseptual.....	86
4.6 Kerangka Operasional umum penelitian.....	109



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Data klinis penderita RAS dan Identifikasi Protein RAS	171
2. Prosedur pengumpulan sampel protein	173
3. Prosedur SDS-PAGE	174
4. Prosedur Elusi & Dialisis	177
5. Prosedur uji westernblot	178
6. Prosedur Uji imunogenitas Protein spesifik RAS	179
7. Prosedur ELISA untuk mengetahui imunogenitas protein RAS	180
8. Prosedur kerja Native Imunofluoresen	181
9. Prosedur produksi antibodi monoklonal	183
10. Prosedur ELISA untuk deteksi Imunoglobulin dari Kultur sel	184
11. Prosedur ELISA Antibodi Anti subtype	185
12. Uji ELISA Spesifisitas antibodi Monoklonal	186
13. Titer antibodi produksi sel hibrid	187
14 Hasil Perhitungan BM Protein RAS	188
15. Hasil uji ELISA Sel Hibrid	188
16. Titer antibodi Serum Kelinci	189
17. Kadar Subklas antibodi IgG2a,IgG3 dan IgA	190
18. Bagan Prosedur Penelitian	196
19. Kurva Standar Protein	199
20. Kurva Standar Protein Marker	201

21. Hasil Uji ANOVA dan LSD subklas IgG2a, IgG3 dan IgA dan uji screening sensitivitas dan spesifisitas	203
22. Hasil Laboratorium penderita RAS	212
23. Keterangan Laik Etik	213
24. Lembar Informed Consence	214
25. Kuesioner	215



DAFTAR SINGKATAN

AAT	: Adenine Aminopterin Thymidin
ADA	: Adenosin Desaminase
ADCC	: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity
Ag	: Antigen
AP	: Alkaline Phosphatase
APC	: Antigen Presenting Cells
APRT	: Adenosin Phosphoribosyl Transferase
BrdU	: Brom deoxyuridin
BSA	: Bovine serum Albumin
CFA	: Complete Freund's Adjuvant
CMI	: Cell Mediated Immunity
ChRBC	: Chicken Red Blood Cell
Da	: Dalton
DAB	: Diaminobenedin
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
EDTA	: Ethylene Diamine Tetra acetic Acid
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
Fc	: Crystalline fragment
FCS	: Fetal Calf Serum
FITC	: Fluorescent Isothiocyanate
Gln	: Glutamin
HA	: Hypoxanthin Azasarin
HAT	: Hypoxanthin Adenine Thimine
HAZ	: Hypoxanthin Adenine Zusatz
HCL	: Hydro chloride
HGPRT	: Hypoxanthin Guanidin Phosphoribosyl Transferase
HRP	: Horse Radish Peroxidase
HLA	: Human Leucocyte Antigen
HSP	: Heat Shock Protein
Ig	: Immunoglobulin
IFN	: Interferon
LTA	: Lipoteichoic Acid
MHC	: Major Histocompatibility Complex
PBMCs	: Peripheral Blood Mononuclear cells
PVDF	: Polyvinyl Diodefluoride
RAS	: Recurrent Aphthous Stomatitis
RAU	: Recurrent Aphthous Ulceration
Sel NK	: Sel Natural Killer
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphat-Polyacrylamide Gel electrophoresis
TK	: Thymidin Kinase
TNF	: Tumor Necrosing Factor
TEMED	: N,N,N,N-Tetra Methyl Diamine
Tris-Cl	: Tris-hidroxyaminomethene chloride

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Mukosa mulut merupakan jaringan lunak yang sangat berperan pada sistem imun di dalam rongga mulut. Pada keadaan normal mukosa mulut selain berfungsi untuk menahan masuknya mikroorganisme juga mempunyai resiko dan rentan terhadap agen infeksi maupun non infeksi. Pada lapisan mukosa ini dapat dijumpai imunoglobulin maupun sel-sel imun non spesifik sebagai respons imun lokal yang bertanggung jawab terhadap agen asing.

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) merupakan salah satu kelainan jaringan lunak mulut yang paling sering dijumpai (Ship, 2001; Barrons, 2001). Kelainan ini tergolong penyakit yang tidak ganas tetapi keberadaannya di rongga mulut merupakan masalah tersendiri bagi penderita. Keluhan rasa sakitnya sangat mengganggu dan mengakibatkan kesulitan dalam berbicara, makan dan menimbulkan bau mulut yang tidak enak, serta dapat mempengaruhi estetik bila ulser terjadi pada daerah bibir (Soemarijah, 1985).

Prevalensi RAS di berbagai negara menunjukkan angka yang bervariasi antara 5 % - 66 % (Ship, 20001, Scully, 2002). Hasil penelitian di Thailand menunjukkan prevalensi RAS 46,7% (Ponissawaranun & Laohapand,1997). Di Amerika utara 20 % - 50 % (Mirowski,2001), di Inggris 10 %-25 %, di Swedia 5 %



-66 % (Scully,2002). Di Sabah dan Serawak 1,2 % sedang Malaysia 0,5 % dari 11687 penderita *RAS* (Zian, 2000). Di R.S Cipto Mangunkusumo dan di Klinik *Oral Medicine* Fakultas kedokteran Gigi Universitas Airlangga kasus *RAS* ditemukan sekitar 26,6 %-69,2 % (Sumarjah dan Sarsito,1992; Djamhari,1995; Karsini dan Endah,1998, Emawati, 2002).

Walaupun lesi ini seringkali ditemukan di rongga mulut oleh para dokter dan dokter gigi serta telah diteliti oleh banyak ahli tetapi sampai saat ini masih belum dapat diatasi dengan baik karena etiopatogenesis (mekanisme yang melatar belakangi serta etiologi) kelainan ini belum diketahui dengan pasti. Hipotesis sementara penyakit ini berkaitan dengan gangguan sistem imun yang belum diketahui prosesnya (Barrons, 2001, Mirowski, 2001)

RAS merupakan suatu kondisi kerusakan pada epitel yang kemungkinan diakibatkan oleh faktor eksternal (seperti trauma, infeksi bakteri, infeksi virus) dan faktor internal (seperti genetik, hormonal, gangguan sistem imun, defisiensi hematinik, penyakit gastrointestinal, alergi makanan dan psikis). Faktor-faktor yang berkaitan dengan *RAS* dapat bertindak sebagai agen yang akan membentuk ikatan kompleks dengan epitel mukosa mulut. Agen tersebut dapat menimbulkan rangsangan yang terus menerus kemungkinan akan meningkatkan aktivasi protein kinase di dalam siklus sel dan enzim polimerase II. Peningkatan aktivasi dalam siklus sel terjadi pada fase S2 yang berakibat terjadinya peningkatan multiplikasi sel, sehingga terjadi peningkatan aktivitas gen *CDC8* dan *CDC21* (*cell division cycle*) yang akhirnya terjadi peningkatan ekspresi protein. Sedang enzim polimerase II mempunyai peranan penting di dalam

proses pembentukan protein baru melalui peningkatan asam asparagin dan asam glutamin, sehingga mengakibatkan perubahan struktur primer protein pada mukosa mulut menjadi anomali protein. Perubahan ini terjadi melalui rangkaian proses secara molekuler yang kemungkinan diawali adanya perubahan urutan nukleotida yang berkaitan dengan pembentukan asam amino yang dipengaruhi oleh enzim polimerase II (Kolozik *et al.*, 2000). Dengan demikian protein yang diekspresi mengalami perubahan sifat, sehingga menjadi protein yang bersifat antigenik (Westoff, *et al.*, 1994). Kondisi seperti ini dapat disebut juga sebagai anomali protein mukosa yang masih diperlukan pembuktian secara molekuler (Burruano and Tortorici, 2001).

Adanya anomali protein mukosa yang dapat memodulasi reaksi yang berlebihan secara lokal kemungkinan dapat berperan sebagai salah satu faktor pemicu awal timbulnya *Recurrent Aphthous Stomatitis*. Hal ini sesuai dengan penelitian (Sistig *et al.*, 2002), bahwa pada RAS ditemukan antibodi secara sistemik terutama IgG, dan IgA pada saat fase akut. Menurut McNally, (2003) sistem imun yang tersensitivasi oleh protein yang terdapat pada daerah spesifik di rongga mulut, kemungkinan akan mengakibatkan disregulasi respons imun yang akhirnya dapat menimbulkan ulser pada mukosa mulut.

Pengekspresian protein mukosa melalui *major histocompatibility complex* (*MHC class I dan MHC class II*) dipresentasikan ke permukaan kemungkinan dapat menyebabkan respons imun yang meningkat (Savage, *et al.*, 1986; Reyes, *et al.*, 1997). Hal ini dapat mengakibatkan antibodi yang diinduksi oleh protein yang diekspresikan mempunyai spesifitas tertentu. Sistem imun humoral

memiliki kapasitas untuk memberikan respons terhadap berbagai antigen dengan membentuk kelas antibodi yang berbeda (Abbas *et al.*, 2000).

Beberapa hasil penelitian menunjukkan tidak terdapat perbedaan kadar IgG dan IgA antara bentuk *RAS* major dan minor yang signifikan (Sisteg, *et al.*, 2002). Tetapi jika dibandingkan dengan normal terjadi peningkatan kadar imunoglobulin yang sangat signifikan (Brozvics, *et al.*, 2001). Hasil tersebut belum diketahui secara rinci subklas imunoglobulin yang berperan penting atau dominan pada kasus *RAS*. Selain itu timbulnya *RAS* kemungkinan tidak hanya antibodi humoral yang mempunyai peranan penting, tetapi kemungkinan juga respons imun seluler ikut berperan, oleh karena itu perlu dilakukan pembuktian apakah protein anomali mempunyai sifat stabil dan mempunyai reaktifitas antara antigen dan antibodi sebagai hasil respons imun.

Sampai saat ini telah banyak penelitian yang mengarah pada temuan mekanisme patogenesis *RAS*, tetapi sampai sekarang masih belum ada hipotesis jelas yang berkaitan dengan mekanisme secara molekuler ekspresi anomali protein. Oleh karena itu penelitian ini bertujuan untuk menganalisis secara molekuler ekspresi anomali protein mukosa mulut dan profil subklas antibodi yang berperan pada timbulnya *RAS*. Berdasarkan latar belakang diatas, maka dapat di rumuskan beberapa permasalahan sbb :

1.2. Rumusan Masalah

1. Apakah terdapat protein anomali pada mukosa mulut penderita *RAS* ?

2. Apakah ada korelasi anomali protein yang di ekspresikan dengan gambaran klinis/tipe *RAS* ?
3. Apakah ada perbedaan profil subklas antibodi spesifik *RAS* dengan gambaran klinis *RAS* ?
4. Apakah antibodi monoklonal subklas terhadap protein spesifik *RAS* mempunyai sensitivitas dan spesifisitas sehingga dapat mengungkap etiopatogenesis *RAS* ?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Penelitian ini secara umum bertujuan untuk mengungkap secara molekuler salah satu etiopatogenesis *RAS* melalui analisis ekspresi anomali protein pada mukosa mulut serta profil subklas antibodi dengan gambaran klinis *RAS*.

1.3.2. Tujuan khusus

1. Mengkarakterisasi anomali protein spesifik *RAS* (predominan) hasil ekspresi pada penderita *RAS*
2. Menganalisis ekspresi anomali protein pada mukosa mulut berdasarkan berat molekul (BM) pada pasien *RAS* mayor, minor dan remisi
3. Menentukan profil subklas antibodi dari serum penderita *RAS*

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) merupakan salah satu kelainan yang paling sering dijumpai dan ditandai adanya ulser kambuhan pada mukosa mulut tanpa disertai penyakit lain (Greenberg, 1997; Barrons, 2001). Kelainan ini sering menimbulkan rasa sakit yang mengganggu penderita terutama pada saat berbicara dan makan, serta akan mengganggu estetik bila ulser terjadi di bibir (Soemarijah, 1985). Menurut Scully, *et al.*, (2003) ada beberapa sinonim yang dapat digunakan untuk kelainan ini antara lain *Recurrent Aphthous Ulceration*, *Recurrent Oral Ulceration*; *Recurrent Mikulicz's Oral Aphthae*, *Cancer Sores*, . Masyarakat umum menyebut RAS ini dengan nama *sariawan*, *lumpangan*, *jampien* atau *panas dalam* (Soemarijah, 1985). Di dalam studi ini penulis menggunakan sebutan sebagai *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)* dan untuk selanjutnya digunakan singkatan RAS sesuai dengan tendensi penggunaan sebutan akhir-akhir ini untuk kelainan tersebut (Scully, 2002)

2.1.1. Epidemiologi *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) yang dikenal juga sebagai sariawan adalah suatu kelainan berupa ulser kambuhan di mukosa mulut tanpa disertai tanda-tanda penyakit lain. Prevalensi RAS dari populasi tertentu cukup tinggi,

seperti yang terjadi diantara mahasiswa Kedokteran dan Kedokteran Gigi sebesar 60% lebih tinggi dibanding prevalensi yang terjadi di masyarakat (10-20%). Hasil penelitian di beberapa bagian di dunia menunjukkan bahwa prevalensi RAS sangat bervariasi antara 5% - 66% (Sonis, *et al.*, 1995; Greenberg, 1997; Zian, 2000; Ship, 2001; Scully, 2002). Hasil penelitian di Amerika utara menunjukkan prevalensi RAS 20-50% (Mirowski, 2001), di negara Inggris 10-25% sedangkan di negara Swedia prevalensi menunjukkan 2-66%. (Scully, 2002). Hasil penelitian di Thailand menunjukkan prevalensi RAS 46,7% (Ponissawaranun & Laohapand,1997). Di Sabah dan Sarawak 1,2% sedang Malaysia 0,5% dari 11687 penderita RAS (Zian, 2000). Di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo tercatat 26,6% dari semua penyakit mulut yang ditemukan adalah RAS (Soemarijah dan Sarsito,1992). Dari tahun 1991–1995 di Klinik Penyakit Mulut, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dijumpai 2663 penderita RAS dari 4487 penderita yang datang (Djamhari M,1995) dan tahun 1996 – 2000 dijumpai 1808 penderita RAS (Emawati, 2000).

Distribusi usia pada semua kelompok umur mulai anak–anak sampai dewasa. Tampaknya predileksi terbanyak terjadi pada wanita. Pernah dilaporkan 56% dari penderita adalah wanita dan usia yang banyak terlihatnya ulser antara 19 – 30 tahun (Scully, 2002; Tydesley,2004). Faktor genetik tampaknya ikut berperan untuk timbulnya RAS, antara lain terbukti dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Ship (2001), menunjukkan bahwa 90% dari penderita RAS kedua orang tuanya juga menderita, 60% dari penderita bila satu orang tuanya

menderita RAS dan 20% dari penderita RAS yang kedua orang tuanya tidak menderita RAS (Greenberg, 1997).

2.1.2. Etiologi dan Patofisiologi RAS

Meskipun telah berpuluh tahun penelitian dilakukan dimana-mana tetapi sampai saat ini belum diketahui faktor penyebab yang definitif dari RAS. Banyak ahli membahas berbagai macam faktor yang diduga berperan serta untuk terjadinya kelainan ini, antara lain virus, bakteri, gangguan sistem imunologik, makanan, alergi, penyakit gastrointestinal, psikis dan gangguan emosional (Ship, 2001; Scully, 2002 & 2003). Natah *et al.*, (2000) menduga bahwa terjadinya RAS diduga dipicu oleh karena faktor eksternal seperti trauma, infeksi bakteri, virus, bakteri dan jamur, sedang faktor internal seperti genetik, hormonal, gangguan sistem imun, penyakit gastrointestinal dan psikis. *The Journal of Medicine* Tahun 2002 (Scully, 2002) mengelompokkan faktor penyebab RAS menjadi 2, yaitu : Faktor hospes meliputi : genetik, hormonal, nutrisi, endokrin, gangguan sistem imun dan psikologik, sedangkan faktor lingkungan meliputi : trauma, infeksi dan alergi.

2.1.2.1. Faktor Internal

2.1.2.1.1. Genetik

Faktor genetik memegang peranan penting dalam proses terjadinya RAS. Melalui penelitian pada suatu keluarga RAS lebih sering ditemukan pada

keluarga penderita *RAS* dimana terjadinya tidak menurut hukum Mendel (Meiller *et al.*, 1991; Rees, *et al.*, 1996). Sebanyak 50% keturunan pertama penderita *RAS* juga menderita *RAS*. Penderita dengan riwayat keluarga *RAS* mempunyai kecenderungan untuk timbul *RAS* pada usia muda dan menjadi lebih parah dibandingkan penderita tanpa riwayat keluarga menderita *RAS* (Vincent *et al.*, 1992). Dua studi yang terpisah menyatakan adanya asosiasi yang bermakna antara *RAS* dan HLA tipe 2A dan 812. Pengasingan HLA tidak dapat memberikan kesimpulan (Scully, *et al.*, 2003) data tersebut memang ada hubungannya dengan dasar genetik, tetapi penetrasinya tidak sempurna dan hanya memberikan kemungkinan kepekaan terhadap terjadinya ulser.

2.1.2.1.2. Hormonal

Hormon kelamin wanita (estrogen dan progesteron) dapat berperan sebagai faktor penyebab *RAS*, oleh karena kebanyakan wanita mengatakan bahwa perbaikan dan pengurangan ulser terjadi selama kehamilan dan sebagian kecil penderita mengalami ulser yang hebat sebelum haid atau terutama ulser terjadi selama fase luteal dari siklus haid tersebut (Lynch, 1997). Pada beberapa wanita timbulnya ulser diduga ada kaitannya dengan penurunan kadar estrogen seperti yang terlihat pada periode menstruasi dan menjelang menopause. Kekurangan hormon estrogen tersebut dapat menyebabkan atrofi pada mukosa, hal ini juga dapat menyebabkan kekeringan pada vulva dan vagina, iritasi dan perdarahan. Pada keadaan kadar estrogen yang rendah tersebut juga akan

menyebabkan terjadinya penurunan derajat komifikasi mukosa, hal ini yang mengakibatkan keratinisasi pada mukosa mulut berkurang sehingga kemungkinan mukosa akan lebih rentan terhadap trauma yang memudahkan terbentuknya ulserasi (Wray,1999).

2.1. 2.1.3. Defisiensi Nutrisi

Pada penderita RAS terjadi defisiensi vitamin B1, B2, B6, B12, Asam folat dan zat besi. Menurut Wray *et al.*, (1992) dan Rees, *et al.*, (1996) menemukan 20 % penderita RAS menderita defisiensi zat besi, asam folat, atau vitamin B12. Salah satu hal yang harus diperhatikan hubungan antara defisiensi nutrisi dengan timbulnya RAS adalah faktor alergi makanan. Banyak yang memiliki alergi makanan berbeda-beda. Pengurangan diet yang dilakukan pada beberapa penderita RAS menunjukkan adanya perbaikan dari symptom antara 25-75 % penderita (Piskin *et al.*,2002). Defisiensi nutrisi tidak mutlak merupakan penyebab, hanya mempengaruhi perubahan nilai ambang terhadap timbulnya ulser.

2.1.2.1.4. Stres (Psikologik)

Faktor stres pada perkembangan terjadinya RAS adalah sangat kontroversial. Penderita sering secara subjektif mengkaitkan timbulnya RAS dengan stres (Rees&Binnie,1996). Beberapa penelitian secara kuantitas

ditujukan kepada hubungan stres dengan RAS, tampak insiden yang sangat tinggi kira-kira 66% diantara mahasiswa Kedokteran dan Kedokteran Gigi, kejadian ini lebih tinggi dibanding pada populasi umum yang berkisar antara 10-20%. Faktor lingkungan atau stres emosional dilaporkan lebih tinggi pada saat pertama terkena RAS sekitar 60%, dan pada kasus yang rekuren sekitar 21% (Rees, et al., 1996; Scully, 2002). Banyak keadaan atau penyakit yang terkait dengan imunitas berhubungan dengan stres, walau mekanismenya belum jelas.

Respons terhadap stres diawali oleh sistem syaraf dan sistem endokrin, khususnya CRF dari hipotalamus, sistem syaraf locus ceruleus-norepinefrin/autonomik (simpatetik) dan kelenjar adrenal (Croley, 1998). Efek secara tidak langsung dari SSP pada fungsi imun melibatkan poros HPA (Hypothalamus-Pituitary Adrenal). Peningkatan kadar Glukokortikoid yang beredar (GCS) diperkirakan merupakan mekanisme yang penting, baik dalam perubahan sehubungan dengan stres pada struktur imun maupun dalam supresi respons imun. Korteks adrenalis teraktivasi selama stres oleh ACTH. Aktivasi ini akan meningkatkan sekresi hormon glukokortikosteroid (steroid), utamanya kortisol. Efek keseluruhan dari kerusakan akibat kortisol pada protein menghasilkan keseimbangan nitrogen negatif dan peningkatan sirkulasi asam amino, juga sebagai penekan imun melalui supresi sintesis protein, termasuk sintesis dari imunoglobulin, kortisol juga menghambat proliferasi fibroblast dan fungsinya pada tempat respons peradangan, hal ini berhubungan dengan jeleknya kesembuhan luka, meningkatnya kerentanan terhadap infeksi dan berkurangnya respons peradangan (Ottaway, 1991, McNally, 2003)



2.1.2.2. Faktor Eksternal

2.1.2.2.1. Faktor Lingkungan

Trauma telah lama dianggap penyebab timbulnya ulser pada penderita yang *susceptible* dan penelitian terakhir menyatakan bahwa trauma yang kecilpun telah menyebabkan ulser pada penderita yang mempunyai bakat *RAS*, tetapi tidak pada kelompok kontrol, hal ini diduga oleh karena adanya mediator histamin dan hipotesis ini didukung oleh penelitian yang sama, dilakukan pada penderita dengan *Behcet syndrome* (Kamel MN, 1995). Faktor lingkungan yang lain adalah adanya kemungkinan infeksi kuman. Menurut beberapa peneliti ada beberapa virus yang berperan dalam timbulnya *RAS* terutama golongan virus DNA seperti *Human Herpes Virus 6 (HHV-6)*, *Epstein Barr Virus (EBV)*, *Human Cytomegaly Virus (HCMV)*, *Varicella Zoster Virus (VZV)* dan *Adeno virus tipe 1 juga virus Herpes Simplek (HSV-1 dan HSV-2)* (Pederson A, 1991, Nisengard RJ, 1994). Menurut Xiang, (2000) infeksi virus dan beberapa agen penyebab infeksi dapat menginduksi trauma awal yang diikuti dengan kerusakan pada mukosa mulut yang disebabkan oleh reaksi sitotoksik limfosit pada mukosa mulut. Virus dan *RAS* sampai sekarang masih sering dihubungkan dengan ketidakseimbangan sistem imun. Tanda klinis dan penampakan histologis dari *RAS* menunjukkan kemungkinan keterlibatan virus sebagai penyebab kekambuhan *RAS* (Lyck, *et al.*, 1983, Pederson, 1991, Nisengard, *et al.*, 1994) Demikian pula beberapa penderita mempunyai beberapa kelainan imunologik dengan respons autoimun terhadap antigen mukosa mulut ataupun beberapa

Demikian pula beberapa penderita mempunyai beberapa kelainan imunologik dengan respons autoimun terhadap antigen mukosa mulut ataupun beberapa reaksi silang antigen mikroba. Graykowski (1974) menanam kuman "L form" yang diambil dari bahan biopsi lesi *RAS*. Inokulasi dilakukan *intra dermal* pada kelinci dan dapat menimbulkan fesi pada kulit dan mukosa yang secara klinik dan histologik serupa dengan lesi pada manusia. Akhir-akhir ini telah dilaporkan bahwa reaksi silang antara *heat shock protein* yang berasal dari bakteri (misal protein 65 kD pada mikobakterium) dan *heat shock protein* homolog pada mukosa mulut dapat diperhitungkan atas timbulnya beberapa manifestasi autoimun (Hasan, *et al.*, 1995 & 2002, Scully *et al.*, 2003)

2.1.2.2. 2. Alergi Makanan.

Faktor alergi makanan dapat menginduksi histamin yang dilepaskan dari basofil darah perifer dari penderita *RAS*, akan menimbulkan ulkus (Wray,*et al.*, 1982). Makanan yang dapat menginduksi ulkus adalah makanan *cereal* yang mengandung gluten dimana perubahan *cereal* tersebut mempengaruhi keadaan klinis dari kelainan (Ship, 2000). Sejauh ini telah banyak penelitian dilakukan serta diskusi dan lokakarya, tetapi etiologi dan faktor-faktor yang berperan serta dalam mekanisme terjadinya penyakit ini masih belum diketahui atau masih mengaburkan. Hasil kongres *Oral Medicine* di Eropa pada tahun 1998 menemukan kesepakatan yang cenderung pada gagasan bahwa penyakit *RAS*

ini adalah penyakit yang disebabkan oleh bermacam-macam penyebab (multifaktorial)

2.1.3. Manifestasi Klinis *Recurrent Aphthous Stomatitis*

Scully (2002) dan Lehner (1992) mempergunakan sebutan *Recurrent Aphthous Stomatitis* untuk tiga variasi gambaran klinik pada kelainan ulser yang rekuren. Berdasarkan koleksi dari macam-macam nama yang dipergunakan untuk RAS, maka dibuat klasifikasi sebagai berikut

1. *Minor Aphthous Ulcer*
2. *Mayor Aphthous Ulcer*
3. *Herpetiform Ulcer*

2.1.3.1. *Recurrent Aphthous Stomatitis Minor*

Paling sering terjadi adalah RAS *minor* dengan frekwensi kira-kira 80% dari semua tipe RAS. Tanda-tanda RAS *minor* antara lain kambuhan (recurrent), oval, kecil, sakit, ulser dengan dasar nekrotik, tepi meninggi dan kemerahan, diameter kurang dari 10 mm dan memiliki *pseudo* membran putih keabuan. Lesi ini bisa sembuh sendiri selama 10-14 hari tanpa jaringan parut. Lokasi terbanyak RAS *minor* ini pada mukosa rongga mulut yang tidak berkeratin (mukosa labial, bukal dan dasar mulut). Lesi ini bisa *single* atau *multiple* dan bisa dibedakan dengan kelainan mukokutaneus rongga mulut yang lain berdasarkan riwayat

penyakit, lokasi, jaringan penunjang yang sehat disekitar lesi dan faktor sistemiknya (Mirowski, 2001; Scully, 2002)

2.1.3.2. Recurrent Aphthous Stomatitis Mayor

RAS mayor ini kadang-kadang menunjukkan suatu kelainan *Sutton's disease* atau *peradenitis mucosa necrotica recurrent*. *RAS* mayor ini terjadi kira-kira 10-15% dari seluruh *RAS*. Lesi ini secara klinis tampak sama dengan lesi *RAS minor*, tetapi *RAS* mayor berdiameter lebih dari 10 mm, dasar lesi lebih dalam, bila sembuh sering meninggalkan jaringan parut dan lesi bisa menetap dalam beberapa minggu sampai beberapa bulan. Lesi mayor punya predileksi di bibir, lidah, palatum lunak dan *palatal fauces* yang menimbulkan rasa nyeri dan disfagia (Mirowski, 2001; Scully, 2002)

2.1.3.3. Recurrent Aphthous Stomatitis Herpetiform

RAS yang juga sering dijumpai adalah *herpetiform aphthous ulcer*. Pada penderita *RAS* ditemukan 5% hingga 10% ulser herpetiformis. Lesi ini terjadi *multiple* dalam rongga mulut dengan ukuran sangat kecil (antara 2-3 mm) dan ditemukan dalam jumlah yang sangat banyak (10-100 lesi ulser) tapi lesi-lesi kecil tersebut bisa menyatu menjadi ulser yang lebih besar, tampak seperti bercak atau plak, dengan tepi lesi tak beraturan. Lesi *herpetiform* ini bisa berlangsung selama 7-30 hari dengan meninggalkan jaringan parut. Meskipun

lesi ini secara klinis mirip dengan lesi herpes atau lesi herpetiform itu sendiri, tetapi *virus herpes simpleks* tidak dapat dikultur dari lesi tersebut (Ogawa *et al.*, 1990).

2.1.4. Lokasi *Recurrent Aphthous Stomatitis*

Secara klinis ulser timbul pada permukaan mukosa rongga mulut yang *non keratinized*, misalnya, mukosa bukal, mukosa labial, permukaan ventral lidah, dasar mulut dan *pallatum molle*, juga pada permukaan *dorsum lidah*, sedangkan pada perlekatan gusi atau *pallatum durum* jarang sekali timbul ulser tersebut. Hasil penelitian Ernawati (2000) bahwa kasus RAS lokasi terbesar (sekitar 80%) pada mukosa labial dan mukosa bukal, sedangkan pada daerah mukosa *pallatum durum*, ginggiva ataupun daerah yang mengalami keratinisasi jarang ditemukan.

Lesi dapat berbentuk bulat atau oval dengan diameter sampai sepuluh milimeter, satu ulser atau banyak, terasa nyeri dan dapat sembuh sendiri setelah dua sampai empat minggu, dengan atau tanpa pembentukan jaringan parut, tergantung dari macam variasi ulser tersebut. (Sonis, 1995; Tyldesley *et al.*, 2004).

2.1.5 Diagnosis dan Terapi *Recurrent Aphthous Stomatitis*

Diagnosis RAS dapat ditegakkan berdasarkan pada pengamatan serta riwayat klinis dari lesi seperti bentuk ulkus yang bulat pada mukosa mulut, bersifat kambuhan serta dapat sembuh secara spontan tanpa ada tanda atau

gejala lain (Tyldesley *et al.*,2004). Banyak ulser di rongga mulut yang sepintas mirip dengan ulser traumatikus, herpes simpleks rekuren intra oral, *Behcet's syndrome*, ulser sekunder dari penyakit sistemik (Lynch,1997). Pada umumnya kondisi kelainan tersebut dapat dibedakan dengan RAS dilihat dari lokasi lesi atau munculnya gejala lain. Gejala klinik RAS pada tahap awal berupa makula atau papula dengan edema, berlangsung 1-3 hari. Tahap ulserasi, selain adanya ulser juga disertai rasa sakit, terjadi antara 1-16 hari. Tahap penyembuhan, pada tahap ini semua gejala yang timbul berangsur berkurang sampai hilang, memerlukan waktu 1-5 minggu, tergantung dari lokasi dan ukuran lesinya.(Mirowski, 2001, Scully, 2002).

Infeksi virus herpes simpleks secara klinis mirip dengan RAS, tapi infeksi virus herpes simpleks primer sering ditandai dengan eritema gingiva yang difus dan disertai demam, juga terdapat ulser dan vesikel pada mukosa rongga mulut. Ulser RAS tidak disertai demam dan vesikel, sering terjadi pada mukosa tidak berkeratin. Lesi RAS dapat dibedakan dengan infeksi *virus varicella zoster* atau *shingles* berdasarkan penampakan klinis (lesi *Virus Herpes Zoster* mempunyai pola distribusi unilateral baik di intra oral maupun ekstraoral sepanjang saraf trigeminal). Riwayat penyakit secara rinci dan melalui pemeriksaan klinis diperlukan untuk menghasilkan diagnosis yang akurat (Ghodratnama *et al.*,1997). Perawatan RAS yang spesifik sampai saat ini belum ada, walaupun dapat sembuh sendiri tapi sangat mengganggu terutama rasa sakitnya, sehingga perawatannya ditekankan untuk mengurangi rasa sakit dan mempercepat kesembuhan (Lynch, 1997) Beberapa peneliti menyatakan bahwa terapi efektif

yang dapat mencegah kekambuhan masih belum ada, hal ini kemungkinan disebabkan antigen yang menjadi target penyebab kekambuhan tetap belum diketahui (Burruano dan Tortorici, 2001). Pemberian obat untuk perawatan lesi ini sangat bervariasi yaitu dapat dengan bahan penutup (*covering agents*), antiseptik lokal, antibiotik topikal, antiinflamasi topikal dan pada keadaan yang parah dapat diberikan steroid secara sistemik (Ship, 2001, Mirowski, 2001, Scully, 2003).

2.2 Sistem Imun Mukosa

Sistem imun mukosa secara struktural merupakan bagian integral yang penting dari sistem imun, oleh karena luas permukaan mukosa pada tubuh yang melapisi gastrointestinal, traktus respiratorius dan traktus urogenital mencapai luas 400 m² yang dilapisi oleh sel-sel epitel. Pentingnya arti pertahanan mukosa ini terlihat dari banyaknya sel memproduksi antibodi yang jumlahnya melebihi yang ada di lien, limfonodi, sumsum tulang (*bone marrow*) secara keseluruhan.

Sistem imun mukosa secara morfologi dan fungsional dapat dibagi menjadi dua bagian utama yaitu :a) Kumpulan jaringan limfoid mukosa GALT dan BALT. Kumpulan jaringan limfoid merupakan daerah limfoid aferen/induktif dimana antigen masuk ke dalam sistem dan menginduksi respons imun. b) Jaringan limfoid yang tersebar di mukosa (*diffuse lymphoid tissue*) terutama di lamina propria. Jaringan limfoid ini merupakan daerah limfoid eferen/efektor dimana antigen berinteraksi dengan sel-sel yang telah berdiferensiasi dan merangsang sekresi antibodi oleh sel-B atau menginduksi reaksi sitotoksik oleh

sel T. Kumpulan jaringan limfoid mukosa secara morfologi berbeda dengan sistem limfoid sistemik, dimana menerima antigen melalui epitel dan bukan melalui sirkulasi limfatik atau sirkulasi darah. Jaringan limfoid mukosa tersebar dari sistem imun mukosa terdiri dari populasi sel yang terdapat dalam 2 kompartmen yaitu kompartmen limfosit intra epitelial (IEL) dan limfosit lamina propria (LPL). Limfosit Intra Epitelial adalah limfosit yang terletak diatas membran basalns diantara sel epitel. Meskipun populasi dari sel-sel ini lebih kecil dari populasi di sel lamina propria, dalam keadaan normal terdapat 6- 40 IEL/100 sel epitel. IEL dari manusia, tikus (rat), mencit (mice) adalah limfosit T dimana 85% adalah CD8+ dan 15% CD4+. Pada mencit IEL mempunyai fungsi khusus efektor imun yaitu aktivitas sel NK, sitotoksisitas sel spesifik (specific cells cytotoxicity), sekresi IFN- γ yang dapat meningkatkan ekspresi γ / δ TCR (Kendati, 1999)

Populasi limfosit dalam LPL (limfosit lamina Propria) mempunyai jumlah yang seimbang dalam bentuk sel T dan sel B. Populasi sel B terutama dalam bentuk yang sudah berdiferensiasi menjadi sel plasma. Pada mencit (mice) 40% LPL menghasilkan imunoglobulin terutama IgA isotype dan 25% mengekspresikan petanda sel T (T cells marker) yang terutama adalah sel Th2 CD4 (McDonald, 1994). Pada manusia sel T CD4+ mengekspresikan petanda sel memori (memory cells marker), yang tidak berproliferasi sebagai respons terhadap stimulasi antigen tetapi mensekresi limfokin yang melaksanakan fungsi bantuan. Lamina propria juga banyak mengandung sel makrofag, sel dendrit, neutrofil dan sel mast. Sel Th1 di lamina propria mensekresi IL-2 dan IFN- γ yang

merangsang diferensiasi sel B IgA (IgA sel B) menjadi sel plasma yang memproduksi IgA (IgA producing plasma cells) (McIntyre, 1998)

Aktivasi sel T helper oleh antigen yang telah diproses dalam bentuk peptide yang spesifik oleh APC. Pemrosesan dan penampilan antigen oleh APC adalah merupakan langkah awal untuk pengenalan antigen dan stimulasi yang spesifik terhadap sel T CD4⁺ dan sel T CD8. Tahap ini adalah tahap yang kritis untuk membangkitkan respons imun, antigen yang utuh tak dapat dikenali oleh sel T helper atau sel T sitotoksik, melainkan harus diproses lebih dahulu dan ditampilkan oleh sel yang mempunyai ekspresi MHC klas II. Kontak antara Th dan APC terjadi antara *TCR* dan peptida epitope yang ditampilkan oleh MHC klas II membentuk ikatan kompleks setelah diperkuat oleh ikatan CD4 molekul dengan MHC. Sel Th yang sudah teraktivasi akan memproduksi sitokin untuk menginduksi sel B masuk dalam fase G1, untuk selanjutnya terjadi proliferasi, diferensiasi dan maturasi sel B menjadi sel plasma.

Peranan sel Th1 dan Th2 dalam respons imun mukosa, konsep yang baru untuk fungsi Th1 dan Th2 didasarkan pada sitokin yang diproduksi. Th1 mampu memproduksi IL-2, IFN- γ , TNF- β sedangkan Th2 mensekresi IL-4 dan IL-5 dan IL-10 setelah stimulasi antigen. Th1 dan Th2 saling meregulasi (*cross regulation*) melalui sitokin yang diproduksinya. IFN- γ yang diproduksi oleh Th1 meregulasi negatif terhadap fungsi Th2, sedangkan IL-10 yang disekresi oleh

Th2 menghambat fungsi sel Th1. Sel Th1 regulasi negatif IL-4 sedangkan produksi IL-5 dan IL-6 oleh Th2 yang esensial untuk sintesis Ig tetap dipertahankan. IL-5 dan IL-6 yang diproduksi oleh Th2 adalah sitokin yang esensial untuk perkembangan Ig A plasma cells.

2.2.1. Sitokin dalam Sistem Imun Mukosa

Eksresi imunoglobulin (Ig) isotype spesifik diatur oleh sitokin yang bekerja baik mempengaruhi *heavy chain class* maupun menstimulasi maturasi sel B yang mengekspresikan isotype tertentu. Sistem imun mukosa berbeda dengan organ limfoid sekunder dalam hal dominasi sekresi IgA ke dalam mukosa, hal demikian dapat terjadi oleh karena adanya isotype switching ke IgA dan maturasi sel membran yang mengekspresikan IgA menjadi sel yang mensekresi IgA. Sel prekursor yang mensekresi IgA terutama banyak terdapat di Peyer's patches, sedangkan sel plasma yang mensekresi IgA banyak ditemukan juga di lamina propria. Sitokin yang berperan dalam stimulasi tersebut diproduksi secara lokal di mukosa (usus) dan hal ini membuat suasana yang kondusif untuk terjadi respons sekresi IgA.

Sitokin yang mempengaruhi maturasi sel-sel yang mengekspresi IgA menjadi sel yang mensekresi IgA antara lain IL-5, IL-4, IL-2, IL-6 (Lebman, 1994). Interleukin -5 (IL-5), dapat meningkatkan 4-5 kali sekresi IgA dari kultur sel B yang di stimulasi dengan LPS. Mekanisme IL-5 dalam meningkatkan sekresi IgA dapat dilihat dengan memakai beberapa sistem kultur yang berbeda-beda.

Penambahan IL-4 ke dalam kultur sel dapat lebih meningkatkan sekresi IgA, tetapi penambahan IL-4 tanpa stimulasi LPS tidak banyak berpengaruh terhadap sekresi IgA. IL-2 dapat meningkatkan 2-3 kali sekresi IgA dalam kultur sel B yang di stimulasi dengan LPS, demikian juga IL-2 dapat merangsang sekresi IgA dari sel B yang berasal dari Payer's patches yang di rangsang oleh sel T, tetapi bukan berasal dari sel B yang berasal dari lien. (Husband, 1999).

IL-6 yang di produksi oleh makrofag mempunyai aktifitas yang luas dalam jaringan limfoid dan non limfoid. IL-6 mensekresi IgA lebih tinggi dari IL-5 terhadap sel B. Kombinasi IL-6 dan IL-5 sangat efektif untuk menginduksi IgA.

2.2.2. Sitokin yang menginduksi *Isotype Switching* ke IgA

Transforming Growth Factor β (TGF- β) adalah 25 kDa peptida yang tersebar dalam mukosa mempunyai aktivitas yang pleiotropik. TGF- β dapat menghambat proliferasi sel T (human) dan sekresi imunoglobulin dan mencegah maturasi pre sel B menjadi mature sel B. Penambahan IL-2 dan TGF- β ke dalam sel B yang telah distimulasi dengan LPS akan meningkatkan sekresi IgA yang lebih besar daripada kombinasi dari rangsangan masing-masing sitokin saja, hal ini menunjukkan bahwa IL-2 sinergistik dengan TGF- β untuk membangkitkan respons IgA (Laman, 1994). Penelitian tingkat seluler menunjukkan bahwa TGF- β mempunyai efek untuk menstimulasi isotype switching ke IgA dan mampu untuk meningkatkan sekresi IgA. Penambahan IL-2 ke dalam kultur yang mengandung TGF- β menyebabkan kenaikan 10-20 kali sekresi IgA. Analisis

molekuler menunjukkan bahwa sitokin dari sel T helper mempunyai peranan penting untuk membangkitkan respons imun Ig A pada mukosa.

2.3 Sistem Imunitas Rongga Mulut

Rongga mulut merupakan pintu masuk utama mikroorganisme, oleh karena itu banyak faktor yang terlibat dalam organisasi pertahanan terhadap kuman patogen. Menurunnya fungsi faktor faktor ini akan menimbulkan masalah karena adanya bakteri oportunitis yang dapat menjadi patogen dan menimbulkan berbagai kelainan. Faktor faktor tersebut, dapat dikategorikan menjadi barier anatomi dan fisiologi, seperti epitel, air liur, atau anatomi gigi, pertahanan seluler, misalnya fagositosis oleh leukosit dan makrofag, dan imunitas humoral melalui antibodi di dalam air liur dan cairan celah gusi. Berbagai faktor ini, merupakan fungsi beberapa jaringan di dalam rongga mulut (Lehner, 1992)

Mukosa sangat berperan pada kesehatan di dalam rongga mulut karena pada keadaan normal, integritasnya berfungsi untuk menahan penetrasi mikroorganisme. Respons imun seluler lokal dan sistemik serta respons humoral sekretori lokal dan serum juga ikut berperan dalam proses patogenesis berbagai kelainan di dalam rongga mulut.

Komponen Jaringan

Membran Mukosa

Barier protektif mukosa mulut terlihat berlapis lapis, terdiri atas air liur pada permukaannya, lapisan keratin, lapisan granular, membran basal, dan

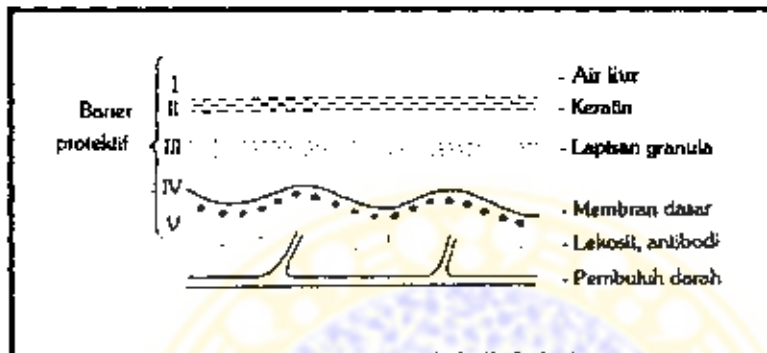
komponen seluler serta humoral yang berasal dari pembuluh darah. Komposisi jaringan lunak merupakan mukosa yang terdiri atas skuamosa yang karena bentuknya, berguna sebagai barier mekanik terhadap infeksi. Mekanisme proteksinya, tergantung pada deskuamasi yang konstan sehingga bakteri sulit melekat pada sel sel epitel dan derajat keratinisasinya yang menyebabkan mukosa mulut sangat efisien sebagai barier.

Di dalam lapisan granular, membran yang dilapisi granula dikeluarkan ke dalam ruang antarsel dan ini merupakan barier pergerakan substansi-substansi semacam mikroorganisme atau antigen melewati epitel. Membran basal epitel juga merupakan barier untuk menahan penetrasi mikrobial dan bahan bahan lain

Di dalam lamina propria yang dekat dengan membran basal, ditemukan sel limfoid dan juga antibodi yang merupakan pertahanan berikutnya apabila mikroorganisme atau antigen dapat melewati membran basal epitel. (Lehner, 1992)

Jaringan lunak rongga mulut berhubungan dengan nodus limfatik ekstraoral dan agregasi limfoid intraoral. Suatu jaringan halus kapiler limfatik yang terdapat pada permukaan lidah, dasar mulut, palatum, pipi dan bibir, mirip yang berasal dari gusi dan pulpa gigi. Kapiler- kapiler ini bersatu membentuk pembuluh limfatik besar dan bergabung dengan pembuluh limfatik yang berasal dari bagian dalam otot lidah dan struktur lainnya. Antigen mikrobial yang dapat menembus epitel masuk ke lamina propria, akan difagositosis oleh sel-sel langerhans yang banyak ditemukan di mukosa mulut. (Lehner, 1992). Pada jaringan gusi ditemukan berbagai komponen seluler dan humoral seperti PMN

neutrofil, makrofag, limfosit, dan sel plasma, yang penting dalam respons imun terhadap plak bakterial, sedang pada submukosa juga tersebar sel limfoid yang akan berproliferasi bila barier pertahanan pertama pada permukaan mukosa dapat ditembus antigen.



Gambar 2.1. Lapisan barier protektif mukosa rongga mulut
(sumber Dolby, 1975; Lehner, 1992)

2.3.1 Peran Sistem Imunitas Pada *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*

Sampai saat ini *RAS* masih merupakan masalah karena penyebab utamanya belum terungkap dengan jelas. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor eksternal dan internal. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa faktor eksternal dan internal ini lebih mengarah pada terjadinya gangguan sistem imun (Natah, *et al.*, 2000). Pada gangguan sistem imun baik kualitas maupun kuantitas dari sejumlah sel imun dapat menyebabkan gangguan terhadap keseimbangan respons imun baik spesifik maupun non spesifik. Adanya ketidakseimbangan (*imbalance*) pada regulasi imun dari *RAS* terbukti ditemukannya tanda-tanda kelainan imunitas berupa perubahan proporsi dan

jumlah absolut subpopulasi limfosit. Jenis sel tersebut antara lain golongan regulator seperti sel *T helper* dan sel *T supresor*. Selain itu juga ditemukan adanya reseptor sel T pada mukosa normal sangat rendah, sedang pada jaringan epitel dan perivaskuler pada lokasi RAS ditemukan banyak reseptor sel T gamma dan delta (Savage *et al.*, 1992&1994; Natah, *et al.*, 2000).

Terdapat perbedaan reaksi imunologis pada setiap fase akut dan remisi, pada fase akut limfosit B (CD19), limfosit T (CD3) dan CD4 lebih rendah dibandingkan normal, sedang pada fase remisi banyak ditemukan sel *NK*, *ADCC* dan *PMN* tetapi pada fase eksaserbasi jumlah sel *NK*, IL-2, IFN-gama menurun yang disertai peningkatan reseptor IL-2 (rIL-2) dan CD8 dalam plasma. (Sun *et al.*, 2000; Sistig, *et al.*, 2001). Pada RAS bentuk minor proliferasi sel T dan sel B tidak mengalami peningkatan bila dibandingkan dengan fase remisi. Begitu juga respons imun humoral pada fase remisi (*RAS pasif*) jumlah IgM tinggi sedang IgG rendah bila dibandingkan dengan RAS aktif, hal ini menunjukkan adanya disfungsi limfosit dan perbedaan karakter respons imun selama patogenesis RAS. Ketidakseimbangan inilah dimungkinkan sebagai mediator sitotoksitas yang menyebabkan destruksi mukosa yang berkelanjutan (Vicente, *et al.*, 1996)

Dugaan tentang patogenesis RAS oleh beberapa ahli imunologi dapat berkaitan dengan gangguan sistem imun (Lehner, 1992, Barrons, 2001, Mirowski, 2001) dan infeksi (Ship, 2001, Scully, 2002). Mekanisme ketidakseimbangan sistem imun terjadi akibat berkurangnya jumlah sel T helper (CD4+), sehingga induksi CD4+ terhadap sel B (CD 19) untuk berproliferasi menjadi sel plasma penghasil antibodi menjadi berkurang (Bahtiar, *et al.*, 1998).

Keadaan ini akan mengakibatkan kemampuan antibodi untuk mengeliminasi bahan asing menjadi tidak sempurna. Pada individu tertentu keadaan seperti ini dapat menjadi faktor pencetus timbulnya RAS

Gangguan sistem imun dapat terjadi melalui kekebalan seluler, antara lain melalui sel efektor yaitu limfosit T sitotoksik (CD8+) yang menunjukkan perubahan proporsi pada sel T sitotoksik (CD8+) yang terdiri dari sel golongan regulator dan golongan efektor. Sel efektor lain yang dapat berperan sebagai efektor/sitotoksik adalah sel natural killer (Natah, *et al.*, 2000; Goldsby, *et al.*, 2000).

Beberapa peneliti imunologik menunjukkan bahwa *cell mediated immunity* (CMI) dan *humoral immunity* (HI) terhadap antigen mukosa mulut dan *streptococcus sanguis* memberikan gambaran yang karakteristik dari penderita RAS (Lehner, 1992, Lindeman *et al.*, 1995). Beberapa cara yang telah dilakukan oleh para peneliti untuk mengenal respons imun pada penyakit RAS antara lain :

a) Migrasi leukosit : Donatsky (1978) menunjukkan bahwa terjadi kenaikan yang bermakna dari hambatan migrasi leukosit terhadap *Str sanguis prototype 2A*. Hal ini memberikan dugaan yang spesifik tentang *streptococcus* dalam mekanisme terjadinya RAS. b). Proliferasi dan transformasi limfosit. Pada penderita dengan RAS terlihat adanya limfosit darah perifer yang disensitisasi terhadap antigen mukosa membran. Hal ini menunjang hipotesis bahwa mekanisme hipersensitivitas mediator seluler mungkin ikut berperan dalam patogenesis RAS. Limfosit dari penderita RAS sitotoksik terhadap sel epitel. c). Reaksi hipersensitif dan autoimun. Respons autoimun pada RAS terutama

diperankan oleh limfosit seperti terlihat pada respons limfo proliferasif dan sitotoksik terhadap epitel mukosa mulut atau beberapa reaksi silang dari beberapa antigen (Lehner, 1992). d). *Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)* : Beberapa diantara peneliti mendukung kemungkinan reaksi silang antara *Fetal Human Oral Mucosa (FHOM)*, *Adult Human Oral Mucosa (AHOM)*, dan antigen *streptococcus* dari *streptococcus sanguis 2A* (Francis, et al., 1980).

Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC) telah diamati sebagai salah satu mekanisme patogenesis RAS (Greenspan, 1981). ADCC ditimbulkan oleh sel mononuklear dari penderita macam-macam stadium dari RAS yang dibandingkan dengan ADCC yang diinduksi oleh sel kontrol pasangannya. Sebagai target sel dipakai *chicken red blood cell (ChRBC)* yang diliputi dengan antibodi anti *ChRBC* kelinci. Terjadi peningkatan ADCC bermakna pada stadium dini dari kelainan, di bandingkan dengan kontrol. Pengamatan kenaikan ADCC pada stadium dini dan tidak adanya pada stadium lanjut mungkin terjadi oleh karena terbentuknya kompleks imun (Savage, et al, 1992).

2.3.2 Mekanisme Imunologi Pada Kerusakan Jaringan.

Reaksi imunologik (humoral atau seluler) terhadap antigen, baik yang bersumber endogen maupun eksogen, dapat menyebabkan beberapa reaksi kerusakan jaringan. Antigen yang menyebabkan reaksi kerusakan jaringan mungkin adalah eksogen, homolog atau endogen (*autolog*). Suatu respons imun merupakan aksi dari suatu rangkaian molekul-molekul efektor yang bertujuan

untuk menghilangkan antigen melalui berbagai mekanisme. Pada umumnya molekul-molekul efektor ini menyebabkan respons peradangan yang subklinis lokal yang mengeliminasi antigen tanpa kerusakan yang berarti pada jaringan inang (*host*). (Goldsby *et al.*, 2000)

Respons peradangan merupakan proses utama di mana tubuh mempertahankan diri terhadap agen infeksius dan senyawa toksik, dan juga merupakan mekanisme dasar di mana tubuh memperbaiki kerusakan jaringan yang disebabkan oleh penyakit akut atau kronik. Peradangan melibatkan berbagai macam sel sistem imun dan berbagai macam mediator (Sigal dan Ron, 1994; Goldsby *et al.*, 2000). Selama respons peradangan, berbagai macam mediator dilepaskan oleh sel imun. Mediator ini berfungsi untuk memicu atau meningkatkan aspek khusus dari respon peradangan. Mediator ini dilepaskan oleh sel mast jaringan, platelet, dan berbagai macam leukosit, termasuk neutrofil, monosit/ makrofag, eosinofil, basofil, dan limfosit (Goldsby *et al.*, 2000). Sejumlah sitokin juga berperan penting dalam perkembangan respon peradangan akut dan kronik. IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , dan banyak kemokin berperan secara bersama dalam respon peradangan. (Sigal & Ron, 1994; Roitt, 1998; Male, 1998; Goldsby *et al.*, 2000). Namun dalam keadaan tertentu respons peradangan ini dapat menimbulkan efek merugikan dan menghasilkan kerusakan jaringan yang berarti atau bahkan kematian. Respons imun yang tidak sesuai ini dinamakan hipersensitivitas atau alergi. Walaupun kata hipersensitivitas mengacu pada respons yang meningkat, tetapi responsnya tidak selalu meningkat tetapi sebaliknya dapat merupakan respons imun yang tidak memadai terhadap

antigen. Reaksi hipersensitivitas dapat timbul baik oleh respons humoral atau respons dengan perantara sel. Pada kebanyakan reaksi imun, mekanisme proteksi dan kerusakan jaringan keduanya dapat berjalan bersamaan. Perlu diingat bahwa ke empat tipe reaksi hipersensitif ini tidak selalu diperankan oleh satu tipe saja melainkan kadang-kadang mekanisme kerusakan jaringan terjadi sebagai reaksi gabungan dari tipe –tipe tersebut. (Roitt, 1998)

Aktivasi sistem komplemen akan menyebabkan sejumlah fenomena radang yang meliputi pelepasan histamin, produksi faktor kemotaktik untuk sel sel polimorfonuklear dan mononuklear, fenomena radang tersebut dapat menyebabkan kerusakan dinding sel yang akan menyebabkan lisis sel tersebut (Goldsby, et al., 2000). Banyaknya sel darah putih, prostaglandin dan leukotrin yang dihasilkan oleh sel sel radang diduga merupakan penyebab utama terjadinya proses peradangan.

2.4. Respons Imun

Respons imun adalah suatu tahapan proses kejadian yang teregulasi dengan sangat kompleks yang melibatkan beberapa tipe sel, sel yang menampilkan antigen APC (*antigen presenting cells*), sel T (*thymus derived lymphocytes*), sel B (*bone marrow derived lymphocytes*) sel-sel tersebut mengadakan interaksi satu sama lain baik langsung atau melalui mediator interleukin. Sistem imun dapat berhubungan dengan sistem komplemen, sistem pembekuan dan sistem fibrinolitik (Goldsby et al, 2000).

Untuk membangkitkan respons imun yang efektif diperlukan adanya antigen (Ag) yang bersifat asing dan ditampilkan sedemikian rupa oleh *antigen presenting cells (APC)* yang sebelumnya telah mengalami proses yang cukup kompleks sehingga mudah dikenali oleh sistem imun sebagai ancaman, antigen ditampilkan secara efisien oleh *antigen presenting cells (APC)* akan dikenali oleh sel *T helper*. Sel *T helper* tersebut menjadi aktif yang selanjutnya akan memicu aktivasi sel limfosit yang lain, yaitu sel B dan sel T sitotoksik. Limfosit yang telah aktif akan mengadakan proliferasi dan menjalankan fungsi efekturnya yang spesifik dengan tujuan akhir untuk menenyapkan antigen baik yang bebas maupun yang terkait dengan sel. Setiap step ini diregulasi oleh sistem signal yang terdapat dalam sel sistem imun yang dibangkitkan dari lingkungannya. Signal ditangkap oleh sel melalui reseptor untuk antigen, reseptor untuk sitokin, reseptor untuk protein matriks ekstraseluler, dan reseptor untuk molekul permukaan sel (*cells surface molecules*) yang diekspresikan oleh limfosit, APC, dan sel endotel atau sel epitel (Stites,1997). Sel yang menerima signal akan memberikan respons bermacam-macam dalam bentuk aktivasi, proliferasi dan diferensiasi sel efektor dan relokasi dari sel atau produknya ke tempat dimana harus menjalankan fungsinya. Signal tersebut harus ditransduksikan melalui membran plasma dan sitoplasma untuk mencapai nukleus, dengan tujuan akhir untuk aktivasi transkripsi, translasi dan produksi akhir spesifik protein biologis (Goldsby *et al.*, 2000)

2.4.1. Respons Imun Humoral

Bersama dengan masuknya antigen ke dalam tubuh maka perangkat imun akan memberikan respons berupa suatu kaskade reaksi yang terkenal dengan dogma sentral imunologi. Sesuai dengan banyaknya antigen determinan (epitop), maka suatu antigen akan menstimulasi sejumlah sel limfosit B yang mana hanya sel yang mempunyai reseptor sesuai dengan masing-masing epitop yang selanjutnya berproliferasi. Hal ini sesuai dengan hipotesis dari *Clonal selection Theory* dari Burnet yang mengatakan bahwa : Klon limfosit imunokompeten mempunyai reseptor pada permukaan sel yang sangat spesifik dan identik dengan imunoglobulin yang disintesis oleh sel progeninya. Reseptor ini adalah imunoglobulin akan tetapi masih terikat membran sel melalui suatu tanker yang terdiri dari kira-kira 30 asam-asam amino hidrofobik (Roitt, *et al*,1998). Setiap limfosit-B yang imunokompeten mempunyai reseptor antibodi yang unik dan spesifik. Masing-masing limfosit B akan mensintesis antibodi dengan kespesifikan yang telah ditentukan sebelum kontak dengan antigen. Antigen yang sesuai akan menstimulir klon-klon limfosit spesifik untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma dan sel memori berkaitan dengan reseptornya sendiri-sendiri. Oleh karena itu maka dalam tubuh mamalia terdapat berbagai macam klon sel limfosit-B yang telah ditentukan (*predetermine*) untuk suatu antigen determinan tertentu sehingga masing-masing populasi sel B mempunyai potensi untuk mensintesis antibodi spesifik. Bila antigen berhasil melewati berbagai barrier dan masuk dalam tubuh mamalia

maka terjadilah rangkaian reaksi imun baik seluler maupun humoral akibatnya adanya interaksi yang spesifik antara masing-masing klon sel limfosit-B dengan antigen. Hal ini berarti respons imun itu beraneka ragam dan demikian pula sejumlah klon dapat sekaligus terstimulasi tergantung dari potensi dan jumlah epitop suatu antigen, dengan kata lain imun respons adalah heterogen. Ini berarti pula bahwa antibodi yang dibebaskan sekalipun mempunyai kespesifikan yang heterogen dan berbeda-beda. Dengan demikian antiserum konvensional adalah amat heterogen, berbeda sifat, kelas dan subkelas, afinitas dan spesifitas. Antibodi dari serum mamalia seperti tersebut diatas disebut dengan antibodi poliklonal. Sebaliknya antibodi yang diproduksi dari satu klon sel menghasilkan hanya satu macam imunoglobulin yang disebut dengan antibodi monoklonal. Anti serum yang heterogen itu sampai pertengahan 1980 an masih digunakan untuk diagnosis, terapi, profilaksis dari beberapa penyakit tertentu dan juga dari antibodi campuran seperti itu adalah mempunyai keanekaragaman susunan, sulit standarisasi dan umumnya karena adanya keanekaragaman antibodi maka kurang dari 1% yang diharapkan spesifik terhadap epitop yang dikehendaki. Sebaliknya monoklonal memiliki sifat yang berlawanan yaitu spesifitas yang sudah tertentu dengan afinitas yang tetap, serta memiliki subkelas atau kelas imunoglobulin tertentu dan dapat pula mempunyai fungsi biologis tertentu yang meniadakan semua kelemahan – kelemahan dari antibodi poliklonal (Burgess, 1998).

Imunitas humoral diperantarai oleh antibodi produksi dari sel B. Fungsi biologis dari antibodi adalah untuk menetralisasi dan eliminasi antigen yang

menginduksinya. Eliminasi antigen atau mikroba membutuhkan beberapa mekanisme efektor yang tergantung dari kelas atau isotipe antibodi. Sistem imun humoral memiliki kapasitas untuk memberikan respon terhadap berbagai antigen dengan membentuk kelas antibodi yang berbeda. Respons antibodi bervariasi tergantung dari tipe antigen, keterlibatan sel T, riwayat paparan antigen dan tempat masuk anatomis dari antigen (Roitt.,1998; Abbas., *et al*, 2000).

2.4.2. Sintesis Antibodi

Teori instruksional, menyebutkan bahwa produksi antibodi terjadi setelah distimulasi oleh antigen yang akan dipakai sebagai cetakan (*template*) pada rantai γ -globulin standar. Teori ini menyebutkan bahwa suatu antibodi akan kehilangan spesifitasnya bila lipatannya dibuka dan akan terlipat lagi bila tidak ada antigen.

Teori selektif, menunjukkan bahwa informasi untuk sintesis antibodi yang berbeda sudah ada di dalam kode genetik. Gen pengkode antibodi spesifik sudah diseleksi dan tinggal "*switched on*" bila terjadi kontak antara antigen dan sel, lalu melalui transkripsi dan translasi akan disintesis rantai polipeptida imunoglobulin. Rantai ini akan melipat dengan spontan membentuk konfigurasi globular dan menyediakan situs kombinasi spesifik dengan antigen. Teori selektif dibuktikan dengan tidak adanya antigen di dekat sel plasma yang mengandung antibodi intraseluler. Selain itu, sekuens asam amino antibodi berbeda yang merefleksikan adanya perbedaan sekuens nukleotida DNA yang

berarti spesifisitasnya dikontrol secara genetik (Janeway, *et al.*, 1998; Kolozik, *et al.*, 2000) .

Model seleksi klonal menunjukkan bahwa setiap limfosit diprogram secara genetik untuk memproduksi satu antibodi yang molekulnya dibangun pada membran permukaan sel sebagai reseptor. Limfosit yang berbeda membuat antibodi yang berbeda. Antigen akan berkombinasi secara tepat dengan limfosit yang membawa antibodi pada permukaannya, lalu sel ini akan distimulasi melalui reaksi pada membran plasma sehingga mengalami diferensiasi dan terbelah menjadi klon sel yang mensintesis antibodi dengan spesifisitas yang sama seperti pada permukaan limfosit induk. Beberapa di antaranya menjadi limfosit kecil menjadi sel memori. Seleksi yang sebelumnya sudah ada dan dibuat secara acak, bukan merupakan tema baru dalam biologi. Hal ini merupakan inti teori Darwin (Darwinian) tentang evolusi. (Janeway, *et al.*, 1999)

2.4.3 Antibodi

Antibodi merupakan protein yang terbentuk karena adanya paparan dengan antigen dan mempunyai kemampuan untuk mengikat antigen yang merangsang pembentukannya. Immunoglobulin adalah protein dengan aktivitas antibodi yaitu mengadakan ikatan spesifik dengan substansi yang berperan dalam pembentukannya (imunogen atau antigen), tetapi dapat pula memprakarsai fenomena biologik yang tidak tergantung dari spesifisitas antibodi (dwifungsi). Kebanyakan antibodi berada dalam fraksi globulin- γ dari serum. Diketahui bahwa

sel-sel B menggunakan bentuk ikatan membran dari antibodi yang disekresi sebagai reseptor antigen (Male,1998). Antibodi merupakan glikoprotein yang disekresi oleh sel plasma sebagai respons terhadap rangsangan antigen pada sel B. Antibodi ini mempunyai sifat molekuler dari imunoglobulin. Molekul-molekul antibodi semuanya mempunyai suatu bentuk dasar 4 rantai polipeptida terdiri dari 2 rantai ringan (*light = L chain*) dan 2 rantai berat (*heavy chain*) yang identik dan distabilkan dan terkait silang oleh ikatan-ikatan rantai intra dan rantai inter disulfida, dan adanya glikosilasi rantai H. Terdapat 5 tipe utama rantai H imunoglobulin ($\mu, \gamma, \alpha, \epsilon, \delta$) terdiri dari 450-600 residu asam amino dan tipe ini menentukan kelas dari antibodi. Rantai L terdiri 2 tipe (κ, λ) terdiri dari sekitar 230 residu asam amino dan salah satu tipe dari rantai L dapat mempunyai asosiasi dengan setiap rantai H. Rantai H dan L keduanya terlipat menjadi ranah-ranah (*domains*). Rantai L mempunyai 2 domains sedang rantai H 4 atau 5 domain. Daerah "hinge" (Engsel) pada struktur antibodi merupakan sdeksi dari rantai H yang terletak diantara *Fc* dan *Fab* dan mengandung ikatan disulfidainter rantai H yang memberikan kelenturan pada molekul antibodi. Setiap rantai polipeptida mengandung bagian terminal amino (*regio V = variable*) dan bagian terminal karboksil (*regio C = constan region*). Bagian V dari satu rantai L dan satu rantai H merupakan tempat melekatnya antigen (antigen binding site).

Bagian dari molekul antibodi yang mengikat antigen dibentuk oleh hanya sebagian kecil dari asam amino pada regio V dari rantai H dan rantai L. Domain sisanya relatif tidak bervariasi sehingga dinamakan *regio C (constan)*. Digesti

satu imunoglobulin G (*IgG*) dengan enzim papain menghasilkan 2 fragmen *Fab* (*antigen binding*) dan satu fragmen *Fc* (*crystallizable*) (Abbas, *et al.*, 2000).

Antibodi-antibodi dapat dihasilkan sebagai protein membran integral dari sel B, yang bertindak sebagai reseptor antigen, atau dalam bentuk yang disekresi. Imunoglobulin yang disekresi mempunyai struktur yang identik dengan imunoglobulin membran kecuali tidak didapatkannya segmen transmembran dan potongan kecil asam amino intrasitoplasmik pada terminal C dari Ig membran. Sel-sel B yang masih perawan (*virgin*) memproduksi imunoglobulin–immunoglobulin membran, namun pada aktivasi oleh antigen dan pada diferensiasi menjadi sel-sel plasma, akan berganti (*Switch*) memproduksi imunoglobulin yang disekresi. Antibodi mempunyai salah satu tugas dalam eliminasi antigen dengan berbagai cara :

1. Netralisasi toksin (toksin bakteri atau racun dari insekta/ular) dengan cara mengikat antigen toksin dalam suatu kompleks antigen-antigen yang inaktif kemudian mengeluarkannya melalui system retikulo endothelial.
2. Netralisasi virus : antibodi dengan epitope yang spesifik pada permukaan virus akan menghalangi pelekatan virus pada sel sasaran (*target cell*).Mekanisme ini mungkin kalah pentingnya dengan mekanisme untuk membunuh virus melalui sel Tc.
3. Opsonisasi bakteri : antibodi dapat melapisi bakteri sehingga menunjang pengeluaran dan fagositosis oleh makrofag (*Opsonin*)

4. Aktivasi komplemen : beberapa antibodi dapat mengaktivasi system komplemen bila membentuk kompleks dengan antigen. Komplemen yang teraktivasi dapat menyebabkan lisis sel melalui aktivitas ensimatiknya.
5. Sitotoksitas seluler yang tergantung pada antibody (*Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity = ADCC*). Antibodi (IgG) mengikat sel NK (*Natural Killer Cell*) yang kemudian akan melekat pada sel sasaran (bakteri/sel tumor) dan membunuhnya dengan sitotoksin.

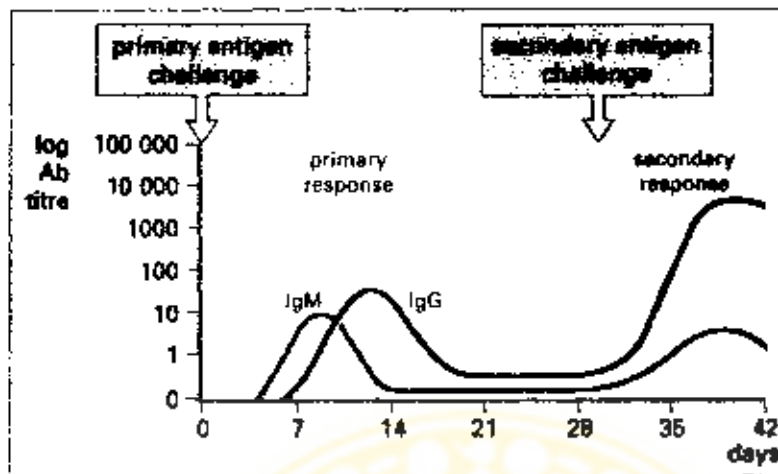
2.4.4 Respons Antibodi terhadap Antigen

Respons antibodi terhadap antigen protein membutuhkan keduanya baik limfosit B maupun limfosit T. Karena alasan ini, protein diklasifikasikan sebagai *thymus dependent* atau *T-dependent antigens*. Limfosit B memproduksi antibodi. Sel T menstimulasi sel B untuk berproliferasi dan berdiferensiasi sebagai respons terhadap antigen protein, karenanya disebut sebagai *helper T cells* (*Th*)

Respons antibodi terhadap antigen non protein, seperti polisakarida dan lipid, tidak membutuhkan antigen-spesifik *helper T lymphocytes*. Oleh karenanya polisakarida dan lipid disebut *thymus independent* atau *T-independent (TI) antigens*. Respons imun humoral *helper T cell-dependent* terhadap antigen protein bersifat sangat khusus menyebabkan terbentuknya antibodi dari isotipe yang berbeda, termasuk beberapa subtype IgG, IgE dan IgA. Sebaliknya respons antibodi terhadap antigen *T-independent* relatif sederhana dan terutama terdiri atas IgM (Abbas., *et al* , 2000). Pada *T-dependent immune response* terdapat

perubahan yang progresif mengenai kelas imunoglobulin dari antibodi spesifik yang diproduksi, pada umumnya imunoglobulin yang dimaksud adalah IgG. Isotype-switching ini tidak terjadi pada *T-independent immune response*, dan imunoglobulin utama biasanya tetap Ig M. Antibodi Ig M menduduki proporsi utama dan terbentuk lebih awal mendahului antibodi IgG pada respons primer (setelah pemberian antigen pertamakali), sedangkan pada respons sekunder (setelah pemberian antigen kedua) antibodi yang terbentuk didominasi oleh IgG dengan sedikit IgM (Fieldman, 1998)

Ciri respons antibodi *in vivo* adalah, peningkatan respons sekunder, *isotype switching*, *affinity maturation*, dan terbentuknya *memory*. Pemberian antigen yang pertama kali akan menunjukkan beberapa fase, pertama fase *lag*, tidak ada antibodi yang terdeteksi, diikuti dengan fase saat antibodi meningkat secara logaritmik kemudian menuju *plateu* dan akhirnya menurun. Perbedaan antara respons primer dan respons sekunder menyangkut empat hal, yaitu : A) Waktu : respons sekunder memiliki fase *lag* yang pendek dan perpanjangan *plateu* dan *decline*. B) Titer antibodi : antibodi pada *level* *plateu* lebih besar pada respons sekunder, sekitar 10 kali lipat atau lebih dibanding respons primer. C). Kelas antibodi : pada respons primer antibodi yang terbanyak adalah IgM, sedangkan pada respons sekunder didominasi oleh IgG dengan sedikit IgM. D). Afinitas antibodi : afinitas antibodi pada respons sekunder biasanya lebih tinggi, dan disebut sebagai *affinity maturation* (Fieldmann, 1998). Karakteristik dari respons antibodi primer dan respons antibodi sekunder dapat digambarkan seperti pada Gambar 2.2. di bawah ini :



Gambar 2.2. Respon antibodi primer dan sekunder (Roitt, 1998)

2.4.5 Profil Antibodi

Imunoglobulin G (IgG)

IgG merupakan komponen utama dari imunoglobulin dalam serum, dengan berat molekul 160.000 dalton. Kadanya dalam serum sekitar 13 mg/ml, merupakan 75% dari semua imunoglobulin. IgG mempunyai aktivasi terhadap antigen yang paling besar dan dapat mengaktivasi komplemen serta mudah berdifusi sehingga dapat melalui plasenta dan masuk ke fetus dan berperan pada imunitas bayi sampai umur 6-9 bulan.

IgG ditemukan dalam berbagai cairan, antara lain cairan serebrospinal (CSF) dan juga urin. IgG dan komplemen bekerja saling membantu sebagai opsonin pada pemusnahan antigen. IgG memiliki sifat opsonin yang efektif karena sel-sel fagosit, monosit dan makrofag mempunyai reseptor untuk fraksi Fc dari IgG sehingga dapat mempererat hubungan antara fagosit dengan sel sasaran. Selanjutnya proses opsonisasi tersebut dibantu oleh reseptor untuk

komplemen pada permukaan fagosit. Immunoglobulin G (Ig G) juga berperan pada imunitas selular karena dapat merusak antigen selular melalui interaksi dengan sistem komplemen atau melalui efek sitolitik *killer cell*, eosinofil dan neutrofil, yang semuanya mengandung reseptor untuk *Fc* dari IgG. Sel K merupakan efektor dari *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC)*. *ADCC* tidak hanya merusak sel tunggal, tetapi juga mikroorganisme multiseluler. Peranan efektor *ADCC* ini penting pada penghancuran kanker, penolakan transplan jaringan dan penyakit autoimun, sedang *ADCC* melalui neutrofil dan eosinofil berperan pada investasi parasit. Kadar IgG meningkat pada infeksi kronis dan penyakit autoimun. IgG banyak ditemukan banyak dalam darah, cairan SSP dan peritoneal. Immunoglobulin G (IgG) pada manusia terdiri dari beberapa subklas yaitu IgG1, IgG2, IgG3 dan IgG4 yang berbeda dalam sifat dan aktivitas biologik. (Brostoff, *et al.*, 1998)

Imunoglobulin A (IgA)

Jumlah IgA di dalam serum menempati urutan kedua dari seluruh klas imunoglobulin, yaitu 15% dari total imunoglobulin serum. Immunoglobulin A (IgA) serum ditemukan dalam bentuk monomer atau polimer. Bentuk monomer IgA mempunyai 4 rantai polipeptida, 2 rantai-L dan 2 rantai H. Rantai-L terdiri atas tipe κ dan λ dengan berat molekul 22.000, sedangkan rantai H lebih besar dari rantai γ dan disebut rantai- α dengan berat molekul 54.000. Kontribusi IgA dalam sistem imun lebih penting pada sistem sekretori eksternal. Di dalam cairan sekresi eksternal seperti air liur, air mata, cairan intestinum, cairan hidung, atau

sekresi saluran pematangan, antibodi ini terdapat dalam bentuk sIgA (sekretori IgA) karena berkombinasi dengan komponen sekresi (SC).

Jaringan limfoid yang terdapat pada saluran pencernaan, pematangan dan ketumam, memproduksi sIgA dalam kadar yang tinggi. Kadar sIgA akan meningkat bila terjadi stimulasi lokal oleh antigen. Produksinya terjadi pada tempat yang sama dengan tempat stimulasi. Pada keadaan normal, akumulasi sIgA air liur disebabkan flora mikroba normal, atau antigen dari makanan.

Molekul sIgA di dalam cairan ekskresi eksternal ternyata lebih besar dari pada IgA serum. Elektroforesis pada gel poliakrilamid, menunjukkan bahwa sIgA terdiri atas dua subunit IgA yang masing-masing mengandung dua rantai-H dan dua rantai-L, mempunyai rantai-J dan komponen sekresi. Rantai-J menghubungkan 2 monomer IgA secara kovalen melalui residu *half-cystine*. *Secretory Component (SC)* merupakan komponen tambahan glikoprotein bukan imunoglobulin yang bertindak sebagai antigen ekstra, berikatan secara kovalen melalui jembatan disulfida dengan salah satu dari dua subunit IgA monomer. Berat molekul rantai-J sekitar 15.000-25.000, sedangkan berat molekul SC sekitar 60.000. Dalam setiap rantai- α IgA terdapat dua bagian karbohidrat. Salah satu terletak didekat pertengahan rantai dan lainnya pada regio *Fc*. Karbohidrat ini terikat pada *serin* dan *asparagin* melalui ikatan OH dan N-glikosidik. Karbohidrat yang terkandung di dalam IgA sekitar 10%, jauh lebih banyak daripada kandungan karbohidrat imunoglobulin G (Ig G).

Sintesis sIgA terjadi secara lokal di dalam kelenjar sekresi eksternal. Molekulnya terdiri atas dua bagian protein, masing-masing disintesis oleh sel

yang berbeda. Protein yang identik dengan IgA serum, disintesis di dalam sel plasma-limfoid organ sekresi, sedang komponen sekresi disintesis di dalam sel epitelnya. Sel plasma individual, mensintesis sIgA dalam bentuk dimer, bukan dalam bentuk monomer yang mengalami dimerisasi ekstraseluler. Penggabungan *IgA dimer* dengan SC terjadi di dalam sel epitel. IgA dimer mengalami endositosis pada permukaan basal sel epitel, kemudian IgA dimer mengalami pasasi di dalam sel epitel menuju ke ruangan antar sel sampai ke batas apikalnya, dan singgah di dalam sel ini. Setelah terjadi penggabungan dengan SC, baru disekresikan ke dalam lumen kelenjar dalam bentuk sIgA. Dalam hal ini, SC berperan pada pasasi IgA dimer ke dalam lumen kelenjar. Secara rinci dapat disebutkan bahwa dalam sistem imunitas eksternal, SC berperan sebagai reseptor IgA dimer pada sel epitel ekskresi, yang kemudian bertindak sebagai alat untuk memindahkan IgA melewati barrier sel; sebagai molekul yang menemukan prekursor sel plasma dan menyebarkannya keluar ke dalam jaringan kelenjar; dan melindungi molekul IgA dari proteolisis di dalam cairan sekresi. (Steeber, *et al.*, 1999)

Imunoglobulin A sekretori lebih tahan terhadap proteolisis daripada protein lain. Ikatan kovalen antara SC dan IgA dimer akan menghasilkan konformasi tiga dimensi sehingga lipatannya relatif resisten terhadap proteolisis. Antara rantai-J dan SC, tidak terlihat adanya interaksi kovalen, namun rantai-J dianggap berperan dalam pengikatan SC dengan IgA dimer agar didapat konformasi yang optimal. Karena itu, rantai-J mungkin juga berfungsi agar sIgA liur lebih tahan terhadap proteolisis. (Janeway, *et al.*, 1999)

Diperkirakan s-IgA mempunyai empat buah tempat kombinasi untuk hapten monovalen kecil, karena itu dapat dikatakan sIgA bervalensi empat. Untuk determinan antigenik molekul besar, antibodi ini mempunyai dua situs yang efektif. Oleh karena itu, bila dibandingkan dengan efisiensi aglutinasi yang tinggi pada IgM, diduga sIgA lebih efisien dalam reaksi aglutinasi dibandingkan IgG. Reseptor IgA ditemukan pada limfosit, PMN leukosit, dan monosit. Molekul IgA tidak dapat mengaktivasi sistem komplemen melalui jalur klasik tetapi dapat mengaktivasi melalui jalur alternatif atau sistem properdin.

Di dalam rongga mulut, sIgA berfungsi melindungi permukaan mukosa dari infeksi virus dengan cara menghambat pertumbuhan virus. Antibodi ini mampu mengaktivasi sistem komplemen melalui jalur alternatif dan mempunyai aspek opsonisasi, efek bakterisidal, dan efek bakteriolitik. Lisisnya kuman diduga karena adanya kerja sama antara s-IgA, komplemen, dan lisozim. Secara *in vitro*, sIgA dapat menghambat pelekatan streptokokus *salvarius* pada permukaan epitel mukosa pipi. Hal ini mungkin juga berlaku pada pelekatan, agregasi, dan kolonisasi *S. mutans* pada proses pembentukan plak gigi dan karies gigi. Apabila demikian halnya, s-IgA diduga ikut berperan dalam mekanisme pertahanan tubuh terhadap terjadinya karies gigi, sebagai agen kariostatik. (Lehner, 1992)

Sistem imun mukosa berbeda dengan organ limfoid sekunder dalam hal dominasi sekresi IgA ke dalam mukosa, hal demikian dapat terjadi oleh karena adanya *isotype switching* ke IgA dan maturasi sel membran yang mengekspresikan IgA menjadi sel yang mensekresi IgA. Sel plasma yang mensekresi IgA banyak ditemukan pada lamina propria (Steeber, *et al.*, 1999).

Sitokin yang berperan dalam stimulasi tersebut diproduksi secara lokal di mukosa dan ini membuat suasana yang kondusif untuk terjadi respons sekresi IgA. Penelitian menunjukkan bahwa regulasi isotype *in vitro* sama dengan *in vivo* (Husband, 1999).

Sitokin yang bereperan menginduksi *isotype switching* ke Ig A adalah TGF- β dan IL-2. Penambahan IL-2 dan TGF- β ke dalam sel B yang telah distimulasi dengan LPS akan meningkatkan sekresi IgA yang lebih besar daripada kombinasi dari rangsangan masing sitokin saja, hal ini menunjukkan bahwa IL-2 sinergistik dengan TGF- β untuk membangkitkan respons IgA. (Lebman, 1994). Interleukin- 5 (IL-5) sinergistik dengan TGF- β untuk meningkatkan sekresi IgA. TGF- β berfungsi untuk stimulasi *isotype switching* ke IgA. TGF- β mampu untuk meningkatkan proporsi sel mIgA (Lebman,1994). Penambahan IL-2 ke dalam kultur yang mengandung TGF- β menyebabkan kenaikan 10-20 kali lipat sekresi IgA. Kombinasi TGF- β dan IL-2 menyebabkan transisi dari mIgA- dan menjadi IgA+ menjadi sel yang mensekresi IgA. Dalam keadaan defisiensi vit A akan terjadi gangguan regulasi TGF- β . TGF- β berfungsi untuk stimulasi *isotype switching* ke IgA dan mempunyai kemampuan untuk meningkatkan proporsi sel mIgA+ (Lebman,1994)

Imunoglobulin M (IgM)

IgM disebut sebagai makroglobulin (900.000/19S) karena molekulnya sangat besar dan terbesar di antara semua imunoglobulin. Rantai-H IgM merupakan rantai- μ , sehingga formulanya bisa $\mu_2\kappa_2$ atau $\mu_2\lambda_2$. Lima unit yang

masing-masing mengandung 4 rantai- μ , terikat bersama membentuk pentamer yang diikat oleh ikatan disulfida di dekat ujung *Fc*. Rantai-J pada IgM melekat pada *Fc*. Karbohidrat yang terkandung dalam molekul IgM sekitar 10% dan terikat pada rantai-H.

Jumlah IgM sekitar 10% dari total imunoglobulin serum dan kadarnya paling tinggi pada awal respon imun terhadap antigen di antara kelas imunoglobulin lainnya. Imunoglobulin ini juga sangat besar perannya pada respon antibodi tertentu semacam antibodi golongan darah. Bersama Ig D, Ig M merupakan imunoglobulin utama yang diekspresikan pada permukaan sel B. IgM juga paling efisien dalam memfiksasi komplemen karena sistem komplemen cukup diaktivasi hanya dengan satu molekul IgM yang terikat pada antigen.

2.5 Anomali Protein Mukosa Mulut

Anomali protein mukosa mulut yaitu suatu protein yang diekspresikan pada permukaan membran epitel mukosa mulut, ada yang bersifat antigenik maupun imunogenik. Adanya faktor eksternal dan internal melalui proses molekuler mengalami perubahan. Pada permukaan membran mukosa protein yang diekspresikan terjadi perubahan struktur primer. Kedua faktor tersebut kemungkinan akan mengaktifkan enzim dalam sel epitel yaitu adanya peningkatan aktivitas enzim polimerase II dan juga protein kinase pada sel epitel. Aktifnya enzim tersebut akan menyebabkan asam glutamin dan asparagin meningkat, sehingga struktur primer protein mengalami perubahan. Begitu juga aktifnya protein kinase akan meningkatkan siklus multiplikasi sel yang dimulai

pada fase G₀, selanjutnya fase S₂ dan fase G₁. Pada fase S₂ merupakan fase yang kritis akibat adanya stimulasi dari aktifnya protein kinase, karena fase ini yang mempunyai peranan penting pada reaksi enzimatik dalam sel. Proses ini terjadi melalui ekspresi CDC8 dan CD21, yang mengatur enzim deoksiribonuklease, sedang CDC9 dan CDC17 yang mengatur enzim polimerase.

Proses enzimatik secara molekuler dalam sel akan mengakibatkan perubahan struktur primer protein, yang kemungkinan terjadi proses mutasi pada gen penyandi CDC8, CDC21, CDC9 dan CDC17, selanjutnya protein hasil ekspresi tersebut mengalami perubahan struktur dikenal dengan protein anomali (Kolozik, *et al.*, 2000)

Secara fisiologis antigen mukosa tidak menginduksi terjadinya reaksi imun tetapi karena adanya stimulator terus menerus yang berlebihan sehingga terjadi ketidakseimbangan sistem imun dan akhirnya reaksi fisiologis berubah menjadi patologis. Hal ini kemungkinan disebabkan adanya perubahan fleksibilitas dari N terminal dan CH₃ pada permukaan antigen yang mempunyai mobilitas yang tinggi serta mengandung gugusan hidroksil yang besar, sehingga sifat hidropobitas pada residunya tinggi dan permukaannya bersifat hidrofilik (Westhof, 1984).

Adanya anomali dari antigen mukosa yang dapat memodulasi reaksi yang berlebihan secara lokal kemungkinan dapat berperan sebagai *trigger factor* terjadinya RAS (Burruano and Tortorici, 2001). Dari berbagai hasil penelitian lainnya kemungkinan protein anomali antigen mukosa merupakan hasil *cross reaction* respons imun dengan *heat shock protein (hsp)*, sehingga pengaruh

faktor eksternal dan internal dapat memicu terjadinya respons imun yang disorientasi, hal ini kemungkinan merupakan tanda awal terjadinya RAS (Hasan *et al.*, 2002)

Anomali protein terbentuk dan bersifat antigen disebabkan adanya rangsangan yang terus menerus baik dari faktor eksternal maupun internal. Adanya proses ini juga kemungkinan akan menyebabkan peningkatan produksi senyawa aktif (oksigen reaktif). Senyawa oksigen reaktif dapat menyebabkan kerusakan asam lemak khususnya asam lemak tak jenuh yang merupakan komponen penting fosfolipida penyusun membran sel, kerusakan DNA, dan kerusakan protein yang memegang peranan penting dalam sel, yaitu sebagai enzim, antibodi, pembentuk matriks dan sitoskeleton (Davies, 2000, Suryohudoyo, 2000)

Kerusakan oksidatif protein akan membentuk atau memunculkan suatu antigen baru, sehingga dapat dikenali oleh sistem imun, sebagai molekul asing yang selanjutnya dapat menstimulasi respon imun yang menimbulkan terjadinya peradangan. Sel T CD4⁺ dapat mengenali antigen baru yang terbentuk karena modifikasi oksidatif. Selanjutnya, sel TCD4⁺ aktif akan merangsang monosit, makrofag untuk menghasilkan sitokin IL-1, IL-6 dan TNF- α , serta mensekresi *matriks metaloproteinase* melalui signaling pada permukaan sel, yaitu melalui CD69 dan CD118, dan juga TNF- α , adalah sitokin utama yang mendorong peradangan (Halliwell, *et al.*, 1999, Muller, *et al.*, 1999). Sel T CD4⁺ aktif juga merangsang sel B melalui kontak dengan permukaan sel dan melalui ikatan dengan integrin, CD154 (CD 40 ligan), dan CD28, untuk menghasilkan

imunoglobulin. Imunoglobulin yang terbentuk dapat berikatan dengan antigen dan menghasilkan kompleks imun yang akan mengaktifkan komplemen. Akibatnya adalah terjadi kerusakan lebih lanjut pada epitel mukosa mulut. (Savage, 1995; Natah, 2000; Golsby *et al.*, 2000)

2.6. Struktur Protein

2.6.1. Karakteristik Protein

Protein merupakan kelompok senyawa yang terbesar terdapat dalam sel sebagai biomolekul, yaitu sebanyak 50 % berat kering senyawa organik total terdapat dalam sel. Ditinjau dari fungsi biologiknya dikenal ada beberapa macam kelompok protein, misalnya sebagai enzim, hormon, protein pengangkut, protein pembangun dan masih banyak lagi fungsi yang lain. Dengan cara pengelompokan yang lain dapat ditemukan : (1) kelompok protein sederhana, yaitu yang hanya tersusun atas unit-unit polipeptida saja dan (2) protein majemuk yang tersusun atas senyawa protein dengan karbohidrat atau lipida (glikoprotein dan lipoprotein). Berdasar atas bentuk dikenal protein globular yang bentuknya bulat atau lonjong dan protein fibrous, berbentuk serabut. Struktur protein berasal dari penggabungan beratus-ratus asam amino, padahal jumlah asam amino yang umum terdapat dalam alam hanya 20, maka kebanyakan asam amino frekuensinya lebih dari satu. Dalam jasad hidup yang sangat kompleks susunannya, terdapat beribu-ribu jenis protein . Secara kimiawi perbedaan itu terletak pada frekuensi jenis asam amino yang menyusun protein dan urutan asam aminonya. Perbedaan itu akan menyebabkan terjadinya

perbedaan struktur primer, sekunder, tersier dan selanjutnya menyebabkan perbedaan fungsi biologik protein (Murray, *et al.*, 2000,)

2.6.2. Reaksi dan Sifat Umum Protein

Faktor-faktor luar seperti asam, basa, garam dan suhu dapat menyebabkan perubahan baik kimiawi maupun fisik. Perubahan yang terjadi diatas dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis protein atau asam amino tertentu yang terdapat dalam bahan yang diteliti. Adanya gugus terminal NH₂ dan COOH (karboksil) serta gugus rantai cabang R dapat bermuatan positif ataupun negatif menyebabkan protein tadi bersifat basa dan asam. Sifat demikian merupakan sifat kembar yang dinamakan elektrolit amfoterik atau lazim disingkat dengan amfolit.

Konformasi molekul protein didukung oleh 4 macam struktur yaitu primer, sekunder, tertier dan kuartener. Struktur primer suatu protein dapat ditentukan secara umum oleh komposisi asam aminonya dan secara khusus oleh urutan aminonya. Komposisi asam amino suatu protein memberikan informasi dasar tentang jenis dan tipe asam amino yang terkandung dalam molekul protein tsb, sedangkan urutan asam amino suatu protein seperti suatu sidik jari, yang menjelaskan identitas suatu molekul protein dan urutan asam amino aminonya. Komposisi suatu molekul protein dengan mudah dapat ditentukan dari urutan aminonya. Contoh : dua molekul protein yang berbeda urutan asam aminonya mungkin mempunyai kesamaan komposisi asam aminonya. Struktur primer ini ditentukan oleh adanya ikatan kovalen antara sisa asam amino yang berurutan

yang membentuk ikatan polipeptida (Murray, *et al.*, 2000). Struktur primer protein dapat ditentukan melalui tahap tahap : 1). Penentuan jumlah rantai polipeptida protein, 2). Pemutusan ikatan-ikatan diantara rantai polipeptida yang satu dengan yang lain, 3). Pemisah masing-masing rantai polipeptida, dan 4). Penentuan urutan asam amino masing-masing rantai polipeptida. Pada teknik elektroforesis untuk penentuan struktur primer protein dilakukan terutama pada tahap 3 (Murray, *et al.*, 2000)

2.6.3. Ikatan Kimia Yang Berperan Dalam Molekul Protein

Protein sebagai rantai makro molekul saling terikat oleh ikatan kovalen, yang cukup kuat untuk menjaga dan memelihara urutan asam amino sebagai sub unit makro molekul ini, Tetapi informasi yang diemban oleh urutan asam amino dikuatkan melalui ikatan non kovalen yang kekuatannya jauh lebih lemah. Ikatan non kovalen yang dikenal antara lain adalah ikatan hidrogen, interaksi Van der Waals, ikatan ionik dan ikatan hidrofobik. Ada ikatan lemah lain yang dihasilkan akibat struktur tiga dimensi molekul-molekul air yang cenderung untuk memaksa menyatukan gugus yang bersifat hidrofobik. Dengan cara ini gangguan gugus hidrofobik terhadap jaringan ikatan hydrogen terbentuk antara molekul air akan sekecil mungkin. Ikatan yang terbentuk antara gugus hidrofobik ini sebagai ikatan hidrofobik.

Ikatan non kovalen tidak tahan terhadap gerakan termal yang cenderung menyebabkan molekul-molekul saling terpisah. Jadi mempertahankan dua permukaan molekul yang saling terkait diperlukan ikatan non kovalen dalam

jumlah besar. Sejumlah besar ikatan semacam ini dapat terbentuk bila kedua permukaan molekul tersebut saling cocok, hal itu dikenal sebagai kekhususan pengenalan biologis yang terjadi misalnya antar enzim dengan substratnya. Ikatan non kovalen juga menentukan bagaimana bagian-bagian yang berbeda pada suatu molekul saling cocok. Sesungguhnya suatu protein yang terbangun atas rantai panjang yang fleksibel dapat tergulung dengan banyak cara. Tetapi dalam prakteknya, hampir semua protein dalam sel mempunyai hanya satu bentuk tergulung yang stabil (Murray, *et al.*, 2000, Kolozik, 2000).

2.6.4. Urutan Asam Amino menentukan Konformasi Molekul Protein

Suatu protein sesungguhnya mempunyai konformasi yang sangat banyak. Tetapi dalam kondisi biologis, rantai polipeptida umumnya akan tergulung dalam salah satu konformasi saja. Hal ini terjadi karena rantai samping asam amino akan saling berasosiasi, juga rantai samping ini berasosiasi dengan air membentuk ikatan non kovalen, tergantung pada macam rantai dan posisi dalam polipeptida, maka suatu kekuatan besar akan terbentuk dan memberikan konformasi tertentu dengan kestabilan yang tinggi.

Protein umumnya tergulung secara spontan menjadi bentuk yang benar. Misalnya protein dapat mengalami denaturasi, suatu keadaan dimana rantai polipeptida yang fleksibel kehilangan konformasi semula. Salah satu faktor penting yang mengatur tergulungnya suatu polipeptida adalah distribusi samping polar maupun non polar. Selama sintesis protein, banyak rantai samping hidrofobik cenderung didorong kedalam molekul yang memungkinkan mereka

terhindar dari kontak dengan lingkungan berair. Sementara itu, rantai samping polar cenderung mengatur dengan sendirinya di luar molekul, di dalam mereka dapat berinteraksi dengan air maupun gugus lainnya.

Ikatan peptida, karena mereka sendiri bersifat polar, akan cenderung untuk berinteraksi antara mereka sendiri atau dengan rantai samping polar, dengan membentuk ikatan hidrogen. Ikatan hidrogen berperan penting dalam penyatuan berbagai bagian rantai polipeptida membentuk molekul protein yang tergulung dan ikatan ini sangat penting dalam banyak interaksi pada permukaan protein (Murray, *et al.*, 2000, Kolozik, *et al.*, 2000)

Setelah keluar dari sitoplasma, protein yang disekresikan atau yang terletak pada permukaan kerap kali memperoleh ikatan rantai-rantai kovalen. Misalnya ikatan disulfida antara gugus SH sisteina yang berdekatan pada rantai polipeptida yang tergulung dapat berperan untuk menstabilkan struktur tiga dimensi suatu protein ekstraseluler, meskipun sesungguhnya mereka tidak dibutuhkan untuk penggulangan molekul tersebut. Ikatan S-S ini jarang terbentuk pada protein yang masih di sitosol.

Sebagai hasil akhir interaksi semua sisa asam amino pada umumnya molekul protein akan tergulung secara spontan membentuk suatu formasi yang unik, biasanya kompak dan globuler atau panjang menyerupai serat. Inti bagian dalam terbangun oleh rantai samping hidrofobik yang menyatu dan terpadu dalam susunan yang ketat, sedangkan bagian luar yang sangat kompleks dan tidak teratur umumnya terbentuk dari rantai samping polar. Penempatan dan kimiawi berbagai atom yang berbeda pada permukaan menyebabkan tiap protein

mempunyai ikatan yang spesifik terhadap permukaan makromolekul lain maupun molekul yang lebih kecil.

2.7. Antibodi Monoklonal

Antibodi monoklonal adalah antibodi yang spesifik terhadap satu macam epitope. Dalam pembuatan antibodi monoklonal dapat dilakukan dengan cara *invitro* dan *invivo*. Secara *invitro* antibodi monoklonal diproduksi dengan cara hibridisasi sel myeloma dan sel limfa kemudian di biakan pada *mikroplate 96 well* dan diinkubasikan pada inkubator 37°C yang mengandung CO₂ 5%, sedang secara *in vivo* setelah hibridisasi diinokulasikan pada ruang peritoneum pada tikus, kemudian cairan asites di isolasi dan dimurnikan sebagai antibodi monoklonal. Agar dalam pengerjaan dan produksi monoklonal antibodi bebas dari kontaminasi dan hal yang tidak diinginkan, maka diperlukan prosedur yang komprehensif. (Rantam, 2003)

Karakter spesifik yang dimiliki oleh antibodi monoklonal adalah merupakan syarat utama untuk berbagai tehnik reaksi imunologi. Kelompok pertama yang tinggi terhadap suatu antigen, sifat-sifat ini tergantung pada daerah ikatan antigen (daerah variabel) dari suatu antibodi dan dapat ditentukan dengan suatu reaksi inhibisi dengan menggunakan beberapa antigen sejenis. Kelompok kedua dari sifat –sifat utama antibodi monoklonal adalah ditentukan oleh sruktur dari molekul antibodi tersebut, yang ditentukan oleh sekuens/urutan asam amino yang membentuknya., termasuk disini adanya klas dan subklas

rantai berat atau adanya perbedaan tipe rantai ringan dari suatu antibodi. (Rantam, 2003, Burgess, 1998)

2.7.1. Prinsip dan Teori Dasar Hibridoma

Dewasa ini antibodi monoklonal merupakan suatu perangkat istimewa dalam imunologi modern, yang dari hari ke hari makin banyak melibatkan bidang biomedis dari ilmu-ilmu lainnya. Penggunaannya sendiri mampu membuka era baru dalam penelitian dasar, dan sangat bermanfaat untuk agen diagnostik dan bahkan untuk maksud terapi dengan target spesifik. Antibodi monoklonal mempunyai arti begitu besar karena kespesifikan dan kemampuannya mengenal hanya satu epitop. Sebaliknya antibodi poliklonal yang kita ketahui sebagai anti serum konvensional, pada prinsipnya mengenal semua epitop dari suatu antigen, sehingga untuk maksud tertentu tidak menguntungkan. Antibodi diproduksi akibat adanya stimulasi suatu antigen terhadap perangkat imun, yang selanjutnya diikuti dengan serangkaian proses reaksi imun. Satu sel limfosit -B yang telah diaktivasi antigen akan memproduksi antibodi spesifik hanya terhadap antigen bersangkutan. Di lain pihak tumor dari limfosit-B (mieloma, plasmositoma) dapat juga memproduksi antibodi, tetapi spesifikasinya tidak ditentukan sebelumnya. Tumor seperti itu pada hakekatnya menghasilkan antibodi yang sama, yaitu monoklonal. Disamping itu sel tumor diketahui dapat tumbuh terus menerus secara *in vivo* ataupun *in vitro*, sedang sel limfosit-B tidak dapat tumbuh terus menerus, dan hanya memiliki kemampuan hidup terbatas di dalam kultur. Apabila memungkinkan dari sel limfosit-B normal yang memproduksi antibodi

dengan kespesifikan tertentu dapat dikultivasi di dalam kultur (*in vitro*) seperti halnya sel tumor maka maksud untuk menghasilkan antibodi monoklonal yang spesifik dari sel normal akan dapat tercapai, akan tetapi maksud tersebut sekarang ini belum dapat direalisasikan. Oleh karenanya orang mencoba melalui suatu jalan pintas yaitu dengan menfusikan sel limfosit-B yang menghasilkan antibodi tetapi sulit atau tidak tumbuh dalam kultur, dengan sel mieloma yang dapat tumbuh terus menerus dalam kultur tetapi tidak memproduksi antibodi.

Dengan fusi sel seperti ini akan di hasilkan sel hibrid yang memiliki kedua sifat dari sel induknya yaitu hidup di dalam kultur (*in vitro*) dan mampu memproduksi antibodi yang spesifik terhadap antigen yang dikehendaki. Sel hibrid yang memiliki kemampuan seperti itu disebut dengan *sel hibridoma*. (Rantam, 2003, Burgess, 1998)

2.7.2. Cara fusi sel sel somatik dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu

1) Sel limfosit-B yang telah di preseleksi dan spesifik terhadap suatu antigen yang dikehendaki dapat di tumbuhkan secara permanen dengan pemberian mutagen atau di transformasi dengan suatu agen seperti virus dan lain-lain. 2) Preseleksi dari limfoblast yang spesifik terhadap antigen yang dikehendaki (dengan limfosit) kemudian difusikan dengan *cell line* (mieloma) sehingga sel hibrid yang memiliki kedua sifat dari sel induknya dapat diseleksi dan dipropagasi secara terus menerus untuk dapat memproduksi antibodi yang hanya spesifik terhadap antigen yang bersangkutan. Fusi sel seperti ini dapat dicapai dengan menggunakan polietilenglikol (PEG) sebagai fusogen atau

dengan menggunakan impuls listrik (*Electrofusion*). Untuk maksud produksi hibridoma biasanya digunakan *cell line* yang mempunyai defek enzim (HGPRT negatif dan TK negatif) sebagai partner sel limfosit-B, baik untuk *mouse hibridoma* ataupun *rat hibridoma*.

Dengan menginduksi sel limfosit-B melalui imunisasi mencit dengan antigen tertentu maka antigen ini akan menstimulir sejumlah sel limfosit-B yang kebetulan ditakdirkan mempunyai reseptor yang sesuai dengan salah satu epitop dari antigen tersebut, sehingga akhirnya sel-sel tersebut berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akhirnya akan memproduksi antibodi. Kondisi kedua partner fusi ini, sel limfosit atau mieloma hendaknya masing-masing berada dalam satu stadium yang siap membelah yaitu berada pada fase mitosis. Dengan mempertimbangkan faktor-faktor tersebut serta dengan menggunakan medium seleksi, pada fusi sel tersebut hanya hibrid yang berasal dari satu sel limfosit-B dan sel mieloma yang akan lolos dari seleksi dan mampu tumbuh, untuk seterusnya menghasilkan antibodi monoklonal (Burgess, 1998, Rantam, 2003)

2.7.3. Isolasi dan Sifat Sel Limfosit B

Dari manakah sel limfosit atau limfosit B dapat diisolasi untuk maksud produksi antibodi monoklonal ? Seperti disebutkan di depan sel limfosit terdapat pada berbagai sumber, akan tetapi untuk *mouse* antibodi monoklonal organ yang menjadi pilihan adalah limpa. Hal yang utama adalah bagaimana kita dapat menciptakan kondisi dimana kedua sel mieloma untuk difusikan. Oleh karena itu

dua syarat utama yang perlu diperhatikan adalah : 1) Sel limfosit B yang dipersiapkan untuk fusi sel harus berada pada suatu kondisi yang menguntungkan, yaitu pada stadium pembelahan (fase mitosis) keadaan ini dapat dicapai bila dilakukan booster 3 kali berturut – turut menjelang fusi sel. 2) Secara alami diketahui dari imunisasi yang dilakukan akan dapat tersedia banyak sel limfosit B yang telah disensibilisasi dari teknik preparasi sel akan didapat minimal 1×10^6 limfosit dari sejumlah itu diketahui hanya kurang lebih 7×10^5 adalah sel limfosit -B sedang dari jumlah ini hanya kurang lebih $10^2 - 10^4$ sel adalah yang spesifik terhadap antigen yang di maksud.

Pada mamalia dewasa sumsum tulang dan *thymus* adalah organ yang paling padat dengan limfosit baik yang belum dewasa maupun dewasa (*immature* dan *mature*). Fraksi sel limfosit yang tergolong dewasa adalah lebih rendah yaitu antara 5–10 % sedang sel yang belum dewasa akan berkembang menjadi sel limfosit dewasa atau mati. Sel–sel besar (limfoblast) merupakan sel yang siap membelah dan dapat dijumpai pada populasi sel yang *immature*. Sel–sel limfosit dewasa tidak akan masuk kembali dan di disposisi dalam suatu organ atau selanjutnya diresirkulasi, namun demikian sumsum tulang mengandung sejumlah sel dewasa, yaitu sel immunokompeten termasuk limfosit kecil yang sudah pernah berada pada darah tepi dan di resirkulasi kembali. Dalam hal ini harus mempunyai tujuan yang jelas, limfosit dewasa hendaknya sel limfosit diambil dari peredaran darah tepi. (Rantam, 2003)

Sel limfosit T terdapat pada *thymus* dan hanya sel T yang telah lolos dari preseleksi di dalam jaringan *thymus* akan masuk sirkulasi sedangkan sel yang

mengenai bagian tubuh dari hewan bersangkutan akan di eliminir pada preseleksi. Demikian pula bila sel T merupakan komponen yang ikut ke dalam sumsum tulang akan di eliminasi, bila perlu dengan *antibody mediated cytotoxicity*. Secara garis besar, bilamana organ-organ limfosit tersebut berfungsi maksimal maka sumsum tulang dapat mengandung 30 sampai 50 % dari limfosit.

Sel limfosit B dewasa dapat diidentifikasi dengan adanya reseptor sel atau imunoglobulin permukaan, yaitu suatu tipe imunoglobulin tetapi masih berbentuk *tanker* pada permukaan sel melalui asam amino hidrofobik. Pada mencit diketahui bahwa 15% dari sel berinti adalah sel limfosit B. Sedangkan pada tikus (*rats*) agak berbeda dimana kira-kira sejumlah 5% adalah sel B dan 25% adalah Pre sel B. Thymus dari hewan muda merupakan sumber dari sel limfosit T, makrofag, *thymus nurse cells* dan beberapa sel-sel lainnya. Besar organ ini sangat bervariasi tergantung dari umur dan ras. Pada *node mouse* sel-sel ini secara *congenital* tidak ada sebegini besar sel-sel thymus memiliki marker terhadap sel yang disebut *T-helper* (CD 4) dan *T cytotoxic* atau *T-supresor* (CD8). Pada *mouse hibridoma* atau *rat hibridoma* kita masih untung dapat melakukan program imunisasi yang terencana dan respon imun yang dapat distandarisasi, dimana kita dapat mengimunisasi dengan antigen yang berlebihan, akan tetapi adalah sangat kontradiktif dengan upaya pembuatan human hibridoma, ada beberapa perkecualian yaitu tidak etis. Kalau kita melakukan imunisasi pada seorang seperti pada mencit atau tikus, memperhatikan segi kesulitan tersebut maka hanya ada beberapa kemungkinan

dari organ mana limfosit–limfosit dapat diperoleh Limfosit dari manusia yang tidak dümunisasi, dapat diambil dari darah tepi (PBL), tonsil, limfonoduli, jaringan tumor, pembuluh darah dan umbilicus (tali pusar). Hal ini sangat berharga kalau kita selalu mempunyai hubungan baik dengan rumah sakit terdekat, agar secara teratur kita dapat memperoleh materi yang diperlukan. Bilamana akan mengembangkan human hibridoma hal-hal yang teknis seperti ini perlu diperhitungkan, seperti misalnya kalau kita dapat mendapatkan organ limfosit seperti limpa maka 30% dari total populasinya adalah sel B, sedangkan dari peredaran darah tepi (PBL) hanya didapatkan kurang dari 10%, akibat pelekatan sel (baik antar sel sejenis maupun dengan sel lain) memungkinkan pertumbuhan yang lebih optimal. Dengan penggunaan sel lain sebagai matriks (*federfeyer*) terutama untuk pertumbuhan sel dalam konsentrasi rendah juga mendukung sel kultur. (Rantam, 2003)

2.7.4 Kultivasi Sel dan Biologi Sel Kultur

Kultur jaringan dalam arti luas menyangkut pengertian umum terhadap kultur organ dan kultur sel. Yang dimaksud kultur organ adalah pengertian umum mengenai kultur tiga dimensi dari jaringan utuh atau sebagian jaringan yang secara histologis seperti halnya *in vivo* sedangkan sel kultiur merupakan kultur dari disfersi sel yang berasal dari jaringan original, dari kultur primer, sel line ataupun sel strein, melalui disagregasi secara enzimatis, mekanis, atau kimiawi.

Perkembangan kultur jaringan sebagai tehnik baru dalam bidang biomedis mempunyai kaitan erat dan perhatian dalam : a) Mempelajari / investigasi

aktifitas intra seluler seperti replikasi dan transkripsi dari DNA, metabolisme energi dan sintesis protein. b) Arus intra seluler seperti : aktivitas dan perpindahan RNA dari inti ke sitoplasma dan translokasi hormon. c) Reseptor kompleks dan fluktuasi mediator kimia dan metabolit dalam arus intra seluler dari sel seperti nutrisi, invasi dan adanya induksi transformasi dari virus atau kimiawi. d) Interaksi antar sel, seperti sinyal sel, populasi kinetik dan adhesi sel

tehnologi kultur jaringan sel sangat menunjang penelitian dibidang tumor, virologi dan imunologi terlebih lagi setelah diperkenalkan fusi sel somatik disamping itu kultur jaringan telah dipakai secara rutin dengan aplikasi dalam bidang industri dan Ilmu kedokteran, seperti analisis kromosom, untuk mengetahui kelainan genetik dari bayi dalam kandungan, mempelajari efek toksik dari komponen obat, penentuan dari infeksi virus / bakteri dan monitoring efek pencemaran lingkungan, selanjutnya yang tidak kalah pentingnya dalam bioteknologi, dimana dari hasil rekayasa genetik dengan mempropagasi bakteri yang disisipi dengan gen tertentu, telah berhasil diproduksi insulin dan beberapa hormon pertumbuhan dalam skala besar. Demikian pula penggunaan antibodi monoklonal sangat meluas baik untuk penelitian maupun uji klinis termasuk diagnosis dan bahkan upaya terapi untuk mencapai target spesifik. Untuk mencapai tujuan kultur jaringan yang bersih dan tumbuh dengan baik tidak lepas dari beberapa tehnik dasar seperti aseptis, sterilisasi, seleksi dan separasi sel, kloning, propagasi dan reserfasi sel, oleh karena itu penguasaan dari pengetahuan dasar, kebutuhan dan ketrampilan seseorang sangat menunjang kesuksesan didalam memelihara kultur suatu sel. Penanganan kultur sel

hendaknya dijalankan dalam kondisi benar – benar aseptik, karena sel / jaringan hewan tumbuh dan berkembang lebih lambat dari kontaminan umum seperti bakteri yeast, jamur dan mycoplasma .

Validitas penggunaan sel kultur sebagai model fungsi fisiologis *in vivo* sering kali mendapat tanggapan/kritik, karena adanya perbedaan milieu/ lingkungan seluler. Dalam kultur *in vivo* interaksi sel – sel dan sel matriks sangat berkurang sebab populasi *cell line* tidak lagi heterogen milieu hormonal dan nutrisi yang berbeda, demikian pula proliferasi sel tidak dapat disepadankan dengan situasi pada *in vivo*. Sel kultur biasanya didapat dari sel yang tumbuh dari fragmen jaringan, dengan proses enzimatik atau difersi jaringan secara mekanis, kemudian berkembang menjadi *cell line* yang uniform. Sel kultur biasanya tumbuh adheren pada lapisan tunggal (*monolayer*) atau hidup dalam suspensi, yang pada prinsipnya menjadi basis dari kultur primer. Dalam kultur primer, sel dapat berproliferasi dan memperbanyak diri menjadi kultur yang konfuen (sel satu dengan lainnya kontak begitu rapat serta semua area pertumbuhan tertutup oleh sel) setelah melalui beberapa tahap seleksi, namun adakalanya sel dapat hidup tetapi tidak memperbanyak diri atau sama sekali tidak dapat hidup dalam kultur. Bilamana pertumbuhan sel mencapai stadium kultur yang konfuen maka secara proposional pertumbuhannya akan menurun melalui tahapan seleksi dan subkultur serta *passage* yang berulang – ulang memungkinkan sel yang produktif tumbuh baik, bisa terseleksi, sedangkan sel yang tumbuh lambat akan tereliminasi. Dengan sistem kloning itu diharapkan dicapai populasi sel yang homogen, dengan fenotipe yang serupa serta memiliki

keseragaman genetik. Dalam perkembangannya sel line dapat mencapai pertumbuhan yang terbatas hanya sampai beberapa generasi, kemudian mati atau menjadi *permanen continuous cell line*. Kemampuan untuk menjadi permanen, *cell line* menggambarkan kapasitas dari kemampuan variasi genetiknya. Kultivasi sel *line* secara terus menerus dalam waktu lama dalam kultur memungkinkan adanya mutasi genetik, perubahan sel menjadi *continues cell line* baik secara spontan, kimiawi maupun dengan induksi dari virus dikenal dengan transformasi.

Keberhasilan kultur jaringan adalah sangat di tentukan oleh lingkungan / milieu bagaimana sel dikultivasi, disamping penguasaan dasar – dasar sterilitas dan aseptik, ada 4 macam lingkungan pokok yang harus diperhatikan : 1) Matriks / *face* substrat dimana sel ditumbuhkan, apakah dalam medium padat sebagai *monolayer* pada permukaan plastik, apakah medium semi padat seperti suspensi kultur (*spin culture*). 2) Konstitusi psikokimia dan fisiologi dari medium 3) Konstitusi fase gas. 4) Temperatur inkubasi (Rantam, 2003)

2.7.5. Imunisasi

Tehnik pemanfaatan sistem imun yaitu dengan tidak melalui kontak langsung terhadap suatu agen penyakit, akan tetapi hanya dengan bagian tertentu dari penyakit yang bersifat imunogenik dapat merupakan pelindung yang protektif terhadap penyakit, seperti yang dikenal pada proses imunisasi dengan penyuntikan vaksin tertentu. Secara teoritis diketahui bahwa sistem imun mamalia bersifat pluripoten, yaitu mengandung suatu pengertian bahwa pada

suatu individu dapat dideteksi serum kebal (antibodi) terhadap setiap antigen yang masuk dan yang mampu menimbulkan respons imun.

Potensi antigen untuk menimbulkan respons imun sangat ditentukan oleh macam jenis, jenis besar molekul, struktur dan kompleksitas antigen tersebut. Suatu antigen walaupun relatif sederhana umumnya mempunyai beberapa *antigen determinan (epitop)*, sesuai dengan hipotesis *clonal selection theory* masing-masing epitop akan memicu satu populasi klon sel limfosit B yang telah memiliki reseptor terhadap antigen determinan tersebut untuk berproliferasi dan berdiferensiasi untuk menghasilkan antibodi, sehingga dari satu molekul antigen akan dapat menstimulir berbagai antibodi terhadap antigen determinan yang ada (Roitt, 1998; Kresno, 2001).

Penyuntikan suatu molekul antigen berarti akan menstimulir sejumlah klon sel limfosit B yang spesifik terhadap masing-masing antigen determinan dari molekul tersebut, yang menyebabkan masing-masing sel akan berproliferasi dan berdiferensiasi sesuai dengan fungsinya, apakah menjadi sel memori atau akan dideterminasi menjadi sel plasma sebagai pabrik antibodi. Immunogenitas suatu molekul protein pada dasarnya ditentukan oleh dua hal, yakni oleh struktur intrinsik dari molekul antigen yang disuntikkan atau oleh dapat tidaknya hewan mengenal senyawa tersebut sebagai agen asing. Dari kedua faktor tersebut timbul suatu pertanyaan mendasar, apakah sistem imun akan berespons terhadap molekul yang disuntikkan?. Injeksi beberapa molekul asing, virus atau sel menimbulkan respons imun yang baik pada hewan percobaan tetapi kadang-kadang beberapa substansi tidak dapat menginduksi sistem imun. Pada

kasus seperti ini imun sistem dapat di manipulasi untuk meningkatkan respons imun dengan modifikasi baik antigen tersebut maupun induk semangnya. Imunisasi secara berulang dengan selang waktu tertentu dapat meningkatkan respons imun suatu individu. Oleh karenanya modifikasi atau penelitian imunogenik dan cara pemberian sangat menentukan keberhasilan hibridoma. Dari beberapa penelitian menunjukkan bahwa dengan modifikasi imunisasi, jumlah relatif sel limfoblast dapat ditingkatkan, dan bila populasi sel blast ini dipakai sebagai partner pada fusi sel maka jumlah klon sel hibrid yang spesifik terhadap antigen akan meningkat dengan dramatis. Peningkatan jumlah relatif dari sel limfoblast dari populasi sel limfa dapat diketahui dengan membandingkan popuasi limfa yang tidak diimunisasi. Untuk meningkatkan jumlah klon yang spesifik terhadap antigen perlu diperhatikan adanya induksi sel B blast yang spesifik dan juga waktu yang tepat, yaitu pada saat sel tersebut pada fase mitosis (M-fase). Kondisi serupa ini dapat dicapai dengan melakukan injeksi ulang 3 atau 4 hari sebelum fusi, baik secara *intra vena* ataupun *intra peritonial*. Untuk booster ini tidak diperlukan adjuvans. Program imunisasi normal sebaiknya dilakukan antara 2-5 bulan sebelum dilakukan booster, setiap hari sampai pada sehari sebelum fusi sel. Disamping cara tersebut kesuksesan fusi sel dan keberhasilan mendapatkan klon yang spesifik terhadap antigen dapat dicapai tidak saja melalui cara klasik tetapi dapat juga dicapai dengan hanya satu kali injeksi *intra venous* pada hari ke 4 sebelum fusi atau hanya dengan sekali penyuntikan antigen secara *intra splenik* (20 µg) pada hari ke 4 (80-88 jam) sebelum fusi sel. Demikian pula imunisasi *in vitro* pada sel limfa yang

kultivasi 4-5 hari sebelum fusi dengan memberikan antigen dan peptid adjuvans dapat dihasilkan sel hibridoma terhadap antigen yang diberikan. Cara-cara tersebut di atas dapat ditempuh hanya saja tehnik-tehnik imunisasi seperti ini pada umumnya banyak didapatkan sel hibrid yang didominasi oleh hibrid yang memproduksi IgM. Untuk menghindari ini dapat dilakukan suatu kombinasi, dimana pertama dilakukan imunisasi konvensional *in vivo* selama 10-14 hari, kemudian dilanjutkan dengan imunisasi *in vitro* sehingga dominasi sel hibrid yang memproduksi IgM akan berkurang secara drastis (Burgess, 1998)

Tehnik imunisasi apapun yang dipilih untuk persiapan produksi antibodi monoklonal hendaknya dilakukan optimasi terencana sesuai dengan kondisi laboratorium masing-masing. Kondisi dan tipe imunisasi yang dipilih sangat menentukan hasil akhir yang akan dicapai. Jadi mengoptimalkan tehnik imunisasi langkah demi langkah sesuai dengan antigen yang dipakai sampai mendapatkan respons imun dengan titer antibodi yang tinggi dan jumlah sel limfoblas yang tinggi menjelang fusi. Bilamana imunisasi berhasil dengan baik maka dapat diharapkan produk yang baik berupa sel klon yang memproduksi antibodi yang spesifik dan dengan afinitas yang tinggi pula. (Burgess, 1998; Rantam, 2003,)

2.7.6. Imunisasi dengan menggunakan ajuvan

Ajuvan baik komplet atau inkomplet *Freund's ajuvan* atau aluminium hidroksil dan lain-lain dapat meningkatkan dan memodifikasi respons imun dengan jalan mengurangi kebutuhan sel akan antigen, yaitu dengan jalan memperlambat pembebasan antigen dari tempat depot, memodifikasi dan

menstimulir sel fagosit untuk lebih reaktif dan membebaskan mediator yang merangsang kaskade imun (karena komponen bakteri seperti Mikobakterium, *Bordetella pertusis* dll). Dengan dasar pengertian seperti ini dapat pula digunakan antigen dari hasil preparatif, baik dengan afinitas khromatografi atau poliakrilamid tanpa preparasi lebih lanjut. Untuk menghindarkan terjadi perubahan struktur antigen dapat disuntikan langsung untuk imunisasi mencit. Terlebih untuk antigen yang pemisahannya dapat dilakukan dengan elektroforesis. Dengan menyuntikkan band protein yang dikehendaki walaupun sudah dilakukan pengecatan dengan *coomasie blue* dapat dikerjakan. Gel yang mengandung band-band yang dikehendaki dapat disuntikkan langsung atau diemulsikan dengan *Freund's* ajuvan. Akan tetapi terbentuknya antibodi terhadap *carrier* molekul atau *Coomasie blue* perlu dipertimbangkan. (Rantam, 2003)

2.7.7. Dosis Imunisasi

Untuk imunisasi pertama umumnya dapat diberikan 1-50 μg larutan antigen, lebih rendahpun dapat diberikan tergantung dari jenis dan macam antigen itu sendiri. Dosis antigen yang terlalu tinggi dan waktu imunisasi terlalu lama dapat mempengaruhi respons imun hewan percobaan. Pemberian dosis tinggi dapat menstimulasi banyak sel limfosit yang kebetulan mempunyai reseptor yang mirip atau pas dengan antigen determinan dari antigen, atau dengan kata lain yang kurang spesifik ikut terstimulasi dan akan diproduksi antibodi yang mempunyai afinitas rendah. Sebaliknya imunisasi dengan dosis kecil akan menstimulasi sejumlah sel limfosit yang hanya memiliki reseptor yang

cocok dengan antigen determinan dari molekul antigen, sehingga sel yang terstimulasi lebih selektif dan dengan suatu harapan menghasilkan hibrid yang memproduksi antibodi dengan afinitas tinggi. Tinggi rendahnya batasan dosis antigen harus dilakukan tes imunisasi, terkadang pemberian dosis sampai 200 μg dan terendah 0,1 μg per injeksi dapat dihasilkan klon yang spesifik.

Pemberian dosis yang terlalu rendah, monomer protein dari hasil sentrifugasi yang tidak dicampur adukan dapat menimbulkan imunotoleran. Penyuntikan antigen dalam bentuk agregat melalui glutaraldehid atau karbondiamida adalah sangat menguntungkan dilihat dari respons imun yang ditimbulkan akan tetapi dari sisi lain ada segi negatifnya karena dalam pembentukan agregat epitop atau antigen determinan dari molekul antigen akan rusak. Beberapa jenis protein dapat dibuat agregat dengan mudah dengan menggunakan lektin, pengikatan kimia, presipitasi hapten dan karier atau dengan cara-cara sederhana lainnya seperti membekukan dan mencairkan protein bertulang-ulang

2.7.8. Produksi Hibridoma

Antibodi monoklonal dapat diproduksi, dengan jalan membuat immortalisasi dari sel yang menghasilkan antibodi. Ini berarti bahwa sel tersebut dapat mensekresikan antibodi yang spesifik, bilamana sel penghasil antibodi difusikan dengan sel tumor yang sudah tergolong *cell line*, sel keturunannya akan memiliki kedua sifat sel induknya yaitu mampu hidup terus menerus pada kultur dan memproduksi antibodi spesifik sesuai dengan maksud yang diharapkan, dan sel

hibrid tersebut dapat memperbanyak diri secara tidak terbatas dan oleh karenanya dapat dihasilkan antibodi dalam skala besar. Untuk immortalisasi sel, secara prinsip dapat dilakukan dengan dua cara yaitu : Pertama dengan cara fusi dengan sel tumor (mieloma). Kedua : adalah dengan jalan transformasi sel-limfosit B dengan agen kimia atau dengan virus. Dengan sendirinya adalah tidak mungkin mengimmortalisasi kerja satu sel melainkan adalah suatu populasi sel atau campuran dari sejumlah sel. (Rantam , 2003)

2.7.9. Preparasi Limfosit dari Limpa dan Limfoglandula.

Di dalam organ limfoid terdapat sel limfosit yang begitu padat, terkemas bersama dengan jaringan ikat dan pembuluh darah. Dengan jalan menekan atau menyuntikkan medium (tanpa serum) dari berbagai posisi dengan jarum suntik, sel dapat dikeluarkan dengan mudah sehingga berada dalam bentuk suspensi sel, keluar bersama medium yang disuntikkan. Dalam populasi sel ini terdapat limfosit, makrofag, monosit, asesori sel dan juga eritrosit. Populasi eritrosit dapat dikurangi dengan jalan berusaha mengosongkan limpa dari eritrosit, yaitu dengan melakukan pengambilan darah dari plexus orbitalis kira-kira 30 menit sebelum mencit dibunuh. Dengan cara lain dapat pula dilakukan destruksi eritrosit dengan shock hipotonis (0,17 M NH_4Cl). Sel –sel lain yang tergolong bukan limfosit dapat dikurangi dengan memberi kesempatan adherent pada matriks dari kultur, dengan melakukan inkubasi pada 37 °C selama beberapa puluh menit saja. Pada prinsipnya untuk tujuan pembuatan hibridoma pemisahan limfosit dari sel-sel yang bukan limfosit tidak merupakan suatu

keharusan, karena eritrosit tidak akan tumbuh dalam kultur, demikian juga makrofag tidak akan berproliferasi. Dengan melakukan pemisahan limfosit, lebih-lebih pemisahan sub populasi limfosit-B akan memberikan kesempatan fusi lebih besar dengan sel myeloma, sehingga maksud ini dapat diharapkan produk fusi yang lebih tinggi, dengan demikian otomatis jumlah hibrid akan meningkat, namun dari sisi lain usaha pemisahan limfosit tersebut meningkatkan volume pekerjaan dan memerlukan langkah tambahan sehingga akibat manipulasi terlalu banyak dapat mengakibatkan berkurangnya jumlah sel yang didapat dan juga kerusakan sel. Di sisi lain penambahan volume pekerjaan akan meningkatkan pencemaran atau kontaminasi kultur yang tidak diharapkan (Rantam, 2003)

2.7.10 Dasar Hibridisasi dan Produksi Antibodi Monoklonal

Sifat dan Produksi Sel Mieloma dan Sel Line Tumor

Sebagai bahan dasar dalam pembuatan antibodi monoklonal terdapat empat persyaratan yang harus dipenuhi antara lain : 1) Sel tidak dapat mensintesis antibodi komplet atau imunoglobulin *L-chain* dan *H-chain* sendiri. 2) Sel tidak mempunyai enzim defek, supaya setelah seleksi fusi dapat dieliminir. 3) Sel harus mempunyai sifat fusi yang baik, sehingga didapatkan sel hibridoma yang banyak dan baik. 4) Sel harus dapat membawa sifat molekul dalam hibridoma untuk menginduksi sinteisi antibodi monoklonal yang tinggi (Rantam, 2003).

2.7.11. Tanpa Sekresi Immunoglobulin

Sel mieloma atau sel tumor mempunyai sifat yang tidak dapat memproduksi atau mensintesis sendiri antibodi secara utuh atau rantai antibodi, tetapi dapat memproduksi setelah hibridisasi. Hal ini karena terdapat sisternal kombinasi kompartmen dari kromosom 2, 14, 22 (manusia) atau 6,12 dan 16 pada mencit dari sel asal, selain itu juga sel mieloma tidak dapat mensintesis antibodi, sehingga dapat menseleksi untuk memproduksi antibodi monoklonal yang intak dengan kromosom sel B saja. Terdapat beberapa sel mieloma establish seperti *mouse* mieloma yang berkode antara lain P3x63 Ag8.653, SP2/O-Ag14 dan P3-NS1/1-AG4-1 tetapi kadang terjadi mutan. Sedang P3-NS-1/1-Ag4-1 secara intraseluler bebas rantai kappa, tetapi tidak dapat berfusi dengan baik. (Rantam, 2003)

2.7.12. Defek Enzim Untuk Seleksi

Setelah dilakukan fusi terdapat empat kemungkinan populasi sel yang berbeda yaitu tidak terjadi fusi diantara sel myeloma, tidak terjadi fusi diantara sel limfosit, tidak terjadi hibridoma yang salah dan terjadi hibridoma yang benar. Apa yang terjadi setelah fusi terhadap keempat macam sel fusi tersebut ? Sel yang tidak fusi dengan sel B akan mati beberapa hari setelah fusi atau paling lama 3 minggu. Sel yang salah fusi dengan dua sel B dan satu sel mieloma, dua sel mieloma dengan satu sel B, keduanya sel B, sel B dan sel T tidak mempunyai kemampuan hidup dan akan mati dalam beberapa hari. Sel

hibridoma yang sempurna fusi akan tumbuh terus dan paling tidak dalam hibridisasi paling sedikit akan didapatkan sel hibridoma sekitar 10^{-4} meskipun masih ada sel yang tidak fusi seperti sel myeloma yang dapat tumbuh cepat dan dapat berproliferasi, maka diperlukan cara untuk menyasati sel tersebut agar cepat tereliminir atau mati maka perlu ditambahkan medium Thymidin Kinase (TK) agar terjadi defek enzim, atau ditambahkan *Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase* (HGPRT). Dengan adanya defek enzim, maka sel akan mati, sedang sel hibridoma (sel fusi) tidak akan mati. (Pieter & Baumgarten, 1969)

2.7.13. Sifat Fusi Yang Baik

Sifat fusi yang baik adalah dapat menghasilkan sel hibridoma yang banyak. Jika sel linie tumor sesuai dengan kriteria sebagai persyaratan membuat hibridoma maka akan mendapatkan sel partner yang baik dan otomatis akan menghasilkan sel hibridoma yang baik pula. Selain itu juga tidak ditemukan adanya mutasi sel pada tingkat subklon.

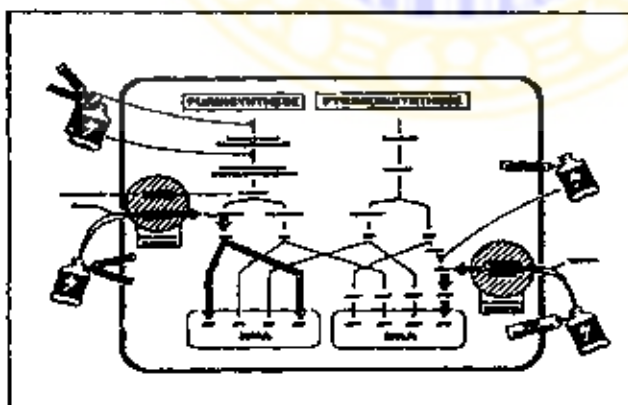
2.7.14. Kualitas Hibridoma

Hibridoma dikatakan baik jika daya sintesis antibodi monoklonal tinggi. Pernyataan ini sangat penting jika menginginkan produksi antibodi monoklonal dalam kapasitas yang cukup banyak. Apakah ingin memproduksi atau mendapatkan kultur hibridoma $10 \mu\text{g/ml}$ atau $50 \mu\text{g/ml}$. Sampai saat ini sel myeloma dapat menginduksi sintesis antibodi monoklonal. Oleh karena itu

sekarang tehnik ini berkembang pesat untuk memproduksi antibodi monoklonal anti human. Selain itu juga tidak banyak ditemukan mutagenesis pada subklon. Dengan demikian melalui teknologi gen kemungkinan yang akan datang didapatkan sel yang baik , sehingga menghasilkan fusi yang baik.

2.7.15. Prinsip Seleksi

Setelah fusi sel tidak semuanya menjadi sel hibrid tetapi masih banyak dijumpai sel yang tidak fusi di dalam kultur sel seperti limfosit, eritrosit yang mati. Makrofag dan sel adherent dari sel limpa kemungkinan tumbuh tapi lambat atau mati. Hal ini berbeda dengan sel mieloma, hibridoma dan sel lainnya cepat tumbuh. Oleh karena itu dibutuhkan sistem seleksi untuk membuat sel menjadi defek mutasi terutama metabolisme pada inti sel (*nucleus*). Sintesis asam inti melalui dua jalan yang berbeda . Jalan utama dan cadangan dikenal dengan *salvage pathways* , tampak pada gambar 2.3 :



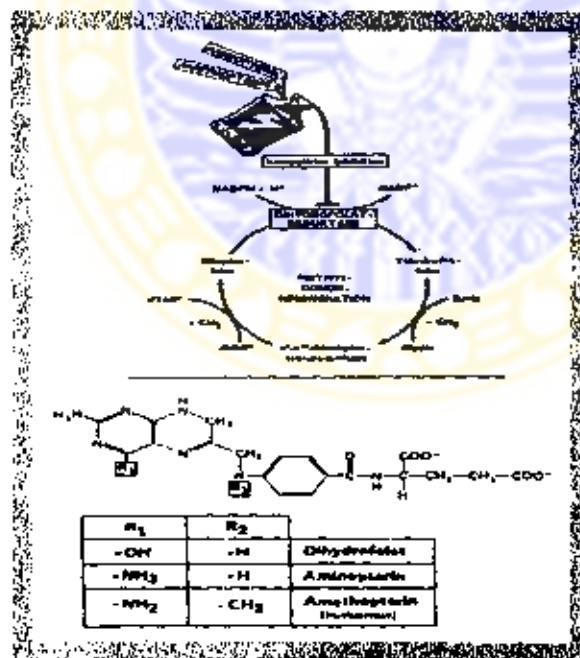
Gambar 2.3. Skema sintesis asam nukleat dan prinsip seleksi (Pieter & Baumgarten, 1989)

Pembuatan defek selamanya jika tidak membuat sel tersebut mati maka dilakukan jalan lain untuk membunuh sel tersebut melalui purin dan pirimidin dengan menambah aminopterin, tetapi agar sel hibridoma tetap hidup maka ditambahkan hypoxanthin dan thymidin (HAT medium), tetapi jika sel mengalami defek pada metabolisme cadangan maka dengan penambahan HAT juga tidak akan menolong sel untuk terus hidup karena terjadi pengeblokan kedua jalan metabolisme. Model pengeblokan dengan penambahan azaserin sama dengan penambahan aminopterin, tetapi dosis yang diperlukan lebih besar, jika tidak maka pengeblokan terjadi hanya pada jalan metabolisme utama yaitu sintesis purin akan diblok. Azaserin dan juga aminopterin pada sistem mouse tidak digunakan lagi karena sedikit sensitif terhadap sinar oleh karena itu sampai sekarang yang paling baik dan dapat dipercaya adalah dengan penambahan HGPRT dan bukan Thimidin Kinase (TK).

Limfosit yang digunakan untuk fusi adalah *wild type*, karena tidak membawa defek genetik yang relevan. Tetapi sebaliknya jika difusikan dengan myeloma yang mempunyai gen defek difusikan dengan limfosit maka akan terjadi defek pada jalan metabolisme cadangan, sehingga sel hibrid akan dapat disembuhkan dengan jalan dominasi gen normal dari limfosit akan mengkompensasi terhadap gen defek, sehingga sel hibrid tahan terhadap aminopterin. Oleh karena itu digunakan hypoxanthin dan thymidin. Sebaliknya sel tumor yang tidak fusi dengan penambahan medium HAT akan mati. Ada dua jalan metabolisme cadangan yang dapat digunakan sebagai dasar prinsip seleksi dan bahan kimia yang digunakan untuk seleksi adalah : 1) menggunakan

hypoxanthin atau guanin dengan bantuan enzim hypoxanthin-guanin-phosphoribosyl-transferase (HGPRT) atau HPRT. 2) Thymidin dengan bantuan enzim thymidin kinase (TK)

Limfosit yang digunakan untuk fusi adalah *wild type*, karena tidak membawa defek genetik yang relevan. Tetapi sebaliknya jika difusikan dengan myeloma yang mempunyai gen defek (sel linie tumor) difusikan dengan limfosit maka akan terjadi defek pada jalan metabolisme cadangan, sehingga sel hibrid akan dapat disembuhkan dengan jalan dominasi gen normal dari limfosit akan mengkompensasi terhadap gen defek. Sehingga sel hibrid tahan terhadap aminopterin. Oleh karena itu digunakan *hypoxanthin* dan *thymidin*. Sebaliknya sel tumor yang tidak fusi dengan penambahan medium HAT akan mati.



Gambar 2.4 Skema pemindahan grup metil untuk sintesis *nucleic acid* dan blokade melalui analog dihidrofolat ((Pieter & Baumgarten, 1989)

Defek dapat terjadi secara sporadis melalui mutasi pada kultur sel. Adanya gen defek melalui mutasi sebaiknya dicari dengan cara menambahkan 6-thioguanin (TG) atau 8-azaguanin melalui HGPRT atau penambahan brom desoxyuridin (BrdU) melalui thymidin kinase di dalam sel. Setiap sel yang kontak dengan bahan ini akan terjadi keracunan dan akhirnya mati. Pada sel lini yang establish defek melalui mutasi secara sporadis frekuensinya sampai 10^{-7} . Hal ini dapat dibuktikan dengan cara menambahkan mutagen yaitu ethyl-methansulfonat, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ atau melalui penyinaran ion dengan dosis 100 – 200 Rad, maka mutasi akan menjadi meningkat.

Akhirnya dalam melakukan seleksi menggunakan bahan kimia yang sesuai dengan menambahkan TG atau BrdU. Tetapi sebaiknya harus dilakukan pengujian terlebih dahulu apakah sel resisten atau tidak. Karena dalam kenyataan sel yang rentan terhadap HAT belum tentu tidak rentan terhadap TG atau BrdU atau sebaliknya tidak rentan terhadap TG dan BrdU rentan terhadap HAT. Beberapa sel kebanyakan mempunyai sifat defek pada sistem transport untuk TG atau BrdU dan tidak pada kinase. Setelah diberi HAT beberapa hari sel yang mengandung TG atau HGPRT-defek akan mati (Pieter & Baumgarten, 1989).

Prinsip seleksi lainnya adalah terletak pada HGPRT-defek, hal ini analog dengan defek di dalam gen *adenosin phosphoribosyl transferase* (APRT). Gen HGPRT pada mencit terletak pada *x-chromosom*. Hibridom yang mengandung sedikit x-kromosom tidak akan dapat hidup terus jika tambahkan HAT. Gen APRT terdapat pada kromosom 8, gen untuk *heavy chain* pada kromosom 12.

Robertsonian 8, 12, 5Bnr mencit membawa translokasi kromosom campuran 8 dan 12, sehingga terjadi segregasi bersama.

Pada partner sel *line* HL1 myeloma-653 yang defisiensi APRT masih diperlukan tambahan HGPRT dan negatif imunoglobulin. Sel ini difusikan di Jerman dengan sel limfa Rb (8,12) 5Bnr mencit, kemudian diseleksi dengan adenine aminopterin dan thymidin (AAT), sehingga sel klon saja yang dapat tumbuh karena terdapat *heavy chain* dalam lokus. Awal perjalanan HGPRT dalam metabolisme purin memerlukan gen adenosine desaminase (ADA) sebagai marker seleksi. Tidak ada ADA maka sel memerlukan adenosine desoxyadenosin untuk dapat hidup terus. Disini juga ditambahkan aminopterin untuk memblokir jalan metabolisme utama dengan memerlukan tambahan desoxyadenosin untuk mensubstitusi thymidin.

Pada industri yang memproduksi antibodi monoklonal prinsip seleksi harus betul-betul dipertimbangkan terhadap sel yang akan digunakan. Kebanyakan sel mieloma yang digunakan berasal dari manusia karena harus difusikan berkali-kali, tetapi jika tidak didapatkan, maka dapat digunakan myeloma mencit yang difusikan dengan myeloma manusia sehingga terjadi kombinasi. Sebagai contoh lainnya membuat antibodi monoklonal bispesifik dapat dihasilkan jika dua hibridoma mensintese antibodi sendiri tetapi fusi dengan lainnya, karena keduanya setelah fusi genom tetap aktif, terjadi kombinasi sendiri dan mensintesa rantai antibodi bispesifik. Oleh karena itu dalam hal ini diperlukan dua kali fusi dan dua kali seleksi.

Sebagai marker seleksi yang sering digunakan adalah Quabain resisten. Dalam heterofusi antara sel manusia dan sel mamalia secara alami sangat peka terhadap Quabain (Strophantin), sehingga setelah fusi sel manusia akan mati sendiri. Pada sel myeloma manusia terutama untuk heterofusi, heteromyeloma dan hibridoma sering menggunakan transformasi EBV (Epstein Barr Virus).

Akhirnya jika akan melakukan produksi antibodi monoklonal dan dalam seleksi tidak menggunakan bahan kimia dan tidak memenuhi persyaratan dalam menumbuhkan sel maka tidak akan didapatkan sel hibridoma atau fusi partner yang baik. Hal ini tidak perlu diragukan lagi jika dalam seleksi menggunakan medium HAT atau thymidin. Karena sel sangat sensitif terhadap bahan kimia tersebut. Contoh lain juga seperti penambahan diatas seleksi dengan menggunakan hypoxanthin-azasarin (HA) akan menghasilkan hibridoma yang baik (Rantam, 2003)

2.7.16. Aplikasi Antibodi Monoklonal

Penggunaan serum imun atau preparasi antibodi, baik yang berasal dari hewan yang telah diimunisasi ataupun serum pasien (orang) yang mengandung antibodi spesifik untuk tujuan diagnosa klinik telah dipakai sejak bertahun – tahun. Antibodi yang diperoleh dengan cara ini umumnya adalah antibodi campuran, yang memiliki beberapa kekurangan / kelemahan seperti persediaan yang amat terbatas, titer antibodi relatif rendah, heterogen yang sukar distandarisasi sehingga saat ini aplikasinya tergeser antibodi monoklonal. Namun demikian, karena kelebihanannya dapat mengenal semua epitop dari suatu

antigen untuk suatu test rutin seperti ELISA atau RIA, hal ini masih dipandang menguntungkan .

Dewasa ini antibodi monoklonal dapat dipakai untuk berbagai maksud dan bahkan sudah dibutuhkan secara rutin di laboratorium untuk bermacam – macam test, penetapan hormon, seperti TSH, T3, T4, cortison, FSH, LH, Estradiol, Aldosteron, Serotonin, Dopamine, Progesterone , Vasopresin, dan juga untuk penetapan berbagai jenis enzim. Dengan antibodi monoklonal juga dimungkinkan memisahkan sub populasi limfosit T secara kuantitatif sehingga bermanfaat dalam menentukan diagnosa penyakit yang berhubungan dengan sistem imun seperti AIDS (*Aquired Immune Deficiency Syndrome*). Virus AIDS hidup pada sel limfosit T helper , sehingga dapat mengurangi sub populasi limfosit ini secara masif, dimana ratio antara sel T helper dengan T supresor dapat mencapai (0,5 – 0,1) : 1, dimana dalam keadaan fisiologis mempunyai ratio normal 2 : 1. Disamping itu antibodi monoklonal sangat bermanfaat dalam penelitian dasar bidang kedokteran baik sebagai perangkat diagnostik ataupun untuk terapi melalui imunotargeting (Burgess, 1998, Rantam, 2003)

2.7.17 Penggunaan Antibodi Monoklonal Dalam Bidang Medis

Antibodi poliklonal sangat karakteristik dengan sifat heterogenitasnya. serum dari jenis ini diketahui walaupun spesifik atau sangat berbeda dari satu serum dengan serum lainnya sehingga tidak dapat mengharapkan hasil yang konsisten. Hal ini disebabkan karena rendahnya kadar dari antibodi spesifik (1% - 15%) dapat menjadi kendala di atas. Sebaliknya antibodi monoklonal,

disamping karena kespesifikannya, juga tersedia dalam jumlah yang tidak terbatas dan hasil yang diperoleh sangat konsisten, maka dewasa ini telah menjadi primadona industri untuk agen diagnostik. Dalam tehnik *immunoassay* antibodi monoklonal mempunyai beberapa kelebihan dari antibodi poliklonal yaitu: a) Karena homogenitas dan satu kesatuan tetapan afinitas memungkinkan penggunaan dengan waktu inkubasi lebih pendek dan hasil yang memuaskan . b) Standarisasi yang baik dari reagensia akan memungkinkan hasil ulangan yang konsisten. c) Sensitifitas suatu test dapat divariasasi dengan tetapan afinitas antibodi monoklonal yang berbeda-beda. d) Dengan menggunakan antibodi monoklonal yang memiliki afinitas homogen maka pelekatan monoklonal antibodi dalam matriks padat akan mengurangi *hook effect* akibat pemberian antigen yang berlebihan e). Spesifitas dan sensitifitas suatu agen diagnostik dapat ditingkatkan dan diefisiensikan.

Penggunaan antibodi monoklonal dalam bidang medis sekarang ini sudah sangat beragam mulai dari agen diagnostik, monitoring obat, penetapan hormon polipeptida dan untuk diferensiasi dari agen penyakit seperti bakteri, parasit dan virus. Dalam pemanfaatan antibodi monoklonal untuk monitor obat sudah banyak dipublikasikan seperti misalnya pelacakan digosin dalam jumlah nano molar (NM) atau obat anti tumor seperti methotrexat (MTX) dengan obat jenis lainnya seperti anti depresi (Alprenololnortriptylin). Lebih-lebih dalam diagnosis tumor atau antigen yang terasosiasi pada tumor manfaat antibodi monoklonal sangat berarti .

BAB 3

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1. Kerangka Konseptual

Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS) adalah penyakit pada mukosa rongga mulut yang etiopatogenesisnya belum diketahui dengan jelas. Timbulnya penyakit ini kemungkinan karena ketidakseimbangan sistem imun dalam tubuh baik secara lokal maupun sistemik. Beberapa hasil penelitian menunjukkan adanya RAS diawali dengan stimulasi faktor internal dan eksternal. Peristiwa intraseluler sebagai respons terhadap stimulasi kedua faktor tersebut terjadi pada enzim dalam sel epitel yaitu enzim polimerase II dan protein kinase. Aktifnya enzim polimerase II akan menyebabkan asam glutamin dan asparagin meningkat, dan mengakibatkan perubahan struktur primer protein yang diekspresikan. Begitu juga aktifnya protein kinase akan meningkatkan siklus multiplikasi sel yang dimulai pada fase G₀, selanjutnya fase S₂ dan fase G₁. Pada fase S₂ merupakan fase yang kritis akibat adanya stimulasi dari aktifnya protein kinase, karena fase ini yang mempunyai peranan penting pada reaksi enzimatik dalam sel. Proses ini terjadi melalui ekspresi CDC8 dan CDC21, yang mengatur enzim deoksiribonuklease, sedang CDC9 dan CDC17 yang mengatur enzim polimerase. Hal ini kemungkinan terjadi proses mutasi pada gen penyandi CDC8, CDC21, CDC9 dan CDC17 (Kolozik, *et al.*, 2000) dan selanjutnya protein

hasil ekspresi tersebut mengalami perubahan struktur primer yang selanjutnya dikenal dengan anomali protein

Anomali protein yang diekspresikan pada mukosa mulut bersifat antigenik, sehingga dapat menginduksi respons imun humoral maupun seluler. Pada respon imun humoral imunoglobulin akan menyebar secara lokal dan sistemik sebagai respons stimulasi yang terus menerus oleh protein yang diekspresikan mengakibatkan ketidakseimbangan sistem imun pada permukaan sel epitel mukosa. Protein ini setelah difagositosis oleh sel Langerhans (APC) terjadi fragmentasi menjadi antigen peptida, selanjutnya dipresentasikan ke permukaan melalui MHC kelas I dan MHC kelas II.

Ekspresi antigen peptida yang melalui proses eksogenous antigen dapat memicu terjadinya reaksi Th berlebihan terhadap ligan dan respons imun seluler, akibatnya terjadi peningkatan aktivitas vaskuler endotel dan fagositosis. Jika hal ini berlangsung dalam waktu lama maka akan terjadi peningkatan aktivitas sel Th1 yang akan memicu makrofag, IFN- γ dan TNF- β yang menyebabkan reaksi inflamasi dan kerusakan jaringan. Selain itu sel Th2 yang teraktivasi juga akan menstimulasi sel B, aktivitas sel B juga meningkat sebagai akibat adanya stimulasi dari IL-5 dan IL-6 maka akan terjadi sekresi imunoglobulin yang berlebihan, sehingga timbul reaksi kompleks imun yang menyebabkan peningkatan aktivitas endotel vaskuler dan fagositosis. (Healy, *et al.*, 1999, Horie, *et al.*, 1998, Muller, 1999).

Adanya sekresi imunoglobulin dari sel B yang berlebihan akan mengakibatkan antibodi yang terbentuk akan berikatan dengan antigen dan

menyebabkan pembentukan kompleks imun, yang selanjutnya akan mengaktifkan komplemen. Aktivasi komplemen akan menimbulkan sejumlah fenomena radang dan kerusakan dinding sel yang menyebabkan lisis sel, oleh karena itu respons imun humoral merupakan faktor dominan yang kemungkinan mengakibatkan kompleks imun. (Goldsby *et al.*, 2000, Steeber *et al.*, 1999). Pada kasus RAS imunoglobulin yang berperan adalah IgG dan IgA, tetapi kadar imunoglobulin ini tidak mempunyai perbedaan yang berarti pada semua kasus RAS, tetapi kemungkinan yang berbeda signifikan adalah subklas imunoglobulin, sehingga kemungkinan dapat membedakan kasus RAS major dan minor

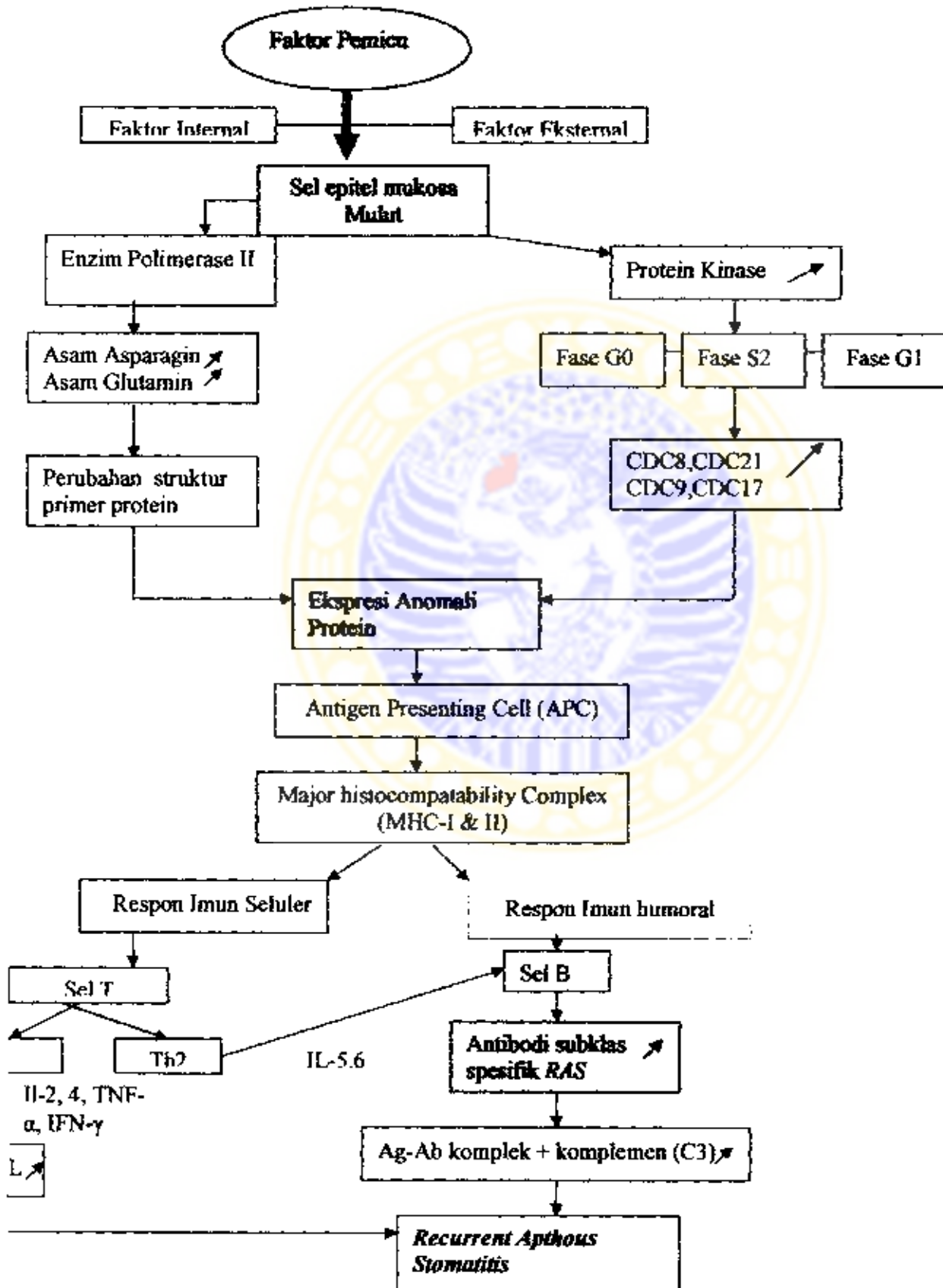
Respon imun lain yang juga berperan adalah respons imun seluler, respons ini akan mengaktifkan sel sitotoksik (CTL) dan sel NK, yang kemungkinan dapat merusak sel dan mencerna sel epitel secara berlebihan sehingga terjadi lisis sel epitel yang akhirnya akan berlanjut menjadi *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*. Jika hal ini berlangsung dalam waktu lama maka akan terjadi peningkatan aktivitas sel Th1 yang akan memicu makrofag, IFN- γ dan TNF- β yang menyebabkan reaksi inflamasi dan kerusakan jaringan (Sun, *et al.*, 1997 & 2000).

Fenomena yang belum terungkap akibat adanya induksi protein antigenik (anomali protein) pada epitel mukosa mulut dan kemungkinan diekspresikan juga beberapa protein spesifik yang berkaitan dengan penyebab RAS fungsinya masih belum diketahui dengan jelas. Selain itu belum terungkapnya jenis dan sifat protein yang memegang peranan dalam proses awal imunopatogenesis

RAS. Oleh karena itu perlu dilakukan analisis anomali protein secara molekuler yang berkaitan dengan gambaran klinis RAS dan profil subklas antibodi. Sehingga kasus RAS dapat dideteksi secara dini, dengan demikian penanganan RAS akan menjadi lebih baik.



Bagan Kerangka Konseptual



BAB 4

MATERI DAN METODE PENELITIAN

4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode observasional eksploratif dan analitik dengan menggunakan rancangan *cross sectional*. Subjek yang diobservasi adalah penderita yang telah dilakukan pemeriksaan dengan diagnosis klinis RAS dan penderita normal yang memenuhi syarat penelitian, kemudian penderita di kelompokkan menjadi dua kelompok yaitu kelompok RAS (*major*, *minor* dan *remisi*) dan kelompok kontrol. Penelitian dapat dibagi menjadi empat tahap. Tahap pertama yaitu : karakterisasi secara klinis penderita RAS, sehingga dapat ditentukan tipe RAS, kemudian dilakukan koleksi sampel. Tahap ke dua adalah mengkarakterisasi protein anomali yang diekspresikan oleh penderita RAS. Tahap ke tiga adalah analisis profil antibodi subklas pada serum penderita RAS. Tahap ke empat adalah analisis spesifisitas dan sensitivitas antibodi monoklonal spesifik RAS.

4.2. Populasi dan Sampel Penelitian

4.2.1. Populasi penelitian

Populasi acuan adalah semua penderita yang datang pada bagian *Oral Medicine* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya dengan diagnosa klinis *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)* .

4.2.2. Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah penderita *RAS* tipe mayor, minor, dan remisi serta penderita *non RAS* sebagai kontrol. Penderita kontrol diambil dari sampel lain yang tidak pernah mengalami *RAS*.

Unit analisis adalah protein mukosa hasil swab pada mukosa mulut yang telah dilakukan purifikasi dengan shepadex G 125 kromatografi serta serum

4.2.3. Tehnik Pengambilan Sampel :

Pengambilan sampel secara total populasi yang dilakukan selama empat bulan mulai bulan Juli 2003 sampai Oktober 2003 serta harus memenuhi kriteria inklusi maupun eksklusi

Kriteria Inklusi

1. a). Penderita kasus *RAS* dengan kesehatan umum baik (tidak menderita Diabetes mellitus dan penyakit sistemik lain). b). Pernah mengalami ulserasi minimal tiga kali atau lebih per tahunnya secara periodik. c) Mukosa mulut tanpa kelainan lain atau peradangan kecuali lesi *RAS*. d) Diameter ulser antara 3-10 mm.
2. a). Penderita *non RAS* dengan kesehatan umum baik (tidak menderita penyakit sistemik). b). Mukosa mulut sehat, tanpa adanya radang atau lesi lain .

3. Penderita telah bersedia ikut dalam penelitian setelah mendapat penjelasan mengenai maksud, tujuan dan prosedur penelitian selengkapnya dengan menandatangani surat persetujuan. (*informed consent*)

Kriteria eksklusi

Penderita yang mempunyai ulser didalam rongga mulut yang disebabkan oleh karena adanya manifestasi dari kelainan sistemik .

4.3. Definisi Operasional Penelitian

1. Protein mukosa mulut adalah protein mukosa secara fisiologis di dalam rongga mulut tidak menyebabkan reaksi imunopatologik
2. Anomali protein adalah protein yang diekspresikan oleh sel epitel mukosa mulut yang mengalami perubahan struktur primer.
3. *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)* adalah suatu kelainan berupa ulser yang sifatnya kambuhan secara periodik di mukosa mulut tanpa disertai tanda- tanda penyakit lain.
4. Stimulasi faktor eksternal adalah stimulasi yang ditimbulkan dari luar tubuh. Stimulasi internal adalah stimulasi yang ditimbulkan dari dalam tubuh.

5. Profil subklas antibodi adalah nilai *optical density* subklas antibodi/immunoglobulin yang diekspresikan pada serum penderita dan pada sel hibrid
6. *RAS* tipe minor adalah tipe *RAS* yang secara klinis mempunyai diameter berkisar antara 0-5 mm. Lesi ini sembuh dalam waktu 10-14 hari tanpa meninggalkan jaringan parut.
7. *RAS* tipe mayor adalah *RAS* yang secara klinis mirip *RAS* minor hanya diameternya lebih besar dari 5 mm sampai 1 cm atau lebih, dan bila sembuh akan meninggalkan jaringan parut. Lesi ini bisa menetap dalam beberapa minggu sampai beberapa bulan. Lesi ini sering terjadi pada bibir, lidah dan palatum lunak.
8. *RAS* remisi adalah salah satu fase *RAS* yang secara simptomatis tidak menimbulkan rasa sakit, secara klinis ada perubahan ke arah penyembuhan yang ditandai adanya perubahan lesi mejadi lesi primer (makula) dan bila dibandingkan dengan jaringan sekitar secara klinis tanda radang sudah berkurang.
9. Protein spesifik predominan adalah protein yang dapat bereaksi dengan antibodi anomali protein

4.4. Bahan Penelitian

4.4.1. Bahan penelitian adalah protein mukosa mulut dan serum yang dikumpulkan dari pasien *RAS* dan non *RAS* di bagian *Oral Medicine* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga..

4.4.2. Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Tris-HCL*, *Glycin*, *Sodium dodecyl sulphat*, *acrylamid*, *bisacrylamid*, *ammonium persulphat*, TEMED, H₂O, methanol, glutaraldehyde, alkohol, gliserin, PBS, E-buffer, perak nitrat (AgNO₃), *Fast Red*, Konjugat IgG anti *rabbit*, Konjugat anti *human*. *Membran Nitrosellulose*, H₂O₂, OPD, *Acetic Acide*, NaOH, Formaldehyde, Butanol, *Zitroen znure*, Selofan, Mikroplate tipe 200 μ l, 1000 μ l, *mouse MonoAB-ID Kit (HRP)*.

4.4.3. Instrumen Penelitian

Peralatan yang dipakai dalam penelitian ini adalah *fræzer*, *waterbath*, *Refrigerated Centrifuge*, seperangkat elektroforesis (vertikal), *centrifuge*, *Elisa reader*, *washer machine*, petridis, spektrofotometer, pH meter, *gel dryer*, *laminar flow*, *shaker*, *incubator*, *transilluminator*, *Polaroid camera*.

4.5. Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian dilakukan di bagian *Oral Medicine* Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, *Tropical Disease Centre (TDC)* Universitas Airlangga dan Fakultas Farmasi Universitas Widya Mandala Surabaya. Waktu penelitian mulai bulan Juli 2003 sampai bulan Juli 2004.

4.6. Prosedur Penelitian

4.6.1. Tahap Persiapan

Menentukan Karakteristik Klinis sampel RAS.

Penderita RAS yang datang ke bagian *Oral Medicine* FKG UNAIR dilakukan pemeriksaan klinis dan selanjutnya dicatat berdasarkan riwayat penyakitnya, fase lesi, diameter lesi, jumlah lesi, jenis kelamin, frekuensi kekambuhan, serta faktor pemicu. Penderita yang sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi diminta untuk menandatangani lembar persetujuan (*informed consent*). Lembar persetujuan ini dibuat khusus untuk penelitian pada keluarga atau penderita yang bersangkutan, setelah itu diberikan penjelasan tentang hal-hal yang berkaitan dengan kegiatan penelitian (lihat pada lampiran 24)

Pengumpulan Sampel Protein Mukosa Mulut

Sampel diperoleh dari penderita RAS yang sesuai dengan kriteria sampel. Sampel diambil dengan cara melakukan kerokan (*swab*) pada mukosa mulut. Hasil *swab* dimasukkan ke dalam tabung eppendorf 400 μ l yang sudah berisi medium MEM tanpa serum, kemudian disimpan pada freezer -20 °C. Setelah sampel terkumpul selanjutnya dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 40.000 rpm selama 5 jam dengan temperatur 10 °C. Setelah itu supernatan dibuang dan peletnya disuspensikan dengan PBS, selanjutnya dilakukan dialisis agar didapatkan protein yang murni. Dialisis protein atau sampel dilakukan dengan cara memasukkan sampel ke dalam selofan kemudian dimasukkan ke dalam PBS dengan pH 8,2 dan diputar dengan *shaker* yang didalamnya terdapat

magnetic bar, kemudian diputar pelan-pelan selama 24 jam dan ditempatkan pada temperatur 4°C. Setelah itu sampel dipindahkan ke dalam tabung eppendorf dan disimpan pada -80°C sampai digunakan selanjutnya atau langsung dilakukan karakterisasi dengan menggunakan SDS-PAGE. Sampel protein selain dari protein mukosa mulut juga melalui koleksi protein serum dari penderita. Proses pemisahan serum dilakukan dengan cara membiarkan darah yang diambil sebanyak 4 ml di atas meja laboratorium pada temperatur ruangan (37°C) sampel membeku. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi 1600 rpm selama 10 menit dengan temperatur 4°C. Akhirnya setiap sampel dipisahkan dan dimasukkan dalam eppendorf steril dan selanjutnya disimpan pada -70°C sampai dilakukan penelitian atau langsung digunakan untuk penelitian.

Pemurnian sampel protein dari kontaminan dengan Kromatografi Sephadex G 125

Model pemurnian protein mukosa mulut dengan menggunakan pipet volum sebagai kolomnya. Cara : *glass wool* dimasukkan ke dalam kapiler yang berdiameter 1 cm kemudian dituangkan suspensi sephadex G 125, kemudian dibiarkan di temperatur ruangan sampai menjendal. Selanjutnya sampel berupa suspensi protein dituangkan diatas sephadex sebanyak 1 ml dan selanjutnya di tambahkan fosfat buffer diatas sampel. Agar di dapatkan protein murni selanjutnya sampel dialirkan melalui pori-pori sephadex tersebut dengan cara membuka katub bawah dengan perlahan-lahan dan sampel ditampung pada tabung *eppendorf* . Akhirnya suspensi protein dapat dianalisis dengan SDS-PAGE (Rantam,2003 ; Ernawati,2003)

Produksi Antibodi Poliklonal

Percobaan dilakukan dengan menyuntikkan protein RAS yang telah dicampur dengan *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) dan *Incomplete Freund's Adjuvant* (IFA), masing-masing untuk imunisasi primer dan sekunder dilakukan secara *intra muscular* pada kelinci ras New Zealand. Antibodi poliklonal anti RAS yang diproduksi akan dipergunakan untuk mengkarakterisasi protein mukosa mulut.

Metode Pembuatan Antibodi Poliklonal :

Whole protein yang dikumpulkan dari pasien RAS kemudian dilakukan pencucian dengan *medium eagle* tanpa FCS serum, kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit selanjutnya supernatan dibuang dan peletnya di resuspensikan dengan PBS 0,5 ml dengan konsentrasi protein 500 µg/ml. Setelah itu dicampur dengan *adjuvan complet* sama banyak dan selanjutnya diimunisasikan 1 ml secara *intra muscular* pada kelinci yang berumur 2,5 bulan. Setelah 14 hari dilakukan *booster* kembali dengan protein yang sama menggunakan *adjuvan incomplet*. Akhirnya 14 hari setelah *booster* darah diambil melalui vena telinga sebanyak 5 ml kemudian dipisahkan serumnya untuk dipergunakan pada tahap selanjutnya. Antibodi poliklonal anti RAS yang diproduksi akan dipergunakan untuk karakterisasi protein dengan analisis *Western blot* dalam penentuan protein spesifik RAS

4.6.2. Tahap Penelitian

Tahap 1 : Karakterisasi protein spesifik *RAS*

Karakterisasi dilakukan untuk mengetahui sifat protein mukosa dengan cara mengukur berat molekulnya masing-masing protein yang terdapat dalam mukosa mulut dengan cara analisis SDS-PAGE 12% dan selanjutnya dilakukan imunoblotting dengan metode *Westernblot*, sehingga dapat diketahui atau diidentifikasi protein spesifik yang berkaitan dengan terjadinya *RAS*. Kandungan protein spesifik *RAS* dilakukan dengan spektrofotometri sedangkan densitas protein spesifik dilakukan dengan menggunakan scan densitometer.

SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulphat-Polyacrylamide Gel Eletrophoresis)

Protein hasil dialisis sebelum dianalisis dengan SDS-PAGE dilakukan lisatisasi dengan cara menambahkan NP40 agar terjadi pemecahan protein secara homogen. Sampel protein di masukkan ke dalam tabung disposable 15 ml kemudian ditambahkan NP40 yang telah disuspensikan sebanyak 10 % kemudian ditambahkan ke dalam sampel dengan perbandingan 1:1. Setelah itu diinkubasikan di dalam refrigrator dengan temperatur 4°C selama 1 jam. Setelah diinkubasikan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 15 menit pada temperatur 10°C. Akhimya supernatan dipisahkan dan ditempatkan pada tabung eppendorf yang steril. Sampel setelah dipreparasi dengan lisat, selanjutnya digunakan untuk analisis protein *RAS*. Analisis protein *RAS* dilakukan dengan cara suspensi sampel dari lisat, kemudian ditambahkan

laemmli buffer dengan perbandingan 1:3. Selanjutnya diinkubasikan pada *waterbath* dengan temperatur 100°C selama 5 menit. Sebelum sampel di elektroforesis, disiapkan terlebih dahulu *separating gel* dengan konsentrasi 12 % kemudian di masukkan ke dalam *glass plate* dan ditunggu sampai menjadi gel. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* di atasnya. Kemudian di masukkan *comb* sebagai cetakan tempat sampel di masukkan ke dalam gel dan ditunggu selama 45 menit. Setelah gel terbentuk *comb* diambil dan dicuci dengan *E-buffer* dan akhirnya sampel sebanyak 15 µl di masukkan ke dalam lubang cetakan dengan tip 200 µl. Setelah itu *power supply* distarter dengan kekuatan 30 mA selama 5 jam. Jika reaksi gel sudah sampai bawah kemudian dimatikan dan plate dibuka dan dipisahkan selanjutnya dicuci dengan buffer. Akhirnya analisis protein RAS di visualisasikan dengan pengecatan *silver nitrat* (AgNO_3).

Penentuan spesifisitas protein dengan cara *straffing westernblot*

Protein spesifik RAS dengan analisis SDS-PAGE 12 % masih belum teridentifikasi dengan spesifik. Oleh karena itu perlu dilakukan uji spesifisitas dengan cara *Westernblot*. Sampel yang sudah *dirunning* dengan elektroforesis tanpa dilakukan pewamaan, kemudian di transfer ke membran nitroselulose menggunakan 4 mA dan volt 150. Proses ini berlangsung 1,5 jam. Setelah ditransfer ke membran nitroselulose, di potong sebesar 3 mm, kemudian memasukkan potongan-potongan tersebut ke dalam parit (*slot*) dan di *blocking* dengan BSA 1% selama 1 jam. Dicuci dengan PBS Tween 0,05 %. Kemudian direaksikan dengan serum penderita RAS selama 18 jam. Dicuci kembali dan

direaksikan dengan konjugat fragmen imunoglobulin G anti human. Akhirnya penentuan spesifisitas protein divisualisasi dengan pewarnaan *fast-red*, dengan demikian akan didapatkan protein spesifik RAS dengan berat molekul tertentu. Selanjutnya dilakukan purifikasi protein spesifik.

Tahap 2. Purifikasi Protein Predominan dengan cara Elusi

Protein spesifik yang telah didapatkan dengan berat molekul tertentu tadi di analisis kembali dengan cara SDS-PAGE 12 % sama dengan cara yang dilakukan pada penentuan berat molekul protein hanya sampai *running*. Kemudian gel dipotong sesuai dengan berat molekul yang dimaksud ke dalam selofan yang panjangnya kira-kira 10 cm. Bagian ujung bawah selofan diikat dengan benang dan potongan gel tadi dimasukkan dengan posisi lurus dan tidak boleh melengkung. Ujung atas diikat dengan benang. Kemudian dimasukkan ke dalam apparatus Elusi (Biorad) yang telah di isi *E-buffer* sebanyak 500 ml atau melebihi kawat. Diletakkan secara melintang dari katode katode. Biorad dinyalakan 150 v dan 40 mA kurang lebih 1,5-2 jam. Cairan yang ada dalam selofan tadi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf. Kemudian dilakukan analisis elektroforesis dan blotting kembali. Setelah dilakukan pengecatan akan tampak satu macam protein dengan berat molekul sama yang merupakan protein spesifik RAS.

Metode Densitometri

Rasio antara molekul protein *RAS* yang muncul ditentukan melalui densitogram menggunakan densitometer terhadap hasil running SDS-PAGE 12 %. Analisis densitometri terhadap gel hasil elektroforesis dengan cara yaitu gel hasil elektroforesis diletakkan pada sebuah lempeng aluminium yang telah dibasahi dengan akuades, untuk menghindari agar gel tidak mengering. Gel dimasukkan ke dalam *Scanning chamber*, lampu iluminasi dinyalakan dan diarahkan pada pita-pita pada gel yang akan di *scan*. Satu sumuran (*well*) tersebut diarahkan agar dilewati oleh cahaya iluminasi yang merupakan seberkas cahaya hijau yang berupa garis tipis. Pada proses ini teridentifikasi lebar dan panjang sumuran yang akan di *scan*. Langkah selanjutnya adalah mengisikan parameter yang perlu diukur (lebar pita, panjang sumuran dan panjang gelombang) pada perangkat lunak yang membaca dan mengolah hasil *scanning*. Selanjutnya *scanning chamber* ditutup dan proses *scanning* dilangsungkan.

Tahap 3. Produksi Antibodi Monoklonal

3.1. Tahapan Produksi Antibodi Monoklonal

1. Kultur Sel

Persyaratan kultur sel yang perlu diperhatikan antara lain adalah desinfektan untuk alat, lantai, gas dalam inkubator, antibiotik, dan bahan-bahan pelarut lainnya karena toksik terhadap sel terutama akan merusak metabolisme

sel dan sitogenitas sel. Oleh karena itu harus ada aturan standar tersendiri terhadap teknisi dan kelompok kerja di laboratorium. Selain itu juga harus dihindari adanya gas di dalam laboratorium (Shiraishi and Bandaw, 1985). Bahan-bahan untuk pencuci gelas dan alat yang sudah teruji antara lain 7x and 7x-o-matic, RBS-vitro, Deconex 20 NS, Decon 90. Hal lain yang perlu diperhatikan adalah tube untuk membekukan sel boleh digunakan hanya satu kali, disamping itu juga material dan alat-alat harus diberi tanda khusus untuk kultur sel dan tidak diperbolehkan digunakan yang lainnya.

Penyimpanan bahan-bahan plastik harus diberi sirkulasi udara yang baik sehingga tidak terjadi kerusakan bahan tersebut, karena banyak mengandung formaldehyde yang sangat toksik terhadap sel. Oleh karena itu plastik yang lama tidak dapat dipergunakan lagi. Kualitas air pada laboratorium *Tissue Culture* harus disediakan beberapa tingkatan kualitas air terutama untuk fusi sel seperti proses pertukaran ion sangat penting misalnya osmosis diperlukan kualitas air tingkat II atau aqua bidest. Selain itu juga diperlukan dimineralisasi dengan cara pertukaran ion yaitu kation dan anion yang nantinya digunakan selain untuk pengenceran atau membuat larutan juga untuk pencucian alat. Aquadestillata yang diproses dengan menggunakan spiral pemanas dari besi atau metal tidak bisa digunakan, sebaiknya dari glaskuarsa karena tidak merusak proses ionisasi. Oleh karena itu kualitas air merupakan syarat utama dalam mengerjakan kultur sel.

a) Preparasi Sel Mieloma. Sel tumor yang akan digunakan untuk hibridisasi adalah jenis sel mieloma. Sel sudah tersedia di Laboratorium *Tropical Disease Centre (TDC)* Universitas Airlangga, dilakukan *thawing* kemudian di kultur dengan menggunakan *roux* 15 ml dengan medium RPMI, FCS 10 %, penstrep 1i.u dan fungizon. Setelah itu diinkubasikan pada inkubator CO₂ 37°C, selama 2 hari sel dilakukan pasase dan langkah dilanjutkan sampai mendapat kan sel yang homogen dengan jumlah lebih kurang 10⁸ /ml

b) Preparasi sel Limfosit mencit yang sudah diimunisasi dengan protein 65 kDa spesifik *RAS*. Caranya : Limpa disayat-sayat kemudian ditekan agar didapatkan sel limfosit yang cukup banyak. Setelah itu sel limfosit ditampung dalam tabung sentrifuse 15 ml kemudian dilakukan sntrifugasi dngan kecepatan 1500 rpm 10°C dan akhitnya pellet dipisahkan dari supernatan, sel diresuspensikan dengan medium penumbuh selanjutnya siap untuk difusikan dengan sel mieloma dengan perbandingan 1:3. Selain antibodi monoklonal yang dideteksi juga dilakukan pengamatan respons antibodi seluler dengan cara melihat aktifitas sel T dalam darah perifer(*PBMCs*), selanjutnya dilakukan analisis dengan imunofluoresen yang dilabel *FITC (Fluoresence Isothiocyanat)*.

2. Imunisasi

Imunsasi dilakukan untuk menentukan imunogenitas protein 65 kDa spesifik *RAS*, profile antibodi dan produksi antibodi monoklonal. Caranya :

Antigen berupa protein 65 kDa spesifik *RAS* sebanyak 100 µg di suspensi dengan PBS 100 µl, ditambah dengan ajuvan Freund komplit volume sama banyak, dicampur sampai homogen kemudian disuntikkan kepada 10 ekor hewan coba mencit strain *balb/C* yang berumur 1,5 bulan secara *intra peritoneal*. Selanjutnya 1 minggu kemudian dilakukan penyuntikan antigen ulangan (dicampur dengan ajuvan Freund tidak komplit) tiga kali selang 1 minggu. 1 hari sebelum fusi dilakukan *booster* kembali. Akhir minggu ke 5 mencit dimatikan. Pada mencit yang telah diimunisasi dilakukan pengambilan serum yaitu darah yang diambil melalui vena lateralis ekor, ditampung dalam tabung eppendorf, didiamkan sekitar 10 menit dalam suhu kamar, kemudian disentrifus dengan kecepatan selama 15 menit sehingga terbentuk dua lapisan. Supernatannya merupakan serum dan kemudian dimasukkan pada *cryotube* untuk selanjutnya disimpan dalam freezer dengan suhu -70°C atau digunakan untuk pengukuran titer antibodi anti *RAS* dengan metode *indirect-ELISA*. Pada mencit yang telah diimunisasi selain dilakukan pengambilan serum juga dilakukan pemanenan sel limpa dalam keadaan steril.

3. Fusi

Pelaksanaan: Empat minggu sebelum fusi, pasase -3 sel mieloma di kultur, kemudian diseleksi dengan antidote *HGPRT*- defisiensi (dalam 6-*thioguanin* atau 8 *Azaguanin* (mg/ml) 1:100 selama 1-2 minggu. Sepuluh hari sebelum difusikan sel dicari eksponensial pertumbuhan sel (yang bagus

viabilitasnya harus 90%). Saat fusi sel dihitung dan diperlukan 10. Mencit yang telah diimunisasi dilakukan *booster* sehari sebelum fusi, sel peritoneal 5×10^6 /ml dilapiskan pada well 96 sebanyak 50 ul/well (sel peritoneal dipanen sebanyak 3 ml). Pada saat fusi, mencit dibunuh dan limfa diambil secara aseptis. Limfa dimasukkan ke dalam medium yang bebas serum sebanyak 10 ml yang telah dipanaskan 37°C dan kemudian dengan glass objek disayat-sayat kemudian ditekan dengan pinset. Sisa jaringan kemudian dimasukan pada tabung 50 ml dan letakan pada inkubator selama 5 menit. Supernatan diambil dan kemudian disentrifugasi selama 5 menit pada level 3-4 dengan kecepatan 600 g atau 2000 rpm. Pelet kemudian diresuspensikan dengan 0,83% NH_4Cl dan eritrosit dilisiskan pada temperatur ruangan selama 2 menit. Suspensi 9 ml medium dengan FCS dihangatkan dalam 12 ml dan sel mieloma pindahkan ke tabung 50 ml. Kedua sel disentrifugasi dengan kecepatan 450 g atau 1750 rpm stufe 3 sampai 8 menit. Kedua sel dipisahkan dengan cara mencuci menggunakan medium tanpa serum. Mieloma mengumpul kemudian dipindah sebanyak 12 ml ke dalam tabung dan sentrifugasi pada stufe 3 selama 5 menit. Sel dihitung dan kemudian dihitung bersama dengan perbandingan 3:1, sel limfa: mieloma kemudian disentrifuse 5 menit pada stufe 3. Supernatan dipisahkan dengan sisa organ sedimen harus lembab, kemudian diresuspensikan tanpa ada gumpalan. Pada saat fusi semua medium di hangatkan 44,4% 1 ml PEG dipanaskan selama 1 menit setelah autoklave dan sebelum ditambah medium tanpa serum 1,5 ml selama 1 menit, 3 ml medium tanpa serum selama 2 menit dan sekali dicampur, 6 ml MPM selama 2 menit dengan sekali dicampur. Sel disentrifus

dengan kecepatan 150 g atau 1000 rpm selama 1-2 menit¹³. Pelet diberi HAT dan diinkubasikan pada inkubator selama 30 menit, lakukan dengan pelan-pelan. Masukkan kedalam *plate* klonisasi 9×10^5 /well sekitar 2 tetes., 6 *plate* 96 well 2×10^5 /well sampai kurang lebih 10 μ l untuk 12 *plate*. Setiap 3-4 hari di makan 3 x HAT dan HT dan setelah itu setiap 10 hari diuji.

Thawing sel

Sel mieloma yang disimpan pada nitrogen cair cepat dicairkan pada *water bath* dengan temperatur 37°C. lakukan dengan cara menuangkan sel 1 ml kedalam tabung yang mengandung 10 ml medium MPM yang telah dipanaskan 37°C. Kemudian disentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 450 g atau 1750 rpm, stufe 3. Selanjutnya supernatan dibuang dan pelet diresuspensikan dalam 7 ml MPM yang dipanaskan 37°C, kemudian dimasukan *flash* dan diinkubasikan selama 6 jam. kemudian dilihat dan bila perlu selnya diencerkan.

Pembekuan sel

Sel yang akan dibekukan sebaiknya sel yang berumur 2-3 hari agar setelah di *thawing* sel yang hidup lebih banyak. Sel yang akan di bekukan pada setiap *tube/cryotube* mengandung sel kurang lebih 2×10^7 . Caranya yaitu sel yang ditanam pada *flash* 45 ml dipanen dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 450 g selama 60 menit. Supernatan yang positif klon MAb disimpan

dan pelet di resuspensikan dengan medium pembeku kemudian didinginkan secara pelan-pelan dengan meletakkan dalam es selama 40 menit. Kemudian tambahkan medium pembeku 1 ml yang telah didinginkan 4°C. Sel diletakkan pada *styrophor* dan disimpan pada *freezer* -70°C selama 3 hari. Akhirnya sel disimpan di nitrogen cair.

4. Kloning

Hasil hitungan sel dari mikroplate atau *flask* (yang kecil) diencerkan 500 sel per ml (4 ml per 96 well). Pada baris B-H diencerkan lagi sampai 7. Pada pengenceran ke 2 tambahkan (2 ml + 2 ml medium). Setiap pengenceran A-H setiap *well* diberi 0,1 ml (0,01, 2 ml). Sehingga setiap baris A 12x50 sel/*well*, untuk baris B 12x25 sel/*well*, dan seterusnya sehingga pada baris H 12x0,35 sel/*well*. Pengenceran dengan medium HT atau MPM/piruvat ditambah makrofag. Setelah 7 hari di uji dengan Elisa. Klon yang positif pada pengenceran yang tertinggi di pilih dan di lanjutkan untuk di kultur.

5. Pemanenan Immunoglobulin hasil Hibridisasi

Setelah sel hibrid hasil fusi dikultur dan dites titer antibodinya dengan cara ELISA, jika titer antibodi yang didapat tinggi maka sebaiknya dilakukan pemanenan dengan cara mengambil cairan supernatan dari biakan sel kemudian dilakukan identifikasi immunoglobulin yang diekspresikan oleh sel hibrid.

Selanjutnya dilakukan purifikasi. Model pemurnian yang paling efektif adalah dengan penambahan ammonium persulfat. Setelah itu hasil purifikasi dimasukkan *cryo tube* untuk disimpan pada 80 °C sampai digunakan atau langsung digunakan untuk penelitian selanjutnya.

6. Seleksi sel hibrid yang menstimulasi Imunoglobulin

Sel hibrid yang sudah di klon dilakukan uji sekresi imunoglobulin dengan menggunakan ELISA. Caranya adalah supernatan dari kultur sel hibrid diambil 100 μ l (sebagai antibodi primer) kemudian direaksikan dengan antigen protein 65 kDa yang dilapiskan (*coating*) pada mikroplate dengan dasar datar selanjutnya direaksikan kembali dengan antibodi sekunder (konjugate) spesifik Ig M, Ig G. yang dilabel dengan alkali fosfatase/ peroxidase dan akhirnya dilakukan pembacaan titer antibodi monoklonal dengan *ELISA Reader* menggunakan panjang gelombang 450 nm. Sel hibrid yang mempunyai titer tinggi dilakukan kultur untuk memproduksi antibod monoklonal spesifik protein 65 kDa.

Hasil kultur sel hibrid yang mempunyai titer tinggi dapat juga dilakukan uji imunologis untuk menentukan respons imun seluler dengan mengisolasi *peripheral blood mononuclea cellsr* (*PBMCs*) dan kemudian dianalisis dengan menggunakan metode *native immuno fluoresens* (*NIF*).

7. Identifikasi Immunoglobulin hasil sekresi sel Hibrid

Untuk mengidentifikasi immunoglobulin hasil sekresi sel hibrid dilakukan *indirect ELISA* dengan menggunakan beberapa macam konjugat antara lain :

IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM, kappa (*light chain*) dan lambda (*heavy chain*), selanjutnya setiap immunoglobulin yang mempunyai titer tinggi dapat digunakan untuk beberapa uji laboratorium.

Penelitian Tahap 4. Uji Sensitivitas dan Spesifisitas

Uji Sensitivitas

Uji sensitivitas terhadap anti bodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA ini bertujuan untuk mengetahui kepekaan antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap antigen anomali protein (protein spesifik *RAS*). Uji sensitivitas dilakukan dengan uji *indirect ELISA*, dimana antigen atau protein spesifik *RAS* (mayor, minor dan remisi) dilapiskan pada mikroplate dan kemudian direaksikan dengan antibodi monoklonal (subklas immunoglobulin IgG2a, IgG3 dan IgA) dan akhirnya direaksikan dengan konjugat spesifik, setelah itu dibaca dengan *ELISA Reader* dengan menggunakan panjang gelombang 405 nm. Apakah protein (*whole protein*) dari penderita *RAS* mayor, minor dan remisi sensitive terhadap antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA begitu juga protein elusi *RAS* mayor, minor dan remisi apakah juga sama sensitive terhadap immunoglobulin subklas IgG2a, IgG3 dan IgA. ?

Uji Spesifisitas

Uji ini digunakan untuk menentukan spesifisitas antibodi monoklonal apakah mempunyai sifat spesifisitas yang tinggi tanpa ada reaksi silang dengan protein lain. Dengan cara, antigen yang digunakan dari isolat protein mukosa mulut penderita RAS mayor, minor dan remisi yang telah dimurnikan, selanjutnya direaksikan dengan antibodi monoklonal kemudian direaksikan dengan konjugat spesifik, apakah antibodi monoklonal spesifik terhadap 65 kDa dan negatif terhadap protein lainnya.

4.7. Analisis Data

4.7.1. Penelitian 1 : Karakterisasi Protein Spesifik RAS

Penelitian ini merupakan penelitian observasional eksploratif, sehingga tidak ada analisis statistik, data disajikan secara deskriptif. Parameter yang diukur pada penelitian ini adalah kandungan protein RAS, berat molekul pita-pita protein RAS serta rasio mol dari pita-pita yang muncul hasil SDS-PAGE.

4.7.2. Penelitian 2 : Purifikasi Protein Predominan spesifik RAS

Penelitian ini merupakan penelitian observasional eksploratif, data yang disajikan secara deskriptif. Parameter yang diukur pada penelitian ini adalah berat molekul protein yang dominan.

4.7.3. Penelitian 3 : Produksi Antibodi Monoklonal

Penelitian ini merupakan penelitian observasional eksploratif dan analitik, data disajikan secara deskriptif. Produksi antibodi monoklonal hasil hibridisasi sel limfosit dan sel mieloma ditunjukkan melalui titer antibodinya, baik itu secara kualitatif (perubahan warna) maupun kuantitas. Untuk menentukan adanya perbedaan profil subklas antibodi pada serum penderita *RAS* tipe mayor, minor dan remisi dapat menggunakan uji homogenitas, analisis ragam (Anova) dan uji LSD.

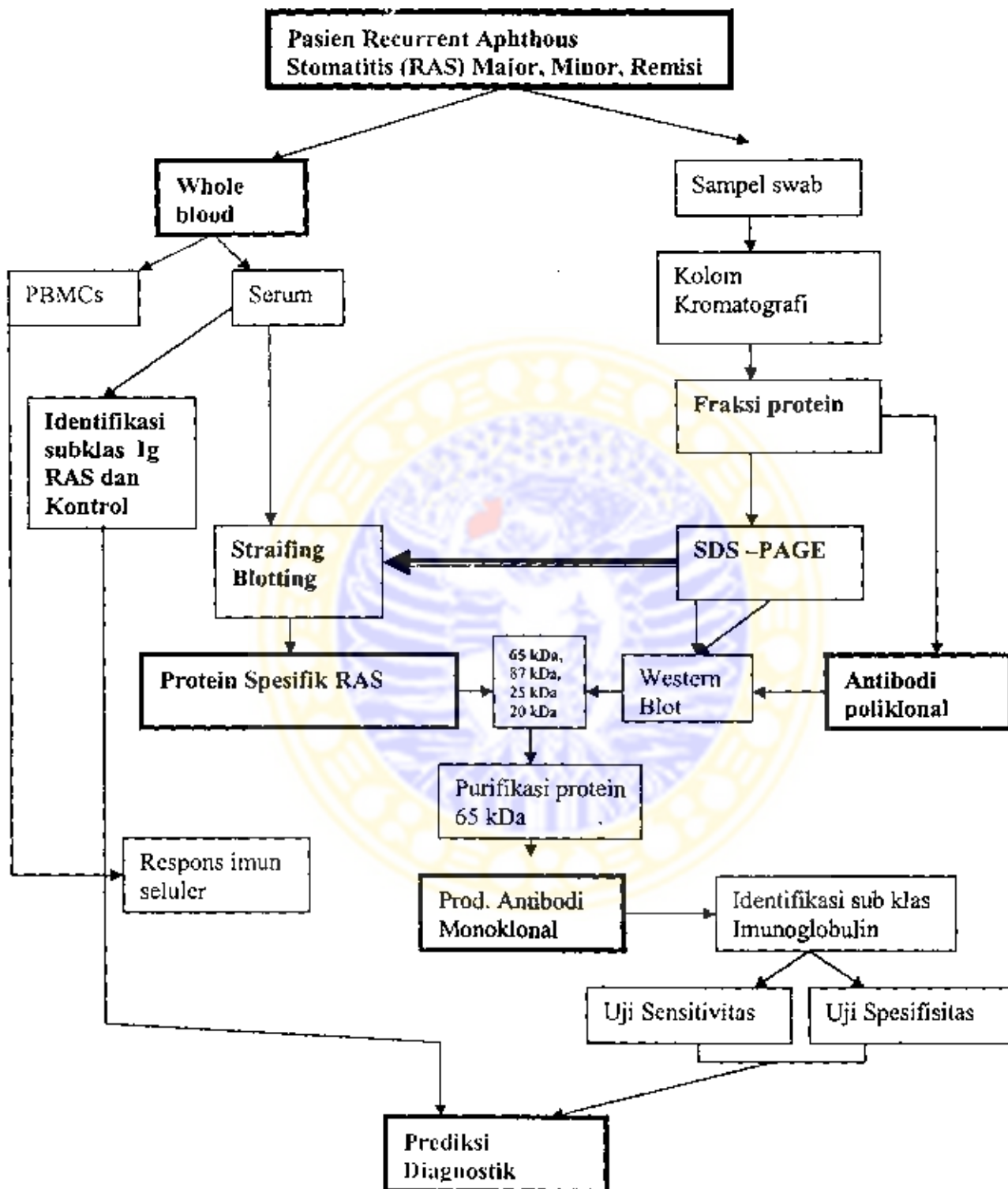
4.7.4. Penelitian 4 : Uji Spesifisitas dan Sensitivitas

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik. Untuk mengetahui sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal dapat dilakukan dengan menggunakan uji *screening* terhadap subklas antibodi monoklonal.

4.7.5. Etik Penelitian

Etik penelitian dilaksanakan sesuai dengan kaidah yang berlaku. *Ethical clearance* dari komisi etik

4.8. KERANGKA OPERASIONAL UMUM



BAB 5

HASIL PENELITIAN

Pada bab ini memuat data penelitian dan analisis hasil penelitian yang relevan dengan tujuan penelitian. Penyajian data hasil penelitian ditampilkan dalam bentuk tabel, grafik, foto atau gambar yang sesuai dengan rancangan pelaksanaan penelitian yang terdiri dari 4 tahap penelitian yaitu: Tahap 1. Karakterisasi protein spesifik RAS. Tahap 2. Purifikasi protein dominan spesifik RAS. Tahap 3. Produksi Antibodi Monoklonal. Tahap 4. Uji spesifisitas dan sensitivitas.

5.1. Karakteristik Klinik *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*

Pada penelitian klinis ini dapat dikumpulkan sebanyak 50 orang kasus RAS dan *Non RAS* dengan hasil pemeriksaan klinis sebanyak 20 orang kasus RAS minor dan 15 kasus RAS mayor serta 15 orang kelompok kontrol (*non RAS*). Hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.1 di bawah ini :

Tabel 5.1. Distribusi umur dan jenis kelamin pada kasus *RAS* dan kontrol

Umur/thn	Kasus <i>RAS</i>						Kontrol		
	Mayor			Minor			P	W	Total
	P	W	T	P	W	T			
10-19	3		3	1	5	6		1	1
20-29		9	9	4	7	11	1	9	10
30-39	3		3		1	1	3	1	4
40-49				1		1			
50-59					1	1			
Total	6	9	15	6	14	20	4	11	15

Keterangan: W : wanita; P : Pria; T : total

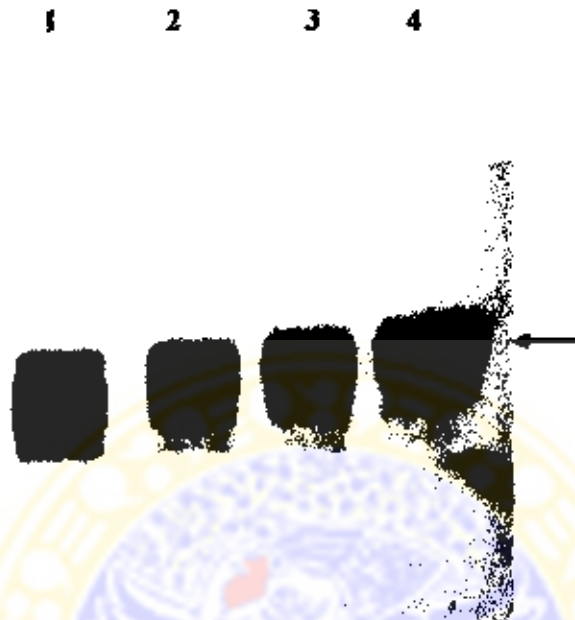
Pada tabel 5.1 tampak bahwa penderita *RAS* berkisar antara umur 10-59 tahun. *RAS* lebih banyak dijumpai pada penderita wanita, 23 atau 65,7% dari kasus *RAS* dibandingkan dengan penderita pria 12 atau 34,2 %. Penderita yang berumur 20-29 thn sebanyak 20 atau 57,1% dari kasus *RAS* merupakan kelompok dengan frekuensi terbanyak baik pada wanita maupun pria. Hasil wawancara sebanyak 27 orang menyatakan *RAS* merupakan masalah bagi mereka, disamping itu penderita sudah cukup lama menderita *RAS* dengan waktu antara 2 tahun – 10 tahun. Frekuensi kekambuhannya dapat terjadi setiap tahun antara 3 kali sampai 12 kali, sehingga beberapa diantaranya dapat dikatakan tidak pernah bebas dari ulser. Sebagai ilustrasi dapat dilihat pada gambar 5.1 dibawah ini.



Gambar 5.1. A. Gambaran klinis pada kasus RAS mayor, B. Gambaran klinis pada kasus RAS remisi, C. Gambaran klinis pada kasus RAS minor.

Pemurnian protein sampel mukosa mulut dari kontaminan

Hasil swab protein mukosa mulut selanjutnya dilakukan purifikasi terhadap kontaminan dengan menggunakan kolom kromatografi sephadex G 125. protein yang berbeda dan menunjukkan kemurnian yang tinggi. Hal ini dapat dilihat pada pita yang muncul setelah dilakukan pewarnaan *Silver Nitrat* (AgNO_3) terlihat hanya satu pita yang muncul pada setiap lajur.



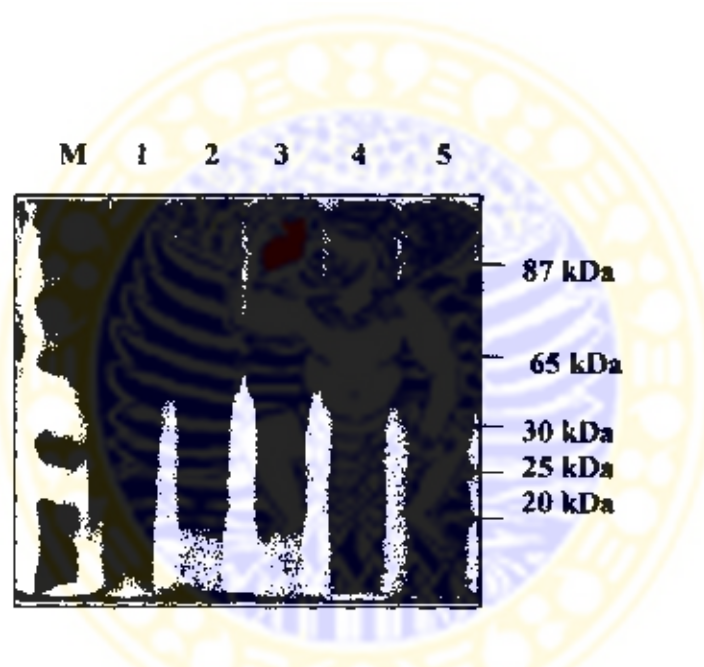
Gambar 5.2. Contoh hasil eliminasi kontaminan bahan-bahan non spesifik dengan kolom kromatografi menggunakan sephadex G 125, dari beberapa fraksi protein sampel RAS mayor yang divisualisasikan dengan pewarnaan *silver nitrat* (AgNO_3). Lajur 1: protein hasil kromatografi dari koleksi sampel keenam, Lajur 2: protein hasil kromatografi dari koleksi sampel ketujuh, lajur 3: protein hasil kromatografi dari koleksi sampel kedelapan, lajur 4: protein hasil kromatografi dari koleksi sampel kesembilan.

Beberapa fraksi protein hasil kromatografi ini selanjutnya dicampur, kemudian dilakukan analisis ulang berat molekul protein dengan SDS-PAGE 12% dan akhirnya karakterisasi protein dilanjutkan dengan imunobloting.

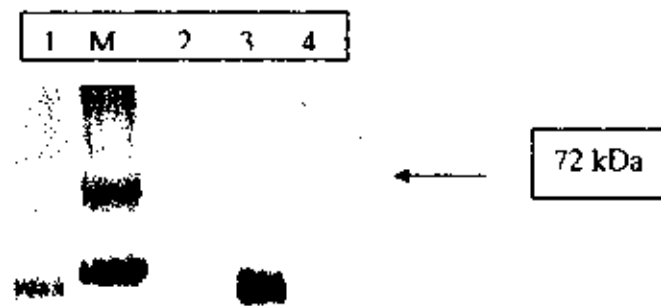
5.2. Karakterisasi Protein

Analisis berat molekul protein

Hasil fraksinasi protein melalui sephadex kromatografi yang telah dikoleksi, selanjutnya semua fraksinasi protein dicampur dan dianalisis berat molekul protein dengan menggunakan SDS-PAGE 12%, setelah dilakukan visualisasi dengan menggunakan AgNO_3 ditemukan beberapa pita protein seperti pada Gambar 5.4. di bawah



Gambar 5.3 Analisis berat molekul protein dengan SDS-PAGE 12% dari protein hasil kromatografi yang dicampur. Lajur M: marker, Lajur 1-2: Campuran fraksi pemurnian protein mayor, lajur 3-4: Campuran fraksi pemurnian protein minor, lajur 5: Campuran fraksi pemurnian protein remisi. Visualisasi protein dilakukan pengecatan dengan *silver nitrat* (AgNO_3).

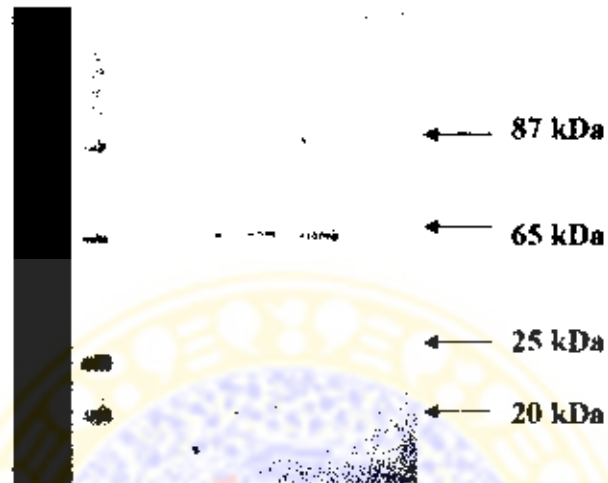


Gambar 5.4. Hasil analisis SDS-PAGE 12 % pada penderita non *RAS* pada lajur no 2 Lajur M : marker. Lajur 1: minor, lajur 3: mayor, lajur 4: remisi

Setelah dilakukan pengecatan dengan *silver nitrat* (AgNO_3) menunjukkan adanya beberapa pita pada semua lajur. Pada lajur 1 dan 2 sampel campuran fraksi protein 87 kDa, 65 kDa, 30 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Begitu juga pada lajur 3 dan 4 yang merupakan fraksi protein dari kasus *RAS* minor ditemukan beberapa macam protein yang mempunyai berat molekul sama dengan kasus *RAS* mayor, hanya protein yang mempunyai berat molekul 30 kDa tidak ditemukan pada kasus *RAS* minor, begitu juga pada kasus *RAS* remisi.

Hasil analisis SDS-PAGE di atas (Gambar 5.3) menunjukkan bahwa anomali protein yang di ekspresikan secara signifikan tidak berbeda di antara kasus *RAS*, walaupun pada kasus mayor ditemukan protein yang diekspresikan secara kualitatif tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Hasil ini

selanjutnya dilanjutkan dengan analisis imunobloting seperti pada **Gambar 5.5** di bawah.



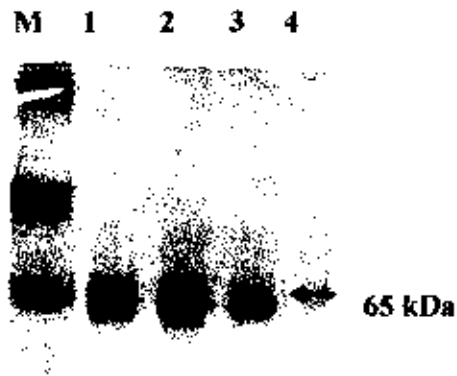
Gambar 5.5 Analisis protein spesifik dengan *Western blot*. Lajur M: marker, Lajur 1: campuran fraksi protein dari RAS mayor yang diekstraksi dengan phenol, lajur 2 : Campuran fraksi pemurnian protein mayor, lajur 3-4: Campuran fraksi pemurnian protein dari RAS minor, lajur 5: Campuran fraksi pemurnian protein remisi, lajur 6: sampel kontrol negatif. Selanjutnya direaksikan dengan serum yang mengandung antibodi anti protein anomali dengan titer 1:10.000 (data lengkap tidak ditampilkan), kemudian direaksikan dengan antibodi kedua (konjugate) alkaline phosphatase, dan akhirnya divisualisasikan dengan pewarnaan Fast-Red.

Protein yang ditransfer ke membran nitroselulose dan kemudian dilakukan analisis protein dengan westernblot menunjukkan, bahwa tidak semua protein dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal anti whole protein dalam serum kelinci. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5.5. pita yang dapat bereaksi dengan antibodi poliklonal adalah fraksi protein yang berasal dari kasus RAS mayor

ditemukan empat macam pita protein dengan berat molekul 20 kDa, 25 kDa, 65 kDa dan 87 kDa, sedang protein yang berasal dari fraksi protein dari kasus *RAS* minor hanya ditemukan dua macam pita protein yaitu protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa walaupun sangat tipis, tetapi fraksi protein yang berasal dari kasus *RAS* remisi ditemukan dua macam protein yang mempunyai berat molekul beda dengan kasus *RAS* minor yaitu ditemukan protein dengan berat molekul 65 kDa dan 87 kDa. Hasil ini menunjukkan jelas bahwa protein yang nampak setelah dilakukan analisis *Westernblot* mempunyai arti penting dalam respons imun. Oleh karena itu selanjutnya dilakukan pemurnian protein yang mempunyai sifat reaktivitas tinggi, karena kemungkinan protein ini yang mampu menginduksi antibodi pertamakali, sehingga dapat digunakan untuk bahan diagnostik pada semua kasus yang muncul.

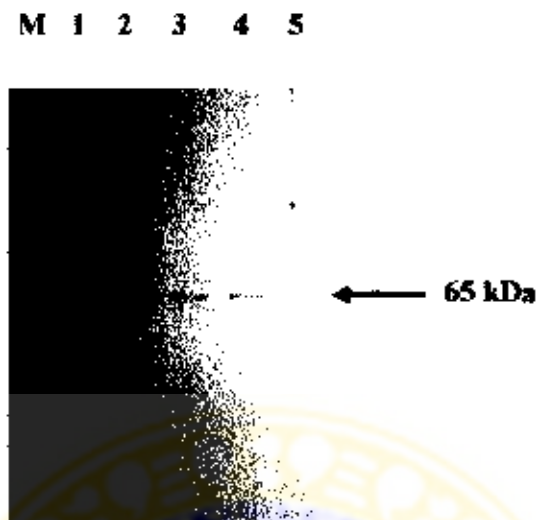
5.3. Pemurnian Protein Predominan

Protein yang mempunyai sifat reaktivitas tinggi dibandingkan dengan protein lainnya dalam hal ini protein yang berat molekul 65 kDa dilakukan purifikasi untuk selanjutnya digunakan sebagai bahan imunogen dalam menyiapkan pembuatan antibodi monoklonal. Hasil purifikasi dengan elusi setelah didialisis selanjutnya dilakukan analisis ulang dengan SDS-PAGE 12% menunjukkan hasil seperti **Gambar 5.6** di bawah ini.



Gambar 5.6 Analisis berat molekul protein dengan menggunakan SDS-PAGE12% dan selanjutnya divisualisasikan dengan pewarnaan silver (AgNO_3) menunjukkan hasil pada lajur 1, 2, dan 3 menunjukkan satu macam pita protein yang mempunyai berat molekul sama.

Hasil SDS-PAGE pada Gambar 5.6. menunjukkan hasil hanya **satu pita**, hal ini menandakan bahwa protein tersebut hanya mengandung **satu macam protein**. Hasil ini menunjukkan tingkat kemurnian yang cukup tinggi. Walaupun demikian untuk membuktikan bahwa protein tersebut murni, dan sesuai dengan protein yang diharapkan, selanjutnya dilakukan analisis protein dengan imunobloting yaitu dengan metode westernblot. Hasil dari analisis Westernblot dapat dilihat pada Gambar 5.7. di bawah.



Gambar 5.7 Analisis protein spesifik dan predominan hasil pemurnian dengan elusi, dan selanjutnya dilakukan *Westemblot* menunjukkan hanya satu pita yang ditemukan setelah direaksikan dengan antibodi anti protein anomali pada serum kelinci dengan titer antibodi 1:10.000. Lajur M: marker, lajur 1 dan 5 adalah kontrol negatif, sedang lajur 2: fraksi protein hasil kromatografi yang dicampur dari kasus RAS mayor, lajur 3 dan 4: protein hasil pemurnian dengan elusi.

Hasil analisis pemurnian protein predominan menunjukkan tingkat kemurnian yang cukup tinggi, seperti terlihat pada Gambar 5.7. ditemukan hanya satu pita protein dengan berat molekul 65 kDa. Protein ini selanjutnya digunakan sebagai bahan imunogen pada pembuatan antibodi monoklonal dengan cara hibridisasi antara sel limfosit dari mencit jenis *BALB/C* yang diimunisasi dengan protein 65 kDa, tetapi sebelum dilakukan imunisasi protein tersebut dilakukan pengujian ulang tentang kemurnian protein setelah dilakukan dialisis.

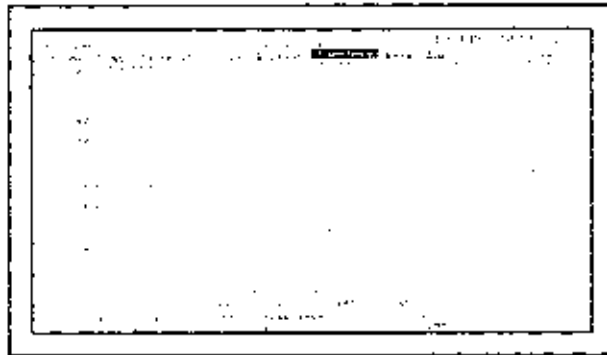
Uji kemurnian protein yang digunakan adalah dengan cara scan densitometri, hal ini dilakukan untuk memastikan apakah protein 65 kDa hasil

elusi tidak terkontaminasi dengan protein lain dan atau mempunyai tingkat homogenisasi yang tinggi, hal ini sangat erat berhubungan dengan sifat antigeniknya, sehingga jika digunakan sebagai bahan imunogen mampu menginduksi antibodi yang stabil dan menghasilkan titer antibodi yang cukup tinggi. Oleh karena itu selain dilakukan uji *scan* densitometri juga dilakukan secara paralel uji respons imun seluler. Hasilnya dapat dilihat pada **Gambar 5.9** dan **Gambar 5.10** di bawah.

Pada **Gambar 5.9** homogenitas protein yang merupakan hasil pemurnian protein menunjukkan, bahwa protein tersebut mempunyai densitas yang tinggi serta homogen. Oleh karena itu model protein ini merupakan protein yang cukup ideal untuk digunakan sebagai **bahan diagnostik/prognostik**, karena dapat menginduksi antibodi yang cukup tinggi dan sifatnya stabil.

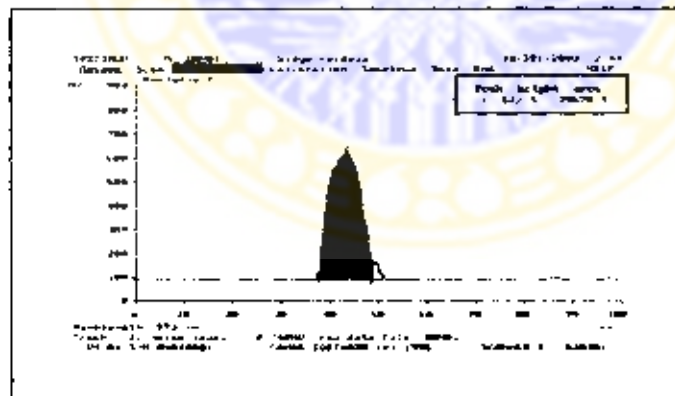
Analisis Densitometri

Untuk mengetahui homogenitas molekul protein yang terkandung dalam protein mukosa mulut *RAS* dilakukan analisis menggunakan gel densitometri, dengan hasil data berupa densitogram yang dibaca menggunakan alat Densitometer. Hasil rasio molekul tampak pada hasil densitogram (**Gbr 5.9**) yang terdiri dari 1 puncak dengan area : 39678.9 mm. Penentuan densitogram ini didahului dengan penentuan pembacaan pita hasil SDS-PAGE dari sampel yang akan dibaca pada panjang gelombang maksimumnya, seperti pada **gambar 5.8**. Hasil pembacaan panjang gelombang maksimum dari gel hasil analisis SDS-PAGE 12% adalah 576 nm.



Gambar 5.8 Densitogram penentuan panjang gelombang maksimum pada pita protein hasil SDS-PAGE 12 %

Hasil analisis protein menggunakan alat Densitometer terhadap molekul protein mukosa mulut penderita RAS dengan satu puncak grafik dengan ketinggian 522.5 mm dan luas area 39678.9 mm, ini merupakan luas area untuk molekul dominan protein spesifik penderita RAS dengan BM 65 kDa. Tampak pada Gambar 5.9 di bawah ini



Gambar 5.9 Analisis kemurnian protein 65 kDa dengan scan densitometri. Hasil scan pita protein dari SDS-PAGE 12% menunjukkan ketinggian 522.5 mm. dengan area 39678.9 mm

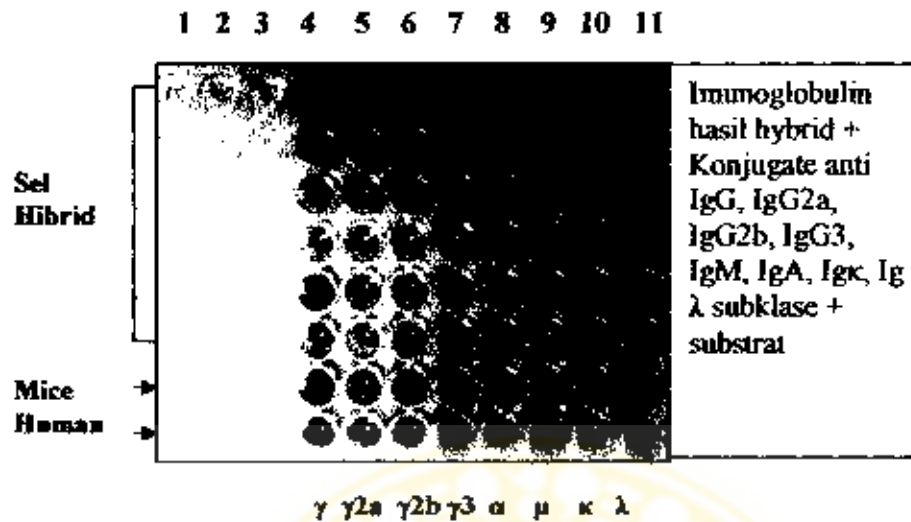
Hasil scan ini tampak bahwa protein ini mempunyai sifat stabil karena tingkat homogenitasnya tinggi, selanjutnya dapat dibuktikan apakah protein tersebut juga menginduksi respons imun seluler, maka dilakukan uji imunofluoresen secara natif, dan hasilnya dapat dilihat pada **Gambar 5.10**. di bawah



Gambar 5.10. Respons imun seluler dengan *native immunofluorescence* dari *PBMCs* kelinci yang telah diimunisasi dengan campuran fraksi protein fraksi protein yang telah dibooster tiga kali. Setelah dilakukan isolasi dengan cara ficol histopaque kemudian sel direaksikan dengan anti IFN-gama dan kemudian direaksikan dengan antibodi kedua (konjugate) yang telah dilabel dengan FITC menunjukkan seperti panah di atas yang menunjukkan sel T aktif .

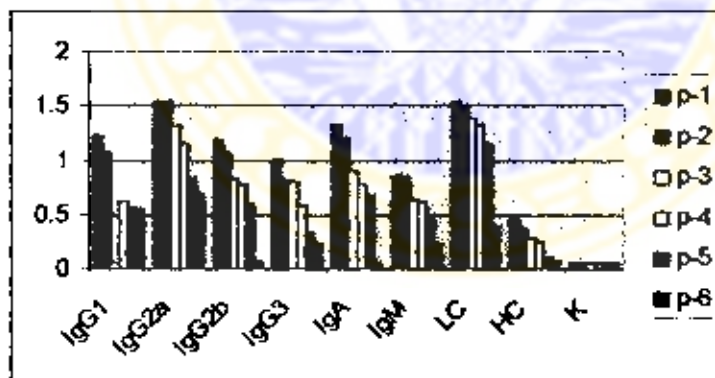
5.4. Pembuatan Antibodi Monoklonal Spesifik Anomali Protein 65 kDa

Antibodi monoklonal anti anomali protein dengan berat molekul 65 kDa dilakukan dengan cara hibridisasi sel limfosit dan sel mieloma, selanjutnya dilakukan kultur setelah melalui seleksi klon sel hibrid. Hasilnya dapat dilihat pada **Gambar 5.11** di bawah ini



Gambar 5.12 Identifikasi imunoglobulin subklas dengan cara ELISA.

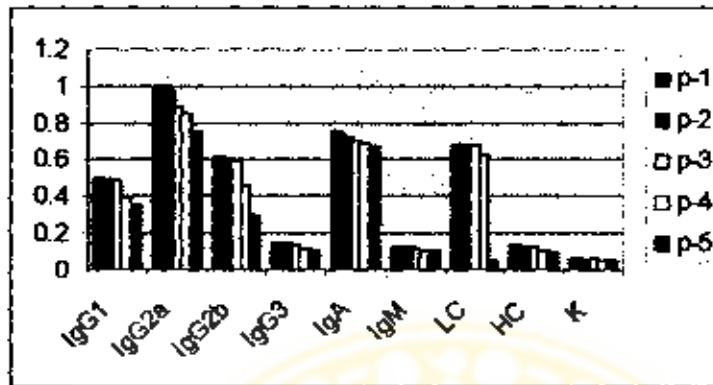
Hasil identifikasi tipe (isotyping) antibodi monoklonal terhadap klon sel hibrid dengan menggunakan uji ELISA ditemukan urutan titer yang tinggi yaitu mulai IgG2a, kappa chain (κ -chain), IgG2b, IgG1, IgG3, IgA, IgM dan lambda chain (λ -chain)



Gambar 5.13 : Grafik titer imunoglobulin dari supernatan produk sel hibrid dengan menggunakan beberapa imunoglobulin spesifik sub tipe.

Keterangan : P-1: pengenceran serum 10^{-1} , P-2: pengenceran serum 10^{-2} , P-3: pengenceran serum 10^{-3} , P-4: pengenceran serum 10^{-4} , P-5:

pengenceran serum 10^{-5} , P-6 : pengenceran serum 10^{-6} dan K : kontrol



Gambar 5.14 : Grafik titer imunoglobulin dari serum pasien RAS dengan menggunakan beberapa imunoglobulin spesifik sub tipe.

Keterangan : P-1: pengenceran serum 10^{-1} , P-2: pengenceran serum 10^{-2} , P-3: pengenceran serum 10^{-3} , P-4: pengenceran serum 10^{-4} dan P-5: pengenceran serum 10^{-5} , dan K : kontrol

Hasil titrasi subklas imunoglobulin dari serum pasien menunjukkan kesamaan dan sangat signifikan dengan imunoglobulin yang disekresikan oleh sel hibrid, jika dibandingkan dengan kontrol. IgG2a mempunyai titer yang paling tinggi dengan pengenceran 10^{-5} . jika dibandingkan imunoglobulin lainnya, begitu juga IgG2b mempunyai titer hampir sama dengan IgG1 selanjutnya diikuti oleh IgA, *kappa chain* (κ -chain), IgM dan lambda chain (λ -chain).

5.4.1. Profil Subklas Antibodi IgG2a, IgG3 dan IgA dengan gambaran klinis *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*

Tabel 5.4.1 Hasil Anova antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan Ig A pada serum penderita RAS berdasarkan nilai *optical density (OD)*

Variabel	Serum	
	F	Sig.
IgG2a	5.121	0.003
IgG3	18.37	0.000
Ig A	2.528	0.006

Hasil analisis varians satu jalur (ANOVA) menunjukkan ada perbedaan yang signifikan nilai *OD* antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA pada serum penderita RAS di banding serum penderita kontrol ($p < 0.05$).

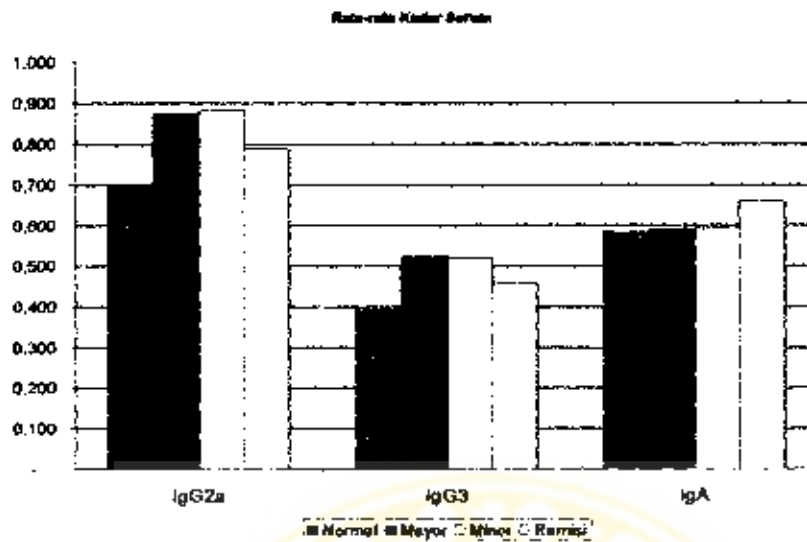
Tabel 5.4.2. Hasil uji LSD antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan Ig A pada serum penderita RAS tipe mayor, minor, remisi dan Kontrol berdasarkan nilai *optical density (OD)*

Variabel	Serum penderita RAS		Sig.
Ig G2a	Normal	Mayor	0.002
		Minor	0.001
Ig G3	Normal	Mayor	0.000
		Minor	0.000
		Remisi	0.003
Ig A	Remisi	Mayor	0.003
		Minor	0.003
		Mayor	0.002
Ig A	Normal	Mayor	0.002
		Minor	0.002
		Remisi	0.021
Ig A	Remisi	Mayor	0.034
		Minor	0.028

Hasil uji LSD IgG2a, pada serum penderita RAS tipe mayor, minor ada perbedaan yang sangat signifikan bila dibanding kontrol ($p < 0,05$). sedang antara serum penderita RAS tipe mayor dan minor tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$). demikian pula nilai *Optical Density* antibodi subklas IgG3 pada serum penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi ada perbedaan yang sangat signifikan bila dibanding kontrol ($p < 0,05$), sedangkan pada serum penderita RAS tipe mayor dan minor tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0,005$).

Hasil uji LSD imunoglobulin A pada serum penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibanding kontrol, tetapi kadar Ig A antara RAS tipe mayor dan RAS tipe minor tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Grafik profil antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA pada serum penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi serta kontrol dapat dilihat pada gambar 5.16 di bawah ini,



Gambar 5.16. Profil subklas IgG2a, IgG3 dan IgA pada serum pasien *RAS* tipe mayor, minor, remisi dan kontrol berdasarkan nilai OD dengan menggunakan uji ELISA dengan panjang gelombang 405 nm

5.4.2. Profil antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap *whole protein* dan protein elusi penderita *RAS* dapat dilihat pada tabel 5.4.3.

Tabel 5.4.3 Hasil Anova antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap *whole protein* dan protein elusi penderita *RAS* berdasar nilai *Optical Density* (OD)

Variabel	<i>Whole Protein</i>		Protein Elusi	
	F	Sig	F	Sig
IgG2a	4.637	0.006	9.114	0.000
IgG3	17.939	0.000	9.043	0.000
Ig A	3.567	0.019	6.973	0.000

Hasil analisis varians satu jalur (ANOVA) menunjukkan ada perbedaan yang signifikan nilai *optical density* (OD) antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap *whole protein* maupun protein elusi penderita RAS di banding kontrol ($p < 0.05$).

Tabel 5.4.4. Hasil uji LSD antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan Ig A terhadap *whole protein* dan protein elusi penderita RAS tipe Mayor, Minor, remisi dan Kontrol berdasar nilai *optical density* (OD)

Variabel	RAS		Significancy	
			<i>Whole Protein</i>	Elusi Protein
Ig G2a	Normal	Mayor	0.001	0.000
		Minor	0.001	0.000
	Mayor	Minor	0.044	0.045
Ig G3	Normal	remisi	0.014	0.001
		Mayor	0.000	0.000
		Minor	0.000	0.000
Ig A	Normal	remisi	0.000	0.002
		Mayor	0.005	0.000
		Minor	0.011	0.001
	Mayor	remisi	*	0.007
	Minor	remisi	*	0.042

* Tidak signifikan

Hasil uji LSD antibodi subklas IgG2a terhadap *whole protein* penderita RAS tipe mayor dan minor ada perbedaan yang sangat signifikan bila dibanding kontrol ($p < 0,05$), demikian pula halnya kadar antibodi subklas IgG2a terhadap *whole protein* penderita RAS antara tipe mayor dengan RAS tipe minor dan remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,005$).

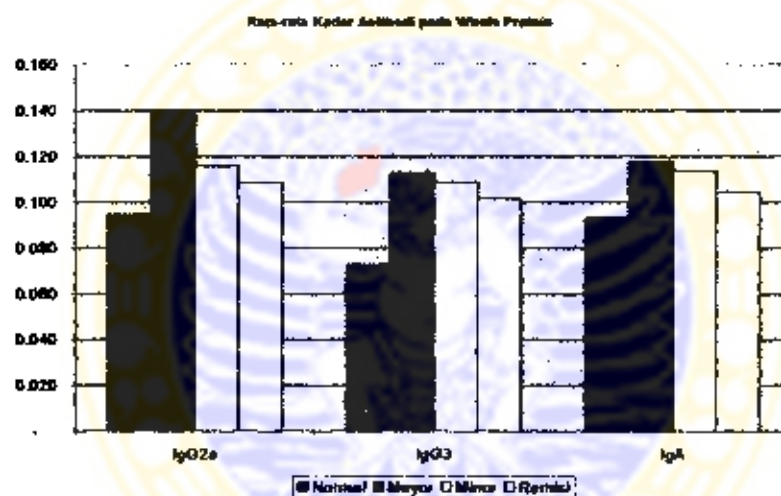
Antibodi subklas IgG2a terhadap protein elusi penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan dibanding protein elusi penderita kontrol ($P < 0.05$), demikian pula kadar IgG2a terhadap protein elusi antara RAS tipe mayor dengan RAS tipe minor serta remisi ada perbedaan yang signifikan ($P < 0.05$).

Hasil uji LSD menunjukkan antibodi subklas IgG3 terhadap *whole protein* penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi ada perbedaan yang sangat signifikan bila dibanding kontrol ($p < 0,05$), sedangkan antibodi subklas IgG3 antara RAS tipe mayor, minor dan remisi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($P > 0.05$). Demikian juga IgG3 terhadap protein elusi penderita RAS tipe mayor dan minor serta remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibanding kontrol ($P < 0.05$), sedangkan IgG3 pada setiap tipe RAS tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Hasil uji LSD menunjukkan bahwa antibodi IgA terhadap *whole protein* penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibanding kontrol, sedangkan antibodi subkla IgA antara RAS tipe mayor dan minor dengan RAS fase remisi tidak menunjukkan perbedaan yang

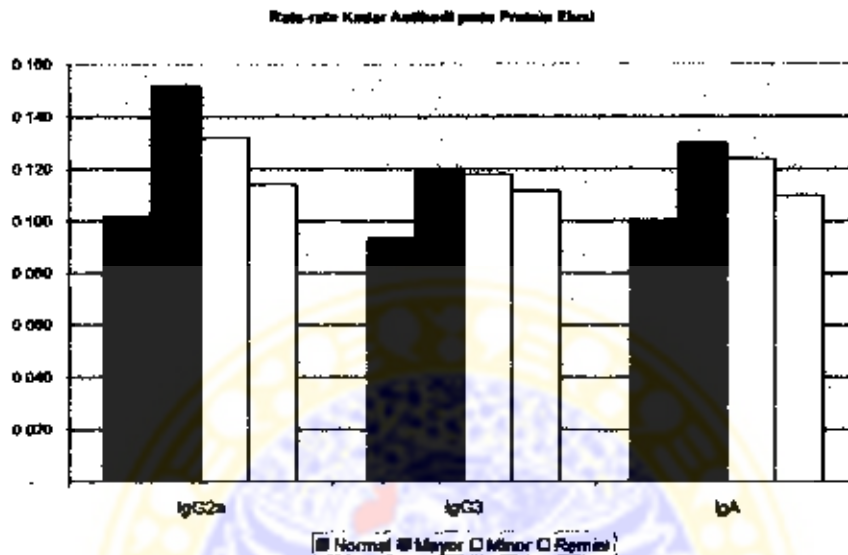
Antibodi subklas IgA terhadap protein elusi penderita RAS tipe mayor, minor dibanding normal menunjukkan perbedaan yang signifikan, demikian juga antibodi subklas IgA antara RAS tipe mayor, tipe minor dibanding RAS fase remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0.05$)

Grafik profil antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap *whole protein* penderita RAS tipe mayor, minor dan remisi serta kontrol dapat dilihat pada grafik 5.17 di bawah ini,



Gambar 5.17. Profil antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap *whole protein* penderita RAS mayor, minor, remisi dan kontrol. Menggunakan uji-ELISA dengan panjang gelombang 405 nm

Grafik profil antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap protein elusi pasien *RAS* dan *non RAS*



Gambar 5.18. Profil antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan Ig A terhadap protein elusi penderita *RAS* mayor, *RAS* minor, remisi dan kontrol berdasar nilai OD. Menggunakan Uji ELISA dengan panjang gelombang 405 nm

5.4.2. Uji Sensitivitas dan Spesifisitas Antibodi Monoklonal

Uji sensitivitas terhadap antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA ini bertujuan untuk mengetahui kepekaan antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap antigen anomali protein (protein spesifik *RAS*). Uji spesifitas digunakan untuk menentukan spesifisitas antibodi monoklonal apakah mempunyai sifat spesifisitas yang tinggi tanpa ada reaksi silang dengan protein lain.

Sensitivitas subklas IgG2a terhadap protein elusi dibandingkan dengan *whole protein* mempunyai perbedaan sebesar 20 % untuk sensitivitas protein elusi. Sedang tingkat spesifisitas antibodi monoklonal IgG2a terhadap protein elusi dibandingkan *whole protein* mempunyai perbedaan spesifisitas 6,7% untuk *whole protein*.

Hasil hibridisasi spesifik antibodi monoklonal IgG3 terhadap *whole protein* tingkat sensitivitasnya lebih rendah dibanding protein Elusi sebesar 11,4 %, sedang tingkat spesifisitasnya mempunyai perbedaan sebesar 6,7%.

Antibodi monoklonal IgA mempunyai tingkat sensitivitas terhadap *whole protein* lebih rendah 11,5% dibanding protein Elusi, sedang spesifisitasnya lebih tinggi sebesar 13,3% dibanding protein elusi, hasil uji sensitivitas dan spesifisitas tampak pada tabel di bawah ini :

Tabel 5.4.5. Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal subklas IgG2a terhadap *whole protein* dan protein elusi RAS

Kasus RAS

		+	-	
IgG2a (<i>whole Protein</i>)	+	26	2	28
	-	9	13	22
		35	15	50

Kasus RAS

		+	-	
IgG2a (Protein elusi)	+	33	3	36
	-	2	12	14
		35	15	50

Keterangan :

Kasus RAS (+) : Penderita yang mengalami RAS baik mayor maupun Minor

Kasus RAS (-) : Penderita yang tidak menderita RAS (Penderita sehat atau Normal/ sebagai kontrol).

Kadar IgG2a Positif (+) :Terjadi ikatan reaksi antigen (protein RAS) dengan antibodi (supernatan dari sel Hibrid). Kadar IgG2a nilainya lebih besar dari nilai *cutt of* , diketahui nilai *cutt of* sebesar 0,104.

Kadar IgG2a Negatif (-) : Tidak terjadi ikatan antara antigen dengan antibodi

Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas diagnostik tersebut mengacu rumus :

Sensitivitas Diagnostik = $TP / TP + FN$ (TP = True positif, FN= False negatif)

Spesifisitas Diagnostik = $TN / TN + FP$ (TN : True Negatif, FP : False Positif)

(sumber : Soeparto 1998; Handoyo,2003 dan Charles *et al.*,1987).

Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas dari Antibodi monoklonal **IgG2a** terhadap protein elusi mempunyai tingkat sensitivitas sebesar 94,3% dan spesifisitas sebesar 80 %. Sedangkan tingkat sensitivitas antibodi monoklonal IgG2a terhadap *whole* protein RAS mempunyai tingkat sensitivitas sebesar 74,3 % dan spesifisitas sebesar 86,7 %.

Tabel 5.4.6 Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal subklas IgG3 terhadap *whole* protein dan protein elusi RAS

		Kasus RAS				
		+		-		
IgG3 (<i>Whole Protein</i>)	+	28	a	b	0	28
	-	7	c	d	15	22
		35			15	50

		Kasus RAS				
		+		-		
IgG3 (<i>Protein elusi</i>)	+	32	a	b	1	33
	-	3	c	d	14	17
		35			15	50

Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas dari Antibodi monoklonal IgG3 terhadap protein elusi mempunyai tingkat sensitivitas sebesar 91,4 % dan spesifisitas sebesar 93,3 %. Sedangkan tingkat sensitivitas antibodi monoklonal IgG3 terhadap *whole* protein RAS mempunyai tingkat sensitivitas sebesar 80 % dan spesifisitas sebesar 100 %. Demikian pula untuk uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal IgA terhadap *whole* protein RAS mempunyai tingkat sensitivitas sebesar 77,1% dan spesifisitas sebesar 93,3 %, sedangkan tingkat sensitivitas antibodi monoklonal Ig A terhadap protein elusi mempunyai tingkat sensitivitas sebesar 88,6 % dan spesifisitas sebesar 80 % seperti pada tabel 5.13 ddibawah ini :

Tabel 5.4.7. Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal subklas IgA terhadap whole protein dan Protein elusi RAS

		Kasus RAS				
		+		-		
Ig A	+	31	a	b	3	34
	(Protein Elusi)	4	c	d	12	16
		35			15	50

		Kasus RAS				
		+		-		
Ig A	+	27	a	b	1	28
	(Whole Protein)	8	c	d	14	22
		35			15	50

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Karakteristik Klinis *Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)*

Karakteristik klinik terhadap penderita *RAS* diperoleh dengan melakukan anamnesa, pemeriksaan secara klinis pada rongga mulut, pengisian formulir kuesioner pada penderita *RAS* maupun kontrol, sehingga didapatkan data secara komprehensif. Berdasarkan hasil penelitian didapatkan frekuensi penderita *RAS* berkisar antara umur 10-59 tahun yang kebanyakan pada penderita wanita 23 penderita atau 65,7 % dari kasus *RAS*, sedang penderita pria 12 orang atau 34,2 %. Penderita yang berumur 20-29 tahun merupakan kelompok dengan frekuensi terbanyak baik pada wanita maupun pria ditemukan sebesar 20 orang atau 57,1 % dari kasus *RAS*. Hasil penelitian ini sesuai dengan Lehner (1995) menunjukkan bahwa *RAS* paling banyak ditemukan pada usia dekade ke dua, karena pada dekade ini merupakan saat yang paling banyak dan paling tinggi aktivitasnya. Hal ini akan berpengaruh terhadap regulasi sistem hormon dan sistem ketahanan tubuh.

Hasil wawancara terhadap 27 penderita menunjukkan bahwa *RAS* merupakan masalah kesehatan bagi mereka, disamping itu penderita sudah cukup lama menderita *RAS* dengan waktu antara 2 tahun – 10 tahun. Frekuensi kekambuhan dapat terjadi setiap tahun antara 3 kali sampai 12 kali, sehingga beberapa diantaranya dapat dikatakan tidak pernah bebas dari ulser.

Melalui anamnesis terhadap riwayat penyakit dan pemeriksaan klinis pada penderita *RAS* ditemukan sebanyak 70 % tidak diketahui penyebab timbulnya ulser (Emawati, 2002). Kondisi seperti ini juga ditemukan pada hasil penelitian Barrons (2001), bahwa timbulnya *RAS* sebagian besar penderita tidak mengetahui penyebabnya. Faktor trauma juga dilaporkan sebagai salah satu pemicu timbulnya kelainan ini seperti yang didapatkan pada penelitian Rees dan Binnie (1996), sedangkan Ship (2001) dalam penelitiannya menunjukkan hasil bahwa dari 128 penderita *RAS* ditemukan sebanyak 25 % disebabkan karena trauma sedang oleh faktor stres (psikis) 16 %. Hasil penelitian lain menunjukkan adanya gangguan keseimbangan hormon dapat menyebabkan berkurangnya keratinisasi mukosa mulut dan perubahan atrofi pada mukosa mulut, sehingga trauma atau iritasi kecilpun dapat mengakibatkan mudah terjadi ulser (Soames & Southan, 1998; Wray *et al.*, 1999).

6.2.2 Analisis Ekspresi Anomali Protein

Timbulnya anomali protein pada *RAS* kemungkinan disebabkan dua mekanisme yaitu melalui jalur enzim polimerase II dan melalui jalur protein kinase. Mekanisme ini berkaitan dengan gambaran klinis dari *RAS* seperti pada *RAS* mayor, minor dan remisi. Jalur enzim polimerase II ini diawali dengan aktifnya enzim polimerase II yang akan menyebabkan peningkatan asam glutamin dan asparagin, sedang aktifnya protein kinase akan meningkatkan pembentukan protein pada fase translasi yang berpengaruh terhadap ikatan gugus NH₂ dan COOH siklus multiplikasi sel, yang dapat mengakibatkan

perubahan struktur primer protein pada mukosa mulut menjadi anomali protein (Knippers, 1997).

Hasil analisis ekspresi protein mukosa mulut pada penderita *RAS* mayor dengan menggunakan SDS-PAGE 12 %, ditemukan lima pita protein dengan berat molekul 87 kDa, 65 kDa, 30 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Selanjutnya protein tersebut di analisis dengan *Westernblot* menggunakan serum poliklonal dari kelinci yang sudah diimunisasi dengan anomali protein anti *RAS*. Menunjukkan hasil sifat yang berbeda, terutama sifat yang tampak adalah reaktifitas protein tersebut terhadap antibodi poliklonal. Bahkan beberapa protein yang ditemukan pada SDS-PAGE 12% tidak mempunyai reaktifitas terhadap antibodi poliklonal anti protein anomali setelah dianalisis dengan *Westernblot*.

Pita protein dengan BM 30 kDa tidak bereaksi dengan antibodi poliklonal karena pertama kemungkinan di dalam serum kadar antibodi sangat rendah, kedua adalah protein tersebut tidak mempunyai sifat antigenik sehingga tidak dapat menginduksi antibodi. Hasil keempat protein setelah dilakukan analisis *Westernblot* menunjukkan protein 65 kDa mempunyai sifat dominan dibandingkan dengan protein lainnya berarti, bahwa protein tersebut mempunyai sifat antigenitas yang baik sehingga dapat menginduksi antibodi dengan liter yang tinggi. Hal ini berkaitan dengan protein yang diekspresikan pada permukaan sel epitel mukosa mulut, jika protein tersebut di ekspresikan terus menerus dalam jumlah yang banyak maka stimulasi terhadap respons antibodi juga semakin meningkat, karena memori klon sel imun terus bertambah.

Fenomena ini terbukti pada analisis densitometri menunjukkan bahwa protein 65 kDa mempunyai homogenitas yang tinggi begitu juga densitasnya, sehingga protein tersebut dapat menginduksi respons antibodi secara simultan. Protein 65 kDa merupakan protein yang sangat penting dalam etiopatogenesis timbulnya *RAS*, maka protein 65 kDa selalu ditemukan pada semua kasus *RAS* (mayor, minor, remisi).

Pada kasus *RAS* minor ekspresi protein dengan analisis SDS-PAGE ditemukan empat macam protein dengan berat molekul 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Protein tersebut sama dengan protein yang ditemukan pada kasus mayor, sedangkan protein yang mempunyai BM 30 kDa tidak ditemukan pada kasus *RAS* minor. Protein ini kemungkinan mempunyai peranan yang penting pada berbagai kasus *RAS*, dan kemungkinan dapat digunakan sebagai pembeda diantara tipe *RAS*.

Sifat reaktifitas protein pada *RAS* minor setelah direaksikan dengan antibodi poliklonal anti protein anomali dengan cara *Westernblot* menunjukkan, bahwa protein 65 kDa dan 25 kDa mempunyai reaktifitas yang tinggi, walaupun 65 kDa lebih predominan dibandingkan 25 kDa. Pada protein dengan BM 87 kDa, dan 20 kDa tidak ditemukan adanya reaktifitas terhadap antibodi, yang berarti protein tersebut tidak mempunyai peranan penting dalam menginduksi *RAS* melalui jalur imun kompleks Ag-Ab komplemen.

Protein yang predominan pada kasus *RAS* minor melalui analisis *Westernblot* menunjukkan, bahwa reaktifitas protein 25 kDa dan 65 kDa terhadap antibodi poliklonal anti anomali protein sangat jelas dan tinggi. Secara

umum protein dengan BM 65 kDa tidak menunjukkan perbedaan dengan kasus *RAS* mayor. Tetapi sebagai pembeda kasus ini adalah protein dengan BM 30 kDa. Ditemukannya protein ini adalah merupakan penegasan dari fenomena yang timbul selama ini, bahwa *RAS* mayor merupakan lanjutan *RAS* minor. Tetapi dengan ditemukannya protein ini, *RAS* tipe mayor dan minor secara etiopatogenesis tidak ada hubungannya. Fenomena ini sesuai dengan data empiris di bagian *Oral Medicine* FKG Unair (Soemariyah,1985).

Hasil analisis protein pada *RAS* fase remisi dengan SDS-PAGE 12% ditemukan empat pita protein dengan BM 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa, dan 20 kDa (Gambar 4.3). Jenis protein yang di ekspresikan pada *RAS* fase remisi tidak beda jauh dengan protein yang diekspresikan pada *RAS* minor, tetapi berbeda dengan *RAS* mayor yaitu ditemukan protein dengan BM 30 kDa. *RAS* minor dan remisi tidak ditemukan protein dengan BM 30 kDa, hal ini kemungkinan berkaitan dengan frekuensi stimulator pada proses translasi sel epitel dimana tidak terjadi induksi pada gen CDC 8 dan CDC 21 (Knippers,1997). Pada fase remisi protein 87 kDa di ekspresikan lebih stabil, sehingga dapat menginduksi antibodi dengan titer tinggi, terbukti pada analisis *Westernblot* yang mempunyai reaktifitas terhadap antibodi poliklonal anti anomali protein ditemukan pada protein dengan BM 87 kDa dan 65 kDa. Oleh karena itu kemungkinan fungsi dari protein 87 kDa adalah sebagai induktor terhadap proses penyembuhan *RAS* melalui pembentukan keratinisasi. (Soames & Southan,1998)

Imunoglobulin yang dihasilkan oleh karena adanya induksi anomali protein ini bersifat sistemik, hal ini telah terbukti, bahwa Imunoglobulin ini ditemukan pada pembuluh darah perifer. Hasil ini sesuai dengan penelitian Ernawati (2003) Pada penderita RAS tentang respons antibodi dengan *indirect-ELISA* menunjukkan bahwa Ig G ditemukan pada serum penderita. Bukti ini menunjukkan bahwa protein spesifik RAS mampu menginduksi respons imun humoral. Produksi imunoglobulin ini kemungkinan semakin lama semakin meningkat sesuai adanya ekspresi protein pada epitel mukosa mulut. Jika proses ini berlangsung lama maka berakibat terjadinya kompleks imun (Ag-Ab dan komplemen).

Imunoglobulin subklas yang diinduksi oleh protein tersebut terdapat beberapa subklas yang sangat berperan dalam pengaktifan komplemen (C3 dan C4). Pengaktifan komplemen C4 diawali adanya pengikatan antigen antibodi yang mengaktifkan C1q, r2s2 yang selanjutnya mengaktifkan C4 menjadi C4a dan C4b, kemudian C4b diaktifkan oleh C2 menjadi C2b yang dikenal dengan C3 konvertase akibatnya terjadi kompleks C4b2a3b disebut juga konvertase C5. C5 ini akan menjadi C5a dan C5b, selanjutnya C5b menjadi ikatan kompleks yang stabil karena terjadi ikatan C6,C7,C8 dan C9 ke dalam kompleks membran atau *membran attack complex (MAC)*. Salah satu proses ini adalah jalur yang memungkinkan kerusakan pada epitel mukosa mulut. (Knippers, 1997, Goldsby, *et al*, 2000).

Imunoglobulin subklas yang mempunyai peranan penting dalam pembentukan kompleks antigen antibodi komplemen adalah IgG3 selain itu

imunoglobulin lainnya yaitu IgM yang mengikat sel darah merah melalui reseptor akan menyebabkan aktivitas komplemen melalui jalur komplemen secara klasik (Goldsby, *et al.*, 2000). Hasil ini didukung oleh Sistig, *et al.*, (2002) bahwa pada penderita dengan kelainan RAS didapatkan kadar imunoglobulin G3 dan G2 (IgG2 dan IgG3) yang meningkat, dimana IgG3 merupakan aktivator komplemen yang paling besar.

Proses imun kompleks terjadi pada semua jenis RAS, hal ini di dukung hasil penelitian Sistig, *et al.*, (2001 & 2002), menunjukkan kadar IgG subklas tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan pada kasus RAS mayor dan RAS minor, tetapi adanya peranan penting IgG3 dapat diketahui pada remisi. Kadar Imunoglobulin G3 (IgG3) pada remisi menurun yang berarti bahwa pembentukan antigen antibodi komplemen mulai berkurang, sebagai akibat adanya penurunan sekresi protein anomali. Imunoglobulin subklas G3 (IgG3) ditemukan dalam serum pada semua tipe RAS. Hal ini kemungkinan berkaitan dengan struktur protein yang berperan penting dalam penginduksian pembentukan antibodi tidak terdapat perbedaan yang signifikan diantara tipe RAS akibat adanya perubahan struktur primer protein sehingga merubah sifat fleksibilitas protein (Austin dan Woods, 1995).

Sifat spesifik yang dimiliki protein anomali ini sangat mungkin dalam menginduksi antibodi tidak hanya humoral tetapi juga seluler, karena proses induksi antibodi tidak hanya terjadi secara eksogenous tetapi juga endogenous pada level (tingkat) translasi (mRNA) yang bersamaan dengan multiplikasi sel epitel sebagai generasi baru (Kolozik, *et al.*, 2000)

Respons Imun Seluler

Respons antibodi seluler pada kasus *RAS* terjadi akibat adanya induksi dari protein yang diperkenalkan kepada sel T oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) melalui antigen peptida yang di presentasikan melalui MHC kelas I sehingga melalui reseptor sel T terutama sel sitotoksik (CTL) menjadi aktif, hal ini disebabkan karena anomali protein adalah merupakan antigen *dependent* oleh karena memerlukan reseptor pada sel T terutama pada CD8+, termasuk sel non spesifik yaitu sel NK. Adanya aktifitas respons spesifik dan non spesifik dipengaruhi oleh aktifnya sitokin yang dihasilkan oleh sel T, sel NK dan makrofag. Oleh karenanya sitokin mempunyai arti penting dalam terjadinya respon imun seluler pada kasus *RAS* (Sistig, *et al.*,2001, Lewkowicz, *et al.*,2003).

Anomali protein selalu mempunyai sifat fleksibilitas yang tinggi tetapi mempunyai gugusan hidroksil yang besar, sehingga mengakibatkan sifat protein tersebut menjadi tidak mudah berubah. Protein tersebut selain menginduksi terjadinya respons imun humoral juga seluler. Respons imun tersebut terbukti pada hasil penelitian (Ernawati, 2003 & 2004) telah ditemukan antibodi seluler pada kelinci yang diimunisasi dengan anomali protein spesifik *RAS*. Sel T yang aktif dapat dideteksi dengan menggunakan anti IFN- γ yang direaksikan dengan sel T hasil isolasi dari darah perifer mencit, kemudian dianalisis dengan *flow cytometri*, menunjukkan 40%-60% sel T aktif (Ernawati, 2004). Respons ini juga terbukti pada penelitian Bachtar, *et al.*,(1996) dengan menggunakan uji *monoclonal antibodies in double coloured flow cytometri* menunjukkan

berkurangnya aktivitas limfosit T (CD4+) pada serum penderita RAS mayor dan minor yang mengakibatkan induksi CD4+ terhadap sel B untuk berproliferasi menjadi sel plasma penghasil antibodi menjadi berkurang, sehingga mengakibatkan gangguan keseimbangan sistem imun.

6.4 Profil Antibodi Subklas pada Penderita RAS

Antibodi subklas yang ditemukan pada kasus RAS tidak mempunyai perbedaan yang nyata berdasarkan titer antibodi. Tetapi dengan cara *Indirect-ELISA* menunjukkan titer yang berbeda. Titer antibodi subklas yang tinggi ditemukan pada imunoglobulin subklas IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgG1 dan IgM. Seperti telah diketahui bahwa pada manusia konsentrasi IgG dalam serum kurang lebih 1000 mg/ml, merupakan 75% dari total serum imunoglobulin pada dewasa normal dan merupakan antibodi yang paling banyak diproduksi selama respons imun humoral sekunder (Turner,1998), sedangkan Ig A serum 200 mg/ml. Imunoglobulin G (IgG)

Pada *T-dependent immune response* terdapat perubahan yang progresif pada kelas imunoglobulin terhadap antibodi spesifik yang diproduksi. Pada umumnya imunoglobulin yang dimaksud adalah IgG. Telah dibuktikan bahwa adanya *isotype switching* terjadi karena keterlibatan sel T dan beberapa sitokin yang dihasilkan. Kebanyakan dari antibodi yang ada di dalam plasma di produksi oleh sel B yang telah mengalami *isotype switching* (Janeway, *et al.*, 1999)

Pada mencit, sel T dalam mukosa akan menstimulasi produksi Ig A. Sel Th2 dapat memproduksi IL-4, TGF- β dan IL-5. IL-4 menyebabkan perubahan sel B untuk memproduksi IgG1 dan IgE serta secara bersamaan menekan semua isotipe yang lain. TGF- β menginduksi *switching* ke IgG2a dan IgA, sedangkan IL-5 dapat menginduksi 5 sampai 10 kali lipat produksi IgA setelah mengalami *switching*, tanpa penekanan terhadap isotipe yang lain (Janeway, 1999, Austin & Woods, 1995). Sebagian besar antibodi yang ada di dalam plasma diproduksi oleh sel B yang telah mengalami *isotype switching*, sedangkan tingginya kadar imunoglobulin G (subklas IgG2a dan IgG3) serta IgA serum akibat rangsangan protein dominan 65 kDa spesifik RAS kemungkinan terjadi keseimbangan antara IL-4 dengan TGF- β dan IL-5, disamping itu terjadi *isotype switching* ganda, dari IgM ke IgG, lalu dari IgG ke IgA sehingga akan meningkatkan kadar Ig A serum. Telah dibuktikan tingginya kadar IgG2a pada serum pasien RAS kemungkinan disebabkan protein spesifik RAS mempunyai imunoreaktivitas yang tinggi terhadap antibodi dalam tubuh, sehingga kemungkinan terjadi over sekresi dari antibodi. Antibodi tersebut akan berikatan dengan antigen yang dapat membentuk kompleks imun yang selanjutnya mengaktifkan sistem komplemen (Janeway, *et al.*, 1999, Goldsby, *et al.*, 2003). Aktivasi sistem komplemen akan menyebabkan sejumlah fenomena radang yang dapat menyebabkan kerusakan dinding sel dan mengakibatkan lisis sel.

Imunoglobulin G2a (IgG2a) merupakan imunoglobulin yang paling banyak tersebar baik dalam vaskularisasi maupun dalam ruang ekstrasvaskular. Imunoglobulin G3 (IgG3) mempunyai kemampuan aktivasi terhadap antigen

yang besar untuk dapat mengaktivasi komplemen. Sebagai aktivator komplemen yang besar antibodi ini akan berikatan dahulu dengan antigen membentuk kompleks antigen-antibodi (kompleks imun). Adanya aktivasi sistem komplemen akan menyebabkan influks cairan yang membawa antibodi dan fagosit ke tempat masuknya antigen lebih banyak sehingga kemungkinan berpengaruh terhadap kadar IgG3. (Golsby *et al.*, 2000)

IgG3 dan IgM merupakan imunoglobulin subklas predominan yang merupakan hasil dari tanggung jawab sel T *independent*. Hal ini berarti, bahwa sel B dapat sewaktu-waktu *switch* secara spontan untuk memproduksi IgG3. Terjadinya *switching* dimulai dari gen VDJ 5'-3' akan menghasilkan C μ , C δ kemudian C γ 3, C γ 1, C γ 2a, C γ 2b. Mekanisme ini terjadi tidak lepas dari sitokin yang disekresikan oleh sel T pada saat *switching* imunoglobulin subklas secara spontan langsung pada 5'-3' selama proses proliferasi, karena sel T menyediakan faktor yang diperlukan untuk proliferasi. Oleh karena itu sel T berperan penting sebagai penyebab *switching* antibodi subklas dari sel B melalui ekspresi IgM yang mengikat pada membran sel B dan terjadi pembentukan antibodi subklas lainnya. Selain itu kemungkinan *switching* juga dapat langsung terjadi untuk antibodi subklas IgG2a (Austin & Woods, 1995).

Kadar imunoglobulin A (IgA) yang terbentuk dalam serum juga mengalami peningkatan. Produksi imunoglobulin ini kemungkinan dirangsang oleh satu epitop dari antigen protein 65 kDa melalui jalur MHC kelas II untuk menginduksi sel T dan selanjutnya memproduksi TGF- β yang dapat menyebabkan percepatan proses *isotype switching* dari sel B dalam sekresi Ig A, dan sekaligus akan

memproduksi IL-5 untuk meningkatkan kadar Ig A yang tinggi di dalam serum, walaupun tidak menutup kemungkinan ada faktor lain yang akan mempengaruhi kadar IgA di dalam serum. .

Ada fenomena yang mengatakan bahwa suatu antigen atau imunogen yang potensial dapat membangkitkan respons imun mukosal dalam hal ini adalah produksi *secretory IgA* (S-IgA), tetapi juga mampu untuk menginduksi imunoglobulin A (Ig A) di dalam serum dengan kadar yang cukup tinggi bila diberikan secara *parental*. Apabila asumsi ini benar, maka tingginya kadar serum IgA dapat digunakan sebagai indikator bahwa protein yang digunakan dalam perlakuan tersebut adalah suatu imunogen mukosal. Dengan demikian maka dapat diasumsikan bahwa protein spesifik RAS merupakan imunogen mukosal yang potensial sebagai etiopatogenesis pada kasus RAS. Hal ini telah dibuktikan bahwa adanya induksi dari protein dominan spesifik RAS dapat menginduksi respon imun baik respon imun humoral maupun seluler (Emawati, 2003&2004). Demikian juga telah dibuktikan hasil penelitian Soemariyah (1985) bahwa kadar antibodi sIgA dalam saliva penderita RAS baik pada fase akut maupun remisi menunjukkan adanya kenaikan kadar sIgA yang signifikan terhadap antigen streptokokus. Adanya kenaikan kadar sIgA terhadap antigen streptokokus dalam saliva kemungkinan dapat mengakibatkan kerusakan jaringan, melalui aktivasi mediator komplemen atau dapat juga melalui *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) yang mengakibatkan lisis sel pada mukosa mulut sehingga akan menimbulkan suatu ulser (Greenspen, 1981).

Hasil reaktivitas Antibodi yang muncul akibat ekspresi dari protein 65 kDa pada setiap kasus *RAS* akan memberikan profil subklas antibodi yang berbeda sehingga dengan analisis statistik dapat diterangkan subklas antibodi mana yang akan berperan dalam patogenesis *RAS*

Hasil analisis Anova satu jalur menunjukkan ada perbedaan yang sangat signifikan antara kadar antibodi subklas IgG2a, IgG3 dan kadar Ig A pada serum penderita *RAS* bila dibanding kontrol ($p < 0.05$). Analisis dengan LSD didapatkan kadar antibodi subklas IgG2a pada serum pasien *RAS* tipe mayor, tipe minor serta *RAS* fase remisi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$).

Demikian juga halnya kadar antibodi subklas IgG3 serum pasien *RAS* tipe mayor dengan *RAS* tipe minor tidak ada perbedaan yang signifikan, tetapi bila dibanding dengan *RAS* remisi kadar antibodi subklas IgG3 menunjukkan perbedaan yang signifikan. Kadar antibodi subklas Ig A serum pasien *RAS* tipe mayor dibanding kadar antibodi subklas IgA pada pasien *RAS* minor dan remisi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p > 0.05$)

Kadar antibodi subklas IgG2a pada serum tiap kasus *RAS* (mayor, minor dan remisi) tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan jadi berarti antibodi subklas ini pada tiap kasus *RAS* sama, hal ini kemungkinan disebabkan adanya stimulasi yang terus menerus dari antigen yang sama. Ini menandakan bahwa pada kasus *RAS* baik mayor, minor maupun remisi kadar antibodi subklas ini tetap tinggi, berarti pada pasien ini mempunyai kecenderungan yang sama untuk tetap mengalami *RAS* disebabkan adanya kesamaan ekspresi ataupun epitop protein pada *RAS* tipe mayor, *RAS* tipe minor dan remisi sehingga untuk

menginduksi antibodi juga diperlukan kesamaan ekspresi epitop. Dapat berarti juga bahwa ekspresi protein anomali 65 kDa ini dapat menginduksi antibodi subkelas IgG2a pada kadar yang sama

Kadar antibodi subkelas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap protein penderita RAS menunjukkan ada perbedaan yang signifikan bila dibanding kontrol (hasil uji ANOVA $p < 0.05$). Kadar antibodi subkelas IgG2a terhadap *whole* protein pada kasus RAS mayor di banding minor tidak menunjukkan perbedaan, tetapi pada RAS remisi kadar IgG2a pada *whole* protein menunjukkan perbedaan yang signifikan bila dibanding RAS mayor dan minor, ini berarti pada kasus remisi kadar antibodi subkelas IgG2a sudah mengalami penurunan hal ini menandakan sudah mulai ada tanda kearah proses penyembuhan.

Tetapi pada uji LSD tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan antara RAS tipe mayor, tipe minor dan remisi, ($p > 0.05$). Hal ini kemungkinan kadar antibodi subkelas IgG3 terhadap *whole* protein penderita RAS antara RAS mayor dan minor tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Tetapi bila di banding remisi kadar antibodi subkelas IgG3 pada kasus ini menunjukkan ada perbedaan yang sangat signifikan, ini berarti dalam kondisi remisi masih dijumpai adanya tanda peradangan. Oleh karena IgG3 merupakan antibodi yang mempunyai peranan yang lebih besar sebagai aktivator komplemen. Dimana aktivasi terhadap sistem komplemen akan menyebabkan sejumlah fenomena radang. Demikian juga halnya dengan kadar antibodi subkelas Ig A pada kasus RAS mayor maupun minor tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan. Sedang pada kasus RAS remisi menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan RAS

tipe mayor, ini menandakan bahwa antibodi subklas IgA masih berperan pada proses kearah penyembuhan.

6.5. Antibodi Monoklonal terhadap Anomali Protein spesifik RAS 65 kDa

Imunoglobulin subklas yang disekresi oleh sel hibrid yang paling banyak adalah IgG2a, IgG3 dan IgA. Imunoglobulin subklas yang disekresikan ini tidak mempunyai perbedaan yang signifikan jika dianalisis melalui titer antibodi. Hasil ini menggambarkan bahwa protein spesifik RAS dengan berat molekul 65 kDa mempunyai sifat stabil dan mempunyai antigenitas tinggi, sehingga imunoglobulin subklas yang terekspresi oleh sel hibrid terutama IgG2a, IgG3 dan IgA merupakan imunoglobulin predominan pada kasus RAS.

Hasil uji sensitivitas dan spesifisitas antibodi monoklonal IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap *whole protein* maupun protein elusi terdapat perbedaan. Adanya perbedaan sensitivitas dan spesifisitas subklas antibodi monoklonal ini kemungkinan dapat disebabkan adanya perbedaan kemurnian terhadap protein pada elusi, sedang tingginya *whole protein* terhadap daya spesifisitas, kemungkinan adanya reaksi silang. Perbedaan ini kemungkinan juga disebabkan adanya tipe epitop dari protein terhadap antibodi monoklonal. Epitop yang mudah terjadi reaksi silang yaitu epitop yang berbentuk *linear*, karena mempunyai rangkaian peptida yang lebih kecil dibanding rangkaian peptida yang berbentuk *discontinue* yang disusun kurang lebih 6-8 asam amino sehingga

mempengaruhi daya ikat antara antibodi monoklonal dan epitop pada protein sehingga mempunyai spesifisitas kuat (Westhof and Tainer, 1984)

Tingginya sifat sensitivitas yang dimiliki oleh imunoglobulin produk hibridisasi adalah merupakan sifat dari IgG2a, karena mempunyai sifat afinitas tinggi dibandingkan dengan subklas imunoglobulin yang lain. Selain itu juga tingginya titer antibodi atau daya reaktivitas dipengaruhi oleh adanya ikatan kovalen antara antigen dan antibodi yang *discontinue* dan *non linear*, dengan demikian kedua molekul tersebut membentuk ikatan yang kuat karena permukaan antigen akan di ikat secara keseluruhan oleh antibodi, sehingga dalam fase pencucian pada tahapan ELISA juga masih tetap terjadi ikatan secara sempurna. Sifat ini juga tidak lepas dari komposisi asam amino yang membentuk *fragmen ab* pada imunoglobulin tersebut (Rantam,2003, Rantam et al .,2000)

Secara kuantitas antibodi terhadap protein spesifik RAS (65 kDa) dapat menginduksi berbagai subklas antibodi yang mempunyai kadar yang tinggi tanpa mengurangi komplikasi faktor lain. Kadar antibodi subklas IgG2a mempunyai kadar yang lebih tinggi dibanding kadar antibodi yang lain. Juga telah ditemukan adanya spesifisitas dan sensitivitas antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3 dan IgA terhadap protein spesifik RAS (65 kDa).

6.6 Fenomena Anomali Protein 65 kDa dan Etiopatogenesis RAS

Setelah di analisis secara pragmatis hasil penelitian di temukan adanya fenomena yang sangat penting sebagai etiopatogenesis RAS, berdasarkan sifat dan ekspresi protein anomali 65 kDa. Berdasar hasil penelitian menunjukkan, bahwa protein dengan BM 65 kDa mempunyai sifat antigenik yang tinggi dan dapat menginduksi antibodi humoral serta antibodi seluler. Protein dengan BM 65 kDa sebagai protein predominan yang diekspresikan pada epitel mukosa mulut pada semua tipe RAS mampu menginduksi antibodi. Oleh karena itu derajat kasus RAS sangat di pengaruhi jumlah protein yang diekspresikan.

Pada kasus RAS tidak hanya protein 65 kDa sebagai modulator terjadinya RAS, tetapi juga di temukan protein lainnya yaitu protein dengan BM 87 kDa, 30 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Protein tersebut muncul dan hilang sesuai dengan tipe RAS, pada kasus RAS tipe mayor protein dengan BM 30 kDa selalu muncul yang berarti protein tersebut berfungsi sebagai modulator inflamasi dan nekrosis sel epitel, tetapi pada remisi protein anomali dengan BM 87 kDa mempunyai peranan penting yang berarti protein tersebut di ekspresikan dan berfungsi dalam proses penyembuhan.

Secara umum anomali protein mempunyai sifat stabil yang berarti protein tersusun dari asam amino atau peptida yang mempunyai ikatan kovalen yang kuat sehingga dapat bersifat stabil dan hidropobik. Sifat ini terbukti dari hasil hibridisasi sel mieloma dan limfosit yang menghasilkan antibodi, dan ternyata

setelah dilakukan *typing* menunjukkan antibodi subkelas IgG2a, IgG3 dan IgA sebagai antibodi dominan yang disekresikan oleh sel hibrid. Hal ini menandakan bahwa sel B (limfosit B) yang terstimulasi pada saat imunisasi mencit dengan protein dominan 65 kDa sudah terjadi perubahan formasi gen VDJ, sehingga antibodi yang disekresikan tidak berbeda nyata dengan antibodi yang disekresikan secara *in - vivo* (Austin & Woods, 1995).

Antibodi subkelas yang disekresikan secara *in -vivo* dan melalui hibridisasi sel limfosit dan mieloma mempunyai reaktivitas dan sensitivitas yang tinggi terhadap antigen spesifik, oleh karena itu dapat digunakan sebagai bahan diagnostik, selain itu berdasarkan sifat dominan antibodi tersebut digunakan sebagai prognosis pada kasus RAS. Jika IgG2a, IgG3 dan IgA tinggi menunjukkan adanya tendensi, bahwa pasien tersebut dapat diprediksi akan atau sudah menderita RAS.

Secara singkat anomali protein merupakan etiopatogenesis RAS yang terjadi melalui jalur imun kompleks dan respons imun seluler. Intensitas ekspresi protein tergantung dari stimulator yang berasal dari faktor eksternal dan internal. Berdasar pada respons imun yang ditimbulkan dapat digunakan sebagai marker pada kasus RAS.

7 . KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat ditarik suatu kesimpulan seperti tersebut dibawah ini :

1. Anomali protein predominan spesifik *RAS* yang di ekspresikan pada penderita *RAS* adalah protein dengan berat molekul (BM) 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa, dan 20 kDa.
2. Ekspresi protein mukosa mulut pada penderita *RAS* tipe mayor secara kualitatif ditemukan lima pita protein dengan BM 87 kDa, 65 kDa, 30 kDa, 25 kDa dan 20 kDa. Untuk *RAS* minor ditemukan empat pita protein dengan BM 87 kDa, 65 kDa , 25 kDa dan 20 kDa sedang pada *RAS* remisi ditemukan empat pita protein masing-masing dengan BM 87 kDa, 65 kDa, 25 kDa dan 20 kDa.
3. Profil subklas antibodi IgG2a dan IgG3 serta Ig A pada serum pasien *RAS* mayor, *RAS* minor dan remisi tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan.
4. Subklas antibodi monoklonal (IgG2a, IgG3 dan IgA) terhadap *whole* protein mempunyai sensitivitas dan spesifisitas antara 74% – 100%, sedang terhadap protein elusi mempunyai sensitivitas dan spesifisitas antara 80% - 94,3 %.

6.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dari hasil penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Penelitian ini dapat dipakai sebagai landasan teoritik untuk penelitian lebih lanjut terhadap sifat-sifat protein spesifik *RAS* (protein 65 kDa spesifik *RAS*) yang dapat memicu proses terjadinya *Recurrent Aphthous Stomatitis*.
2. Perlu dilakukan karakterisasi anomali protein lebih lanjut terutama karakterisasi peptida dan asam amino. Sehingga dapat digunakan sebagai dasar sintetik dalam pembuatan kit diagnostik
3. Masih perlu dilakukan penelitian lanjutan peranan protein dominan lainnya seperti protein 87 kDa, 25 kDa, sehingga ditemukan etiopatogenesis *RAS* secara molekuler yang komprehensif
4. Perlu dilakukan penelitian lebih profil protein 30 kDa sehubungan dengan kapasitasnya sebagai pembeda *RAS* tipe mayor dan minor untuk mempelajari patogenesis yang lebih mendalam.
5. Perlu dilakukan *field trial* (studi lapangan) antibodi monoklonal subklas IgG2a, IgG3, dan IgA, sehingga dapat digunakan untuk bahan / kit diagnostik

Hasil publikasi yang merupakan bagian dari penelitian ini antara lain;

1. Ernawati D.S, 2000. Karakteristik secara klinik sistem imun pada RAS. Temu Ilmiah Nasional FKG-Unair.
2. Ernawati, D.S, 2002. Anomali protein mukosa menginduksi RAS minor. International Conggres 2nd Bali FDA-Indonesian Dental Assosiantion.
3. Ernawati, D.S, 2003. Protein spesifik 65 kDa mukosa mulut pada RAS major menginduksi respon imun sistemik. Indonesian Journal of Trop. Med. Vol. 14 : 114-116
4. Herdani, P dan Ernawati, D.S. 2004. Identifikasi protein spesifik RAS. Dental journal Surabaya (In Press)
5. Ernawati, D.S. 2004. Anomali protein oral mukosa menginduksi RAS major. J. Dentis. Ind. Vol 11: 13 – 16
6. Ernawati, D.S. and Rantam, F.R. 2004. Pembakuan peptida epitop anomali antigen mukosa sebagai bahan antibodi monoklonal anti RAS. Seminar Nasional Hasil Penelitian Dasar 2003. Dirjen. Dikti. Diknas.
7. Ernawati, D.S. 2004. Analisis densitometri protein 65 kDa pada RAU – major. Indonesian Jour. Trop. Med. Vol 15 : 58-64
8. Ernawati, D.S. 2004 (c). Respon imun seluler dan karakteristik protein spesifik RAU. Pertemuan Ilmiah Tahunan Pertimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI), Semarang. 23-26 Agustus 2004
9. Ernawati, D.S 2004. Immune Response 65 kDa Protein in Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) The International Journal of Oral Health Vol :1 :53.Abstract.

10. Ernawati, D S, 2004. Karakterisasi Epitope Disperse Protein Spesifik RAU sebagai Bahan Antibodi Monoklonal. (In Press)
11. Ernawati, D.S.2005. Respon Antibodi terhadap protein 65 kDa pada RAS (In Press)
12. Ernawati D.S.2005. Spesifisitas dan Sensitivitas antibodi monoklonal protein 65 kDa terhadap protein membran mukosa mulut penderita RAS (In Press)



DAFTAR PUSTAKA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2000. Cells and Tissue of the immune system. Dalam Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS : Cellular and Molecular Immunology, 4th ed. W B.Saunders Co, 331-333
- Austin T & Woods K, 1995. Principles Cellular and Immunology. Oxford University Press.
- Bachtiar E W, Cornain S, Siregar B, Raharjo T W, 1998. Decreased CD4+/CD8+ ratio in major type of RAS: Comparing major to minor types of ulcers. Asian Pac J.Allergy Immunol, 16(2-3) : 75-9
- Barrons R W, 2001. Treatment Strategis for recurrent aphthous ulcers. Am J Health Syst Pharm, 58(1): 41-50 ; quiz 51-3
- Brostoff J, Scadding GK., 1998. Oral Immunology Disorders. In (Roitt I, Brostoff J, Male D) : Clinical Immunology. Fourth edition, Gower Medical Publishing
- Brozovic S, Vucicevic-Boras V, Bukovic D, 2001. Serum IgA,IgG,IgM and salivary IgA in recurrent Aphthous Ulceration, Coll Antropol 25(2) : 633-7
- Buno I J, Huff J C, Weston W L, 1998. Elevated levels of Interferon gamma, tumor necrosis factor alpha , Interleukin 2, 4 and 5, but not interleukin 10, are presents in recurrent aphthous stomatitis . Arch dermatol, 134(7) : 327-31
- Burruano F, and Tortorici S, 2000. Major Aphthous Stomatitis (Sutton's Disease), Ethiopathogenesis , histological and clinical aspects. Minerva Stomatol, 49(1-2) : 41-50
- Burgess GW, 1998. Elisa technology in Diagnosis and Research, By James Cook University of North queensland 139-187
- Croley TE and Miers C.1988. Epithelial changes in the oral mucouse resulting from a variation in hormone stimulus. J.Oral Med.33:86-9
- Davies KJ, 2000. Oxidative stress, antioxidant defense, and damage removal, repair, and replacement system. IUBMB life 50 : 279-289
- Direskeneli S G, and Celet B., 2001. Human HSP 60 peptide responsive T cell lines are similarly present in both Behcet's Disease patients and healthy controls. Immunol Lett, . 79(3): 203-8.

- Dolby A.E., 1975. *Oral Mucosa in Health and Disease*. J.B. Lippincott Company, Edisi ke-1, pp: 2-11
- Donatsky O and Dabelsteen E,1978. An Immunofluorescence study on the humoral immunity to adult human oral mucosa in recurrent aphthous stomatitis. *Act Allergologica* : 29,308-18
- Djamhari M, 1996 . Perbedaan efektifitas pemakaian kombinasi ekstrak sanguis 5% dan polidokanol 1% dengan triamcinolone 0,1% dental paste USP pada pengobatan Stomatitis Aftosa Rekuren. *MIKGI.Edisis Khusus Dies Natalis UGM* :1-14.
- Endah A P, Soewondo I K., 1998. Prevalensi Kelainan Mukosa Mulut antara Pria dan Wanita di Klinik Ilmu Penyakit Mulut FKG Unair (Maret- Juli 1996). Kumpulan Naskah Timnas 1. Peringatan 70 tahun Pendidikan Dokter Gigi, Surabaya.
- Ernawati, D S, 2002. Anomaly Protein of Oral Mucosal Induces Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS). *International Congress 2nd Bali FDI-Indonesian Dental Association (IDA),20 th-22nd Sept 2002.*
- Ernawati, D S., 2002. Pembakuan peptide epitope anomali antigen mukosa sebagai bahan antibodi monoklonal anti RAU. *Laporan Penelitian Dasar 2002.*
- Ernawati, D S., 2003. Respons imun spesifik protein 65 kDa mukosa mulut pada Recurrent Aphthous Stomatitis Mayor. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia* .14 (1) Mar 2003.
- Ernawati, D.S. 2004 (c). Respons imun seluler dan karakteristik protein spesifik RAU. *Pertemuan Ilmiah Tahunan Perhimpunan Mikrobiologi Indonesia (PERMI), Semarang 23-26 Agustus 2004*
- Ernawati, D.S 2004. Immune Response 65 kDa Protein in Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) *The International Journal of Oral Health Vol:1 : 53.Abstract*
- Francis TC and Oppenheim JJ,1980. Impaired Lymphocyte stimulation by some streptococcus antigens in patients with RAS. *Clin Exp Immunol* 6, 573-586
- Fieldman M, 1998. Cell Cooperation in the Antibody response, in Roitt I, brostoff J, male D, *Immunology* 5 th ed, Mosby international Ltd, London, 139-150
- Gadol N, Greenspan CI, Hoover and Olson J A.,1985. Leucocyte Migration Inhibition in RAU, *Journal of Oral Pathology* 14.p.121-132

- Ghodratnama F., Riggio M.P., Wray D., 1997. Search for human herpes-6, human cytomegalivirus and varicella zoster virus DNA in RAS tissue. *J Oral Pathology Med.*26,:192-7
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000. *Kuby Immunology*. Fourth edition, New York : W.H. Freeman and Company, pp1-514
- Graykowsky, 1974. *Periadenitis Aphthae : Clinical and histopathologic aspects in rabbit skin*. *Jada* : 69,118-125
- Greenberg M.S., 1994. *Ulcerative, Vesicular and Bullous lesions dalm Lynch MA, Brightman VJ. Greeberg MS. Burket's Oral Medicine Diagnosis and Treatment 9th ed. JB. Lippincott Co., Toronto, 27-29*
- Greenspan J.S., Gadol N., Olson J.A., Hoover C.L., Jacobsen P.L., 1985. Lymphocyte function in recurrent aphthous stomatitis. *J. Oral Pathol*, 14(8)pp: 592-602
- Guranska N., and Urbaniak B., 2000. *Recurrent Aphthous Ulcers: The etiology with special reference to immunological theorie*. *Pol Merkuriusz Lek*, 8(44): 113-7
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third edition Oxford : Oxford University Press, pp 1-35, 246-350
- Handojo I, 2003. *Pengantar Imunoasai Dasar*. Airlangga University Press, hl 16-21
- Hasan A. and Shinnick T., 2002. *Defining a T cell epitope within HSP 65 in Recurrent Aphthous Stomatitis*. *Clin Exp Immunol*, 128(2) : 318-20
- Hasan A., Childerstone A., Pervin K., 1995. *Recognition of a unique peptide epitope of the myobacterial and human heat shock protein 65-60 antigen by T cells of patients with RAS*. *Clin Exp Immunol*, 99(3) :392-7
- Hayrinen-Immonem R. and Malmstrom M., 1992. *Distribution of Adhesion Receptors in recurrent oral ulcers*. *J.Oral Pathol Med*, 21(5) : 199-202
- Healy C.M. and Thornhill M.H., 1999. *Induction of Adhesion Molecules Expression on blood vessels and keratinocytes in recurrent oral ulceration*. *J.Oral Pathol Med*, 28(1) :5-11
- Henderson A. Gray LA, Webster Cynaqua J, Shugars D C., 2002. *Regulation of Scretory Leucocyte Protease Inhibitor Promoter by Epstein Barr virus. Encoded BZLF*. *J.Dent Res Special A 0898*.

- Horie Y., Chiba M., Suzuki T., 1998. Induction of Major Histocompatibility Complex Class II antigens on human colonic epithelium by interferon-gamma, tumor necrosis factor- alpha, and interleukin-2. *J. Gastroenterol*, 33(1) : 39-47
- Husband AJ, Beagly KW, McGhee JR, 1999. *Mucosal Cytokines in Mucosal immunology* ed by Ogra PL, Lamm ME, Bienenstock J, Mestecky J, Strober W, McGhee JR 2 nd ed San Diego London Boston Academic Press, 541-537
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD, 1999. *Immunobiology, The Immune System in Health and Disease* 4 th ed., Elseiver Science Ltd/Garland Publishing ;314-316
- Kamel MN, 1995. Behcet's Disease and Recurrent Aphthous stomatitis. *MediCad Multimedia*, <http://www.medical.com.tg/> akses 21 januari 2000
- Kelsall B, Strober W, 1999. Gut associated lymphoid tissue antigen handling and T lymphocyte response in *Mucosal Immunology* ed by Ogra PR, Lamm ME, Bienen Stock J, mestecky J, Strober W, McGhee JR 2 nd ed San Diego London Boston Academic Press, 229-314
- Kresno SB, 2001. *Immunology : Diagnosis dan Prosedure Laboratorium*. Edisi keempat, Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hlm 3-428
- Kolozik AE, Hantze MW, Hagemeterc, Bartram CR, 2000. *Molekulare Medizin. Grundlaen-Pathomechanism-klinik*. Copyright by walterde Gruytes GmbH & Co.p.30-32
- Lebman DA, Coffman RL, 1994. Cytokines in the Mucosal immune System In *handbook of Mucosal Immunology*. Ed. By Ogra PI. Academic 243-248
- Lindeman RA, Riviere GR and Sapp JP, 1995. Serum antibody responses to indogenous oral mucosal antigens and selected laboratory-maintained bacteria in recurrent aphthous stomatitis. *J.Oral Surg.Oral med.Oral Pathol*.59 p585-589.
- Lehner T, 1992. *Immunology of Oral Disease* 3rd ed. Blackwell Scientific Publications
- Lehner T, 1995. The role of heat shock protein, microbial and autoimmune agents in the aetiology of behcet's disease. In *Rev.Immunol*, 14 (1);21-23

- Lewkowicz N, Kumatowska A, Banasik M, Glowacka E, 2003. Innate Immune System is implicated in Reurrent Aphthous Ulcers pathogenesis. *J.Oral Pathol Med*,32(8) ; 475-81
- Lyck E, Erling N, 1983. *Textbook of Medical Virology*. Butterworths & CoMc
- Lynch M A,1997. *Burket's Oral Medicine Diagnosis and Treatmen* 9th ed.Lippincot.Reven Publishes, p.222-4
- Male D, 1998. Cell migration and infamation. In (Roitt I, Brostof J, Male D, eds). *Immunology*. Fourth edition, London : Gower Medical Publishing, pp.14.2-14.7
- Manning A M, Rao A, 1999. Agents Targetting transcription factors. In (Gallin JL, Snyderman R, Fearon DT, Hayner BF, Nathan C, eds). *Inflamation Basic Priciples and clinical correlated*. Third edition, Philadelphia : Lippincott William& Wilkins, pp. 1159
- Mc.Nally, 2003. *Recurrent Aphthous Stomatitis and Precieved Stress: Preliminary study* <http://www.aphthous.stress.study.tripod.com/resed.doc>. Tanggal akses 18-03-2003
- McIntyre TM, Strober W, 1999. Gut associated lymphoid tissue antigen handling and T lymphocyte response in *Mucosal Immunology* ed by Ogra PR, Lamm ME, Bienen Stock J, mestecky J, Strober W, McGhee JR 2 nd ed San Diego London Boston Academic Press, 329-356
- Meiller T F, Kutcher M J, Overholser CD., 1991. *Effect on Aphthous Stomatitis. Literature review and open clinical trial employing steroids*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 74 : 79-86
- Mirowski GW, 2001. *Aphthous Stomatitis*. <http://www.emedicine.com/derm/topic486.htm>. Tanggal akses 28-02-2002
- Muller W A, 1999. Leucocyte-endothelial cell adhesion molecules in transendothelial migration. In (Gallin JI, Snyderman R Fearon DT, Hayner BF, Nathan C, eds). *Inflamation. Basic Principles and clinical correlated*. Third edition, Philadelphia : Lippincott William& Wilkins, pp. 585
- Multhoff G, Botzier C, Issel R, 1998. The Role of HSP in the Stimulation of an Immune Respons.*Biol Chem*, 379 (3) : 295-300

- Murray RK., Granner D K , Mayes P.A., Rodwell V W , 2000. Harper's Biochemistry. 25th edition. New York : Mc Graw-Hill, Heath professions Divisions.
- Natah SS, Hayrinen-Immonen R, Hiatanen I, Malmstrom M, 2000. Increased density of lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cells receptors in recurrent aphthous stomatitis. J.Oral maxillo Surg 29(5): 375-80
- Nisengard R J, Newman M G, 1994. Oral microbiology and Immunology.2nd ed. WB.Saunders Company.28: 5-11
- Ogawa H, Kazuyama, Hashiguchik K.1990. Detection of Herpes Simplex virus, Varicella Zoster virus and Cytomegali virus in Aphthous Stomatitis. Nippon Jibin Koka Goikki Kaiho 93 (6)p.920-924
- Ottaway CA, 1991. Neuroimmunomodulation in the intestinal mucosa. Gastroenterol Clitic North Am 20 :511-529
- Pederson A., 1993. Recurrent Aphthous Ulceration: Virological and immunological Aspects. APMIS. 101 (Suppl 57)p. 5-37
- Peter J H, Baumgarten H, 1989. Monoklonale Antibodi : Herstellung und charakterisierung, Springer-verlag.
- Piskin S, Sayan C, Durukam N, 2002. Serum Iron, Ferritin, Folic Acid and Vitamin B12 level in RAS. J.Eur Acad Dermatol Venerol 16(1):66-7
- Ponissawaranun W, Laohapand P, 1997. Epidemiologic study on Recurrent Aphthous Stomatitis in Thai dental Patients population. Community Dental Oral Epidemiol 19:52-3
- Rantam F A., 2003. Metode Immunologi. Airlangga University Press
- Rantam F A., Soetjipto., Dachlan Y P., 2000. Characterization of Envelope (E) protein of Dengue virus Indonesia isolate. Journal of Biol. Res(5) : 85-90
- Rees T D, Binnie W H, 1996. Recurrent Aphthous Stomatitis. Derm.Clinics.(14): 243-56
- Reyes VE, Ye G, Ogra PL, Garofalo R, 1997. Antigen Presentation of mucosal pathogens : The Players and the rules. International Arch Allergy Immunol, 12 : 1103-1114
- Roitt I, Brostoff J, male D, 1998. Cell Involved in Immune Responses. Dalam Roitt I, Brostof I, male D. Immunology 4 ed Mosby, 7.25-2.12

- Savage N W, Seymour J, Kruger B J, 1986. Expression of class I and class II major histocompatibility complex antigens on epithelial cells in recurrent aphthous stomatitis. *J.Oral Pathol*, 15(4) : 191-5
- Savage N W., and Seymour G J, 1994. Specific lymphocytotoxic destruction of autologous epithelial cells: targets in recurrent aphthous stomatitis. *Aust Dent J*,39(2) : 98-104
- Savage N.W., Verdickt G.M., Dodd N.M., 1992. Expression of the CD54 (ICAM-1) and CD11a (LFA-1) Adhesion Molecules in oral mucosal inflammation. *J.Oral Pathol Med*, 21(2) : 65-9
- Scully C., 2002. Aphthous Ulcers. *Med. jour*, 26 , vol 3 no 6, : pp. 1-19
- Scully C., Gorsky M., Lozada-Nur F., 2003. The Diagnosis and management of recurrent aphthous stomatitis a consensus approach. *J.Am Dent* , 134(2): 200-7
- Soemarijah S., 1985. Respon imun humoral terhadap *streptococcus sanguis*, pada *Recurrent Aphthous Stomatitis*. Disertasi . Universitas Airlangga, pp : 1-35
- Soames JV dan Southam,1998. *Oral Pathology* 3 nd ed, Oxford University Press. 212-8
- Soemariyah S, Sarsito AS,1992. Frekuensi Distribusi Penyakit Mulut di klinik Oral Medicine FKG Universitas Indonesia–Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo. Laporan Penelitian FKG UI
- Sonis S T., Fazio RC., Lang L., 1995. *Principle and Practice of Oral Medicine* 2nd ed. WB.Saunders Co.Philadelphia. London. Toronto. Montreal. Sydney, Tokyo. 346-348
- Soeparto P, Soedibjo EP, Soeroso J, 1998. *Epidemiologi Klinis*. GRAMIK FK.UNAIR
- Ship J A., 2001. Recurrent Aphthous Stomatitis. An update. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 81(2): 141-7
- Sigal LH, Ron Y, 1994. *Immunology and Inflammation*. Basic mechanism and clinical consequences. New York : MacGraw-Hill, Inc,pp.243-386
- Sistig S., Cekic Arambasin A., Rabatio S., Vucicevic Boras V., 2001. Natural immunity in recurrent aphthous ulceration. *Oral Pathol Med*, 30(5) pp: 275-80

- Sistig S, Vucicevic-Boras V, Lukac J, Kusic Z., 2002. Salivary IgA and IgG subclasses in Oral Mucosal Disease. *J.Oral Dis* 8(6) ; 282-6
- Steeber DA, Tedder TF, 1999. Molecular basis of lymphocyte migration. In (Gallin JI, Snyderman R Fearon DT, Hayner BF, Nathan C, eds). *Inflammation. Basic Principles and clinical correlated*. Third edition, Philadelphia : Lippincott William& Wilkins, pp. 593-605
- Stites DP, Terr AI, Parslow TG, 1997. *Medical Immunology*. 9 th ed.San Francisco. University of California p.63,138
- Sugiy-ikai N, Nakazawa M, Nakamura S, Minami M, 1998. Increased frequencies of interleukin-2 and interferon-gamma producing T cells in patients with active Behcet's disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39(6) : 996-1004
- Sun A., Chu CT, Wu Y C, Yuan J H, 1997. Mechanisms of depressed natural killer cell activity in recurrent aphthous ulcers. *Clin Immunopathol*, 60(1) pp : 83-92
- Sun A, Chu CT, Liu BY, Wang J ., Leu J S, 2000. Expression of interleukin-2 receptor by activated peripheral blood lymphocytes up regulated by the plasma level of interleukin-2 in patients with recurrent aphthous ulcers. *Proc Nat Sci Coune Repub China B*, 24(3) pp: 116-22
- Suryohudoyo P, 2000. *Ilmu Kedokteran Molekuler*. Cetakaan Pertama, Jakarta : CV Sagung Seto, hlm 31-47
- Syvalahti E, 1986. Psychoendocrine and Immune system in Depression and Stress dalam *Stress and Psychosomatic*. Ed oleh Achte Kalle dan Pakaslahti Anti, *Psychiatria Fennica Supplementum*,97-114
- Turner M,1998. *Antibodies and their Receptors*, in Roitt I, Brostoff J, Male D, *Immunology* 5 th ed., Mosby International Ltd, London; 71-82
- Tydesley W .,2004. *Oral Medicine*.5nd.ed. Oxford University Press. pp : 45-47
- Vicente M, Soria A, Mosquera A.,1996. Immunoglobulin G subclass Measurements in recurrent aphthous stomatitis. *J.Oral Pathol med*, 25(10) : 538-40
- Vincent S D, Lily G E, 1992. Clinical, historic, and therapeutic of aphthous stomatitis. Literature review and open clinical trial employing steroids. *OSOMOP* (74): 79-86
- Westhof and Tainer, 1984. *Choosing the epitope; Antigen vs Immunogen dalam Antibodies : practical Guide*.<http://www.pebio.com>.PE. Biosystem.

- Wray D, Graykowski E A, Abner Louis Notkins, 1992. Role of mucosal injury in initiating Recurrent Aphthous Stomatitis. *British Med Jour*,143
- Wray D,Cs,1999. *Textbook of General and Oral Medicine* 1st ed. Churchill livingstone, 169-170
- Xiang X, Liu J, Li H, 2000. Cytomegali virus infection and the changes of T lymphocyte subsets in RAU patients, *Zhonghua kou qiang Yi Xue za Zhi* 35(3) :212-214
- Zian R B, 2000. Oral Recurent Aphthous Ulcers/Stomatitis : Prevalence in Malaysia and an Epidemiological Update. *J.Oral Sci*, 42(1) : 15-9



Lampiran 1 :

Data Klinis Penderita Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS)

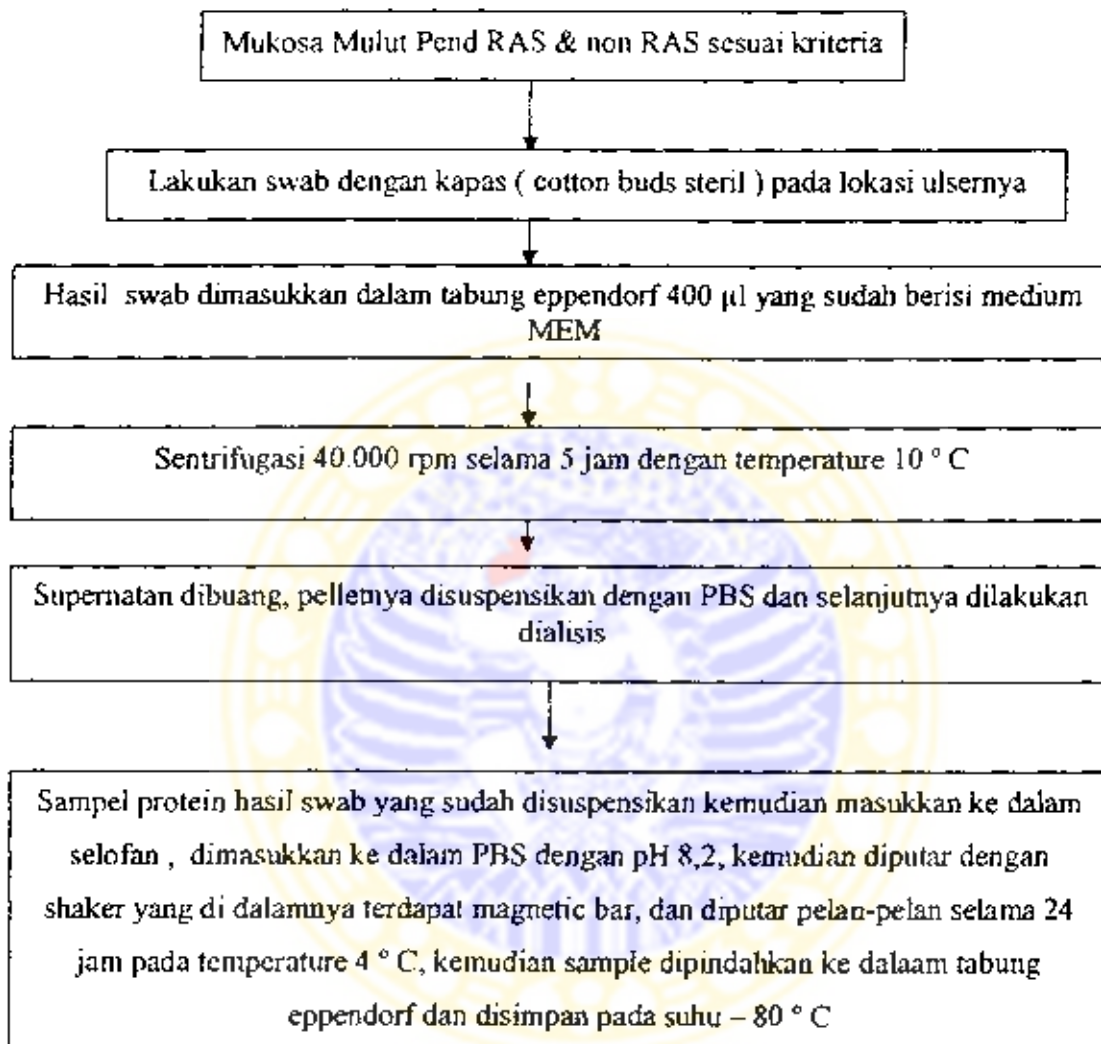
NO	No. Reg	Umur	Seks	Diagnosa klinis	Tipe RAS	Faktor Pemicu	Frek.kambuh	Waktu sembuh	Lama Menderita RAS
1	D5376	20	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	12 hari	7 tahun
2	D5373	20	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	10 hari	5 tahun
3	D5375	19	w	RAS	1	1	4 kali/tahun	12 hari	6 tahun
4	D5463	19	w	RAS	1	1	12 kali/tahun	10 hari	5 tahun
5	D5403	19	w	RAS	1	2	4 kali/tahun	10 hari	7 tahun
6	D5436	47	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	7 hari	10 tahun
7	D5536	20	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	10 hari	5 tahun
8	D5853	21	p	RAS	1	2	4 kali/tahun	7 hari	5 tahun
9	D5014	20	p	RAS	1	1	5 kali/tahun	10 hari	7 tahun
10	D5897	20	p	RAS	1	2	4 kali/tahun	7 hari	5 tahun
11	D5542	20	p	RAS	1	1	6 kali/tahun	12 hari	3 tahun
12	D5579	20	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	10 hari	3 tahun
13	D5623	10	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	7 hari	2 tahun
14	D5592	20	w	RAS	1	4	12 kali/tahun	7 hari	5 tahun
15	D5628	30	p	RAS	1	1	4 kali/tahun	10 hari	5 tahun
16	D5657	19	p	RAS	1	1	6 kali/tahun	12hari	3 tahun
17	D5649	21	p	RAS	1	1	6 kali/tahun	10 hari	4 tahun
18	D6712	52	p	RAS	1	1	4 kali/tahun	14 hari	10 tahun
19	D6748	20	w	RAS	1	1	12 kali/tahun	10 hri	4 tahun
20	D5822	19	w	RAS	1	1	6 kali/tahun	8 hari	4 tahun
21	D4373	20	w	RAS	2	1	6 kali/tahun	14 hari	2 tahun
22	D4375	20	w	RAS	2	1	8 kali/tahun	16 hari	1 tahun
23	D4463	19	w	RAS	2	1	6 kali/tahun	14 hari	2 tahun
24	D4403	19	w	RAS	2	1	12 kali/tahun	12 hari	4 tahun
25	D4376	19	w	RAS	2	2	6 kali/tahun	14 hari	3 tahun
26	D4436	20	w	RAS	2	1	6 kali/tahun	12 hari	4 tahun
27	D4566	21	w	RAS	2	1	8 kali/tahun	14 hari	3 tahun
28	D4883	21	p	RAS	2	2	4 kali/tahun	16 hari	2 tahun
29	D4014	31	p	RAS	2	1	6 kali/tahun	15 hari	3 tahun
30	D5897	20	p	RAS	2	1	6 kali/tahun	12 hri	2 tahun
31	D5542	20	p	RAS	2	1	4 kali/tahun	17 hari	3 tahun
32	D5579	20	w	RAS	2	1	4 kali/tahun	15 hari	4 tahun
33	D5623	35	w	RAS	2	1	6 kali/tahun	14 hari	5 tahun
34	D5592	20	w	RAS	2	1	6 kali/tahun	15 hari	5 tahun
35	D5628	30	p	RAS	2	1	4 kali/tahun	14 hari	4 tahun

NO	No. Reg	Umur	Seks	Diagnosa klinis	Tipe RAS	Faktor Pemicu	Frek.kekambuhan	Waktu sembuh	Lama menderita RAS
36	R5403	19	w	RAS	3	2	4 kali/tahun	10 hari	7 tahun
37	R5436	47	w	RAS	3	1	6 kali/tahun	7 hari	18 tahun
38	R5536	20	w	RAS	3	1	6 kali/tahun	10 hari	5 tahun
39	R5853	21	p	RAS	3	2	4 kali/tahun	7hari	5 tahun
40	R4463	19	w	RAS	3	1	6 kali/tahun	14 hari	2 tahun
41	R4403	19	w	RAS	3	1	12 kali/tahun	12 hari	4 tahun
42	R4376	19	w	RAS	3	2	6 kali/tahun	14 hari	3 tahun
43	R5623	10	w	RAS	3	1	6 kali/tahun	7 hari	2 tahun
44	R5592	20	w	RAS	3	4	12 kali/tahun	7 hari	5 tahun
45	R5628	30	p	RAS	3	1	4 kali/tahun	10 hari	5 tahun
46	R5657	19	p	RAS	3	1	6 kali/tahun	12hari	3 tahun
47	R5649	21	p	RAS	3	1	6 kali/tahun	10 hari	4 tahun
48	R5712	52	p	RAS	3	1	4 kali/tahun	14 hari	10 tahun
49	R6748	20	w	RAS	3	1	12 kali/tahun	10 hri	4 tahun
50	R5822	19	w	RAS	3	1	6 kali/tahun	8 hari	4 tahun
51	D6860	20	w	N					
52	D6851	25	w	N					
53	D7745	23	w	N					
54	D6327	25	w	N					
55	D6897	22	w	N					
56	D5194	21	p	N					
57	D5843	23	P	N					
58	D5194	22	w	N					
59	D6434	21	w	N					
60	D6735	27	P	N					
61	D6432	29	P	N					
62	D6624	24	P	N					
63	D6841	27	w	N					
64	D6454	29	P	N					
65	D6571	24	w	N					

Keterangan : Tipe RAS : 1 = minor; 2 = mayor; 3 = remis. N = normal/kontrol

Faktor Pemicu : 1 = tidak tahu; 2 = trauma; 3 = stress; 4 = hormonal; 5 = genetik.

Frekuensi kekambuhan : 1 = 3 kali/tahun; 2 = 4 kali/tahun; 3 = 5 kali/tahun; 4 = 6 kali/tahun; 5 = 12 kali/tahun

Lampiran 2 : Prosedur Pengumpulan sampel Protein Mukosa mulut

Lampiran 3 : Cara Kerja SDS – PAGE 12 %

1. Siapkan semua bahan yang diperlukan :

- Acrilamid
- Tris HCl pH 8,8
- Tris HCl pH 6,8
- SDS 0,5 %
- Aquades
- Temed
- APS 10 %, 4 ° C
- E Buffer
- Methanol 50 %
- Methanol 5 %
- Acetic Acid / Asam asetat 7,5 %
- Glutaral Dehide 10 %
- NaOH 0,36%
- NH₃
- AgNO₃
- Formaldehide
- Zitronensoure 5 %
- Butanol

2. Membuat Running Gel 12 %

Bahan :

- | | |
|-------------------|--------|
| - Acrilamid | 2,5 ml |
| - Tris HCl pH 8,8 | 1,2 ml |
| - SDS 0,5 % | 1,2 ml |
| - Aquades | 1,1 ml |
| - Temed | 5,0 ml |
| - APS 10 % | 30 ml |

3. Masukkan lewat dinding kaca sampai dengan 1 cm dari atas.

4. Tambahkan butanol sampai penuh di atasnya

5. Membuat Stacking Gel

Bahan :

- | | |
|-------------------|----------|
| - Acrilamid | 0,66 ml |
| - Tris HCl pH 8,8 | 0,8 ml |
| - SDS 0,5 % | 0,8 ml |
| - Aquades | 0,88 ml |
| - Temed | 4,00 µl |
| - APS 10 % | 20,00 µl |

1. Masukkan ke atas cetakan Running Gel sampai penuh kemudian masukkan comb ke stacking gel dan inkubasi sekama 25 menit
2. Siapkan sample (Laemmli Buffer + Sampel), masukkan ke dalam ependorf dan tutup ependorf ditusuk dengan jarum $\frac{1}{2}$ tusukan, langsung rebus dengan suhu 100° C selama 5 menit.
3. Setelah inkubasi selesai, lepaskan *comb* dan cuci dengan E Buffer 1 kali
4. Masukkan cetakan tadi ke Bio Rad
5. Tuangi dengan E Buffer 1 kali (kira-kira 800 ml)
6. Masukkan sample ke dalam lubang *comb* tadi dan hilangkan gelembung udara yang ada dengan jarum.
7. Pasang listrik dengan tegangan 125 V dan arus 40 mA
8. Tunggu sampai sample turun seluruhnya
9. Matikan listrik dan lepas agar secara perlahan
10. Masukkan ke petridish yang telah diberikan larutan pencucian
11. Tahap pencucian :
- 12.

Pencucian I :

- Methanol 25 ml
- Asam asetat 3,75 ml
- Aquades 71,25 ml

Agar yang terdapat dalam petridish digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

Pencucian II :

- Methanol 25 ml
- Asam asetat 3,75 ml
- Aquades 93,75 ml

Agar yang terdapat dalam petridish digoyang dengan kecepatan 42 selama 30 menit

Pencucian III :

- Glutaraldehide 10 %
- Glutaraldehide 10 %
- Aquades 90 ml

Pencucian IV :

- ❖ Pencucian dengan aquades @ 100 ml 3 X selama 30 menit

17. Tahap pewarnaan :

Timbang AgNO_3 0,8 g + 4 ml DW, campur dan masukkan ke dalam larutan yang terdiri dari :

NaOH 21 ml

NH_3 1,4 ml

Aquades 73,5 ml

Masukkan ke dalam petridish dan digoyang dengan kecepatan 42 selama 15 menit, kemudian buang.

18. Cuci dengan aquadest @ 100 ml dua kali selama 2 menit

19. Masukkan pengembang warna yang terdiri dari :

Formaldehyde 3,7 % 50 μl

Zitronensoure 5 % 100 μl

Aquades 100 ml

20. Masukkan stop reaksi dengan acetic acid 10 %

21. Cuci dengan aquades @ 100 ml dua kali selama 2 menit

22. Beri Gliserol 10 %

Gliserol 10 ml

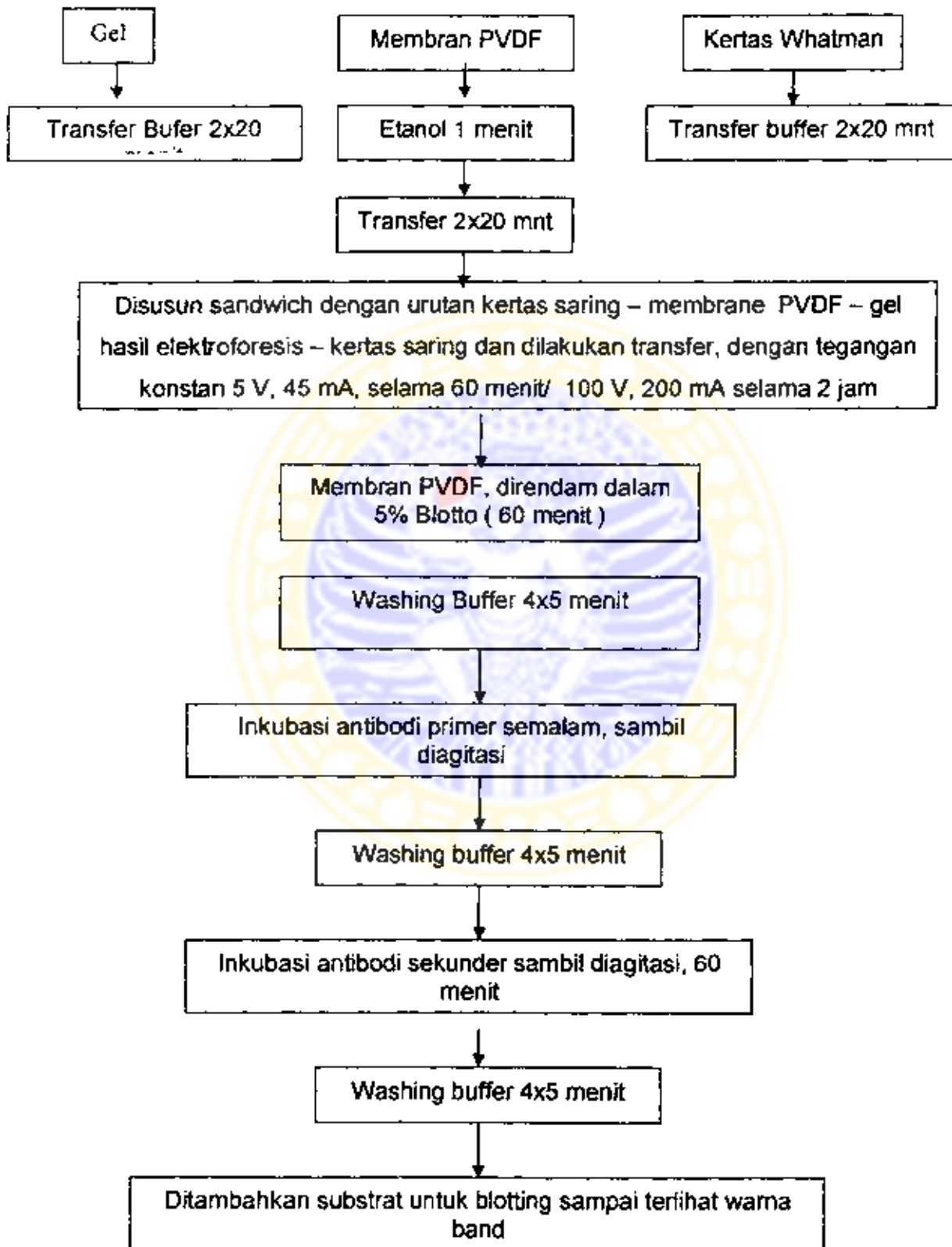
Lampiran 4 :**Elusi Protein Mukosa Mulut Penderita RAS**

- Prinsip kerja memisahkan protein
- SDS-PAGE hanya sampai running saja tanpa pewarnaan
- Potongan gel tadi dimasukkan ke dalam selofan yang panjangnya 100 cm
- Lalu buka kantung selofan, kalau sulit celupkan dengan PBS ujung selofan agar bisa dibuka
- Setelah selesai ikat bawah selofan dengan benang dan masukkan potongan gel tadi (sebaiknya tidak boleh melengkung
- Lalu tambahkan PBS 1x sebanyak 2 ml
- Ikat ujung atas dengan tali
- Masukkan ke dalam elektroforesa yang telah diisi dengan E-buffer sampai kira-kira 1 cm dari atas
- Letakkan secara melintang dari katoda ke anoda
 - Nyalakan runningnya 150 volt dan 40 mA kira-kira 1,5-2 jam
 - Cairan yang ada dalam selofan tadi diambil dan masukkan dalam tube eppendorf dan simpan -70°C , sampai digunakan untuk penelitian.

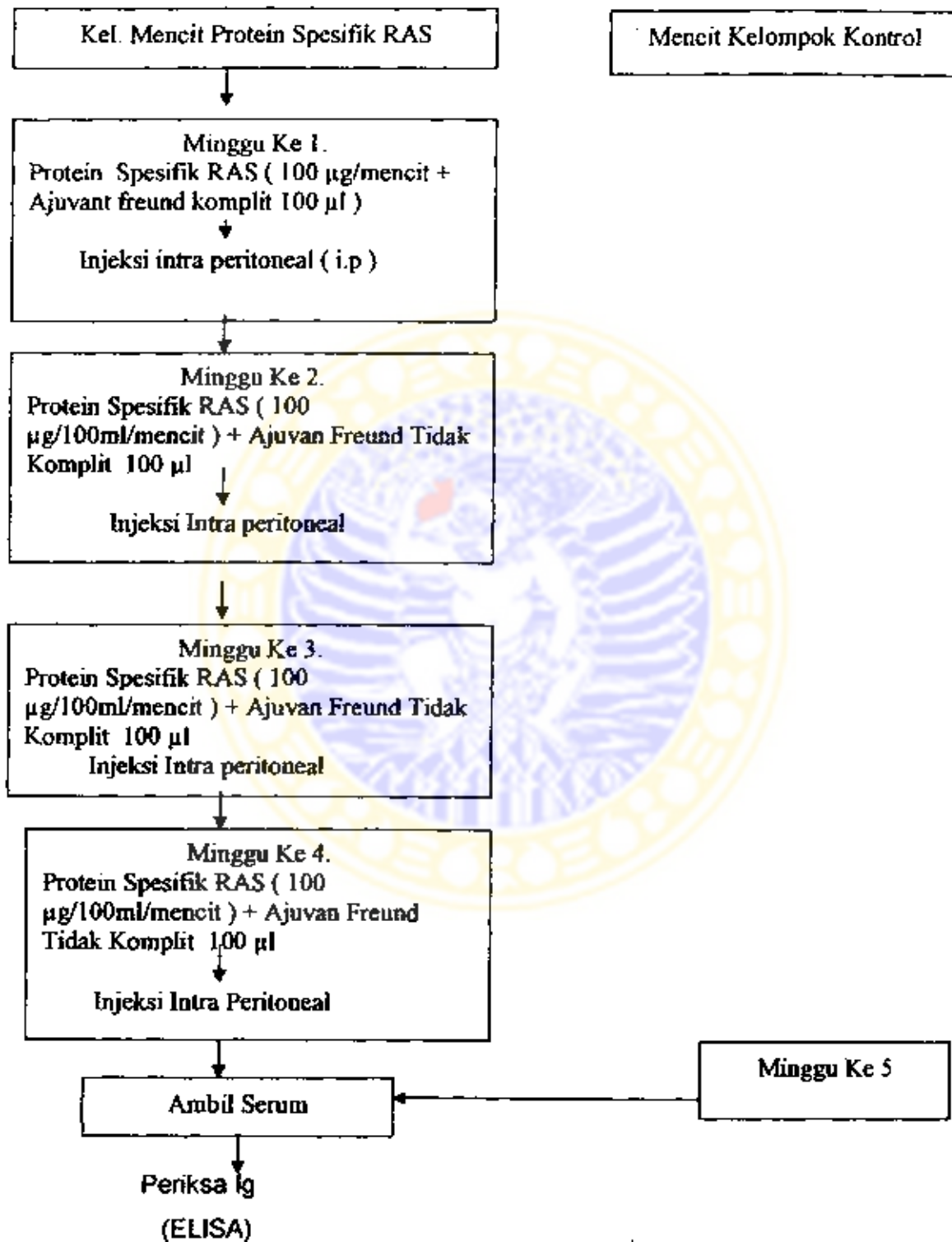
Dialisis Protein Mukosa Mulut Penderita RAS

- ✚ Tujuan Dialisis adalah untuk mencuci protein yang sudah di Elusi, supaya bahan-bahan yang toksik dapat terlepas dari protein tersebut dan diganti dengan cairan yang fisiologis.
- ✚ Cara : Protein mukosa mulut penderita RAS yang sudah di elusi (sebanyak 7 ml) di masukkan ke dalam selofan, kemudian ke dua ujung-ujungnya diikat dengan bali, kemudian dimasukkan ke dalam baker glass yang sudah diisi dengan cairan PBS sebanyak 500 ml, pada dasar baker glas diberi *magnetic bar*. Kemudian protein yang ada dalam selofan dipusingkan/digoyang-goyang sampai terendam di dalam PBS secara perlahan-lahan. Selofan tadi digoyang selama 24 jam pada suhu 4°C . Setelah 24 jam protein tersebut dimasukkan dalam tabung eppendorf (sebanyak 1 ml), untuk kemudian dilakukan pemeriksaan spektrofotometri.

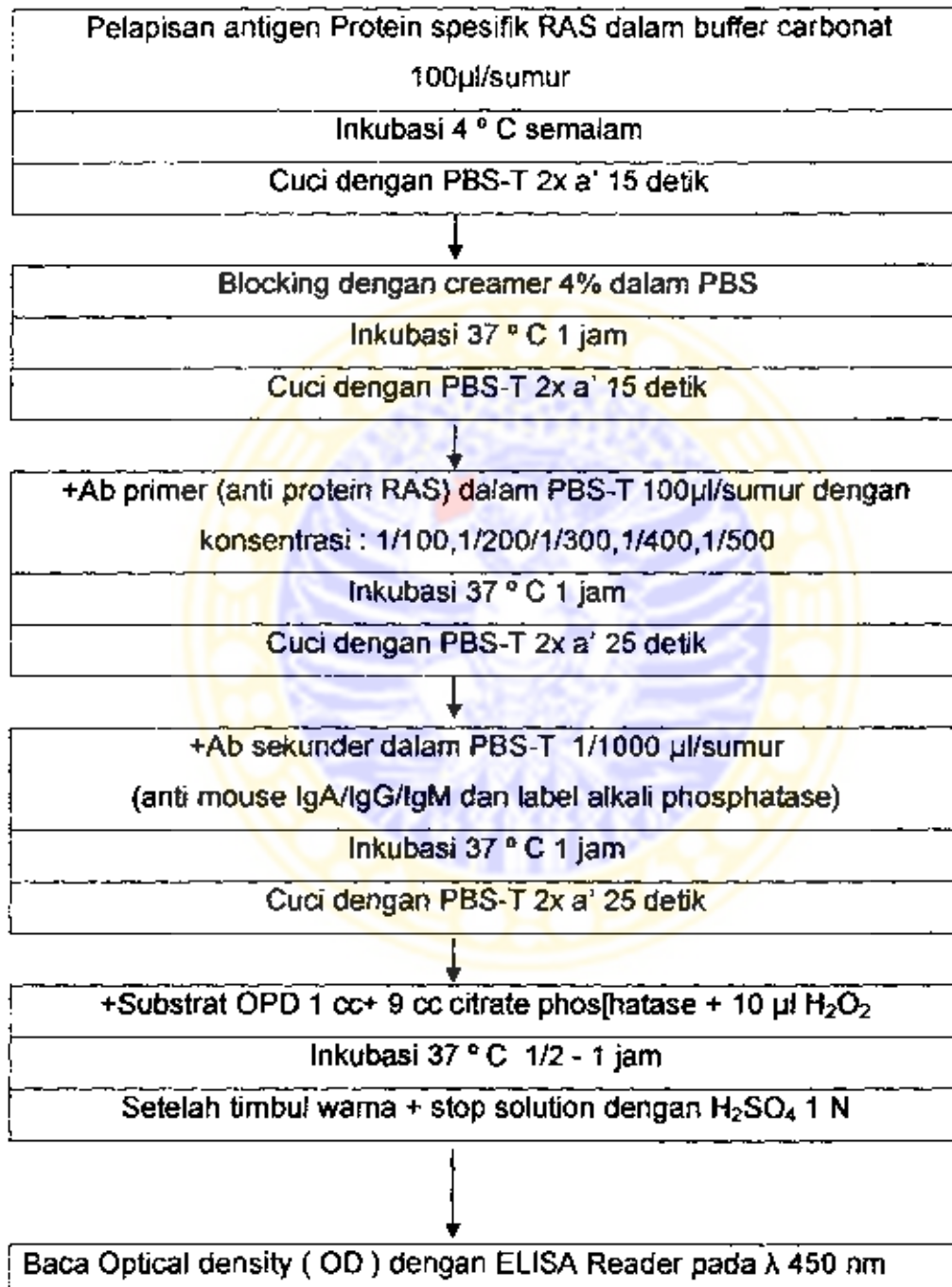
Lampiran 5 : Uji Western Blot terhadap Protein RAS dengan anti RAS



Lampiran 6 : Prosedur Uji Immunogenitas Protein 65 kDa Spesifik RAS



Lampiran 7 : Skema Prosedur ELISA (Untuk Mengetahui Immunogenitas Protein Spesifik RAS)



Lampiran 8 : Prosedur Kerja Native Immunofluoresen (Sel Limfosit)

Bahan : Konjugat anti mice, sel limfosit mencit (mencit yang sudah diimunisasi dengan Protein 65 kDa spesifik RAS). Antigen protein 65 kDa spesifik RAS, Deckglass, Objek glas, Aceton, Feotal Calf Serum (FCS), PBS. Pinset, Gelas incubator, Kotak incubator, incubator 37 ° C, konjugat fragmen immunoglobulin, mikroskop fluoresen,

Preparasi Limfosit

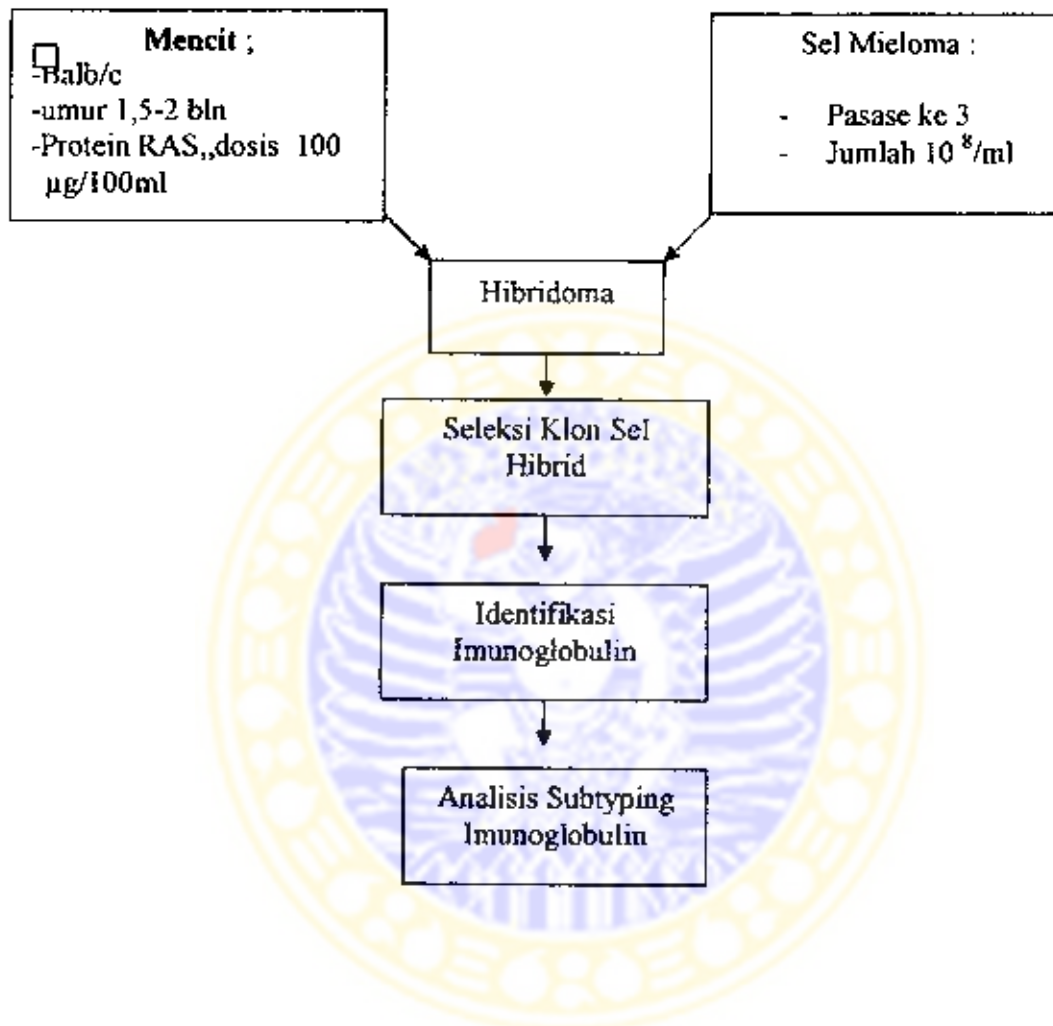
1. Ambil darah dari ekor mencit yang sudah diimunisasi dengan protein 65 kDa spesifik RAS
2. Tampung dalam eppendorf yang mengandung 1,5 ml EDTA
3. Sentrifuse dengan kecepatan 1600 rpm selama 5 menit
4. Cuci dengan PBS/ medium MEM sampai bersih (3x)
5. Tuangkan eritrosit diatas ficoll
6. Sentrifuse 1600 rpm selama 5 menit
7. Band putih pisahkan pada eppendorf
8. Cuci dengan PBS 2x kemudian sentrifus 1600 rpm selama 5 menit.
9. Ambil pelletnya/ sel limfositnya
10. tambahkan conjugate FITC anti mice
11. Inkubasi pada 37 ° C selama 1 jam
12. Teteskan pada objek glas kemudian dapat dilihat dibawah mikroskop

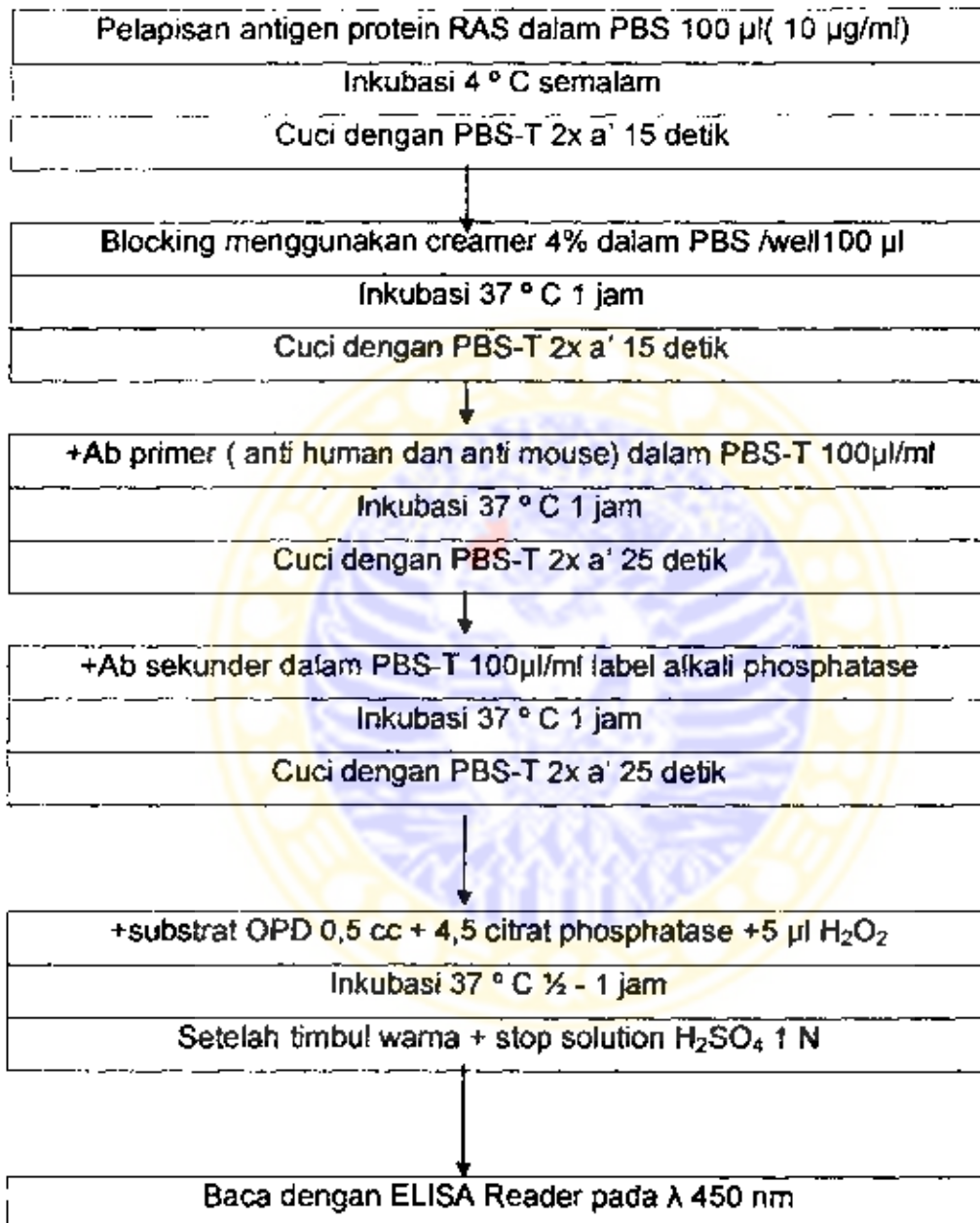
Native Immunofluoresen (serum penderita RAS)**Bahan yang disiapkan :**

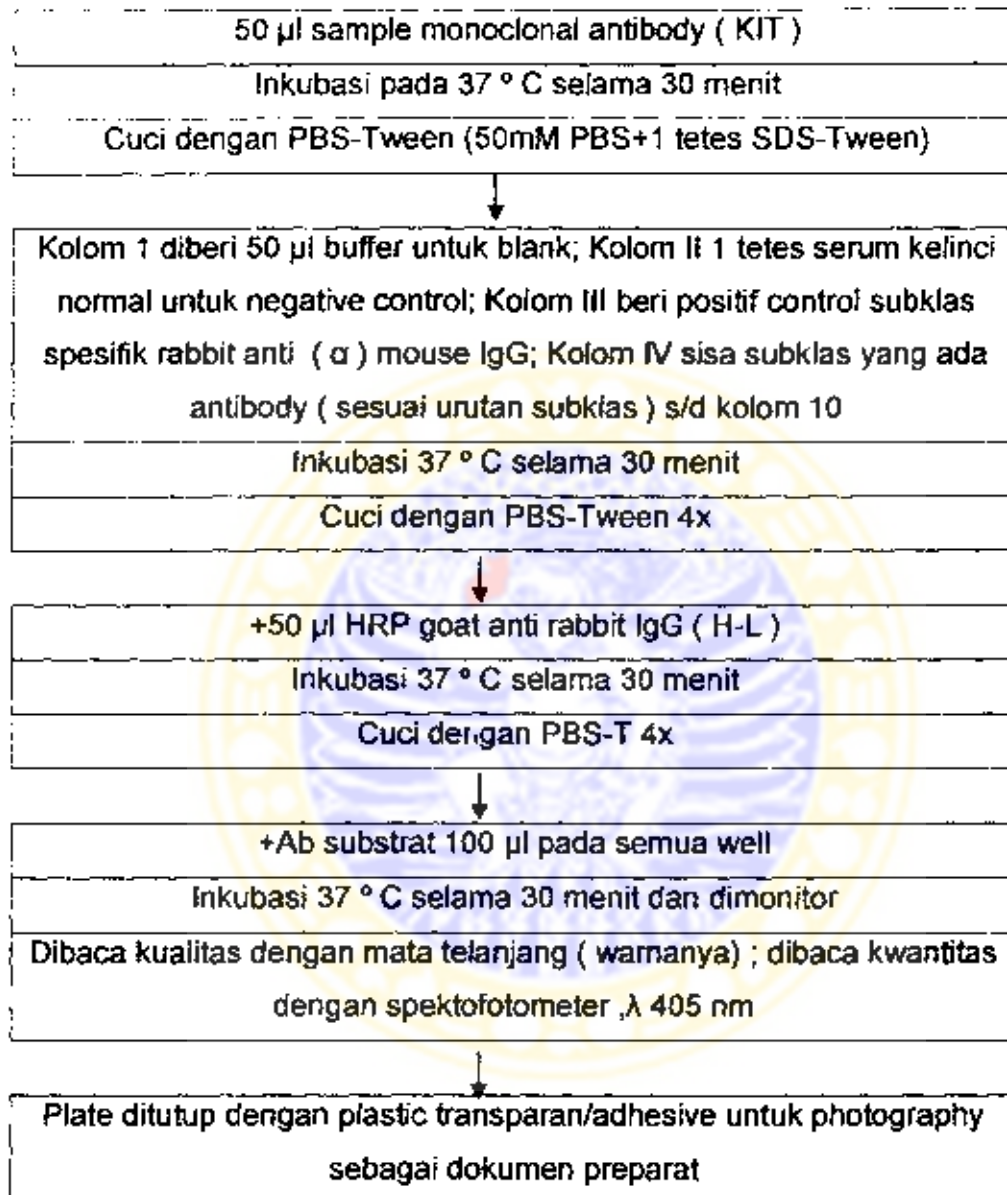
Serum penderita RAS (serum anti RAS). Protein 65 kDa spesifik RAS, Konjugat α human (konjugat anti human), Deckglass, Objek glas, Aceton, Feotal Calf Serum (FCS), PBS. Pinset, Gelas incubator, Kotak incubator, incubator 37 ° C, mikroskop fluoresen,

Cara :

1. Protein 65 kda spesifik RAS + serum penderita RAS (perbandingan 1:1)
2. Per sampel serum 20 μ l ditambahkan 20 μ l protein RAS, masukkan tabung eppendorf kemudian dilakukan konjugasi.
3. Inkubasi pada 37 ° c selama 1 jam
4. Sentrifuge 9000 rpm selama 5 menit, supernatant dibuang ambil pelletnya
5. Tambahkan conjugate FITC anti human
6. Inkubasikan pada 37 ° c selama 1 jam
7. Teteskan pada objek glas dan lihat dibawah mikroskop

Lampiran 9 : Tahapan Produksi Antibodi Monoklonal

Lampiran 10 : Skema Prosedur ELISA (Deteksi Produk Immunoglobulin dari Kultur Sel Hibrid)

Lampiran 11 : Prosedur ELISA Antibodi Anti Subtipe

Lampiran 12 : Uji ELISA Spesifisitas Antibodi Monoklonal



Lampiran 13 : Titer subklas Imunoglobulin produk sel Hibrid dan serum penderit RAS

Tabel I. 13.1.

Titer Imunoglobulin subklas Hasil Hibridisasi (Supernatan Produk Sel Hibrid)

SEL HIBRID	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	K- chain	Λ- chain	Kontrol
P- 1	1,317	1,588	1,222	0,945	1,371	0,79	1,587	0,483	0,06
P- 2	0,39	1,468	0,817	0,809	1,000	0,693	1,339	0,273	0,058
P- 3	0,271	0,537	0,806	0,694	0,872	0,275	1,228	0,180	0,059
P- 4	0,115	0,415	0,096	0,261	0,138	0,027	0,464	0,072	0,067
P- 5	0,026	0,096	0,028	0,183	0,069	0,012	0,255	0,06	0,057
P- 6	0,019	0,079	0,014	0,173	0,028	0,009	0,213	0,057	0,06

Tabel I. 13.2. Titer Imunoglobulin subklas serum penderit RAS

Serum pend.RAS	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	K- chain	Λ- chain	K
P- 1	0,500	0,993	0,618	0,153	0,749	0,125	0,682	0,136	0,06
P- 2	0,490	0,978	0,599	0,150	0,724	0,123	0,680	0,130	0,058
P- 3	0,489	0,879	0,595	0,143	0,699	0,117	0,678	0,127	0,06
P- 4	0,390	0,850	0,460	0,120	0,689	0,110	0,630	0,103	0,057
P- 5	0,35	0,750	0,300	0,109	0,670	0,103	0,057	0,099	0,054

Lampiran 14

Contoh Hasil Perhitungan Berat Molekul Protein Antigen Mukosa mulut RAS dengan tehnik SDS-PAGE

PP* ke	Jarak pada gel	Nilai Rf	Y**Da(Regressi linear)	Antilog(Y)	B.M
1	7 mm	0,1	1,943	87,096	87
2	13 mm	0,185	1,876	75,162	75
3	25 mm	0,351	1,816	65,463	65
4	40mm	0,523	1,102	30,104	30
5	43 mm	0,614	1,404	25,351	25
6	47mm	0,813	0,904	20,231	20

PP=pita protein, **Persamaan regresi: $y=5,216-1,139.x$, dimana x = nilai Rf

Lampiran 15 :

Hasil Uji Elisa pada sekresi sel hibrid yang mengekspresikan Immunoglobulin dengan titer tinggi (OD : 0,061, λ : 450nm)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		1,322	0,086			0,104						1,384
B		0,091	0,089	0,089	0,091	0,098	0,094		0,087	0,098	0,591	0,791
C						0,089	0,089		0,089	0,088		0,726
D			0,093	0,088	0,088	0,098	0,104	0,089				0,936
E		0,087	0,087			0,097	0,109		0,108		1,151	
F										0,092	0,679	
G			1,377					0,089	0,097		1,548	
H											1,151	

Lampiran 16

Titer Antibodi Serum Kelinci sebelum dan sesudah diimunisasi dengan Protein (whole protein RAS) dengan Uji ELISA dengan absorbansi pada 405 nm

Kelinci	Titer antibodi sebelum imunisasi	Titer antibodi sesudah imunisasi
1	0,022	0,104
2	0,050	0,098
3	0,070	0,109
4	0,057	0,0987
5	0,061	0,099
6	0,080	0,105

Catatan :

Kontrol Positif adalah Titer yang paling tinggi yang dipakai pada serum kelinci yang telah diimunisasi dengan protein RAS (whole protein dari RAS mayor, minor dan remisi). Dengan pengenceran 1:2560 didapat nilai absorben sebesar 0,104.

Lampiran 17

Profil subklas IgG2a pada serum penderita RAS mayor dan Minor dengan Uji

ELISA dengan absorbansi 405 nm

Minor

Mayor

Px	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM
1	0,567	0,813	0,619	0,573	0,749	0,401	0,569	0,908	0,621	0,584	0,751	0,410
2	0,515	1,114	0,574	0,565	0,683	0,398	0,520	0,120	0,590	0,570	0,690	0,400
3	0,595	1,118	0,592	0,614	0,721	0,391	0,601	1,216	0,600	0,617	0,725	0,410
4	0,519	0,917	0,681	0,549	0,697	0,401	0,520	0,976	0,700	0,550	0,697	0,411
5	0,613	0,827	0,638	0,515	0,661	0,405	0,620	0,947	0,710	0,520	0,601	0,415
6	0,525	0,897	0,597	0,501	0,525	0,500	0,540	0,890	0,610	0,510	0,525	0,500
7	0,540	0,916	0,614	0,601	0,615	0,498	0,547	0,945	0,650	0,610	0,615	0,498
8	0,587	0,876	0,580	0,510	0,535	0,485	0,590	1,101	0,595	0,510	0,535	0,489
9	0,610	0,938	0,565	0,498	0,520	0,501	0,620	0,950	0,565	0,491	0,520	0,501
10	0,499	0,911	0,510	0,500	0,540	0,420	0,500	0,918	0,525	0,501	0,545	0,420
11	0,450	0,980	0,505	0,492	0,510	0,398	0,457	0,878	0,498	0,505	0,515	0,400
12	0,427	0,914	0,490	0,430	0,570	0,417	0,440	0,779	0,497	0,425	0,580	0,419
13	0,515	0,821	0,497	0,421	0,525	0,410	0,520	0,750	0,501	0,525	0,530	0,420
14	0,490	0,993	0,501	0,500	0,515	0,425	0,495	0,850	0,491	0,490	0,527	0,400
15	0,616	0,791	0,480	0,475	0,525	0,389	0,620	0,890	0,427	0,420	0,480	0,420
16	0,580	0,661	0,425	0,415	0,474	0,415						
17	0,620	0,701	0,685	0,617	0,681	0,390						
18	0,510	0,814	0,618	0,610	0,625	0,413						
19	0,671	0,817	0,489	0,481	0,585	0,420						
20	0,518	0,971	0,515	0,500	0,575	0,410						

Profil subklas IgG2a pada serum penderita Kontrol dan Remisi dengan Uji

ELISA dengan absorbansi 405 nm

Px	Remisi						Kontrol					
	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3	IgA	IgM
1	0,515	0,779	0,585	0,560	0,678	0,401	0,439	0,781	0,501	0,401	0,601	0,301
2	0,518	0,980	0,573	0,510	0,695	0,418	0,500	0,808	0,504	0,411	0,535	0,368
3	0,548	1,101	0,675	0,526	0,710	0,450	0,421	0,639	0,509	0,401	0,526	0,401
4	0,502	0,831	0,614	0,491	0,617	0,400	0,441	0,797	0,515	0,317	0,516	0,396
5	0,483	0,718	0,671	0,401	0,660	0,401	0,418	0,517	0,616	0,397	0,525	0,401
6	0,435	0,618	0,531	0,417	0,618	0,425	0,410	0,616	0,510	0,360	0,516	0,399
7	0,410	0,705	0,434	0,491	0,670	0,400	0,341	0,518	0,515	0,401	0,497	0,401
8	0,505	0,650	0,485	0,400	0,590	0,451	0,501	0,610	0,475	0,395	0,510	0,398
9	0,531	0,730	0,510	0,375	0,475	0,390	0,488	0,518	0,410	0,325	0,417	0,330
10	0,538	0,695	0,525	0,428	0,601	0,425	0,416	0,660	0,510	0,417	0,601	0,401
11	0,434	0,745	0,565	0,528	0,610	0,525	0,415	0,701	0,517	0,491	0,609	0,490
12	0,518	0,827	0,475	0,475	0,789	0,410	0,339	0,818	0,498	0,418	0,780	0,400
13	0,445	0,801	0,488	0,400	0,650	0,395	0,491	0,767	0,404	0,321	0,617	0,360
14	0,405	0,817	0,515	0,375	0,770	0,415	0,369	0,791	0,491	0,438	0,740	0,401
15	0,515	0,818	0,491	0,471	0,750	0,375	0,355	0,891	0,440	0,360	0,749	0,308



Profil subklas IgG2a terhadap whole protein dan protein Elusi penderita RAS dan Kontrol dengan uji ELISA menggunakan λ 405 nm

Whole Protein					Protein Elusi			
NO	N	My	Mi	R	N	My	Mi	R
1	0,088	0,132	0,056	0,096	0,097	0,162	0,110	0,107
2	0,070	0,162	0,048	0,130	0,089	0,172	0,120	0,132
3	0,091	0,168	0,100	0,114	0,101	0,177	0,108	0,117
4	0,102	0,216	0,146	0,102	0,098	0,210	0,155	0,106
5	0,098	0,282	0,096	0,118	0,099	0,290	0,102	0,125
6	0,089	0,100	0,120	0,109	0,100	0,110	0,129	0,111
7	0,094	0,092	0,186	0,094	0,103	0,104	0,190	0,104
8	0,103	0,102	0,120	0,092	0,124	0,107	0,130	0,102
9	0,095	0,108	0,104	0,104	0,096	0,115	0,110	0,105
10	0,105	0,120	0,116	0,116	0,110	0,123	0,120	0,120
11	0,100	0,128	0,118	0,098	0,097	0,128	0,119	0,103
12	0,076	0,126	0,122	0,122	0,010	0,153	0,125	0,132
13	0,150	0,120	0,118	0,096	0,103	0,145	0,132	0,100
14	0,088	0,122	0,152	0,123	0,095	0,144	0,160	0,128
15	0,068	0,108	0,042	0,108	0,098	0,130	0,098	0,117
16			0,096				0,105	
17			0,130				0,143	
18			0,162				0,176	
19			0,148				0,150	
20			0,130				0,152	

Hasil ELISA Profil subklas IgGA terhadap whole protein dan protein Elusi penderita RAS dan Kontrol dengan menggunakan λ 405 nm

No Px	Whole Protein				Protein elusi			
	Nor	Mayor	Minor	Remisi	Normal	mayor	Minor	Remisi
1	0,086	0,106	0,116	0,104	0,099	0,109	0,120	0,105
2	0,096	0,148	0,135	0,110	0,098	0,150	0,140	0,113
3	0,103	0,084	0,082	0,077	0,112	0,104	0,104	0,088
4	0,102	0,171	0,171	0,162	0,103	0,181	0,180	0,165
5	0,068	0,120	0,118	0,113	0,098	0,130	0,120	0,115
6	0,081	0,075	0,075	0,067	0,089	0,098	0,098	0,076
7	0,102	0,114	0,110	0,104	0,103	0,120	0,125	0,106
8	0,101	0,120	0,115	0,107	0,104	0,130	0,120	0,109
9	0,110	0,114	0,110	0,104	0,105	0,119	0,115	0,109
10	0,099	0,098	0,088	0,067	0,100	0,110	0,098	0,066
11	0,072	0,096	0,078	0,069	0,093	0,108	0,096	0,088
12	0,102	0,118	0,112	0,110	0,103	0,137	0,120	0,119
13	0,097	0,120	0,117	0,113	0,099	0,132	0,121	0,123
14	0,086	0,123	0,120	0,117	0,097	0,142	0,126	0,119
15	0,095	0,154	0,148	0,138	0,099	0,174	0,154	0,140
16			0,122				0,132	
17			0,112				0,130	
18			0,110				0,116	
19			0,123				0,130	
20			0,106				0,127	

Hasil ELISA Profil subklas IgG3 terhadap whole protein dan protein Elusi penderita RAS dan Kontrol dengan menggunakan λ 405 nm

Whole Protein

Protein Elusi

No Px	Normal	Mayor	Minor	Remisi	Normal	mayor	Minor	Remisi
1	0,037	0,108	0,107	0,101	0,089	0,109	0,117	0,108
2	0,060	0,110	0,110	0,106	0,078	0,118	0,135	0,113
3	0,057	0,067	0,090	0,089	0,101	0,104	0,100	0,090
4	0,069	0,117	0,121	0,150	0,095	0,137	0,173	0,161
5	0,079	0,120	0,105	0,105	0,085	0,126	0,118	0,110
6	0,081	0,089	0,078	0,088	0,101	0,099	0,099	0,102
7	0,089	0,109	0,105	0,100	0,104	0,116	0,115	0,118
8	0,087	0,107	0,104	0,104	0,101	0,120	0,119	0,110
9	0,061	0,110	0,108	0,098	0,099	0,109	0,110	0,100
10	0,071	0,101	0,099	0,066	0,059	0,107	0,105	0,098
11	0,060	0,159	0,131	0,072	0,099	0,106	0,120	0,089
12	0,087	0,127	0,118	0,109	0,098	0,120	0,105	0,106
13	0,089	0,121	0,108	0,101	0,100	0,117	0,104	0,105
14	0,071	0,126	0,105	0,111	0,089	0,132	0,110	0,121
15	0,091	0,118	0,103	0,120	0,098	0,158	0,120	0,139
16			0,116				0,119	
17			0,106				0,117	
18			0,108				0,119	
19			0,117				0,120	
20			0,129				0,131	

Hasil ELISA Profil subklas IgG1 terhadap whole protein dan protein Elusi penderita RAS dan Kontrol dengan menggunakan λ 405 nm

Whole Protein

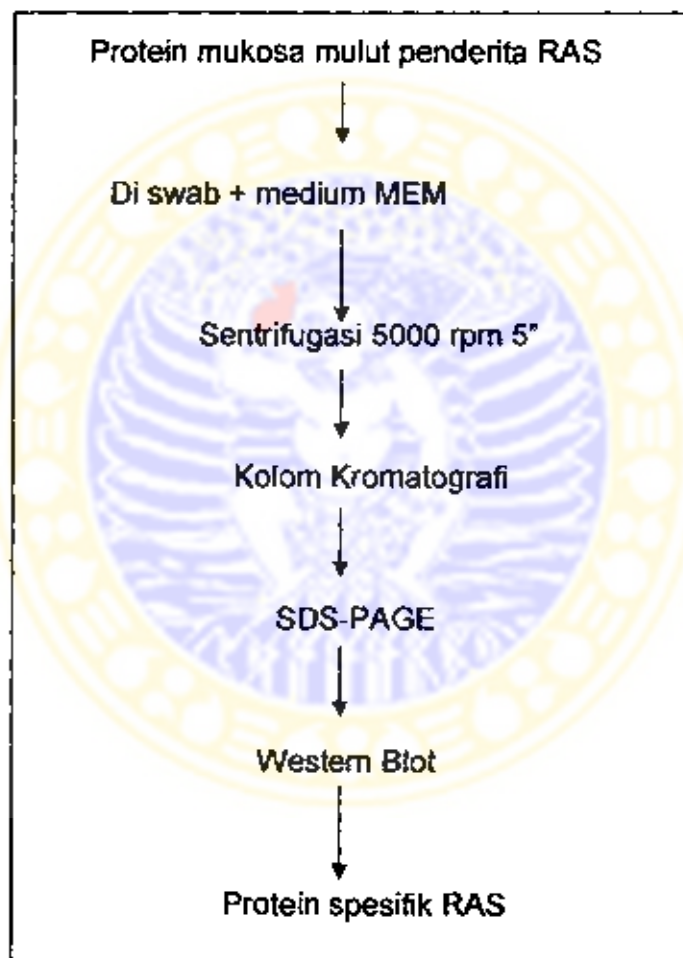
Protein Elusi

No Px	Normal	Mayor	Minor	Remisi	Normal	mayor	Minor	Remisi
1	0,035	0,101	0,103	0,099	0,083	0,103	0,113	0,105
2	0,057	0,103	0,107	0,101	0,075	0,113	0,132	0,110
3	0,054	0,065	0,087	0,086	0,099	0,101	0,097	0,087
4	0,060	0,110	0,118	0,147	0,091	0,134	0,170	0,159
5	0,073	0,115	0,100	0,101	0,080	0,121	0,115	0,107
6	0,079	0,081	0,074	0,080	0,099	0,096	0,096	0,098
7	0,080	0,101	0,101	0,099	0,101	0,112	0,113	0,113
8	0,081	0,100	0,100	0,100	0,099	0,118	0,112	0,103
9	0,057	0,102	0,103	0,094	0,096	0,106	0,101	0,097
10	0,068	0,151	0,095	0,060	0,092	0,103	0,102	0,095
11	0,051	0,120	0,129	0,070	0,099	0,113	0,103	0,081
12	0,080	0,121	0,115	0,103	0,096	0,114	0,103	0,106
13	0,083	0,118	0,101	0,099	0,097	0,128	0,104	0,105
14	0,061	0,124	0,102	0,110	0,089	0,128	0,110	0,121
15	0,088	0,118	0,103	0,117	0,094	0,130	0,118	0,121
16			0,116				0,117	
17			0,110				0,116	
18			0,104				0,118	
19			0,113				0,120	
20			0,126				0,131	

Lampiran 18 : Prosedur Penelitian

Tahap 1. Karakterisasi Protein Spesifik RAS.

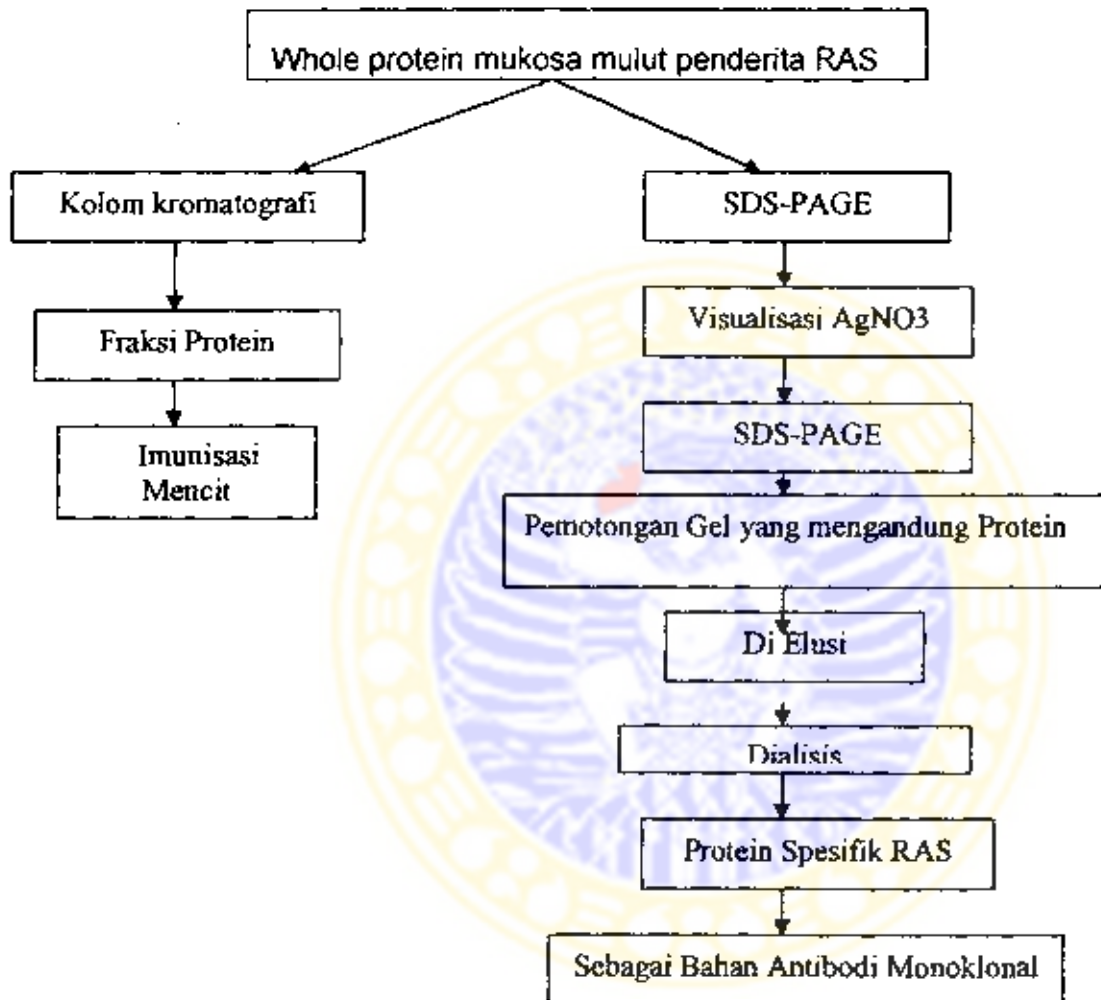
Tahap ini dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi dan menentukan protein spesifik pada RAS/RAU yang selanjutnya dari hasil ini dapat dianalisis secara molekuler profil dari protein spesifik RAS



Bagan 1. Rancangan penelitian tahap karakterisasi Protein RAS

Tahap 2. Purifikasi Protein spesifik RAS

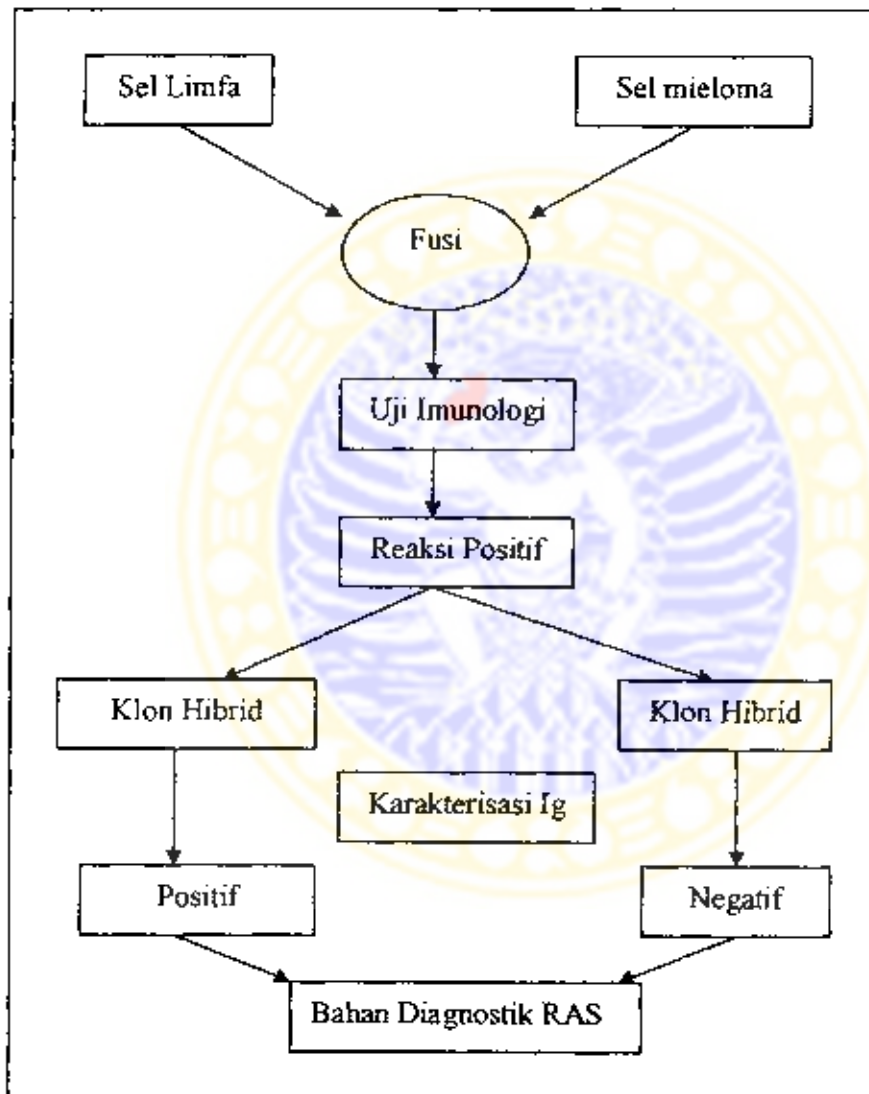
Tujuan pada tahapan ini adalah untuk mendapatkan protein murni dengan spesifisitas tinggi.



Bagan 2. Bagan Rancangan penelitian Purifikasi Protein Spesifik RAS

Tahap 3. Produksi Antibodi Monoklonal

Tujuan penelitian adalah untuk mendapatkan antibodi yang spesifik terhadap satu macam epitop. Hasil protein yang sudah terkarakterisasi digunakan untuk produksi antibodi monoklonal dengan cara seperti pada bagan dibawah ini.



Bagan 3 Bagan Rancangan penelitian untuk Produksi Antibodi Monoklonal

Lampiran 19. Kurva Standar Protein

Kurva standar protein dibuat dengan mengukur kadar protein standar (*bovine serum albumin* atau BSA) berdasarkan metode Lowry Dkk (1951), sebagai berikut :

1. Larutan Protein disiapkan sekitar 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$
2. Larutan protein dibuat bertingkat sehingga kadar gulanya berada dalam kisaran 30 – 300 $\mu\text{g} / \text{ml}$. Pengenceran dapat dibuat sebagai berikut.

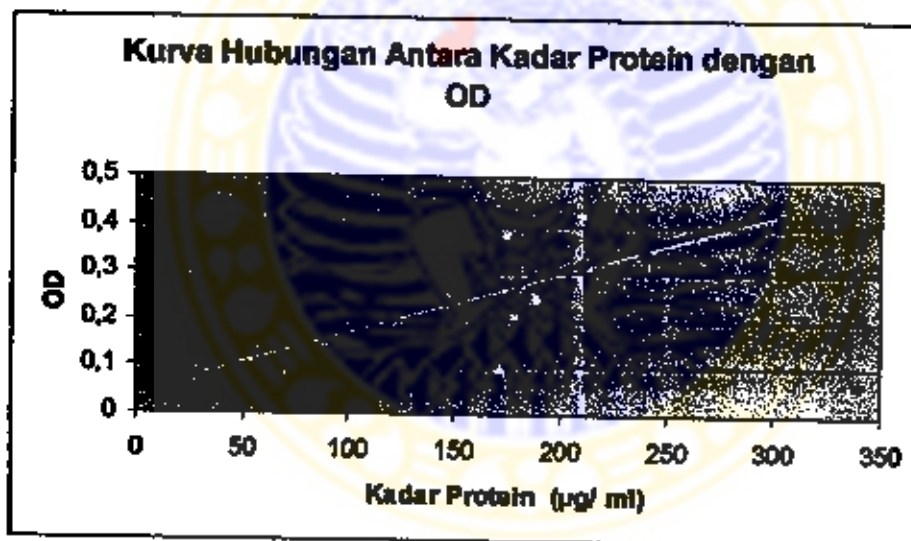
Tabung	ml larutan 300 μg protein / ml	ml H_2O	μg protein / ml
1	0,1	0,9	30
2	0,2	0,8	60
3	0,3	0,7	90
4	0,4	0,6	120
5	0,5	0,5	150
6	0,6	0,4	180
7	0,7	0,3	210
8	0,8	0,2	240
9	1,0	0	300

3. Pereaksi C ditambahkan ke dalam masing-masing tabung sebanyak 8 ml, dikocok, dan dibiarkan 10 menit pada suhu kamar.
4. Pereaksi E ditambahkan sebanyak 1 ml, dikocok, dan dibiarkan selama 20 menit
5. Kadar protein diketahui dari pembacaan OD larutan pada λ 655 nm menggunakan spektrofotometer (λ 655 nm adalah panjang gelombang maksimum dari larutan albumin yang digunakan berdasarkan survei scan spektrofotometer).

Hasil Pengukuran OD larutan BSA, λ 655 nm

Kadar Protein ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	OD
30	0,078
60	0,151
90	0,161
120	0,199
150	0,266
180	0,279
210	0,319
240	0,338
300	0,438

6. Kurva Standar dibuat pada kertas agrafik yang menunjukkan hubungan antara OD (ordinat) dan kadar protein (absis)



Persamaan garis yang terbentuk : $Y = 0,05570 + 0,001252$

Lampiran 20. Kurva Standar Protein Marker

Kurva standar dari protein marker diukur dengan cara sebagai berikut:

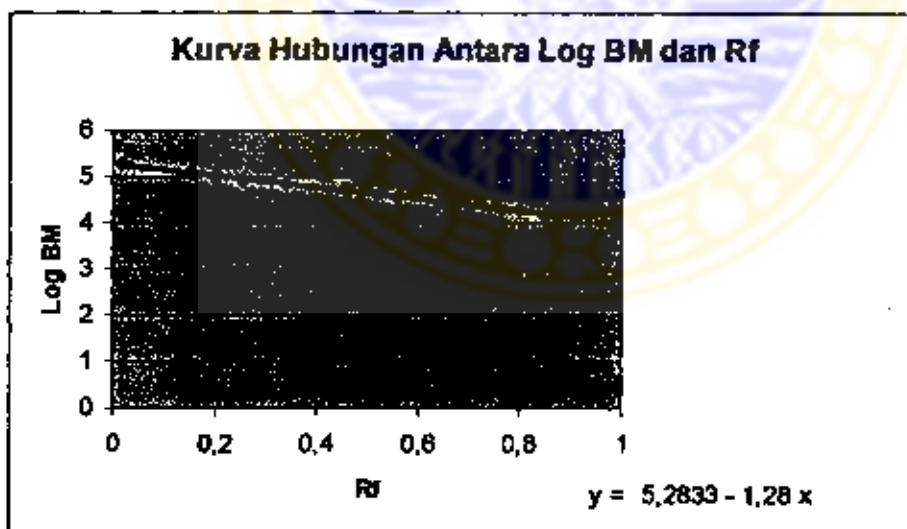
1. Melakukan pengukuran Rf dari protein marker dengan cara membandingkan jarak protein (band) terhadap tinggi gel. Hasil pengukuran Rf protein marker adalah sebagai berikut:

Protein	Rf
Myosin, Rabbit muscle	3/59 (0,0208)
B-Galactosidase, <i>E.coli</i>	9/59 (0,1525)
Phosphorylase b, Rabbit muscle	12/59 (0,2034)
Fructose-6-phosphate Kinase, Rabbit muscle	15/59 (0,2542)
Albumin, Bovine Serum	20/59 (0,3390)
Glutamic Dehydrogenase, Bovine Liver	27/59 (0,4576)
Ovalbumin, Chicken Egg	33/59 (0,5593)
Glyceraldehyde-3-phosphate- Dehydrogenase, Rabbit muscle	38/59 (0,6441)
Carbonic Anhydrase, Bovine Erythrocytes	47/59 (0,7966)
Trypsin Inhibitor, Soybean A Lactalbumin, Bovine Milk	50/59 (0,8475)

2. Melakukan perhitungan logaritma dari BM Protein Marker yang telah diketahui

Protein	BM (Da)	Log BM
Myosin, Rabbit muscle	205.000	5,3118
B-Galactosidase, <i>E. coli</i>	116.000	5,0645
Phosphorylase b, Rabbit muscle	97.000	4,9858
Fructose-6-phosphate Kinase, Rabbit muscle	84.000	4,9242
Albumin, Bovine Serum	66.000	4,8195
Glutamic Dehydrogenase, Bovine Liver	55.000	4,7404
Ovalbumin, Chicken Egg	45.000	4,6532
Glyceraldehyde-3-phosphate-Dehydrogenase, Rabbit muscle	36.000	4,5563
Carbonic Anhydrase, Bovine Erythrocytes	29.000	4,4624
Trypsin Inhibitor, Soybean	20.000	4,3010
A Lactalbumin, Bovine Milk	14.200	4,1523

3. Menggambar kurva yang melukiskan hubungan antara log BM dan Rf



Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max.
						Lower Bound	Upper Bound		
Kadar Serum IgG2a	Normal	15	.69547	.12268	3.17E-02	.62753	.76341	.517	.891
	Mayor	15	.87453	.23787	6.14E-02	.74281	1.00626	.120	1.216
	Minor	20	.88200	.11389	2.55E-02	.82870	.93530	.681	1.118
	Remisi	15	.78767	.12357	3.19E-02	.71923	.85610	.618	1.101
	Total	65	.81546	.16917	2.10E-02	.77354	.85738	.120	1.216
Kadar Serum IgG3	Normal	15	.39020	4.71E-02	1.22E-02	.36414	.41626	.317	.491
	Mayor	15	.52187	5.77E-02	1.49E-02	.48994	.55379	.420	.617
	Minor	20	.51835	6.24E-02	1.40E-02	.48915	.54755	.415	.617
	Remisi	15	.45653	6.07E-02	1.57E-02	.42292	.49014	.375	.560
	Total	65	.47532	7.77E-02	9.64E-03	.45607	.49458	.317	.617
Kadar Serum IgA	Normal	15	.58260	.10408	2.69E-02	.52496	.64024	.417	.780
	Mayor	15	.58907	8.70E-02	2.25E-02	.54090	.63723	.480	.751
	Minor	20	.59115	8.09E-02	1.81E-02	.55327	.62903	.474	.741
	Remisi	15	.65887	8.01E-02	2.07E-02	.61452	.70322	.475	.789
	Total	65	.60432	9.10E-02	1.13E-02	.58176	.62688	.417	.789

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar Serum IgG2a	.610	3	61	.611
Kadar Serum IgG3	.908	3	61	.442
Kadar Serum IgA	.558	3	61	.644

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kadar Serum IgG2a	Between Groups	.368	3	.123	5.121	.003
	Within Groups	1.463	61	2.399E-02		
	Total	1.832	64			
Kadar Serum IgG3	Between Groups	.184	3	6.117E-02	18.37	.000
	Within Groups	.203	61	3.329E-03		
	Total	.387	64			
Kadar Serum IgA	Between Groups	5.867E-02	3	1.956E-02	2.528	.065
	Within Groups	.472	61	7.734E-03		
	Total	.530	64			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Penderita RAS	(J) Penderita RAS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Kadar Serum IgG2a	Normal	Mayor	-17907*	5.66E-02	.002	-.29215	-.68E-02
		Minor	-18653*	5.29E-02	.001	-.29231	-.81E-02
		Remisi	-9.220E-02	5.66E-02	.108	-.20528	.209E-02
	Mayor	Normal	17907*	5.66E-02	.002	6.60E-02	.29215
		Minor	-7.467E-03	5.29E-02	.888	-.11324	9.83E-02
		Remisi	8.5867E-02	5.66E-02	.130	-.26E-02	.19995
	Minor	Normal	18653*	5.29E-02	.001	8.08E-02	.29231
		Mayor	7.4667E-03	5.29E-02	.888	-.98E-02	-.11324
		Remisi	9.4333E-02	5.29E-02	.080	-.11E-02	.20011
	Remisi	Normal	9.2200E-02	5.66E-02	.108	-.21E-02	.20528
		Mayor	-.8687E-02	5.66E-02	.130	-.19995	2.62E-02
		Minor	-.9433E-02	5.29E-02	.080	-.20011	1.14E-02
Kadar Serum IgG3	Normal	Mayor	-.13167*	2.11E-02	.000	-.17379	-.90E-02
		Minor	-.12815*	1.97E-02	.000	-.16756	-.89E-02
		Remisi	-6.633E-02*	2.11E-02	.003	-.10846	-.24E-02
	Mayor	Normal	.13167*	2.11E-02	.000	8.95E-02	.17379
		Minor	3.5167E-03	1.97E-02	.859	-.36E-02	4.29E-02
		Remisi	6.5333E-02*	2.11E-02	.003	2.32E-02	.10746
	Minor	Normal	.12815*	1.97E-02	.000	8.17E-02	.16756
		Mayor	-3.517E-03	1.97E-02	.859	-.43E-02	3.59E-02
		Remisi	6.1817E-02*	1.97E-02	.003	2.24E-02	.10122
	Remisi	Normal	6.6333E-02*	2.11E-02	.003	2.42E-02	.10846
		Mayor	-6.533E-02*	2.11E-02	.003	-.10746	-.23E-02
		Minor	-6.182E-02*	1.97E-02	.003	-.10122	-.22E-02
Kadar Serum IgA	Normal	Mayor	-6.467E-03	3.21E-02	.841	-.71E-02	5.77E-02
		Minor	-8.550E-03	3.00E-02	.777	-.69E-02	5.15E-02
		Remisi	-7.627E-02*	3.21E-02	.021	-.14048	-.12E-02
	Mayor	Normal	6.4667E-03	3.21E-02	.841	-.58E-02	7.07E-02
		Minor	-2.083E-03	3.00E-02	.945	-.62E-02	5.80E-02
		Remisi	-6.980E-02*	3.21E-02	.034	-.13401	-.56E-03
	Minor	Normal	8.5500E-03	3.00E-02	.777	-.52E-02	6.86E-02
		Mayor	2.0833E-03	3.00E-02	.945	-.58E-02	6.21E-02
		Remisi	-6.772E-02*	3.00E-02	.028	-.12778	-.77E-03
	Remisi	Normal	7.6267E-02*	3.21E-02	.021	1.21E-02	.14048
		Mayor	6.9800E-02*	3.21E-02	.034	5.59E-03	.13401
		Minor	6.7717E-02*	3.00E-02	.028	7.65E-03	.12778

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

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min.	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
Kadar Antibodi IgG2a pada Whole Protein	Normal	15	9.45E-02	1.91E-02	4.94E-03	8.39E-02	.10507	.068	.150
	Mayor	15	.13907	5.08E-02	1.31E-02	.11094	.16719	.092	.282
	Minor	20	.11550	3.67E-02	8.21E-03	9.83E-02	.13268	.042	.186
	Remisi	15	.10813	1.19E-02	3.08E-03	.10152	.11475	.092	.130
	Total	65	.11438	3.63E-02	4.51E-03	.10538	.12339	.042	.282
Kadar Antibodi IgG3 pada Whole Protein	Normal	15	7.26E-02	1.55E-02	4.01E-03	6.40E-02	8.12E-02	.037	.091
	Mayor	15	.11260	1.99E-02	5.15E-03	.10156	.12364	.067	.159
	Minor	20	.10840	1.21E-02	2.70E-03	.10276	.11404	.078	.131
	Remisi	15	.10133	1.96E-02	5.05E-03	9.05E-02	.11217	.066	.150
	Total	65	9.95E-02	2.24E-02	2.78E-03	9.39E-02	.10503	.037	.159
Kadar Antibodi IgA pada Whole Protein	Normal	15	9.33E-02	1.22E-02	3.14E-03	8.66E-02	.10006	.068	.110
	Mayor	15	.11740	2.55E-02	6.58E-03	.10328	.13152	.075	.171
	Minor	20	.11340	2.26E-02	5.05E-03	.10283	.12397	.075	.171
	Remisi	15	.10413	2.62E-02	6.77E-03	8.96E-02	.11865	.067	.162
	Total	65	.10755	2.37E-02	2.93E-03	.10169	.11342	.067	.171

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar Antibodi IgG2a pada Whole Protein	4.595	3	61	.006
Kadar Antibodi IgG3 pada Whole Protein	.730	3	61	.538
Kadar Antibodi IgA pada Whole Protein	.958	3	61	.418

Lampiran :

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kadar Antibodi IgG2a pada Whole Protein	Between Groups	1.570E-02	3	5.233E-03	4.637	.006
	Within Groups	6.885E-02	61	1.129E-03		
	Total	8.455E-02	64			
Kadar Antibodi IgG3 pada Whole Protein	Between Groups	1.506E-02	3	5.021E-03	17.939	.000
	Within Groups	1.707E-02	61	2.799E-04		
	Total	3.214E-02	64			
Kadar Antibodi IgA pada Whole Protein	Between Groups	5.347E-03	3	1.782E-03	3.567	.019
	Within Groups	3.048E-02	61	4.997E-04		
	Total	3.583E-02	64			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Penderita RAS	(J) Penderita RAS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Kadar Antibodi IgG2a pada Whole Protein	Normal	Mayor	-4.46E-02*	1.23E-02	.001	-6.9E-02	-2.0E-02
		Minor	-2.10E-02	1.15E-02	.072	-4.4E-02	1.91E-03
		Remisi	-1.37E-02	1.23E-02	.270	-3.8E-02	1.09E-02
	Mayor	Normal	4.460E-02*	1.23E-02	.001	2.01E-02	6.91E-02
		Minor	2.357E-02*	1.15E-02	.044	6.21E-04	4.65E-02
		Remisi	3.093E-02*	1.23E-02	.014	6.40E-03	5.55E-02
	Minor	Normal	2.103E-02	1.15E-02	.072	-1.9E-03	4.40E-02
		Mayor	-2.36E-02*	1.15E-02	.044	-4.7E-02	-6.2E-04
		Remisi	7.367E-03	1.15E-02	.523	-1.6E-02	3.03E-02
	Remisi	Normal	1.367E-02	1.23E-02	.270	-1.1E-02	3.82E-02
		Mayor	-3.09E-02*	1.23E-02	.014	-5.5E-02	-6.4E-03
		Minor	-7.37E-03	1.15E-02	.523	-3.0E-02	1.56E-02
Kadar Antibodi IgG3 pada Whole Protein	Normal	Mayor	-4.00E-02*	6.11E-03	.000	-5.2E-02	-2.8E-02
		Minor	-3.58E-02*	5.71E-03	.000	-4.7E-02	-2.4E-02
		Remisi	-2.87E-02*	6.11E-03	.000	-4.1E-02	-1.7E-02
	Mayor	Normal	4.000E-02*	6.11E-03	.000	2.78E-02	5.22E-02
		Minor	4.200E-03	5.71E-03	.465	-7.2E-03	1.56E-02
		Remisi	1.127E-02	6.11E-03	.070	-9.5E-04	2.35E-02
	Minor	Normal	3.580E-02*	5.71E-03	.000	2.44E-02	4.72E-02
		Mayor	-4.20E-03	5.71E-03	.465	-1.6E-02	7.23E-03
		Remisi	7.067E-03	5.71E-03	.221	-4.4E-03	1.85E-02
	Remisi	Normal	2.873E-02*	6.11E-03	.000	1.65E-02	4.09E-02
		Mayor	-1.13E-02	6.11E-03	.070	-2.3E-02	9.49E-04
		Minor	-7.07E-03	5.71E-03	.221	-1.8E-02	4.36E-03
Kadar Antibodi IgA pada Whole Protein	Normal	Mayor	-2.41E-02*	8.16E-03	.005	-4.0E-02	-7.7E-03
		Minor	-2.01E-02*	7.64E-03	.011	-3.5E-02	-4.8E-03
		Remisi	-1.08E-02	8.16E-03	.191	-2.7E-02	5.52E-03
	Mayor	Normal	2.407E-02*	8.16E-03	.005	7.75E-03	4.04E-02
		Minor	4.000E-03	7.64E-03	.602	-1.1E-02	1.93E-02
		Remisi	1.327E-02	8.16E-03	.109	-3.1E-03	2.96E-02
	Minor	Normal	2.007E-02*	7.64E-03	.011	4.80E-03	3.53E-02
		Mayor	-4.00E-03	7.64E-03	.602	-1.9E-02	1.13E-02
		Remisi	9.267E-03	7.64E-03	.230	-6.0E-03	2.45E-02
	Remisi	Normal	1.080E-02	8.16E-03	.191	-5.5E-03	2.71E-02
		Mayor	-1.33E-02	8.16E-03	.109	-3.0E-02	3.05E-03
		Minor	-9.27E-03	7.64E-03	.230	-2.5E-02	6.00E-03

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

Oneway

Descriptives

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
						Lower Bound	Upper Bound		
Kadar Antibodi IgG2a pada Protein Elusi	Normal	15	.10133	8.27E-03	2.14E-03	9.68E-02	.10591	.089	.124
	Mayor	15	.15133	4.86E-02	1.25E-02	.12445	.17822	.104	.290
	Minor	20	.13170	2.54E-02	5.69E-03	.11979	.14361	.098	.190
	Remisi	15	.11393	1.13E-02	2.91E-03	.10768	.12018	.100	.132
	Total	65	.12512	3.30E-02	4.09E-03	.11695	.13329	.089	.290
Kadar Antibodi IgG3 pada Protein Elusi	Normal	15	9.31E-02	1.18E-02	3.06E-03	8.65E-02	9.96E-02	.059	.104
	Mayor	15	.11853	1.52E-02	3.91E-03	.11014	.12692	.099	.158
	Minor	20	.11780	1.60E-02	3.57E-03	.11032	.12528	.099	.173
	Remisi	15	.11133	1.85E-02	4.78E-03	.10108	.12159	.089	.161
	Total	65	.11077	1.83E-02	2.27E-03	.10623	.11530	.059	.173
Kadar Antibodi IgA pada Protein Elusi	Normal	15	.10013	5.36E-03	1.38E-03	9.72E-02	.10310	.089	.112
	Mayor	15	.12960	2.45E-02	6.32E-03	.11605	.14315	.098	.181
	Minor	20	.12360	1.95E-02	4.35E-03	.11449	.13271	.096	.180
	Remisi	15	.10940	2.45E-02	6.32E-03	9.58E-02	.12295	.066	.165
	Total	65	.11629	2.26E-02	2.80E-03	.11069	.12189	.066	.181

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar Antibodi IgG2a pada Protein Elusi	7.291	3	61	.000
Kadar Antibodi IgG3 pada Protein Elusi	.371	3	61	.774
Kadar Antibodi IgA pada Protein Elusi	3.580	3	61	.019

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kadar Antibodi IgG2a pada Protein Elusi	Between Groups	2.154E-02	3	7.179E-03	9.114	.000
	Within Groups	4.805E-02	61	7.877E-04		
	Total	6.959E-02	64			
Kadar Antibodi IgG3 pada Protein Elusi	Between Groups	6.598E-03	3	2.199E-03	9.943	.000
	Within Groups	1.484E-02	61	2.432E-04		
	Total	2.144E-02	64			
Kadar Antibodi IgA pada Protein Elusi	Between Groups	8.354E-03	3	2.785E-03	6.973	.000
	Within Groups	2.436E-02	61	3.993E-04		
	Total	3.271E-02	64			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

LSD

Dependent Variable	(I) Penderita RAS	(J) Penderita RAS	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Kadar Antibodi IgG2a pada Protein Elusi	Normal	Mayor	-5.00E-02*	1.02E-02	.000	-7.0E-02	-3.0E-02
		Minor	-3.04E-02*	9.59E-03	.002	-5.0E-02	-1.1E-02
		Remisi	-1.26E-02	1.02E-02	.224	-3.3E-02	7.89E-03
	Mayor	Normal	5.000E-02*	1.02E-02	.000	2.95E-02	7.05E-02
		Minor	1.963E-02*	9.59E-03	.045	4.65E-04	3.88E-02
		Remisi	3.740E-02*	1.02E-02	.001	1.69E-02	5.79E-02
	Minor	Normal	3.037E-02*	9.59E-03	.002	1.12E-02	4.95E-02
		Mayor	-1.96E-02*	9.59E-03	.045	-3.9E-02	-4.6E-04
		Remisi	1.777E-02	9.59E-03	.069	-1.4E-03	3.69E-02
	Remisi	Normal	1.260E-02	1.02E-02	.224	-7.9E-03	3.31E-02
		Mayor	-3.74E-02*	1.02E-02	.001	-5.8E-02	-1.7E-02
		Minor	-1.78E-02	9.59E-03	.069	-3.7E-02	1.40E-03
Kadar Antibodi IgG3 pada Protein Elusi	Normal	Mayor	-2.55E-02*	5.69E-03	.000	-3.7E-02	-1.4E-02
		Minor	-2.47E-02*	5.33E-03	.000	-3.5E-02	-1.4E-02
		Remisi	-1.83E-02*	5.69E-03	.002	-3.0E-02	-6.9E-03
	Mayor	Normal	2.547E-02*	5.69E-03	.000	1.41E-02	3.69E-02
		Minor	7.333E-04	5.33E-03	.891	-9.9E-03	1.14E-02
		Remisi	7.200E-03	5.69E-03	.211	-4.2E-03	1.86E-02
	Minor	Normal	2.473E-02*	5.33E-03	.000	1.41E-02	3.54E-02
		Mayor	-7.33E-04	5.33E-03	.891	-1.1E-02	9.92E-03
		Remisi	6.467E-03	5.33E-03	.229	-4.2E-03	1.71E-02
	Remisi	Normal	1.827E-02*	5.69E-03	.002	6.88E-03	2.97E-02
		Mayor	-7.20E-03	5.69E-03	.211	-1.9E-02	4.19E-03
		Minor	-6.47E-03	5.33E-03	.229	-1.7E-02	4.19E-03
Kadar Antibodi IgA pada Protein Elusi	Normal	Mayor	-2.95E-02*	7.30E-03	.000	-4.4E-02	-1.5E-02
		Minor	-2.35E-02*	6.83E-03	.001	-3.7E-02	-9.8E-03
		Remisi	-9.27E-03	7.30E-03	.209	-2.4E-02	5.32E-03
	Mayor	Normal	2.947E-02*	7.30E-03	.000	1.49E-02	4.41E-02
		Minor	6.000E-03	6.83E-03	.383	-7.6E-03	1.96E-02
		Remisi	2.020E-02*	7.30E-03	.007	5.61E-03	3.48E-02
	Minor	Normal	2.347E-02*	6.83E-03	.001	9.82E-03	3.71E-02
		Mayor	-6.00E-03	6.83E-03	.383	-2.0E-02	7.65E-03
		Remisi	1.420E-02*	6.83E-03	.042	5.51E-04	2.78E-02
	Remisi	Normal	9.267E-03	7.30E-03	.209	-5.3E-03	2.39E-02
		Mayor	-2.02E-02*	7.30E-03	.007	-3.5E-02	-5.6E-03
		Minor	-1.42E-02*	6.83E-03	.042	-2.8E-02	-5.5E-04

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

Screening test STUDY_menu

		Disease status		
		+	-	
Results of	+	a	b	a + b
Screening	-	c	d	c + d
Test		a + c	b + d	N

a = True Positive (test+/ill+)
 b = False Positive (test+/ill-)
 c = False Negative (test-/ill+)
 d = True Negative (test-/ill-)

Sensitivity is the probability of testing positive if the disease is truly present: $Se = a/(a+c)$

Specificity is the probability of testing negative if the disease is truly absent: $Sp = d/(b+d)$

Predictive Value Positive is the probability of truly having the disease if testing positive: $PVP = a/(a+b)$

Predictive Value Negative is the probability of being truly disease-free if testing negative: $PVN = d/(c+d)$

Fleiss quadratic confidence intervals are calculated.

Predictive values are meaningless for case-control screening studies.

Reference

[Charles H. Hennekens, *Epidemiology in Medicine*, 1st edition, Little, Brown and company, 1987. ISBN 0-316-35636-0. p. 331]

33	3	36
2	12	14
35	15	50

Screening

Measure of association and 95% confidence interval

Sensitivity	94.3%	79.5, 99.0
Specificity	80.0%	51.4, 94.7
Predictive Value Positive	91.7%	76.4, 97.8
Predictive Value Negative	85.7%	56.2, 97.5

32	1	33
3	14	17
35	15	50

Screening

Measure of association and 95% confidence interval

Sensitivity	91.4%	75.8, 97.8
Specificity	93.3%	66.0, 99.7
Predictive Value Positive	97.0%	82.5, 99.8
Predictive Value Negative	82.4%	55.8, 95.3

31	3	34
4	12	16
35	15	50

Screening

Measure of association and 95% confidence interval

Sensitivity	88.6%	72.3, 96.3
Specificity	80.0%	51.4, 94.7
Predictive Value Positive	91.2%	75.2, 97.7
Predictive Value Negative	75.0%	47.4, 91.7

26	2	28
9	13	22
35	15	50

Screening

Measure of association and 95% confidence interval

Sensitivity	74.3%	56.4, 86.9
Specificity	86.7%	58.4, 97.7
Predictive Value Positive	92.9%	75.0, 98.8
Predictive Value Negative	59.1%	36.7, 78.5

28	0	28
7	15	22
35	15	50

Screening

Measure of association and 95% confidence interval

Sensitivity	80.0%	62.5, 90.9
Specificity	100.0%	74.7, 100.0
Predictive Value Positive	100.0%	85.0, 100.0
Predictive Value Negative	68.2%	45.1, 85.3

27	1	28
8	14	22
35	15	50

Screening

Measure of association and 95% confidence interval

Sensitivity	77.1%	59.4, 89.0
Specificity	93.3%	66.0, 99.7
Predictive Value Positive	96.4%	79.8, 99.8
Predictive Value Negative	63.6%	40.8, 82.0

laporan 22 : Hasil Pemeriksaan Laboratorium Penderita RAS

gantung Jawah
 DR. Dr. A. G. Sudewa Djelantik, Sp.PK

CPST-00-026-00 110

SYSMEX SF-3000

161



Microscopic



Microscopic

White Diagram

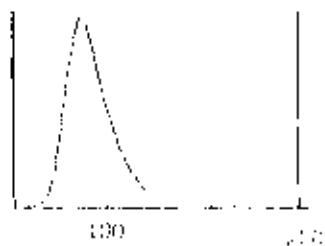
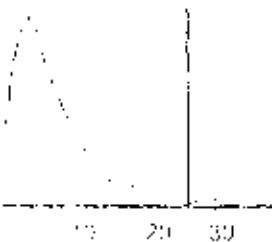


Plate Diagram



CBC	RESULT	UNIT	NORMAL RANGE Female
WBC	7.74	10 ⁹ /ul	4.6 - 10.0
RBC	4.67	10 ¹² /ul	4.2 - 5.4
HGB	13.9	g/dL	12 - 16
HCT	42.5	%	37 - 47
PCV	42.9	f	31 - 39
MCH	31.4	pg	27 - 31
MCHC	33.1	g/dL	33 - 37
PLT	240	10 ⁹ /ul	150 - 450
RDW CV	11.1	%	11.5 - 14.5
RDW SD	41.1	f	35 - 47
PDW	17.4	fL	9 - 13
MPV	11.3	fL	7.2 - 11.1
P-LCR	3.1	%	1.5 - 2.5

DIFFERENTIAL

EOSINOFIL	1.1	%	0 - 7
BASOFIL	0.4	%	0 - 1.5
NEUTROFIL	49.0	%	40 - 74
LYMPOSIT	23.4	%	19 - 48
MONOSIT	4.9	%	3.4 - 9
EOSINOFIL	0.10	10 ⁹ /ul	0 - 0.8
BASOFIL	0.04	10 ⁹ /ul	0 - 0.2
NEUTROFIL	2.42	10 ⁹ /ul	1.9 - 8
LYMPOSIT	1.91	10 ⁹ /ul	0.9 - 5.2
MONOSIT	0.65	10 ⁹ /ul	0.16 - 1

MICROSCOPY :

EOSINOFIL	%
BASOFIL	%
NEUTROFIL	%
LYMPOSIT	%
MONOSIT	%
BLAST	%
META	%
MYELO	%
PROMYLO	%

IP Message :

WBC

WBC - 10⁹/ul

PLT

Platelet

PLT - 240 - 10⁹/ul

Approved

Signature and stamp of the laboratory technician.



DEPARTEMEN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
 FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI UNIVERSITAS AIRLANGGA
PANITIA KELAIKAN ETIK KEDOKTERAN GIGI
 Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo 47 Telp. (031) 5340255 Fax. (031) 5340256 Surabaya 60132

**SURAT KETERANGAN
 KELAIKAN ETIK PENELITIAN**

Nomor : 15/SK/LE/2003

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama Peneliti Utama : DIAH SAVITRI ERNAWATI, drg., M. Si

Judul Penelitian : Karakterisasi Protein Anomali Mukosa Sebagai Trigger Recurrent
 Aphthous Stomatitis (RAS)

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

a. Lais etik

b. Lais etik dengan usulan perbaikan :

.....

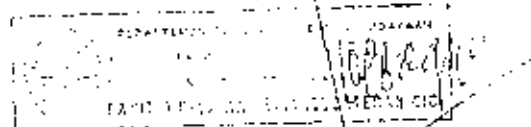
c. Tidak lais etik

Catatan :

Panitia akan memantau prosedur operasional pengambilan data dari penelitian tersebut

Surabaya, 4 September 2003

Ketua,



Prof. Retno Laksuningsih Soebagyo, drg., MHPed.
 NIP. 130206163

LEMBAR INFORMED CONSENT

Yang bertanda tangan dibawah ini,

Nama :
 Tempat/ tanggal lahir :
 Umur :
 Jenis kelamin :
 Semester :
 Alamat :

Bersedia menjadi subjek penelitian dari : Diah Savitri Ernawati, drg., MSi.

Judul penelitian : KARAKTERISASI PROTEIN ANOMALI ANTIGEN MUKOSA
 SEBAGAI TRIGGER RECURRENT APHTHOUS STOMATITIS

Tujuan dari penelitian ini untuk mengkarakterisasi protein anomali antigenik spesifik pada RAS, sehingga dapat ditentukan suatu gambaran salah satu etiopatogenesis sebagai pemicu dominan terhadap terjadinya RAS.

Prosedure yang dilakukan adalah swab mukosa dan pengambilan serum darah dari subjek penelitian yang termasuk dalam kriteria penerimaan subjek penelitian .

Prosedure swab mukosa dan pengambilan serum darah tidak akan menimbulkan resiko dan ketidaknyamanan pada subjek penelitian oleh karena tidak dilakukan tindakan invasive

Setelah membaca penjelasan tersebut diatas dan saya telah diberi kesempatan untuk menanyakan hal-hal yang belum jelas dan telah diberi jawaban yang memuaskan . Dengan ini saya menyatakan sukarela untuk ikut sebagai subjek dalam penelitian ini. Dan saya tahu bahwa saya berhak untuk mengundurkan diri dari penelitian setiap waktu tanpa mempengaruhi perawatan medik saya selanjutnya.

Surabaya,.....2003

Peneliti,
 (Diah Savitri, drg.,MSi)

Subjek Penelitian
 ()

FORMULIR PENELITIAN PENCERITAAN
FORMULIR INI DIISI OLEH PENELITIAN/PENYERIKSA

Harap memberi lingkaran pada jawaban untuk yang benar, sebagai contoh :

Nama :
 Alamat :
 Umur : tahun
 Jenis Kelamin : P / W
 Tanggal wawancara :
 Nomor penderita :
 Suku bangsa :

1. Pendidikan :

1. S.D. tidak tamat
2. S.D. tamat
3. S.L.T.P. tidak tamat
4. S.L.T.P. tamat
5. S.L.T.A. tidak tamat
6. S.L.T.A. tamat
7. Perguruan tinggi tidak tamat
8. Perguruan tinggi tamat

2. Apakah saudara bekerja? ya ; tidak

Bila ya : jenis pekerjaan :
 Berkedudukan sebagai :

3. Kebiasaan merokok :

1. tidak
2. kadang-kadang
3. sering

4. Bila ya : 1. jumlah/hari :
 2. lamanya :

5. Bilamana anda terakhir mengalami luka/lesi/sariawan tsb. ?

- | | |
|------------------|-----------------|
| 1. 2 minggu y.l. | 4. 3 bulan y.l. |
| 2. 1 bulan y.l. | 5. 4 bulan y.l. |
| 3. 2 bulan y.l. | 6. 6 bulan y.l. |

6. Berapa lama kelainan tersebut diderita.

7. Berapa kali kekambuhan dialami tiap tahunnya ?

- | | |
|----------------|---------------------------|
| 1. 1 x / tahun | 4. 4 – 5 x / tahun |
| 2. 2 x / tahun | 5. 6 x / tahun |
| 3. 3 x / tahun | 6. lebih dari 6 x / tahun |

8. Berapa lama luka tersebut menyembuh ?

- | | |
|---------------------|---------------------|
| 1. setelah 3 hari | 3. setelah 10 hari |
| 2. setelah 1 minggu | 4. setelah 2 minggu |

9. Pada umumnya bagaimana besar serta jumlah ulkusnya ?

- | | |
|----------------------------|-------------------------------|
| 1. kecil / satu / soliter | 4. besar lebih dari Satu |
| 2. kecil / lebih dari satu | 5. besar dan kecil / campur |
| 3. besar satu / soliter | 6. tidak tentu / berubah-ubah |

10. Bila timbul ulkus apakah ulkus tersebut melibatkan bagian luar mulut ?

1. ya
2. tidak

11. Adakah hubungan antara timbulnya / kekambuhan dengan :

- | | |
|---------------------|--------------------------------|
| 1. trauma / iritasi | 5. psikis/mental stres/gelisah |
| 2. obat-obatan | 6. kelelahan |
| 3. makanan | 7. tidak tahu |
| 4. menstruasi | 8. lain-lain |

- ADEN - Perpustakaan Universitas Airlangga
12. Kekambuhan / timbulnya ulkus berhubungan dengan makanan :
 1. sayur-sayuran
 2. buah-buahan
 3. daging
 4. ikan/ laut / asin
 5. makan manis-manis
 6. makan pedas
 7. makan goreng-gorengan
 8. lain-lain
13. Apakah anda pernah mengalami kesulitan dibawah ini yang selalu meliputi diri anda (jawaban boleh lebih dari satu)
 1. cemas
 2. gelisah
 3. takut
 4. sedih
 5. putus asa
 6. cepat tersinggung
 7. marah tanpa alasan
 8. kesal
 9. cuniga
 10. susah tidur
 11. gugup
 12. tidak pernah menderita gejala2 seperti tsb. diatas
14. Perawatan apa yang saudara lakukan untuk mengatasi sariawan / lesi tsb. ?
 1. dibiarkan
 2. diberi obat lokal / ulasan
 3. minum vit C / lainnya
 4. kumur2 air garam
 5. kumur2 air sarih
 6. kumur dengan obat kumur lainnya
 7. pergi ke dokter
 8. pergi ke dokter gigi
 9. lain-lain
15. Apakah usaha anda mengatasi tersebut memberikan hasil baik / manjur ?
 1. ya
 2. tidak
16. Apakah penyakit sariawan tersebut juga dialami anggota keluarga anda ?
 1. ya
 2. tidak
17. Adakah riwayat alergi didalam keluarga atau asma, pilek terus-menerus, eksem ?
 1. ya
 2. tidak
18. Apakah saudara pernah menderita (diberikan) adanya kelainan / gangguan pada :
 1. saluran pencernaan / perut kembung / lambung perih
 2. saluran pernapasan / paru2 / asma sesak
 3. gangguan penyakit darah
 4. kencing manis
 5. hati
 6. mulut kering
 7. pusing2 / sakit kepala
 8. membleh 2 hari
 9. jantung berdebar-debar / sakit
 11. saluran kencing
 12. luka2 ditempat lain diluar mulut
 13. tidak pernah mengalami gejala seperti tsb. Dijaras
 14. lain-lain
19. Apakah sariawan yang dialami berhubungan dengan haid ?
 1. sebelum haid
 2. sesudah haid
 3. selama haid
 4. tidak berhubungan