

MOUTH MUCOSA

111  
11. 02/04  
Pep  
i

## TESIS

# IDENTIFIKASI PROTEIN SPESIFIK PADA RECURRENT APHTHOUS ULCERATION



MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

PEPY HERDANI R.A

PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2003

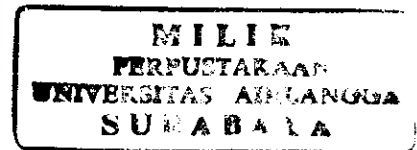
# **IDENTIFIKASI PROTEIN SPESIFIK PADA *RECURRENT APHTHOUS ULCERATION***

## **TESIS**

Untuk memperoleh Gelar Magister  
dalam Program Studi Immunologi  
pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga

Oleh :

**PEPY HERDANI R.A  
NIM 090114273/M**



**PROGRAM PASCASARJANA  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA**

**Tanggal 19 September 2003**

## Lembar Pengesahan

**TESIS INI TELAH DISETUJUI  
TANGGAL 22 OKTOBER 2003**

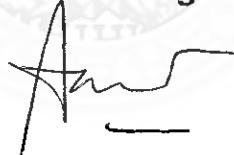
Oleh :

**Pembimbing Ketua**



**Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.**  
**Nip. 131653434**

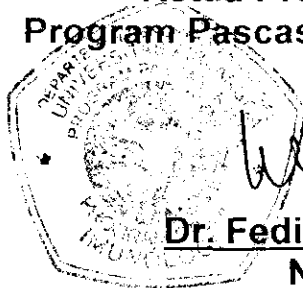
**Pembimbing**



**Diah Savitri Ernawati, drg., M.Si.**  
**Nip. 131470995**

**Mengetahui**

**Ketua Program Studi Imunologi  
Program Pascasarjana Universitas Airlangga**



**Dr. Fedik Abdul Rantam, drh.**  
**Nip. 131653434**

Telah diuji pada

Tanggal 19 September 2003

**PANITIA PENGUJI TESIS**

**Ketua** : Prof. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc.

**Anggota** :1. Dr. Fedik Abdul Rantam, drh

2. Diah Savitri Ernawati, drg., Msi.

3. Prof. Dr. Siti Soemarijah, drg., Sp.PM.

4. Dr. Iwan Hernawan, drg. MS.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pertama-tama puji dan syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT, Tuhan semesta alam atas rahmat, taufik, hidayah dan karunia-Nya, sehingga tesis ini dapat terselesaikan.

Perkenankan saya menyampaikan ucapan terima kasih yang tak terhingga kepada Dr. Fedik Abdul Rantam, drh., sebagai pembimbing ketua sekaligus Ketua Program Studi Immunologi, yang sangat penuh perhatian dan kesabaran telah memberikan dorongan, bimbingan, dan saran yang tak ternilai baik dalam menyelesaikan tesis ini maupun dalam menyelesaikan pendidikan saya di pascasarjana. Saya sampaikan pula terima kasih yang tak terhingga kepada Diah Savitri Ernawati, drg.,M.Si., sebagai pembimbing yang telah memberikan bimbingan baik selama penyusunan tesis ini hingga selesai maupun selama menyelesaikan pendidikan di pascasarjana.

Kepada Prof. Dr. Siti Soemarijah, drg.Sp. PM dan Dr. Iwan Hernawan, drg. MS. sebagai dosen penguji, saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas bimbingannya selama menyelesaikan tesis ini hingga selesai.

Dengan terselesaikannya tesis ini, tak lupa pula saya mengucapkan terima kasih kepada Rektor Universitas Airlangga Prof.Dr.Med.Puruhito,dr atas kesempatan dan fasilitas yang diberikan selama menyelesaikan pendidikan Program Magister, Direktur Program Pascasarjana Universitas

Airlangga Prof. Dr. Muhammad Amin, dr., yang telah memberikan kesempatan untuk menjadi mahasiswa Program Magister pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Ucapan terima kasih ini saya tujukan pula kepada Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Prof. Dr M. Rubianto, drg, Sp. Perio., atas izin penelitian di Laboratorium Ilmu Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Kepala Laboratorium Ilmu Penyakit Mulut beserta staf yang telah banyak membantu dalam pelaksanaan penelitian ini serta Ketua *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., atas izin penelitian di *Tropical Disease Centre* (TDC) beserta seluruh staf dan laboran *Tropical Disease Center* (TDC) yang telah banyak membantu selama pelaksanaan penelitian.

Kepada rekan-rekan di Program Studi Imunologi Angkatan 2001 terima kasih atas dukungan dan semangat yang tak ternilai baik selama kuliah maupun selama penyelesaian tesis ini. Begitu pula ucapan terima kasih yang tak terhingga ini saya sampaikan kepada suami dan ananda tercinta, kedua orang tua dan mertua yang saya hormati, adinda tersayang dan adik-adik ipar serta seluruh keluarga dan pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu atas doa, pengertian, kesabaran, perhatian dan dorongannya yang telah diberikan selama saya kuliah hingga terselesaikannya tesis ini. Semoga Allah SWT membalasnya dengan kebaikan yang berlimpah. "*Jazaakumullah khairan katsira*". Amin.

## RINGKASAN

### IDENTIFIKASI PROTEIN SPESIFIK PADA *RECURRENT APHTHOUS ULCERATION*

*Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) merupakan suatu lesi ulser berulang pada mukosa mulut. Prevalensi *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) berdasarkan data secara internasional antara 5 hingga 66%. Pada kelompok terseleksi seperti mahasiswa kedokteran dan kedokteran gigi ditemukan frekuensi yang cukup tinggi yaitu 50%-60%. *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) juga banyak terjadi pada wanita dan usia dekade kedua. Walaupun lesi ini seringkali ditemukan di rongga mulut pasien oleh para dokter dan dokter gigi, namun hingga kini masih belum diketahui etiologi yang menyebabkan morbiditas yang signifikan itu.

Menurut penelitian, penyebab dari *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) dihubungkan dengan beberapa faktor yaitu trauma, stres, defisiensi nutrisi, alergi makanan, genetik, disregulasi imun, infeksi mikroba, dan siklus menstruasi. Berdasarkan hipotesis faktor-faktor ini menginduksi secara terus-menerus mukosa mulut sehingga terjadi perubahan komponen protein mukosa mulut.

Tujuan penelitian ini adalah mengidentifikasi protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) sehingga dapat digunakan sebagai bahan diagnostik, pencegahan, dan terapi

Mukosa protein dari swab pada ulser dan serum sebagai antibodi poliklonal diambil dari 25 penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) di Klinik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Langkah pertama adalah denaturasi protein mukosa, kemudian analisis molekul protein dengan cara *SDS-polyacrilamide gelectrophoresis* 12 %. Penentuan protein mukosa divisualisasikan dengan *silver stain* ( $\text{AgNO}_3$ ). Langkah kedua gel dari protein dipindahkan ke membran nitroselulose, kemudian dilakukan analisa *Straiffing Westemblot* dengan mereaksikan dengan

antibodi poliklonal penderita RAU dan kontrol normal. Untuk melihat protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) divisualisasikan dengan *fast-red stain*. Kemudian untuk melihat protein spesifik tersebut tetap eksis dilakukan purifikasi pada protein *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) tersebut.

Hasil penelitian tersebut adalah: 1) Ditemukan protein dengan berat molekul 65 kDa sebagai protein dominan pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) yang tidak terdapat pada kontrol dan bereaksi dengan antibodi poliklonal penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) tetapi tidak pada antibodi poliklonal kontrol. Protein 65 kDa ini diidentifikasi sebagai protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU); 2) Protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) 65 kDa dapat dipurifikasi.

Penelitian ini menunjukkan bahwa adanya protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) yang sebagai antigen protein yang dapat memunculkan reaksi silang terhadap imunitas bersifat sistemik.



## SUMMARY

### **Identification of Specific Protein on *Recurrent Aphthous Ulceration (RAU)***

Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) is a disorder characterized by recurring ulcers confined to the oral mucosa. Epidemiologic studies indicate that prevalence of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) is between 5 – 66%. In selected group, such as medical and dental student, it has been observed with a frequency as high as 50% to 60%. There is a higher incidence of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) among females and most commonly during the second decade.

Although Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) are the most common oral mucosa lesions observed by physicians and dentist, but the etiology of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) that causes significant morbidity is still unknown. According to results from studies that Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) can be caused by associated factors include local trauma, stress, nutritional deficiencies, food allergies, genetic predisposition, immune disregulation, microbial infections, and menstrual period. Based on hypothesis these factors may induce oral mucosa continuously, then cause changes in component of oral mucosa protein.

The object of this study was to identify of specific protein on Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) in order to decide a diagnostic, preventive, and comprehensive therapy.

Mucosa protein from swabbed ulcers and serum as polyclonal antibody from 25 patients at Dental Clinic, Faculty of Dentistry, Airlangga University. First step was denatured of mucosa protein and the analyzed with SDS-polyacrylamide gelectrophoresis. To determine mucosa protein were visualized by silver stain ( $\text{AgNO}_3$ ). Second step protein of gel was transferred to nitrocellulose membran and then was analyzed Straiffing westernblot which were reacted with polyclonal antibody patients

Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) and normal control. Specific protein on Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) were visualized by fast-red stain. Then the specific protein on Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) was purified to determine that the protein still existed.

The result of this research were; 1) Found protein with molecular weight 65 kDa was dominant and not found in control and reacted with polyclonal antibody of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) patients but not with control. Protein 65 kDa was identified as specific protein of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU); 2) Specific protein of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) 65 kDa could be purified.

The result of this research suggested that there was specific proteins of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) as antigenic protein that have systemic immune crossreactivity.

**ABSTRACT****Identification of Specific Protein on  
Recurrent Aphthous Ulceration (RAU)**

Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) is a disorder characterized by recurring ulcers confined to the oral mucosa. The cause of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) until now still unclear. The object of this study was to identify of specific protein on Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) in order to decide a diagnostic, preventive, and comprehensive therapy.

The research on 25 patients Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) at Dental Clinic, Faculty of Dentistry, Airlangga University, has been carried out. Mucosa protein and serum was obtained from each sample and analyzed with SDS-polyacrilamide gelelectrophoresis 12 % and to determine protein were visualized by silver stain ( $\text{AgNO}_3$ ). Then was analyzed St.aiffing westernblot which were reacted with polyclonal antibody patients Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) and normal control. Specific protein on Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) were visualized by fast-red stain. Then the specific protein on Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) was purified to determine that the protein still existed.

The result of this research were; 1) Found protein with molecular weight 65 kDa was dominant and not found in control and reacted with polyclonal antibody of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) patients but not with control. Protein 65 kDa was identified as specific protein of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU); 2) Specific protein of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) 65 kDa could be purified.

The result of this research suggested that there was specific proteins of Recurrent Aphthous Ulceration (RAU) as antigenic protein that have systemic immune crossreactivity.

Keyword : *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU); Specific protein ;  
Antigenic protein



## DAFTAR ISI

	Halaman
Sampul Depan.....	i
Sampul Dalam.....	ii
Prasyarat Gelar.....	iii
Persetujuan.....	iv
Penetapan Panitia Penguji Tesis.....	v
Ucapan Terima Kasih.....	vi
Ringkasan.....	viii
Summary.....	x
Abstract.....	xii
DAFTAR ISI.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xvi
DAFTAR GAMBAR.....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xviii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan	
1.3.1 Tujuan Umum.....	4
1.3.2 Tujuan Khusus.....	4
1.4 Manfaat.....	4
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Recurrent Aphthous Ulceration.....	5
2.1.1 Epidemiologi Recurrent Aphthous Ulceration.....	5
2.1.2 Etiologi Recurrent Aphthous Ulceration.....	6
2.1.3 Diagnosa Recurrent Aphthous Ulceration.....	12
2.2 Mukosa Rongga Mulut.....	12
2.2.1 Morfologi Mukosa Rongga Mulut.....	14
2.2.2 Pertahanan Mukosa Rongga Mulut.....	15

	Halaman
2.3 Protein .....	17
2.4 Respon Imun pada Recurrent Aphthous Ulceration .....	18
2.4.1 Respon Imun Lokal pada Recurrent Aphthous Ulceration .....	18
2.4.2 Respon Imun Sistemik pada Recurrent Aphthous Ulceration .....	20
2.5 <i>Heat Shock Protein</i> .....	24
2.6 Antibodi Poliklonal dan Monoklonal .....	25
2.7 Analisa Molekul Protein .....	26
2.7.1 SDS-PAGE .....	26
2.7.2 <i>Western blot</i> .....	27
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL .....</b>	<b>29</b>
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN .....</b>	
4.1 Rancangan Penelitian .....	32
4.2 Sampel .....	32
4.3 Definisi Operasional .....	33
4.4 Bahan Penelitian .....	33
4.5 Instrumen Penelitian .....	33
4.6 Tempat dan Waktu Penelitian .....	32
4.7 Prosedur Penelitian .....	34
4.8 Alur Kerja .....	39
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN .....</b>	<b>40</b>
<b>BAB 6 PEMBAHASAN .....</b>	<b>49</b>
<b>BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	
7.1 Kesimpulan .....	56
7.2 Saran .....	56
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>57</b>
<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>61</b>

## DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 : Distribusi umur pada penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) .....	40
Tabel 5.2 : Distribusi jenis kelamin pada penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) .....	41
Tabel 5.3 : Distribusi diameter ulser pada penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) .....	42
Tabel 5.4 : Distribusi frekuensi kekambuhan pada penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) .....	42
Tabel 5.5 : Distribusi faktor triger penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) .....	42
Tabel 5.6 : Distribusi protein pada penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) dan kontrol.....	43
Tabel 5.7 : Distribusi berat molukul (BM) protein RAU berdasarkan faktor triger penderita <i>Recurrent Aphthous Ulceration</i> (RAU) .....	45

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 5.1 : Lapisan Penangkal Mukosa Mulut .....	16
Gambar 5.2 : Hasil SDS-PAGE dari protein RAU .....	46
Gambar 5.3 : Analisis <i>Stratifying Westernblot</i> pada protein RAU yang direaksikan dengan antibodi poliklonal penderita RAU.....	47
Gambar 5.4 : Purifikasi protein dengan analisis Elusi .....	48





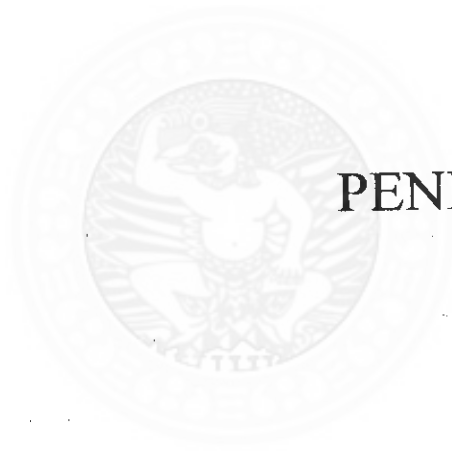
## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 : Surat Laik Etik.....	61
Lampiran 2 : Surat Pernyataan.....	62
Lampiran 3 : Gambar Alat Elektroforesis dan Alat Blotter.....	63
Lampiran 4 : Hasil Analisis SDS-PAGE 12% .....	64



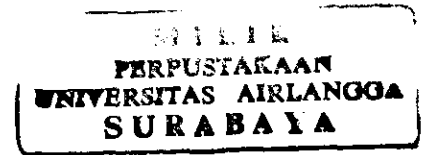
# BAB 1

## PENDAHULUAN



# BAB 1

## PENDAHULUAN



### 1.1 Latar Belakang

*Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) merupakan suatu lesi ulser berulang pada mukosa mulut (Haskell, 1991). Menurut Scully, 2002, berdasarkan data secara internasional presentase kejadian RAU 5-66% dari populasi. Pada kelompok terseleksi seperti mahasiswa kedokteran dan kedokteran gigi ditemukan frekuensi yang cukup tinggi yaitu 50%-60%. RAU juga banyak terjadi pada wanita dan usia dekade kedua dengan puncak kemunculannya dimulai pada usia antara 10 sampai 19 tahun (Lehner, 1992; Lynch, 1997 dan Ship *et al.*, 2000). Walaupun lesi ini seringkali ditemukan di rongga mulut pasien oleh para dokter dan dokter gigi, namun hingga kini masih belum diketahui etiologi yang menyebabkan morbiditas yang signifikan itu ( Mirowski, 2001).

RAU dibagi menjadi tiga kategori berdasarkan ukuran dan jumlahnya secara klinis yaitu ulser minor, ulser mayor dan ulser *herpetiform*. Bentuk lesi secara individual adalah ulser, bulat, simetris, dangkal, sakit, tepi agak meninggi dan eritema di sekitarnya, ulser terletak pada *unattached mucous membranes* (Haskel, 1991; Lynch, 1997; dan Mirowski, 2001). Walaupun RAU dapat sembuh dengan sendirinya dalam jangka waktu beberapa hari namun rasa sakit yang ditimbulkan sangat

mengganggu penderita terutama pada saat makan, berbicara, membersihkan mulut dan terkadang menimbulkan bau mulut yang tidak enak. Bahkan sebelum ulser itu nampak dan setelah ulser tersebut hilang penderita merasakan sakit (Haskel, 1991). Karena etiopatogenesis RAU belum pasti maka pengobatan yang dilakukan selama ini hanya bersifat paliatif. Tak jarang penderita mengalami kekecewaan karena rasa sakit pada ulser tersebut tidak kunjung reda bahkan seringkali bertambah banyak dan besar (Callejo *et al.*, 1999). Sehingga perlu adanya pengobatan yang dapat menghambat timbulnya ulser tersebut sehingga mengurangi rasa sakit yang timbul. Pengobatan yang akan diterapkan akan tergantung pada etiopatogenesis dari penyakit tersebut.

RAU merupakan suatu kondisi multifaktorial dan kerusakan dari epitelium merupakan rangkaian akhir dari patogenesis RAU. Hingga kini penelitian mengenai etiopatogenesis RAU masih terus dilakukan. Ada beberapa kemungkinan faktor-faktor yang dikaitkan dengan penyakit ini, antara lain: faktor genetik, defisiensi nutrisi, disregulasi imun, infeksi mikroba, stres, trauma, rokok, siklus menstruasi, alergi makanan. RAU kemungkinan melibatkan mekanisme *cell-mediated*, tetapi imunopatogenesis secara pasti masih belum jelas. Fagositik dan T sel sitotoksik kemungkinan memandu dalam perusakan epitelium rongga mulut dilakukan secara langsung serta didukung oleh pelepasan sitokin lokal (Scully, 2002).

Adanya reaksi silang antara 60-65 kD *heat shock protein* (hsp) *streptococcus* dan mukosa rongga mulut telah dibuktikan dan secara signifikan meningkatkan serum antibodi terhadap hsp ditemukan pada pasien RAU. Limfosit pasien RAU mempunyai reaktivitas terhadap peptid *Mycobacterium tuberculosis*. Beberapa reaksi silang terdapat antara 65 kDa hsp dan 60 kDa hsp mitokondrial manusia. Antibodi monoklonal bagian dari 65 kDa hsp *M tuberculosis* bereaksi dengan *Streptococcus sanguis*. Kemungkinan adanya respon *cell T-mediated* terhadap antigen *S. sanguis* yang reaksi silang dengan hsp mitokondrial dan mempengaruhi kerusakan mukosa (Scully, 2002)

Faktor-faktor yang dikaitkan dengan RAU dapat bertindak sebagai agen yang akan membentuk ikatan kompleks dengan mukosa rongga mulut. Rangsangan yang dilakukan secara terus-menerus oleh agen tersebut akan mengakibatkan perubahan pada protein mukosa ke arah anomali. Anomali protein mukosa ini yang merupakan suatu antigen akan membentuk respon imun yang berlebih secara lokal sehingga terbentuk suatu ulser. Dengan ditemukannya protein spesifik sebagai antigen pada penderita RAU maka dapat digunakan sebagai deteksi dini serta dapat dibuat suatu bahan antibodi monoklonal anti RAU yang akan digunakan sebagai bahan terapi pencegahan.

## 1.2 Rumusan Masalah

Apakah protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) dapat diidentifikasi ?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui adanya protein spesifik yang berkaitan dengan terjadinya *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU).

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menentukan protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)
2. Melakukan purifikasi protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU).

## 1.4 Manfaat

1. Dapat dibuktikan secara ilmiah penyebab RAU oleh protein spesifik.
2. Dengan melakukan purifikasi protein spesifik dapat diperoleh bahan antibodi monoklonal anti RAU yang dapat digunakan sebagai diagnostik, pencegahan serta terapi terhadap RAU

## BAB 2

# TINJAUAN PUSTAKA



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### **2.1 *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)**

##### **2.1.1 Epidemiologi *Recurrent Aphthous Ulceration***

*Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) adalah suatu kelainan pada mukosa rongga mulut yang biasa terjadi baik pada anak-anak maupun orang dewasa. Menurut Scully, 2002, berdasarkan data secara internasional presentase kejadian RAU 5-66% dari populasi, dengan rata-rata 1% dari populasi anak-anak merupakan golongan sosial ekonomi tinggi di negara berkembang. 40% dari kelompok anak-anak mempunyai riwayat RAU dimulai sebelum mereka berusia 5 tahun.

Di Amerika Utara RAU merupakan penyakit mukosa mulut yang paling banyak terjadi, dengan populasi 20% dan lebih dari 50% terjadi pada kelompok siswa sekolah profesional. Anak-anak dengan status sosial ekonomi tinggi lebih sering menderita RAU dibandingkan dengan anak-anak dengan status sosial ekonomi rendah (Mirowski, 2001). Bahkan menurut Ship *et al.*, 2000, pada populasi mahasiswa kedokteran dan kedokteran gigi ditemukan frekuensi yang cukup tinggi sekitar 50-60%.

Di klinik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dijumpai sebanyak 2663 penderita RAU sepanjang tahun 1991-1995 dari 4487



penderita yang datang ke klinik tersebut (Mintarsih, 1996). Sedangkan pada tahun 1996-2000 dijumpai 1808 penderita RAU (Ernawati, 2000).

RAU banyak dijumpai pada wanita dan usia dekade kedua dengan puncak kemunculannya dimulai pada usia sekitar 10-19 tahun. RAU minor paling sering dijumpai pada anak-anak, sedangkan RAU mayor terjadi setelah masa pubertas dan tetap akan berlangsung hingga usia 20 tahun. RAU herpetiform pertama kali terjadi pada dekade kedua, 67-85% terjadi sebelum usia 30 tahun. Frekuensi dan parahnya penyakit ini dapat meningkat selama dekade ketiga dan keempat, kemudian akan menurun sejalan dengan penambahan usia ( Ship *et al.*, 2000 ; Mirowski , 2001).

### 2.1.2 Etiologi *Recurrent Aphthous Ulceration*

Penyebab RAU hingga kini masih belum jelas, namun ada beberapa faktor yang dapat dikaitkan dengan RAU, yaitu:

1. Non infeksi
  - a. Genetik

Riwayat keluarga dari RAU terjadi pada beberapa pasien yaitu sekitar 50 % dari penderita RAU (Woo dan Sonis, 1996; Lynch, 1997). Penderita dengan riwayat keluarga menderita RAU cenderung mengalaminya pada usia yang lebih muda dan lebih parah dibandingkan dengan penderita tanpa riwayat keluarga RAU. Korelasi tinggi pada kembar identik (Rees dan Binnie, 1996).

Hubungan antara haplotip HLA spesifik dan RAU yang telah diteliti menunjukkan bahwa tidak ada hubungan yang konsisten, namun lebih ke arah immunogenetik terhadap RAU. Faktor genetik lebih ditekankan pada pola kemampuan host yang diturunkan dalam menerima penetrasi faktor-faktor penyebab lainnya. Hubungan antara HLA dan RAU tidak ada hubungan yang konsisten (Mirowski, 2001)

b. Defisiensi nutrisi

Banyak penelitian telah menunjukkan bahwa defisiensi nutrisi yaitu zat besi, asam folat, vitamin B12 sebanyak 20% dari penderita RAU. Dan kini dijumpai pula pada beberapa penelitian penderita RAU juga mengalami defisiensi vitamin B1, B2, dan B6 (Scully, 2002). Bahkan menurut penelitian yang dilakukan Ogura, *et.al.*, 2001, tidak hanya defisiensi vitamin B1 dan zat besi saja, melainkan juga defisiensi kalsium dan vitamin C.

c. Disregulasi imun

Kini tidak ada kesatuan teori mengenai imunopatogenesis RAU, kemungkinan disregulasi imun berperan di dalamnya. Peran sitotoksik dari limfosit dan monosit pada epitelium rongga mulut tampak menyebabkan ulserasi, tetapi tetap saja masih belum jelas. RAU merupakan ulser rongga mulut dengan adanya sel-sel

inflamasi di dalamnya. Sel T helper predominan pada fase preulseratif dan penyembuhan, sedangkan sel T supresor predominan pada fase ulseratif. Selain itu ada beberapa hal yang dikaitkan dengan disregulasi imun yaitu: menurun respon limfosit pasien terhadap mitogen, sirkulasi imun kompleks, aktifitas sel NK, meningkatnya perlekatan netrofil, keterlibatan sel mast dalam patogenesis RAU (Mirowski, 2001).

#### d. Trauma

Telah diketahui bahwa trauma pada rongga mulut dapat menjadi faktor presipitasi perkembangan RAU pada beberapa pasien. Duapuluh dari 128 penderita RAU mengatakan trauma pada rongga mulut dihubungkan dengan perkembangan RAU. Trauma yang dapat menstimulasi terjadinya lesi RAU misalnya tergigit pada mukosa, sikat gigi, perawatan gigi, atau tertusuk makanan yang tajam. Namun trauma tidak dihubungkan dengan faktor di dalam perkembangan RAU pada semua penderita, tetapi sebagai faktor presipitasi (Rees dan Binnie, 1996 dan Ship *et al.*, 1996).

#### e. Alergi makanan

Antigen makan yang dapat dihubungkan dengan perkembangan lesi RAU adalah kacang-kacangan, coklat, sereal, tomat, keju, susu sapi, atau buah sitrus (Rees dan Binnie, 1996)

f. Stres

Stres psikis atau emosi seringkali dilaporkan oleh penderita RAU. Sebuah penelitian tentang hubungan stres dengan RAU menunjukkan suatu angka kejadian yang tinggi yaitu sebanyak 39% pada mahasiswa kedokteran dan kedokteran gigi, dimana angka ini lebih tinggi dibandingkan dengan angka kejadian pada populasi umum yaitu 10-20%. Stres lingkungan dan emosional telah dilaporkan rata-rata 21% dari kasus RAU (Rees dan Binnie, 1996).

g. Merokok dan pengguna tembakau

Terdapat penelitian yang menunjukkan suatu hubungan terbalik di dalam perkembangan RAU dan penggunaan berbagai macam tembakau. Hubungan terbalik telah dibuktikan setidaknya dalam satu studi epidemiologi dimana semua partisipan yang menggunakan tembakau setidaknya sekali mempunyai angka kejadian RAU yang lebih rendah daripada yang bukan pengguna tembakau (Woo dan Sonis, 1996).

Suatu efek yang berkebalikan dari orang yang tidak merokok tembakau dan perkembangan RAU telah dilaporkan oleh Grady *et al.*, 1992 dalam suatu penelitian terhadap pemain *baseball* liga mayor. Anggota dari tujuh tim *baseball* liga mayor, 1456 pemain diteliti selama latihan musim semi pada tahun 1989 dan 1990. Laki-

laki dengan tenggang umur antara 17 dan 63 tahun. Tigapuluh tujuh persen dari partisipan tersebut perokok tembakau, 17% bekas perokok tembakau, dan 44% tidak merokok tembakau. Setelah dilakukan kontrol terhadap variabel-variabel yang ditemukan dari usia, ras, perokok, konsumsi alkohol, dan kebersihan gigi, penderita yang merokok tembakau ditemukan secara signifikan lebih sedikit angka kejadian RAU dibandingkan yang tidak merokok tembakau. Diperkirakan mekanisme dari merokok tembakau dapat meningkatkan keratinisasi mukosa mulut, serta kemungkinan nikotin merupakan faktor protektif dari RAU. Penelitian ini juga diperkuat oleh Tuzun *et al.*, 2000 bahwa ditemukan hubungan epidemiologis negatif antara merokok dengan RAU.

#### h. Siklus menstruasi

RAU juga sering muncul pada wanita dihubungkan dengan siklus menstruasinya (Scully, 2002).

## 2. Infeksi

### a. Virus

Beberapa studi telah gagal membuktikan secara kuat tentang peranan virus *herpes simplek* (HSV), virus *human herpes* (HHV), virus *varicella zoster* (VZV), atau *cytomegalovirus* (CMV) dalam perkembangan ulser *aphthous*. (Mirowski, 2001). Namun

menurut Scully, 2002 *Human Herpes Virus (HHV)-8* ditemukan pada penderita HIV dengan ulser pada rongga mulut.

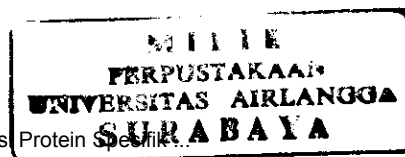
b. Bakteri

Kemungkinan RAU disebabkan adanya respon sel T *mediated* terhadap antigen. Adanya reaksi silang antara 60-65 kD *heat shock protein (hsp) streptococcus* dan mukosa rongga mulut telah dibuktikan dan secara signifikan meningkatkan serum antibodi terhadap hsp ditemukan pada pasien RAU. Limfosit pasien RAU mempunyai reaktivitas terhadap peptid *Mycobacterium tuberculosis*. Beberapa reaksi silang terdapat antara 65 kDa hsp dan 60 kDa hsp mitokondrial manusia. Antibodi monoklonal bagian dari 65 kDa hsp *M tuberculosis* bereaksi dengan *Streptococcus sanguis*. *Streptococcus sanguis* yang mengadakan reaksi silang dengan mitokondrial *heat shock protein* dan mempengaruhi kerusakan mukosa rongga mulut (Mirowski, 2001; Hasan *et al.*, 2002 ; Scully, 2002).

Penemuan terbaru, *Helicobacter pylori* telah dideteksi dalam jaringan lesi pada ulser rongga mulut, tetapi frekuensi dari serum antibodi Ig G terhadap *H. pylori* tidak meningkat pada RAU (Shimoyama *et al.*, 2000 ; Mirowski, 2001)

### 2.1.3 Gambaran Klinis *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

*Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) adalah suatu kelainan dengan karakteristik ulser yang berulang antara 2 hingga 4 kali dalam setahun. Gambaran klinis dari RAU adalah suatu lesi yang terlokalisir terasa sangat sakit, dangkal, ulser berbentuk bulat hingga oval seringkali ditutupi oleh lapisan abu-abu fibromembranosa yang dapat mengelupas dan dikelilingi oleh daerah eritematosa. Biasanya lesi ini sembuh dengan sendirinya dan akan berkurang sejalan dengan bertambahnya usia. Lesi ini diawali dengan gejala prodromal rasa terbakar dari 2 sampai 48 jam sebelum munculnya sebuah ulser. Selama periode inisial ini, berkembang suatu daerah yang terlokalisir. Dalam beberapa jam, sebuah papula putih kecil terbentuk, kemudian terjadi ulser, dan secara bertahap meluas lebih dari 48 sampai 72 jam berikutnya. Daerah mukosa bukal dan labial merupakan daerah yang paling sering terlibat. Selain itu daerah sulkus maksila dan mandibula, *unattached* gingiva, palatum lunak, dasar mulut, *tonsilar fauces*, serta daerah ventral lidah juga sering terlibat. Lesi jarang terjadi pada daerah keratinisasi yang tebal seperti *palatum* atau *gingiva*. Pada kasus RAU ringan lesi akan membesar hingga 0,3 sampai 1 cm dan akan mulai menyembuh dalam waktu satu minggu. Sembuh tanpa bekas biasanya terjadi selama 10 sampai 14 hari (Lynch, 1997; Scully, 2000; dan Mirowski, 2002)



RAU dikategorikan kedalam tiga kategori berdasarkan ukuran dan jumlah lesi (Lynch, 1997; Mirowski, 2001 dan Scully, 2002) .

#### 1. RAU minor

Merupakan jenis yang seringkali terjadi sekitar 80% dari kasus yang ada. Bentuk lesi dangkal, bulat hingga oval. Diameter ulser ini dari 3 mm hingga kurang dari 1 cm. Pada saat yang sama dapat ditemukan 1-5 ulser. Biasanya RAU minor ini terjadi pada *labial*, mukosa bukal, dan dasar mulut. Lesi ini sembuh dengan sendirinya setelah 7 – 10 hari tanpa ada bekas.

#### 2. RAU mayor

Merupakan ulser dengan bentuk oval, lebih besar, lebih dalam, dapat berupa gabungan dari beberapa ulser, tepi ulser meninggi dan tidak beraturan. Ulser ini berdiameter lebih dari 1 cm (1-3 cm). Lesi ini jarang terjadi dengan prevalensi kejadian sekitar 10%. Penyembuhannya memakan waktu lebih lama yaitu lebih dari 6 minggu. Terkadang sembuh dengan bekas dan jika parah dapat merusak mukosa mulut dan taring. Lesi ini biasanya terjadi pada bibir dan palatum lunak serta *fauces*.

#### 3. RAU *herpetiform*

Lesi jenis ini paling jarang terjadi sekitar 5-10% dari kasus yang ada. Lesi ini berupa beberapa ulser kecil berdiameter 1-3 mm,



berkelompok sejumlah 10-100 lesi. Sembuh sekitar 7 hingga 30 hari dengan meninggalkan bekas. Terjadi pada mukosa lunak rongga mulut.

## 2.2 Mukosa Rongga Mulut

### 2.2.1 Morfologi Mukosa Rongga Mulut

Mukosa mulut berbeda dengan kulit. Oleh karena pada mukosa terdapat lapisan pembasah jaringan. Namun dalam hal lainnya menunjukkan persamaan gambaran morfologi dari bagian-bagiannya. Dalam hal ini kulit terdiri dari lapisan epidermis dan dermis, sedang pada mukosa mulut bagian-bagiannya disebut epitel rongga mulut dan lamina propia. Epitel rongga mulut terdiri dari epitel permukaan bertatah dan dibawahnya terdapat jaringan ikat yang disebut corium atau lamina propia. (McCarthy, 1980 dan Dolby, 1975).

Epitel mukosa mulut ini biasanya lebih tebal dari pada kulit dan masuknya lebih dalam ke dalam jaringan ikat, berupa *rete peg*. Epitel bersisik berderet (*stratified squamous*) mempunyai tiga lapisan ialah :

1. Stratum basal atau germinativum.

Sel-sel basal berupa sel kubus atau kolom, dengan inti besar berwarna tajam (jelas). Tebalnya tersusun satu atau dua deretan sel. Sel basal dipisahkan dengan jaringan ikat di bawahnya oleh selaput basal dan bagian inilah yang memberikan batas jelas dengan lapisan jaringan ikat di bawahnya.

## 2. Stratum spinosum (*prickle cell layer*).

Stratum spinosum terletak di atas Stratum basal dan merupakan daerah yang luas dari sel polihedral dengan inti besar warna kurang jelas atau lebih pucat dibandingkan dengan inti sel basal. Sel-sel dari stratum spinosum dibatasi jelas oleh dinding sel dan sel-sel tersebut terpisah dan tampak dihubungkan dengan proses protoplasmik halus, yang disebut dengan jembatan interselular. Sel-sel dari stratum spinosum (*prickle cell layer*) mempunyai tendensi lebih pipih pada daerah dekat permukaannya.

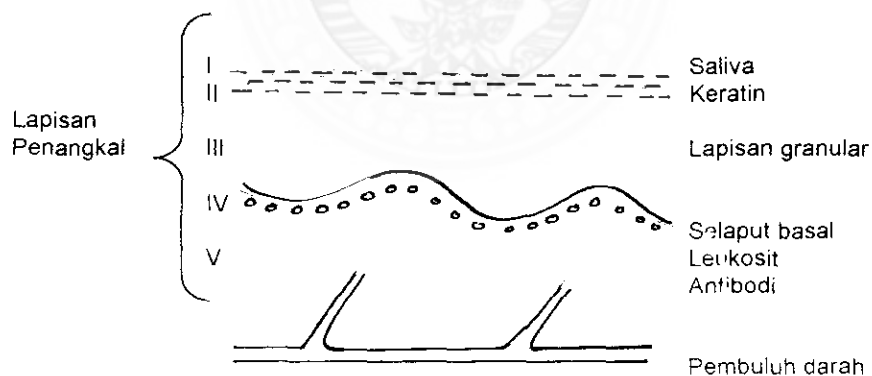
## 3. Stratum granulosum

Terletak di atas lapisan spinosum, terdiri dari beberapa lapis sel-sel pipih yang berisi banyak granular yang berwarna gelap pada sitoplasmanya. Bagian inilah yang menjadi kerato granular hialin. (Dolby, 1975)

### 2.2.2 Pertahanan Mukosa Rongga Mulut

Hanya sedikit penelitian yang dilakukan mengenai faktor-faktor yang mempertahankan keutuhan mukosa mulut. Meskipun demikian penemuan yang konsisten berupa kurangnya penetrasi mikroorganisme ke dalam membrana mukosa yang utuh. Hanya sebagian kecil mukosa mulut yang diliputi lapisan keratin. Mukosa bibir, pipi, dasar mulut dan

palatum lunak tidak diliputi lapisan keratin. Pada daerah granular, selaput yang menutupi granular tersebut dilepaskan ke rongga inter selular dan hal ini berhubungan dengan pembentukan suatu barrier terhadap perpindahan substansi seperti mikroorganisme dan antigen melalui epitel. Kemungkinan antibodi dapat menurunkan sifat penetrasi mikroorganisme dan agen-agen lain, dengan pembentukan imun kompleks dengan antigen. Selaput basal dari epitelium merupakan penangkal yang lain terhadap penetrasi jasad renik dan agen-agen lain. Pada lamina propria yang berbatasan dengan selaput basal terdapat beberapa sel limfoid yang akan menghadapi suatu agen yang berhasil melewati keempat lapisan penangkal tersebut (Lehner, 1992).



Gambar 1. Lapisan penangkal mukosa mulut (Lehner, 1992)

Dolby *et al.*, 1981 menyatakan bahwa barrier epitel adalah membrana granular tertutup yang terdapat di dalam lapisan epitel yang berkeratin dan tanpa lapisan keratin, meskipun granular tersebut bentuknya tidak sama. Tidak mengherankan bahwa sejumlah material dapat memasuki

mukosa mulut. Barrier tidak bekerja sebagai saringan yang sederhana, dimana inulin dihalangi penetrasinya sedangkan dekstran tidak ada perbedaan arah dari kecepatan gerakan material melalui mukosa, ada material yang pergerakannya keluar lebih cepat dari pergerakan ke dalam. Membrana basalis dari epitel merupakan barrier yang lain terhadap mikroorganisme atau agen lainnya. Di dalam lamina propia terdapat sedikit sel-sel limfosit yang dapat merupakan barrier yang keempat dalam menangani agen yang berhasil mengadakan penetrasi ke dalam

### 2.3 Protein

Ribuan protein yang terdapat dalam tubuh manusia melakukan berbagai fungsi yang begitu banyak untuk dituliskan. Fungsi ini mencakup pekerjaan sebagai pembawa vitamin, oksigen dan karbondioksida, plus peranan struktural, kinetik dan katalitik serta pembentukan sinyal. Jadi, tidaklah mengherankan jika konsekuensi yang serius dapat terjadi akibat mutasi pada gen yang mengkode protein atau pada regio DNA yang mengendalikan ekspresi gen. Konsekuensi yang sama seriusnya dapat pula terjadi pada keadaan defisiensi kofaktor yang esensial bagi maturasi sebuah protein (Murray *et al.*, 1997)

Struktur protein disusun atas empat, yaitu :

#### 1. Struktur Primer

Struktur primer rantai polipeptida sebuah protein adalah susunan atau urutan dimana asam-asam amino disatukan dan susunan ini mencakup lokasi setiap ikatan disulfida

#### 2. Struktur Sekunder

Konformasi tulang-punggung polipeptida merupakan struktur sekundernya. Istilah "konformasi" yang kedengarannya serupa mengacu pada arsitektur tiga-dimensi sebuah protein, yaitu hubungan spasial semua atom terhadap semua atom lainnya. Interkonversi atom yang membentuk konformasi (konformer) bukan hanya melibatkan pemutusan ikatan kovalen tetapi juga pemutusan dan pembentukan kembali kekuatan nonkovalen (ikatan hidrogen, ikatan garam, interaksi hidrofobik) yang menstabilkan konformasi tertentu. Bahkan setelah konformasi yang dihalangi oleh interaksi sterik dapat disingkirkan, maka rotasi bebas sekitar dua pertiga ikatan kovalen pada rantai utama sebuah polipeptida memungkinkan terbentuknya konformasi dengan jumlah yang luar biasa besarnya bagi suatu protein tertentu. Namun demikian, bagi suatu protein tertentu mungkin hanya terbentuk sedikit konformasi yang memiliki makna biologis

### 3. Struktur Tersier

Istilah struktur tersier mengacu pada hubungan spasial antar-unsur struktur sekunder. Struktur tersier menjelaskan hubungan antar domain, cara dimana pelipatan protein dapat menyatukan asam-asam amino yang letaknya terpisah dalam pengertian struktur primer dan ikatan yang menstabilkan ini.

### 4. Struktur Kuartener

Protein dengan dua atau lebih rantai polipeptida yang terikat oleh kekuatan nonkovalen akan memperlihatkan struktur kuartener.

## 2.4 Respon Imun pada RAU

Etiopatologi RAU sampai saat ini belum diketahui dengan jelas karena banyak faktor lokal dan sistemik berpartisipasi dalam patogenesis RAU (Goranska *et al.*, 2000). Kemungkinan adanya keterlibatan dari mekanisme *cell-mediated* pada imunopatogenesis dari RAU (Scully, 2002).

### 2.4.1 Respon Imun Lokal pada RAU

Fagositik dan sel T sitotoksik kemungkinan berperan dalam perusakan dari epitel rongga mulut yang secara langsung dan didukung oleh pelepasan sitokin lokal. Penderita dengan RAU aktif mempunyai peningkatan proporsi sel T *gamma-delta* dibandingkan dengan subyek

kontrol dan penderita dengan RAU inaktif. Sel T *gamma-delta* kemungkinan terlibat dalam *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity* (ADCC). Dibandingkan dengan subyek kontrol, penderita dengan RAU mempunyai peningkatan dari sitokin interleukin (IL)-6, IL-2R, dan *soluble intercellular adhesion modules* (ICAM), *vascular cell adhesion modules* (VICAM), dan E-selectin (Scully, 2002).

Proses penyakit ini disebabkan kerusakan dari keratinosit karena adanya protein adesi yang mengikat pada membran dasar dan membran epitel submukosa (Eversole, 1994).

#### 2.4.2 Respon Imun Sistemik pada RAU

Polarisasi atau keseimbangan respon imun spesifik secara fisiologis diperantarai oleh limfosit CD4<sup>+</sup> sel T yang berdasar pada sitokin. Adanya ketidakseimbangan pada regulasi imun dari RAS terbukti ditemukannya reseptor sel T sangat rendah pada mukosa normal (Natah *et al.*, 2000). Selain hal di atas polarisasi sel Th<sub>1</sub> dan Th<sub>2</sub> dipengaruhi oleh profil sitokin pada *natural immunity* yang dapat membangkitkan beberapa agen secara alami dari *peptide ligand* seperti aktifitas *costimulatory molecule* dan *microenvironmentally* sekresi hormon pada kortek yang berbasis pada genetik individu (Romagnani, 1999).

RAU disebabkan adanya ketidakseimbangan respon imun terbukti CD4<sup>+</sup> pada RAU diekspresikan lebih tinggi dibandingkan dengan normal, sementara itu CD8<sup>+</sup> (*suppressor/cytotoxic T cell*) lebih tinggi dijumpai pada

RAU tipe mayor, tetapi jika dibandingkan dengan tipe minor, maka jumlah CD4<sup>+</sup> dan CD 8<sup>+</sup> lebih rendah. Sedang CD19<sup>+</sup> (sel B) , CD56<sup>+</sup> (sel NK) tidak ada perbedaan yang signifikan. Indikator lainnya yang ditemukan pada kasus RAU yaitu terjadi peningkatan ekspresi CDw29 yang berfungsi menginduksi sel Th. Tetapi sebaliknya terjadi penurunan pengekspresian (CD45R) (Bachtiar *et al.*, 1998 dan Ladesberg *et al.*, 1990). Ketidakseimbangan sel Th<sub>1</sub> dan Th<sub>2</sub> dapat berakibat pada aktifitas sel efektor.

Pada fase eksaserbasi tipe mayor aktifitas sel NK mengalami peningkatan, tetapi sebaliknya pada fase posteksaserbasi terjadi penurunan. Adanya deperesi sel NK ini merupakan fenomena yang bersifat sementara pada imunopatogenesis penyakit ini. Kejadian ini disebabkan adanya defisiensi IL-2 didaerah RAU. Sementara itu IL-2 dan IFN-*gamma* di plasma tidak terjadi perubahan (Sun *et.al.*, 1991). Penentuan *peripher blood lymphocyte subsets* dengan *flow cytometry* dan pengukuran level interleukin-2 serta *soluble sIL-2R* pada plasma dengan *sandwich enzyme immunoassay* menunjukkan pada fase eksaserbasi terjadi peningkatan CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>IL-2R, CD8<sup>+</sup>IL-2R dan IL-2R. Sedang pada fase posteksaserbasi terjadi penurunan yang signifikan jika dibandingkan dengan kontrol normal. Peningkatan level IL-2 pada plasma disebabkan adanya aktifitas CD4<sup>+</sup> dan ekspresi IL-2R mengaktifkan limfosit dara perifer. Jadi dengan adanya peningkatan jumlah CD4<sup>+</sup>IL-2R dan CD8<sup>+</sup>IL-2R mengaktifkan sel T, sehingga dapat memicu partisipasi



*cell-mediated cytotoxicity* pada proses imunopatogenesis RAU (Sun *et al.*, 2000)

Molekul yang paling bertanggung jawab reaksi imun yang berlebihan diatas adalah kemungkinan diawali adanya perubahan permukaan protein akibat adanya rangsangan yang terus-menerus oleh berbagai agen, sehingga terjadi antigen mukosa menjadi anomali. Oleh karena itu antigen mukosa tersebut mudah mengalami injeksi ke dalam jaringan yang lebih dalam atau lapisan subkutan. Dengan demikian akan terjadi proses imun dengan perantara sel dendrit. Sel ini mengekspresikan *major histocompatibility complex* (MHC klas I dan MHC klas II) antigen pada sel epitel ditemukan pada sel basal di fase preulseratif, sedang pada fase ulseratif antigen diekspresikan pada membran sel epitel, dan fase penyembuhan antigen MHC I dan MHC II tidak ditemukan pada membran sel epitel (Savage *et al.*, 1986). Secara invitro sel epitel yang diinduksi dengan IFN-*gamma* dapat mengekspresikan MHC I dan MHC II yang dikokultivasi dengan *peripher blood mononuclear* (PBMCs) yang menunjukkan adanya kerusakan sel epitel target. Hal ini seperti terjadi akibat adanya aktifitas CD4<sup>+</sup> pada sel epitel yang mengakibatkan sel menjadi lisis. Oleh karena itu kemungkinan aktivitas CD4<sup>+</sup> merupakan awal terjadinya RAU (Savage and Seymour, 1994). Begitu juga *antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) banyak dijumpai pada awal RAU yang kemungkinan meningkatkan aktifitas reseptor Fc, sehingga dapat meningkatkan populasi sel efektor yang berakibat terjadinya RAU

(Greespan *et al.*, 1981). Peranan ekspresi MHC antigen dan aktifitas CD4<sup>+</sup> pada RAU tidak jauh beda dengan sel B dalam pengekspresian imunoglobulin (IgE dan IgD). Pada pasien RAS ditemukan banyak IgE dan IgD. Hal ini dimungkinkan berkaitan dengan fenomena sel *mediated* pada imunopatogenesis RAU (Scully *et al.*, 1983)

Pada kasus RAU bersamaan dengan infeksi mikrobakterium menunjukkan adanya peranan peptide epitop 91-105 kDa yang menstimulasi limfosit berproliferasi. Adanya lymfoproliferasi diperantarai oleh sel Langerhans mukosa yang diperkirakan selanjutnya menjadikan sel T autoreaktif (Hasan *et al.*, 1995). Begitu juga pada infeksi *human cytomegalo virus* (HCMV) dapat dideteksi pada pre RAU dengan *polymerase chain reaction* (PCR) spesifik DA-HCMV (Sun *et al.*, 1999)

Keadaan diatas akan mempengaruhi antigen mukosa menjadi anomali antigen mukosa yang memodulasi reaksi berlebihan secara lokal dan akhirnya berpengaruh sebagai faktor triger (Burruano dan Tortorici, 2000). Adanya perubahan ini mengakibatkan sel lain berpartisipasi seperti sel langerhans, monosit/makrofag, sel mast dan sel endotelial dengan cara mensekresi TNF- $\alpha$ . Sitokin ini adalah jenis sitokin proinflamasi dan sebagai mediator aspek imun. Oleh karena itu sangat berkaitan dengan pengaktifan pengumpulan leukosit pada daerah RAU sehingga menyebabkan ulserasi (Lehner, 1992 ; Natah *et al.*, 2000). Pada RAU akut dan remisi ditemukannya CD19 pada sel B, tetapi CD4 rendah yang berakibat terjadi depresi aktifitas NK (Sistig *et al.*, 2001).

## 2.5 Heat Shock Protein

*Heat Shock Protein* (hsp) didistribusikan secara luas di alam dan merupakan molekul yang paling sering dibicarakan di biosfer ini. Hsp merupakan suatu protein dengan berat molekul berkisar 10 dan 110 kDa, yang ekspresinya diinduksi secara cepat dan besar-besaran sebagai suatu respon dari sel atau organisme terhadap paparan temperatur tinggi. Hsp membentuk fungsi yang penting di dalam *folding* dan *unfolding* atau translokasi protein sebagaimana penyusunan dan pembongkaran kompleks protein. Karena fungsi penolong ini, hsp diistilahkan sebagai molekul *chaperon*. Molekul ini terlibat di dalam pengenalan antigen seperti imunoglobulin (Ig), *T-cell receptors* (TCR) dan produk gen dari *major histocompatibility complex* (MHC), yang merupakan seluruh kompleks multimerik, dimana penyusunan mereka dipromosikan oleh *chaperon* yang berbeda. Hsp juga berperan penting di dalam *intracellular antigen - processing pathway*.

Sintesa hsp ditingkatkan untuk melindungi sel prokariotik dan eukariotik dari berbagai macam kerugian selama periode stres yang disebabkan oleh infeksi inflamasi atau semacamnya. Tetap dengan jumlah yang berlebih ini, dalam beberapa penyakit infeksi dan autoimun, hsp merepresentasikan prominen antigen dalam respon imun humoral dan seluler yang dimediasi oleh antibodi dan sel T secara berturut-turut. Meskipun hsp mempunyai peranan penting dalam beberapa penyakit

infeksi atau autoimun, namun banyak bukti yang membantah keterlibatan langsung dari hsp dalam proteksi dan autoagresi. Saat ini, inisiasi dari imun protektif melawan agen infeksi atau kerusakan autoimun oleh hsp secara sendirian tidak dipergunakan lagi. Tampaknya ini lebih seperti antigen penting selama infeksi dan inflamasi, yang dengan jalan ini mempengaruhi serta mendukung anti infeksius dan respon imun. Dengan demikian, hsp yang berperan sebagai *chaperon* tidak hanya selama biogenesis dan protein-protein lain, tetapi juga selama respon imun terhadap antigen lain (Zugel dan Kaufmann, 1999 dan Nechifor *et al.*, 2002).

## 2.6 Antibodi Poliklonal dan Monoklonal

Untuk mendapatkan suatu antibodi, dapat dilakukan penyuntikan terhadap suatu hewan coba, misalnya mencit dengan suatu antigen. Sistem imun dari mencit tersebut akan mengaktifkan sejumlah sel plasma yang berbeda melawan antigen tersebut. Sel-sel ini memproduksi sebuah antibodi yang berbeda terhadap bagian-bagian antigen yang berbeda pula. Antibodi ini disebut sebagai antibodi poliklonal. Jadi antibodi poliklonal adalah antibodi yang mempunyai kemampuan untuk mengenal beberapa bagian dari antigen (epitop) yang menunjukkan reaksi silang dengan patogen lainnya.

Antibodi monoklonal adalah antibodi yang spesifik terhadap satu macam epitop. Kebanyakan antigen mempunyai multipel epitop dan oleh

karena itu mempengaruhi proliferasi dan diferensiasi dari suatu varietas klon sel B, yang masing-masing berasal dari sebuah sel B yang mengenal sebuah epitop khusus. Antibodi monoklonal digunakan untuk tujuan penelitian, diagnostik dan terapi. Dalam pembuatan antibodi monoklonal dapat dilakukan secara invitro dan invivo. Secara invitro antibodi monoklonal diproduksi dengan cara hibridisasi sel myeloma dan sel limfa kemudian dibiakan pada *mikroplate 96 well* dan inkubasikan pada inkubator 37°C yang mengandung CO<sub>2</sub> 5%, sedang secara invivo setelah dihibridisasi diinokulasi pada ruang peritoneal pada mencit, kemudian cairan asites diisolasi dan dimurnikan sebagai antibodi monoklonal. (Goldsby *et al.*, 2000 dan Rantam, 2003)

## 2.7 Analisis Molekul Protein

### 2.7.1 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamid Gel Electrophoresis)

Pada SDS-PAGE, protein dielektroforesis dalam *ionic detergent Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS). Detergen ini akan mengikat residu hidrofobik dan bagian belakang peptida dari protein, diperkirakan salah satu dari setiap asam amino, sehingga dapat membuka rantai peptida secara komplit. Dengan demikian protein SDS-komplek migrasi melalui *poyiacrilamid* tergantung dari berat molekulnya.

Ada dua sistem pada SDS yaitu kontinyu (Weber and Obson) dan diskontinyu campuran protein dilapiskan pada bagian atas (*band* pada

bagian atas dari *separating gel*). Sehingga kelemahan pada sistem ini akan terjadi resolusi dengan sampel. Sedang pada sistem diskontinyu protein migrasi dengan cepat melalui pelarut ion melalui *stacking gel* ke dalam *separating gel*. Protein terkonsentrasi pada garis yang tipis dan terlarut pada *band* yang tipis

Struktur sub unit protein dapat ditentukan dengan SDS-PAGE jika dikaitkan dengan *gel* filtrasi. Berat molekul protein maksimum diestimasi dengan *gel* filtrasi dengan kondisi yang lemah, karena pada kondisi tersebut terjadi ikatan disulfida dari protein secara bersama. Sehingga pada SDS-PAGE setelah diwarnai akan terlihat *band* dengan berat molekul yang besar. Hal ini dapat diatasi dengan memberikan bahan yang mempunyai sifat untuk dapat melepaskan ikatan tersebut dengan cara memberikan 2 *mercaptoethanol* (2-ME) atau *dithiothreitol* (DTT). (Rantam, 2003)

### **2.7.2 Westernblot**

Pada umumnya protein yang tidak dimurnikan mengandung banyak protein yang berbeda dan tidak spesifik. Untuk itu dalam mengukur *single* protein spesifik diperlukan *chemical assay*. Meskipun pada SDS-PAGE protein dapat dideteksi, namun bukan protein yang spesifik, sehingga diperlukan uji imunokimia, yaitu *westernblot*.

*Westernblot* digunakan untuk mendeteksi berat molekul protein dari campuran antigen dan digunakan untuk membedakan reaksi silang

diantara protein selama protein disintesa di dalam sel. Keuntungan metode ini adalah membran nitroselulose setelah direaksikan dengan substrat, pencucian, dan pereaksian dengan antibodi dapat disimpan selama beberapa bulan. Selain itu dengan metode ini mudah dilakukan pengecatan protein, *autodiography*, *calirimetric* pada uji enzim dan *ligand binding assay*.

Tahap pertama western blot yaitu dilakukan pemisahan protein dengan SDS-PAGE, selanjutnya ditransfer ke membran nitroselulose yang sesuai dan akhirnya dilabel dengan antibodi dan divisualisasikan dengan pewarnaan yang diinginkan seperti *fast- red* atau *commasie blue* (Rantam , 2003)

## BAB 3

# KERANGKA KONSEPTUAL





## BAB 3

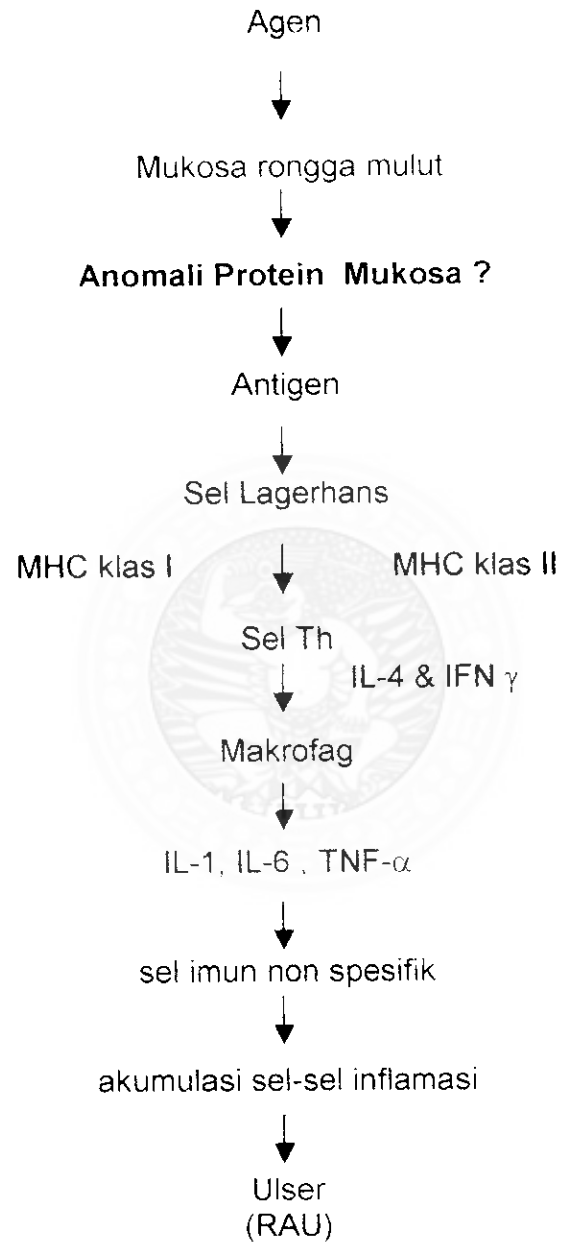
### KERANGKA KONSEPTUAL

Agen merupakan kemungkinan faktor-faktor penyebab dari RAU yang merangsang terus-menerus permukaan mukosa mulut sehingga terjadi perubahan dari protein mukosa tersebut menjadi suatu antigen. Protein mukosa yang menjadi antigen tersebut menstimulasi sel Langerhans di dalam mukosa mulut untuk mengaktifkan suatu respon imun. Sel Langerhans sebagai *Antigen Presenting Cell* (APC) mempresentasikan protein imunogen bersama MHC (*Major Histocompatibility Cell*) kelas I dan II kepada sel T Helper Limfosit. IFN- $\gamma$  dan IL-4 yang disekresikan oleh sel T helper ini dapat mengaktifkan makrofag. Makrofag yang telah teraktivasi ini mensekresikan IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  yang berperan pada reaksi inflamasi. IL-1, IL-6, dan TNF- $\alpha$  bertindak secara lokal menginduksi koagulasi dan peningkatan di dalam permeabilitas vaskular. IL-1 dan TNF- $\alpha$  menginduksi peningkatan ekspresi molekul adesi pada sel *endothelial vascular*.

TNF- $\alpha$  menstimulasi E-selectin, suatu molekul adesi endotelial yang secara selektif mengikat molekul adesi pada netrofil. IL-1 menginduksi peningkatan ekspresi ICAM-1 dan VCAM-1, yang mana mengikat untuk berintegrasi pada limfosit dan monosit. Molekul adesi ICAM-1, VCAM-1 dan E-selectin secara signifikan terekspresi prominen

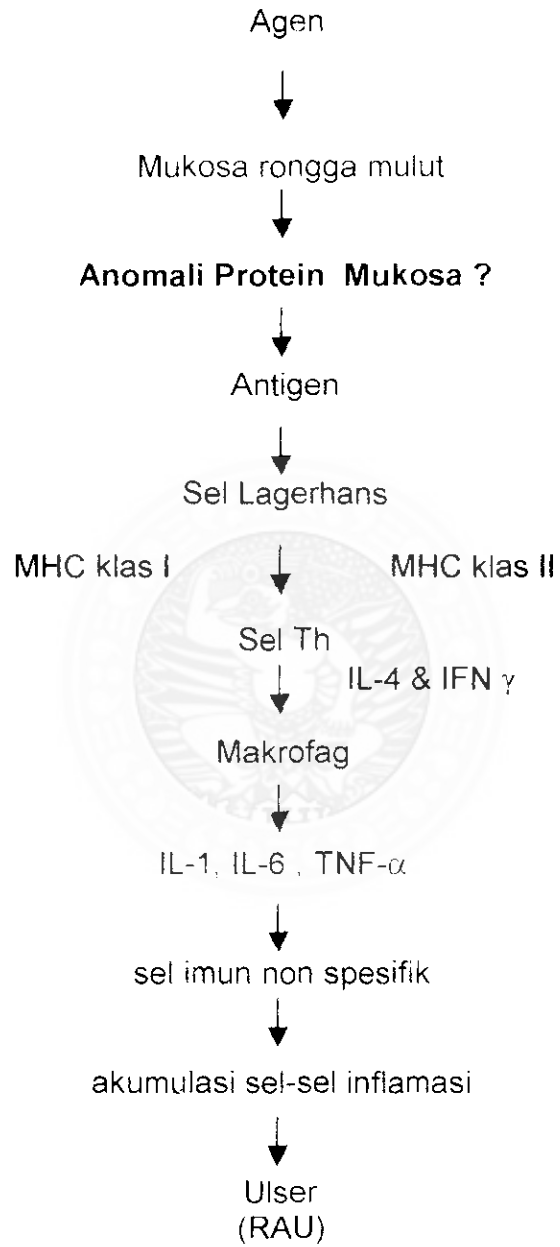
pada RAU. Sirkulasi netrofil, monosit, dan limfosit melekat pada dinding pembuluh darah melalui pengenalan molekul adesi tersebut dan kemudian bergerak melalui dinding pembuluh darah menuju rongga jaringan .

Selain itu IL-1 dan TNF-  $\alpha$  juga berperan pada makrofag dan sel-sel endotelial untuk mempengaruhi produksi kemokin yang memberi kontribusi *influks* netrofil melalui peningkatan adesi mereka terhadap sel-sel endotel vaskular dan melalui peranannya sebagai faktor kemotaktik yang poten, serta mengaktifkan makrofag dan netrofil meningkatkan aktifitas fagositosis dan meningkatkan pelepasan enzim litik ke rongga jaringan. Akumulasi sel-sel inflamasi akan mengakibatkan destruksi pada jaringan sehingga terbentuk suatu ulser pada rongga mulut.



## BAB 4

# METODE PENELITIAN



## **BAB 4**

### **METODE PENELITIAN**

#### **4.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian deskriptif laboratoris

#### **4.2 Sampel**

Sampel penelitian ini adalah penderita RAU yang datang ke klinik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga Surabaya dengan kriteria sebagai berikut :

Penderita yang mengalami RAU minimal 3 kali dalam setahun, diameter lesi minimal 3 mm, mukosa mulut tidak mengalami peradangan atau kelainan kecuali lesi RAU, dan tidak mempunyai kelainan sistemik. Sedangkan kontrol adalah individu sehat yang tidak menderita RAU.

#### **4.3 Definisi Operasional**

Protein spesifik pada *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) adalah protein pada mukosa mulut yang mengalami perubahan sifat sehingga menimbulkan imunopatologis, selain itu punya sifat imunogenik, yang diambil dengan cara *swab* pada mukosa mulut yang terdapat lesi RAU kemudian diperiksa dengan cara elektroforesis dan blotting.

#### 4.4 Bahan Penelitian

Protein yang berasal dari hasil *swab* mukosa mulut penderita RAU, serum penderita RAU, medium MEM, *Phosphate Buffer Saline* (PBS), *ficol*, *polyacrilamid*, *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS), *citroen acid*, *fast-red*, *tris HCl*, *silver stain* ( $\text{AgNO}_3$ ), *agarose*, *Ig G antihuman*, *Bovine Serum Albumin* (BSA), *NP40*, *laemmli buffer*, *E-buffer*.

#### 4.5 Instrumen Penelitian

*Syringe*, *micropipet*, *microplate*, *shaker*, tabung *eppendorf*, kertas *Whatman*, membran nitroselulose, *glass plate*, aparatus elektroforesis, aparatus blotting, dan aparatus elusi

#### 4.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di dua tempat, yaitu :

- Laboratorium Ilmu Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga sebagai tempat pengambilan sampel.
- *Tropical Disease Centre* (TDC) Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat pelaksanaan analisis molekuler.

Waktu penelitian :

- Bulan April-Juni 2003 sebagai waktu pengambilan sampel.
- Bulan Juli-Agustus 2003 sebagai waktu penyusunan tesis.

#### 4.7 Prcsedur Penelitian

1. Menentukan karakteristik sampel

Penderita RAU dicatat berdasarkan riwayat penyakit, fase lesi, diameter lesi, jumlah lesi, jenis kelamin, usia, dan frekuensi kekambuhan

2. Pengambilan *swab* dan darah sampel

Dilakukan *swab* pada ulser RAU untuk mengambil protein mukosanya dan pengambilan darah

3. Pemurnian sampel protein

Sampel diambil dengan cara *swab* dan dimasukkan ke dalam medium MEM, kemudian disimpan pada  $-80^{\circ}\text{C}$ . Setelah sampel terkumpul, setiap sampel disentrifugasi 40.000.000 rpm selama tiga jam dengan temperatur  $10^{\circ}\text{C}$ . Setelah itu supernatannya dibuang kemudian peletnya disuspensikan dan selanjutnya dilakukan dialisis agar didapatkan protein yang bersih dan konsentret. 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 di dalamnya terdapat



*magnetic bar*, kemudian diputar pelan-pelan selama 24 jam dan ditempatkan pada temperatur 4°C. Setelah itu, sampel dipindahkan ke dalam tabung eppendorf .

4. Penentuan protein berdasar berat molekul dilakukan dengan cara SDS-PAGE 12%

Protein hasil dialisis kemudian sebelum dianalisis dengan SDS-PAGE dilakukan lisatisasi dengan cara menambahkan NP40 agar terjadi pemecahan protein secara homogen. Dengan cara sampel protein dimasukkan 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 *refrigerator* dengan temperatur 4 C selama 1 jam. Setelah diinkubasikan selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 9.000 rpm selama 15 menit pada temperatur 10 C. Akhirnya supernatan dipisahkan dan ditempatkan pada tabung eppendorf yang steril . Sampel setelah dipreparasi dengan lisat, selanjutnya digunakan untuk analisis protein RAU. Analisis protein RAU 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 dielektroforesis, disiapkan terlebih dahulu *separating gel* dengan konsentrasi 12 %, kemudian dimasukkan ke dalam *glass plate* dan ditunggu sampai menjadi *gel*. Selanjutnya ditambahkan *stacking gel* di atasnya. Kemudian dimasukkan *comb* sebagai cetakan tempat sampel dimasukkan ke dalam *gel* dan ditunggu selama 45 menit. Setelah *gel* terbentuk *comb* diambil dan dicuci dengan *E-Buffer* dan akhirnya sampel sebanyak 15 µl dimasukkan ke dalam lubang cetakan. Dan selanjutnya dilakukan elektroforesis dengan kekuatan 40 mA, dengan volt 150. Proses elektroforesis ini dijalankan setelah di tanker ditambahkan *E-buffer* sampai *glass plate* tenggelam, agar proses elektrolit secara kimiawi berjalan dengan optimal. Selanjutnya untuk analisis protein RAU divisualisasikan dengan pengecatan *silver*.

#### 5. Penentuan spesifisitas protein dengan cara *Straiffing Westernblot*

Protein RAU dengan analisis SDS-PAGE 12% masih belum teridentifikasi dengan spesifik. Oleh karena itu perlu dilakukan uji spesifisitas dengan cara *werternblot*.

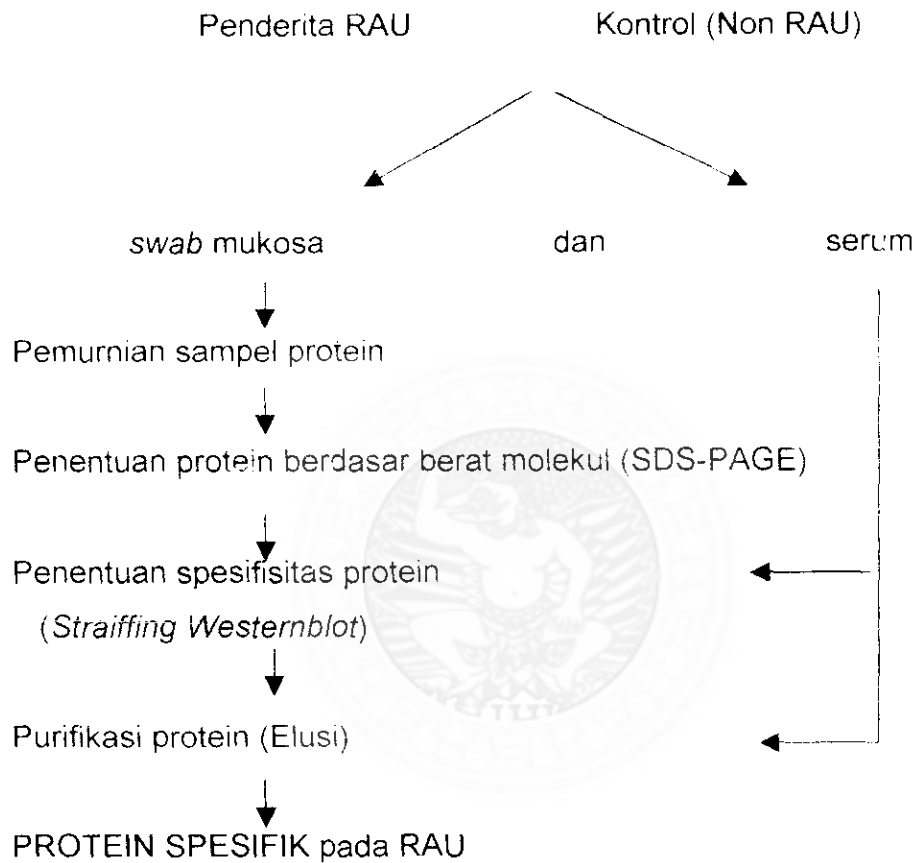
Sampel yang sudah di-*running* dengan elektroforesis tanpa dilakukan pewarnaan, kemudian ditransfer ke membran nitroselulose menggunakan 4 mA dan volt 150. Proses ini berlangsung 1,5 jam. Setelah ditransfer ke membran nitroselulosa, dipotong sebesar 3 mm, kemudian memasukkan potongan-potongan tersebut ke dalam parit (*slot*) dan dibloking dengan BSA 1 % grad 5 selama 1 jam. Dicuci dengan PBS Tween 0,05%. Kemudian direaksikan dengan serum penderita RAU 18 jam. Kemudian dicuci kembali dan direaksikan dengan dengan konjuget fragmen imunoglobulin G *anti human*. Dan akhirnya visualisasi dilakukan pewarnaan dengan *fast- red*. Dengan demikian akan didapatkan protein spesifik RAU dengan berat molekul tertentu. Namun protein ini masih perlu dibuktikan apakah protein tersebut benar-benar spesifik pada RAU, maka perlu dilakukan purifikasi protein spesifik.

#### 6. Purifikasi Protein Spesifik dengan cara Elusi.

Protein spesifik yang telah didapatkan dengan berat molekul tertentu tadi dianalisa 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 dan dimasukkan ke dalam selopan yang panjangnya kira-kira 10 cm. Bagian ujung bawah selopan diikat dengan benang bol dan potongan gel tadi dimasukkan dengan posisi lurus dan tidak boleh melengkung. Ujung atas diikat dengan benang bol. Kemudian dimasukkan ke dalam apparatus Elusi (BioRad) yang telah diisi E-buffer sebanyak 500 ml atau melebihi kawat. Diletakkan secara melintang dari katode-anode. BioRad dinyalakan 150 v dan 40 mA kurang lebih 1,5-2 jam. Cairan yang ada dalam selopan tadi diambil dan masukkan ke dalam tabung ependorf. Kemudian dilakukan analisis elektroforesis dan blotting kembali. Setelah dilakukan pengecatan akan tampak satu protein dengan berat molekul sama yang merupakan protein spesifik RAU.

#### 4.8 Alur Kerja



## BAB 5

# HASIL PENELITIAN



## BAB 5

### HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian tentang identifikasi protein spesifik *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) yang diambil dari pasien yang datang ke klinik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga berdasarkan distribusi umur, jenis kelamin, diameter ulser, frekuensi kekambuhan, faktor triger, dan berat molekul protein RAU dan kontrol dapat dilihat pada tabel 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5 dan 5.6 di bawah ini :

Tabel 5.1 Distribusi umur pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

Umur (tahun)	Jumlah	Prosentase (%)
< 9	1	4
10-19	7	28
20-29	15	60
> 30	2	8

Pada tabel 5.1 di atas terlihat bahwa RAU banyak terjadi pada penderita usia 20-29 tahun yaitu sebanyak 60%.

Tabel 5.2 Distribusi jenis kelamin pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

Jenis kelamin	Jumlah	Prosentase (%)
Pria	18	72
Wanita	7	28

Penderita wanita lebih banyak dari pada pria yaitu sebanyak 72% sedangkan pria hanya 28 %.

Tabel 5.3 Distribusi diameter ulser pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

Diameter ulser ( mm )	Jumlah	Prosentase (%)
3	9	36
4	10	40
5	4	16
7	2	8

Diameter ulser penderita RAU antara 3 sampai dengan 7 mm dengan prosentase terbesar ulser dengan diameter 4 mm



Tabel 5.4 Distribusi frekuensi kekambuhan pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

Frekuensi kekambuhan	Jumlah	Prosentase (%)
Tiap bulan	12	48
2 bulan sekali	11	44
3 bulan sekali	2	8

Frekuensi kekambuhan penderita RAU antara setiap bulan hingga 3 bulan sekali. 48 % penderita mengalami RAU setiap bulannya.

Tabel 5.5 Distribusi faktor triger pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

Faktor triger	Jumlah	Prosentase (%)
Tidak diketahui	16	64
Trauma	5	20
Stres	4	16
Hormonal	2	8
Genetik	1	4

64 % penderita RAU tidak mengetahui faktor triger dari RAU yang dideritanya.

Distribusi protein pada RAU dan kontrol serta perbandingan protein pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) dengan kontrol (non RAU) dapat dilihat pada tabel 5.6 berikut ini :

Tabel 5.6 Distribusi protein pada penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) dan kontrol

BERAT MOLEKUL (kDa)	RAU		Kontrol	
	Jumlah Prosentase (%)		Jumlah Prosentase (%)	
195	5	2	21	84
155	6	24	21	84
150	7	28	22	88
145	2	8	21	84
130	4	16	21	84
125	9	36	22	88
120	1	4	21	88
115	5	2	0	0
105	4	16	0	0
100	13	52	22	88
95	3	12	0	0
90	1	4	0	0
85	0	0	21	84
80	7	28	21	84
75	5	2	0	0
70	6	24	25	100
65	16	64	0	0
60	12	48	24	96
55	10	4	21	84
50	5	2	22	88
45	2	8	0	0
40	13	52	22	88
35	15	6	21	84
30	10	4	21	84
25	16	64	21	84
20	15	6	24	96
15	0	0	22	88

Pada tabel 5.6 terlihat protein yang dominan pada RAU adalah protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa dengan prosentase sebesar 64 %, sedangkan pada protein kontrol distribusinya merata. Dapat dilihat pula pada tabel 5.6 bahwa protein RAU yang tidak terdapat pada protein kontrol adalah protein dengan berat molekul 115, 105, 95, 90, 75, 65, dan 45 kDa. Protein RAU dengan berat molekul 65 kDa merupakan protein yang dominan terdapat pada protein RAU dan tidak terdapat pada kontrol. Sebaliknya protein dengan dengan berat molekul 85 dan 15 kDa tidak dimiliki oleh protein RAU.



Distribusi berat molekul (BM) protein RAU berdasarkan faktor triger dapat dilihat pada tabel 5.7 di bawah ini :

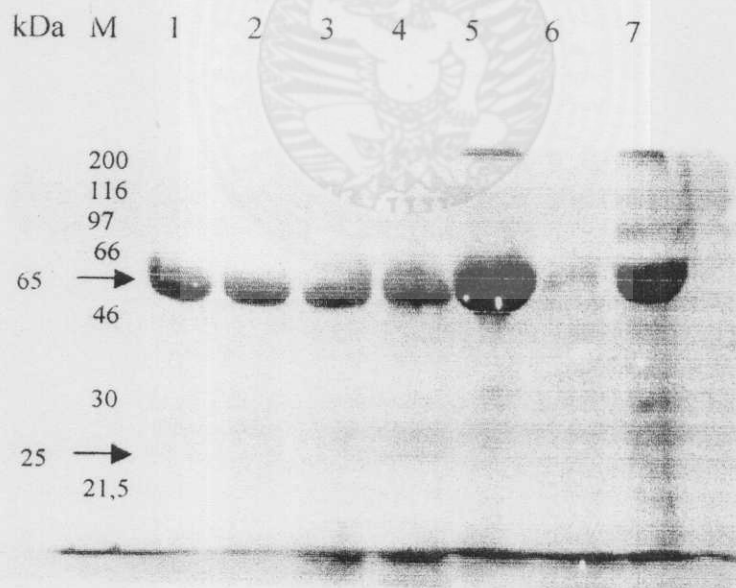
Tabel 5.7 Distribusi berat molekul (BM) protein RAU berdasarkan faktor triger penderita *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU)

BM protein RAU (kDa)	Tidak tahu	Trauma	Stres	Hormonal	Genetik
195	1	1	3	1	1
155	3	2	3	1	1
150	3	1	1	0	0
145	1	1	0	0	0
130	1	1	3	1	1
125	6	1	0	1	0
120	1	2	0	0	0
115	3	1	1	0	0
105	4	0	0	0	0
100	7	5	5	1	1
95	1	0	0	1	0
90	1	0	0	0	0
80	3	1	1	1	1
75	2	3	4	0	0
70	3	2	2	1	0
65	11	2	2	1	1
60	8	2	2	1	1
55	7	2	2	1	0
50	4	1	1	0	0
45	1	1	1	0	0
40	1	3	3	1	1
35	9	2	2	2	0
30	9	2	2	0	0
25	11	3	3	1	0
20	10	3	3	1	0

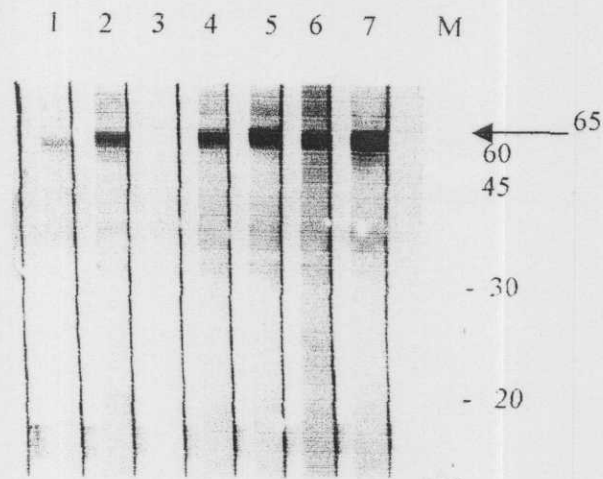
Protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa paling banyak distribusinya pada faktor triger yang tidak diketahui yaitu terdapat pada 11

penderita, sedangkan protein dengan berat molekul 100 kDa masing-masing terdapat pada 5 penderita dengan faktor triger trauma dan stres. Protein dengan berat molekul 65 kDa terdapat pada semua faktor triger.

Hasil analisis protein dengan SDS-PAGE 12 % dari protein RAU dengan pewarnaan *silver stain* dapat dilihat pada gambar 5.1. Analisis protein dengan *Stratifying Westernblot* pada protein RAU yang direaksikan dengan antibodi poliklonal penderita RAU dengan pewarnaan *fast red* dan purifikasi protein RAU dengan cara Elusi dapat dilihat pada gambar 5.2 dan 5.3 berikut :

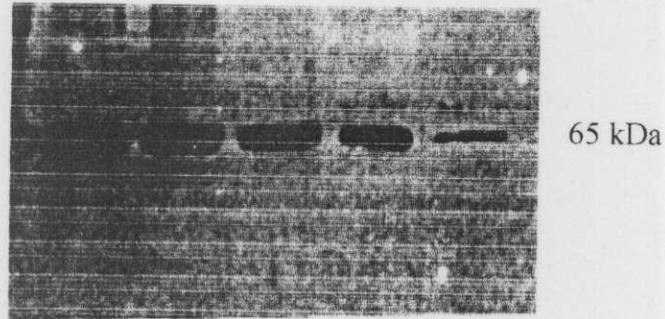


Gambar 5.2 Hasil analisis protein RAU dengan SDS-PAGE 12 % yang divisualisasikan dengan *silver stain* . Lajur 1: RAU, 2 : RAU, 3 : RAU, 4 : RAU, 5: RAU, 6 : kontrol, 7: RAU dan M : marker



Gambar 5.3 Analisis protein RAU dengan cara *Straiifing Westerblot*. Protein direaksikan dengan antibodi poliklonal dari penderita RAU dan kontrol kemudian divisualisasikan dengan pewarnaan *fast red*. Lajur 1 : RAU, 2 : RAU, 3: kontrol, 4: RAU, 5 : RAU, 6 : RAU , 7: RAU dan M : marker.

Hasil analisis protein RAU dengan cara *Straiifing Western Blot* direaksikan dengan antibodi poliklonal dari penderita RAU dan kontrol menunjukkan bahwa adanya reaktivitas antara protein RAU dengan antibodi poliklonal RAU pada protein dengan berat molekul 65 kDa namun tidak dengan antibodi poliklonal kontrol .

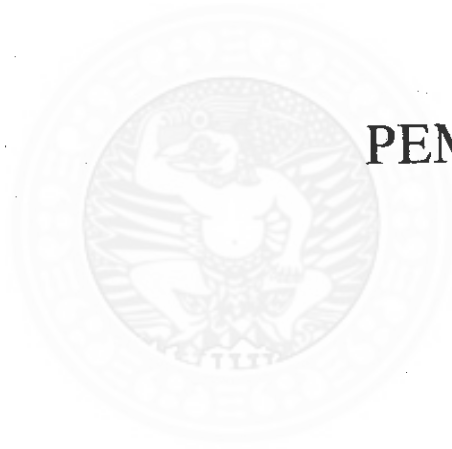


Gambar 5.4 Purifikasi protein RAU dengan cara Elusi

Protein RAU dapat dipurifikasi dengan cara Elusi sebagai metode purifikasi protein spesifik RAU yang akan dijadikan sebagai bahan pembuatan monoklonal antibodi anti RAU

## **BAB 6**

# **PEMBAHASAN**





## BAB 6

### PEMBAHASAN

Pada penelitian ini didapatkan frekuensi terbanyak pada umur antara 20-29 tahun sebanyak 60 % (tabel 5.1). Ini sesuai dengan Lehner, 1992 RAU paling banyak muncul pada dekade 2. Wanita lebih banyak menderita RAU dibandingkan pria, pada penelitian ini wanita sebanyak 72 % (tabel 5.2) Menurut Ship *et al.*, 2000 RAU banyak terjadi pada wanita dibandingkan pria. Diameter ulser penderita RAU pada penelitian ini antara 3-7 mm (tabel 5.3), ukuran lesi ini termasuk pada RAU tipe minor. RAU minor merupakan ulser dengan diameter 3 mm hingga kurang dari 1 cm (Scully, 2002). Pada penelitian ini tidak didapatkan ulser dengan ukuran 1-3 cm yang termasuk kategori jenis RAU mayor, karena menurut Mirowski, 2001 tipe RAU yang terbanyak adalah tipe minor yaitu 80%, sedangkan tipe mayor sekitar 10%. Frekuensi kekambuhan dari setiap bulan hingga tiga bulan sekali ( tabel 5.4) RAU merupakan lesi yang berulang 2 sampai 4 kali setahun (Lynch, 1997)

Berdasarkan anamnesa riwayat penyakit penderita RAU pada penelitian ini sebagian besar faktor trigger munculnya RAU tidak diketahui yaitu sebesar 64 % (tabel 5.5) . Menurut Barrons, 2001 bahwa penyebab RAU tidak diketahui oleh sebagian besar penderita. Sedangkan trauma pada penelitian ini sebagai trigger sebanyak 20 % dan selebihnya dihubungkan dengan faktor stres, hormonal, dan genetik. Trauma banyak dilaporkan

sebagai faktor presipitasi oleh banyak penderita RAU, sebanyak 128 penderita. 20 penderita mengaku disebabkan oleh trauma ( Rees dan Binnie, 1996 dan Ship *et al.*, 1996) Sedangkan faktor hormonal lebih banyak dihubungkan dengan siklus menstruasi (Scully, 2002) Berdasarkan anamnesa pada penderita dengan kekambuhan RAU setiap bulan dihubungkan dengan faktor hormonal. Faktor stres sebanyak 16 % juga dilaporkan sebagai faktor yang dihubungkan dengan penderita (tabel 5.5), demikian pula menurut Rees dan Binnie, 1996, terdapat rata-rata 21% dari kasus RAU. Sedangkan faktor genetik hanya dilaporkan oleh 1 penderita, dimana mempunyai riwayat seluruh keluarganya mengalami RAU dengan frekuensi yang cukup sering 1-3 bulan sekali. Menurut Rees dan Binnie, 1996, faktor genetik berdasarkan anamnesa dilaporkan sebanyak 50% dari kasus yang ada.

Hingga kini faktor-faktor yang dapat menimbulkan RAU masih belum jelas. Mirowski 2001 membaginya berdasarkan faktor host dan faktor lingkungan.

#### a. Faktor host

Faktor lebih banyak diperankan oleh faktor genetik, stres, hormonal dan defisiensi nutrisi. Faktor genetik lebih ditekankan pada pola kemampuan host yang diturunkan dalam menerima penetrasi faktor-faktor penyebab lainnya. Hubungan antara HLA dan RAU tidak ada hubungan yang konsisten (Mirowski, 2001,). Defisiensi nutrisi yaitu kekurangan zat besi, asam folat ,

vitamin B1, B2, B6, B12, C dan kalsium dapat menjadi faktor timbulnya RAU (Mirowski, 2001; Ogura; Scully 2002). Pada sampel penelitian tidak dapat dipastikan sampel menderita defisiensi nutrisi karena perlu dilakukan pemeriksaan secara laboratoris. Namun hal ini tidak menutup kemungkinan terjadi pada beberapa sampel.

#### a. Faktor lingkungan

Faktor ini meliputi trauma, alergi dan peranan mikroba. Trauma pada mukosa mulut lebih ditekankan bukan pada perkembangan RAU tapi sebagai faktor presipitasi (Rees dan Binnie, 1996). Alergi pada jenis makanan tertentu misalnya kacang, coklat, susu, sereal, tomat dan keju dimungkinkan dapat menstimulasi munculnya RAU (Rees dan Binnie, 1996). Berdasarkan anamnesa pada sampel faktor alergi tidak ditemukan.

Akhir-akhir ini penelitian tentang RAU banyak difokuskan tentang peranan mikroorganisme dalam hal ini bakteri merupakan faktor yang menginduksi mukosa mulut. Menurut Mirowski, 2001 adanya reaksi silang antara 65-66 kD hsp *streptococcus* dan mukosa mulut. Sebagaimana penelitian yang dilakukan oleh Hasan *et al.*, 2002 bahwa keberadaan mikroorganisme dalam jumlah yang banyak berkoloni pada mukosa mulut dapat menginisiasi suatu respon imun melalui hsp 65 – peptide 95-105 dari mikroba menstimulasi sejumlah sel Langerhans di dalam mukosa mulut untuk mengaktifkan suatu reaksi silang respon imun terhadap homolog peptide 116-130 pada hsp 60 epitel, sehingga terjadi perubahan

imunopatologi yang menimbulkan RAU. Hal ini memungkinkan karena di dalam rongga mulut terdapat berbagai macam mikroba.

Namun kesemua faktor tersebut masih menjadi faktor yang belum jelas dari penyebab RAU. Oleh karena itu pada penelitian ini dilakukan penelitian untuk mengidentifikasi adanya protein spesifik pada RAU.

Berdasarkan analisis molekul protein dari penderita RAU dengan cara SDS- PAGE 12 % terdapat variasi protein *Recurrent Aphthous Ulceration* (RAU) yaitu protein dengan berat molekul antara 195-20 kDa (tabel 5.6). Protein yang dominan pada RAU adalah protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa (tabel 5.6). Jika dibandingkan dengan protein kontrol (non RAU) maka ada beberapa protein yang tidak ditemukan pada protein kontrol, yaitu protein dengan berat molekul molekul 115, 105, 95, 90, 75, 65, dan 45 kDa.

Adanya kemungkinan bahwa variasi protein yang ada pada protein RAU merupakan hasil induksi dari beberapa faktor baik host maupun lingkungan. Pada tabel 5.7 distribusi berat molekul protein RAU berdasarkan faktor triger penderita RAU, pada faktor triger yang tidak diketahui, protein yang dominan adalah protein dengan berat molekul 65 kDa dan 25 kDa masing-masing terdapat pada 11 penderita dari 16 penderita dengan faktor triger tidak diketahui. Sedangkan pada faktor triger trauma dan stres, protein dengan berat molekul 100 kDa lebih dominan yaitu terdapat pada 5 penderita dari 5 penderita dengan faktor triger trauma. Sedangkan faktor

triger hormonal lebih dominan protein dengan berat molekul 35 kDa yang terdapat pada 2 penderita dari 2 penderita dengan faktor triger hormonal dan faktor triger genetik karena hanya dilaporkan oleh satu penderita maka distribusinya merata pada protein dengan berat molekul 195, 155, 130, 100, 80, 65, 60, dan 40 kDa.

Namun protein hasil analisis SDS-PAGE 12 % ini masih belum spesifik, karena belum dapat ditemukan protein dengan berat molekul berapa yang merupakan protein spesifik pada RAU, walaupun ditemukan protein yang tidak ditemukan pada kontrol. Oleh karena itu masih harus dilakukan analisis *Straiffing Westernblot*.

Hasil yang diperoleh dari analisis protein dengan cara *Straiffing Westernblot* dalam penelitian ini dengan mereaksikan antara protein RAU dengan antibodi poliklonal penderita RAU diperoleh protein dengan berat molekul 65 kDa dan protein tersebut tidak bereaksi dengan antibodi sampel kontrol (gambar 5.3). Hal ini menunjukkan bahwa adanya respon imun secara sistemik terhadap protein 65 kDa pada penderita RAU yang mengindikasikan bahwa protein 65 kDa merupakan protein yang bersifat antigenik.

Pada penelitian ini dapat diidentifikasi adanya protein spesifik pada RAU yaitu protein dengan berat molekul 65 kDa. Protein ini kemungkinan merupakan protein hasil induksi oleh semua faktor-faktor yang berperan dalam RAU, baik faktor host maupun lingkungan secara terus-menerus,

sehingga protein tersebut menjadi anomali. Ini dapat dilihat pada tabel 5.7, protein dengan berat molekul 65 kDa terdapat pada semua faktor triger. Induksi yang terus-menerus ini mempengaruhi *nuclear binding factor* yang berperan dalam transkripsi dari RNA sehingga memunculkan suatu protein yang anomali bersifat sebagai antigen mukosa (Nichifor *et al.*, 2002). Antigen mukosa yang memodulasi reaksi berlebihan secara lokal dan akhirnya berpengaruh sebagai faktor triger yang memunculkan respon imun (Burruano dan Tortorici, 2000).

Protein 65 kDa sebagai protein anomali yang bersifat antigenik menginduksi *nuclear faktor kappa B* (NF- $\kappa$ B) yang berperan dalam menginduksi transkripsi gen IL-2 (Ernawati, 2002). IL-2 merupakan faktor pertumbuhan autokrin pada mayoritas T sel normal, oleh karena itu regulasi transkripsi dari gen IL-2 sangat penting bagi komponen mitotik aktivasi sel T yang fungsional. IL-2 sangat berperan dalam proliferasi dan diferensiasi sel Th<sub>1</sub> dan T sitotoksik serta sel NK (Abbas *et al.*, 1994 dan Goldsby *et al.*, 2000). Ketiga sel tersebut sangat berperan dalam imunopatogenesis RAU (Sun *et al.*, 2000). Selain itu adanya perubahan pada protein mukosa mengakibatkan sel lain berpartisipasi seperti monosit/makrofag, sel mast dan sel endotelial dengan cara mensekresi TNF-alfa. Sitokin ini adalah jenis sitokin proinflamasi dan sebagai mediator aspek imun. Oleh karena itu sangat berkaitan dengan pengaktifan pengumpulan leukosit pada daerah RAU

sehingga terjadi kerusakan dari epitelium yang merupakan rangkaian akhir dari patogenesis RAU (Natah *et al.*, 2000 dan Mirowski, 2001). Dengan demikian protein 65 kDa merupakan protein spesifik pada RAU yang berperan dalam patogenesis RAU.

Kemungkinan adanya hubungan antara protein 65 kDa dengan hsp (*Heat Shock Protein*) karena protein spesifik RAU ini berada dalam kisaran berat molekul protein hsp yaitu 10-110 kDa. Protein 65 kDa yang merupakan protein spesifik RAU muncul akibat induksi dari berbagai macam faktor baik host maupun lingkungan namun hal ini berbeda dengan protein hsp yang diproduksi oleh sel dalam merespon temperatur tinggi (Goldsby, 2000 dan Nichifor *et al.*, 2002). Sehingga belum dapat dipastikan bahwa protein 65 kDa merupakan hsp, oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut bahwa protein 65 kDa merupakan hsp.

Purifikasi dilakukan dengan cara elusi pada protein RAU untuk melihat bahwa protein dengan berat molekul 65 kDa tetap eksis pada setiap penderita, sehingga protein ini dapat digunakan sebagai bahan pembuatan antibodi monoklonal anti RAU

## BAB 7

# KESIMPULAN DAN KESIMPULAN



## BAB 7

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 7.1 Kesimpulan

1. Hasil penelitian ini ditemukan protein dengan berat molekul 65 kDa sebagai protein yang dominan pada RAU yang tidak terdapat pada kontrol dan bereaksi dengan antibodi poliklonal penderita RAU tetapi tidak pada antibodi poliklonal kontrol. Protein 65 kDa ini diidentifikasi sebagai protein spesifik pada RAU.
2. Protein spesifik pada RAU 65 kDa dapat dipurifikasi

#### 7.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut dan mendalam terhadap karakterisasi molekuler terhadap protein 65 kDa untuk menentukan peptide dan komposisi asam amino yang membentuk peptide tersebut sehingga dapat lebih jelas penyebab dari RAU.

# DAFTAR PUSTAKA



## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas KA, Lichman AH, Pober JS, 1994. Cellular and Molecular Immunology, 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia : W.B. Saunders, pp 161-65
- Austyn JM, Wood JW, 1994. Principle of Cellular and Molecular Immunology. Oxford :Oxford University Press, pp 499-578
- Bachtiar EW, Corain S, Siregar B, Raharjo TW, 1998. Decreased CD4+ / CD8+ Ratio I Major Type of Recurrent Aphthous Ulcers: Comparing Major to Minor Types of Ulcers. Asian Pac J Allergy Immunol 16: 75 – 9
- Burruano F, Tortirici S, 2000. Major Aphthous Stomatitis (Sutton,s disease): Etiopathogenesis, Histological and Clinical Aspects. Mierva Stomatol 49: 41 – 50
- Callejo GFJ, Alborch OMH, Ventura MA, Cortes, SP, Algarra MJ, 1999. Recurrent Aphthous Stomatitis and Clinical Response to Pentoxifyline. Acta Otorrinolaringo Esp 50(8):671-3
- Dolby AE, 1975. Oral Mucosa in Health and Disease, 1<sup>st</sup> ed. J.B. Lippincott Company, pp 2-11
- Dolby AA, Walker DM, Matthews N, 1981. Introduction to Oral Immunology. 1<sup>st</sup> ed. Edward Arnold Lmd.
- Ernawati DS, 2002. Anomaly Protein of Oral Mucosal Induces Recurrent Aphthous Stomatitis (RAS). International Congress 2<sup>nd</sup> Bali FDI-Indonesian Dental Association (IDA), 20<sup>th</sup> – 22<sup>nd</sup> Sept 2002
- Eversole LR, 1994. Immunopathology of Oral Mucosal Ulcerative, Desquamative, and Bullous Disease, Selective Review of The Literature. Oral Surg Oral Pathol 7: 555 – 71
- Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, 2000. Kuby Immunology, 4<sup>th</sup> ed. New York : W.H. Freeman and Company, pp 104-110, 384-6
- Garady D, Ersnter VL, Stillman L, Greenspan J, 1992. Smokless tobacco Use Prevents Aphthous Stomatitis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 74:463-5
- Greespan JS, Gadol N, Olson JA, Hoover CI, Jacobsen PL, Shillitoe EJ, Armitage GC, 1985. Lymphocyte Function in Recurrent Aphthous Ulceration. J Oral Pathol 14: 592 – 602

- Hasan A, 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 KS, Mizushima Y, Va der zee, Voughan R, Lehner T, 1995. Recognition of Unique Peptide Epitope of The Mycobacterial and Human Heat Shock Protein 65 – 60 Antigen by T of Patients with Recurrent Oral Ulcers. *Clin Exp Immunol* 99: 392 –7
- Hasan A, Shinnick T, Mizushima Y, van der Zee R, Lehner T, 2002. Defining a T-cell Epitope within HSP 65 in Recurrent Aphthous Stomatitis. *Clin Exp Immunol* 128 (2) : 318-25
- Haskell R, Gayford JJ, 1991. Penyakit Mulut, terj. Yuwono L, Ed. 2, Jakarta : EGC, hlm 1-8
- Healy CM, Thornhill MH, 1999. Induction of Adhesion Molecule Expression on Blood Vessels and Keratinocyte in Recurrent Oral Ulceration. *J Oral Pathol Med* 28 (1): 5-11
- Johnatan AS, Chavez EM, Doer PA, Henson BS, Sarmadi M, 2000. Recurrent Aphthous Stomatitis. *Oral Medicine, Clinical Pract Guideline* 31: 95 – 112
- Lehner T, 1992. Immunology of Oral Disease, 3<sup>rd</sup> ed, Oxford : Blackwell Scientific Publication, pp 1-2, 150-7
- Lynch MM, 1997. *Burket's Oral Medicine Diagnosis and Treatment*, 9<sup>th</sup> ed. Philadelphia : Lippincott-Raven, pp 26-32
- MacPhil LA, Greespan D, Feigel DW, Lenette ET, Greespan JS, 1991. Recurrent Aphthous Ulcers in Association with HIV Infectio, Discription of Ulcers Types and Analysis of T-lymphocyte Subsets. *Oral Surg Oral Med* 7: 678-83
- Mirowski GW, 2001, Aphthous Stomatitis, Departemen of Dermatology and Oral Medicine. Surgery and Pathology, Indiana University School of Dentistry and Medicine
- Multhoff G, Botzler C, Issel R, 1998. The Role of HSP in Stimulation of an Immune Respons. *Biol Chem* 379 (3) : 295-300
- Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW, 1999. *Biokimia Harper*. Ed.24. Jakarta : EGC, hlm 42-53
- Natah SS, Hayrenin-Immunen RI, Hietanen J, Malmorm M, Konttinen YT, 2000. Immunolocalization of Tumor Necrosis Factor-alpha Expressing Cells in Recurrent Aphthous Ulceration (RAU). *J Oral Pathol Med* 29: 19 – 25

- Natah SS, Hayrenin-Immunen RI, Hietanen J, Malmorm M, Konttinen YT, 2000. Increased Density of Lymphocytes Bearing gamma/delta T-cell Receptors in Recurrent Aphthous Ulceration (RAU). *J Oral Maxillofac Surg* 29: 375 – 380
- Nichifor M T, Dumitru IF, Dinu D, 2002. Heat Shock Protein. *Romanian Biotechnological Letters* Vol 7 No 5
- Pockley GA, 2001. Heat Shock Proteins in Health and Disease : Therapeutic Targets or Therapeutic Agents ? *Expert Reviews in Molecular Medicine*.  
[http : www.ermm.cbcu.cam.ac.uk](http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk)
- Rantam FA, 2003. Metode Immunologi. Surabaya : Airlangga University Press, hlm 143-161
- Rees TD, Binnie WH, 1996. Recurrent Aphthous Stomatitis. *Dermatol Clinics* 14:243-56.
- Romagnoni S, 1999. Th1/Th2 cells Inflamm Bowel Dis 5: 285 – 294
- Savage W, Seymour GJ, Kruger BJ, 1996. Expression of Class I and Class II Major Histocompatibility Complex Antigens on Epithelial Cells in Recurrent Aphthous Stomatitis. *J Oral Pathol* 15: 191 – 195
- Scully C, 2002. Aphthous Stomatitis. *eMedicine Journal* Vol 3 No 6
- Scully C, Yap PL, Boyle P, 1983. IgE and IgD Concentration in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. *Arch Dermatol* 119: 31 – 4
- Shimoyama T, Horie N, Kato T, Kaneko T, Komiyama, 2000. Helicobacter Pylori in Oral Ulcerations. *J Oral Sci* 42 (4) : 225-3
- ShipJA, Chavez EM, Doerr PA, Henson BS, Sarmadi M, 2000. Recurrent Aphthous Stomatitis. *Quintessence Int* 31 (2) : 95-112
- Sistig S, Chekie-Arambasin A, Rabatie S, Boras V, Kleinheins J, Piffko J, 2001. Natural Immunity in Recurrent Aphthous Ulceration. *J Oral Pathol Med* 30: 275 – 280
- Sun A, Chu CT, Wu YC, Yuan JH, 1991. Mechanisms of Depressed Natural Killer Cell Activity in Recurrent Aphthous Ulcers. *Clin Immunol Immunopathol* 60: 83 – 92
- Sun A, Chu CT, Liu B, Wang JT, Leu JS, Chiang CP, 2000. Expression of Interleukin-2 Receptor by Activated Peripheral Blood Lymphocytes by The

Plasma Level of Interleukin-2 in Patients with Recurrent Aphthous Ulcers.  
Proc Natl Sci Counc Rep China 24: 116 – 122

Tuzun B, Wolf R, Tuzun Y, Serdaroglu S, 2000. Recurrent Aphthous Stomatitis and Smoking. Int J Dermatol 39 (5) : 358-60

Zugel U, Kaufmann S, 1999. Role of Heat Shock Protein in Protection from and Pathogenesis of Infectious Diseases. Clin Microb Rev 12(1) : 19-39



# LAMPIRAN





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 : 13/SK/LE/2003

Yang bertanda tangan dibawah ini menerangkan bahwa :

Nama Peneliti Utama : PEPY HERDANI RA., drg.  
 Judul Penelitian : Identifikasi Protein pada Recurrent Aphthous Ulceration

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

- a. Laik etik
- b. Laik etik dengan usulan perbaikan :

.....  
 .....

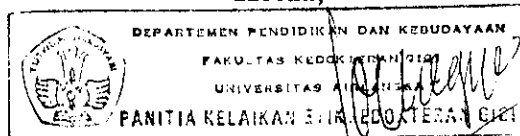
c. Tidak laik etik

**Catatan :**

Panitia akan memantau prosedur operasional pengambilan data dari penelitian tersebut

Surabaya, 4 September 2003

Ketua,



**Prof. Retno Laksmningsih Soebago, drg.,MHPed.**

Identifikasi Protein Spesifik ...  
 NIP. 150206163

Pepy Herdani R.A



Lampiran 2

LEMBAR INFORMED CONSENT

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama :  
Tempat/tanggal lahir :  
Umur :  
Jenis Kelamin :  
Alamat :

Bersedia menjadi subyek penelitian dari :  
Sdri : Pepy Herdani R.A, drg

Judul penelitian: IDENTIFIKASI PROTEIN SPESIFIK PADA *RECURRENT APHTHOUS ULCERATION* (RAU)

Prosedur yang dilakukan adalah swab mukosa dan pengambilan darah tidak akan menimbulkan resiko dan ketidaknyamanan pada subyek penelitian oleh karena tidak melakukan tindakan invasif.

Setelah membaca penjelasan tersebut di atas 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 subyek dalam penelitian ini dan saya tahu bahwa saya berhak untuk mengundurkan diri dari penelitian sewaktu-waktu tanpa mempengaruhi perawatan medik saya selanjutnya.

Surabaya,

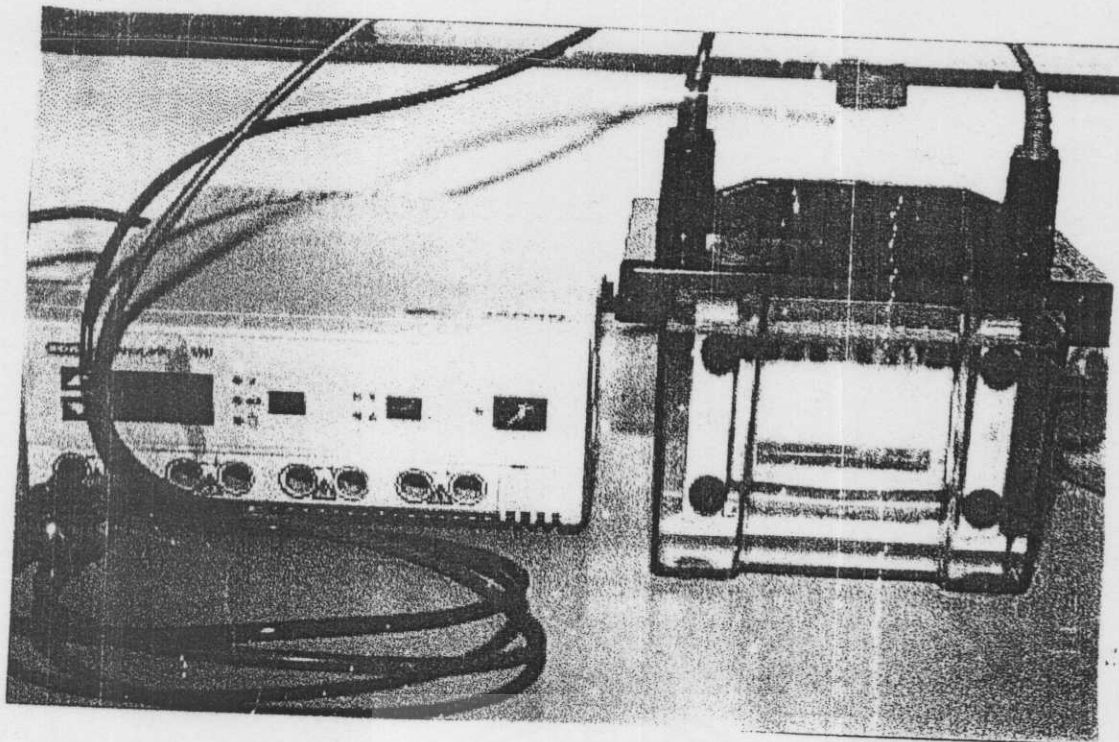
2003

Peneliti,

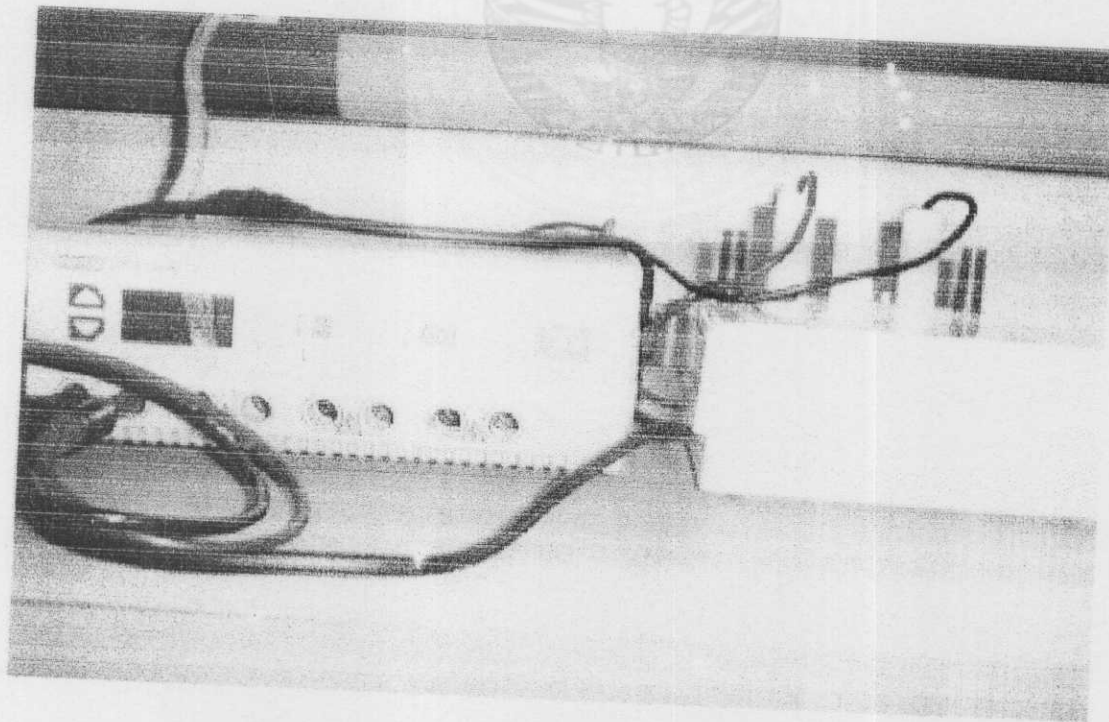
Subyek penelitian,

(Pepy Herdani R.A)

( )



Gambar 1 : Alat Elektroforesis



Gambar 2 : Alat Blotter

## Lampiran 4

## Regression

Variables Entered/Removed<sup>b</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf (x) <sup>a</sup>	.	Enter

- a. All requested variables entered.  
b. Dependent Variable: log BM (y)

## Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.968 <sup>a</sup>	.937	.924	.094116

- a. Predictors: (Constant), Rf (x)

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.653	1	.653	73.761	.000 <sup>a</sup>
	Residual	.044	5	.009		
	Total	.698	6			

- a. Predictors: (Constant), Rf (x)  
b. Dependent Variable: log BM (y)

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.182	.056		91.929	.000
	Rf (x)	-1.013	.118	-.968	-8.588	.000

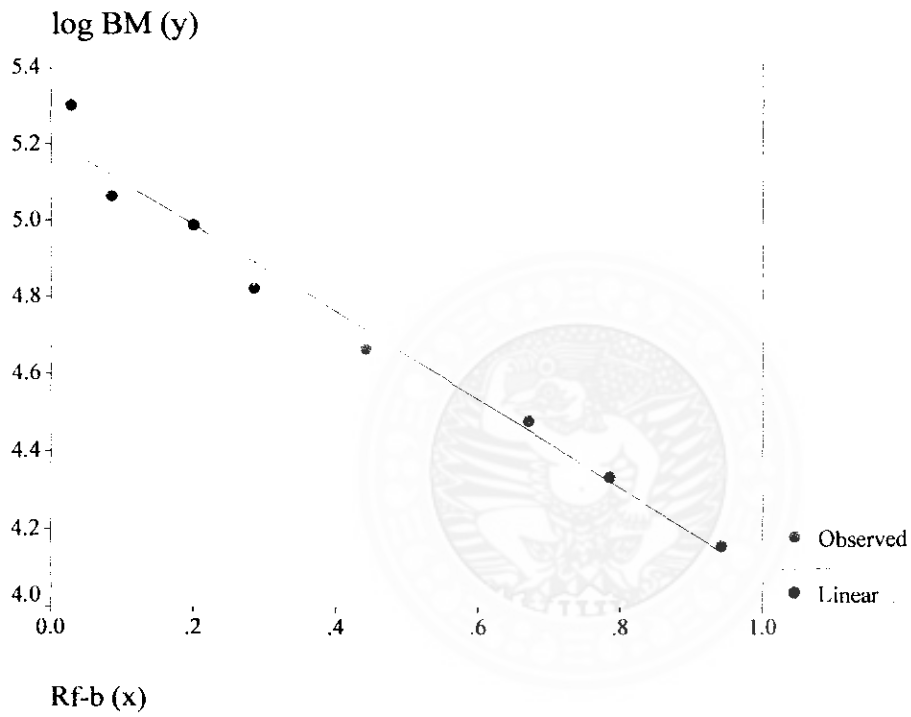
- a. Dependent Variable: log BM (y)

Curve Fit

MODEL: MOD\_5.

Independent: RF\_B

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
LOG_BM	LIN	.976	6	247.50	.000	5.2156	-1.1393



## Regression

Variables Entered/Removed<sup>b</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf-b (x) <sup>a</sup>	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log BM (y)

## Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.988 <sup>a</sup>	.976	.972	.064830

a. Predictors: (Constant), Rf-b (x)

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.040	1	1.040	247.497	.000 <sup>a</sup>
	Residual	.025	6	.004		
	Total	1.065	7			

a. Predictors: (Constant), Rf-b (x)

b. Dependent Variable: log BM (y)

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.216	.039		134.815	.000
	Rf-b (x)	-1.139	.072	-.988	-15.732	.000

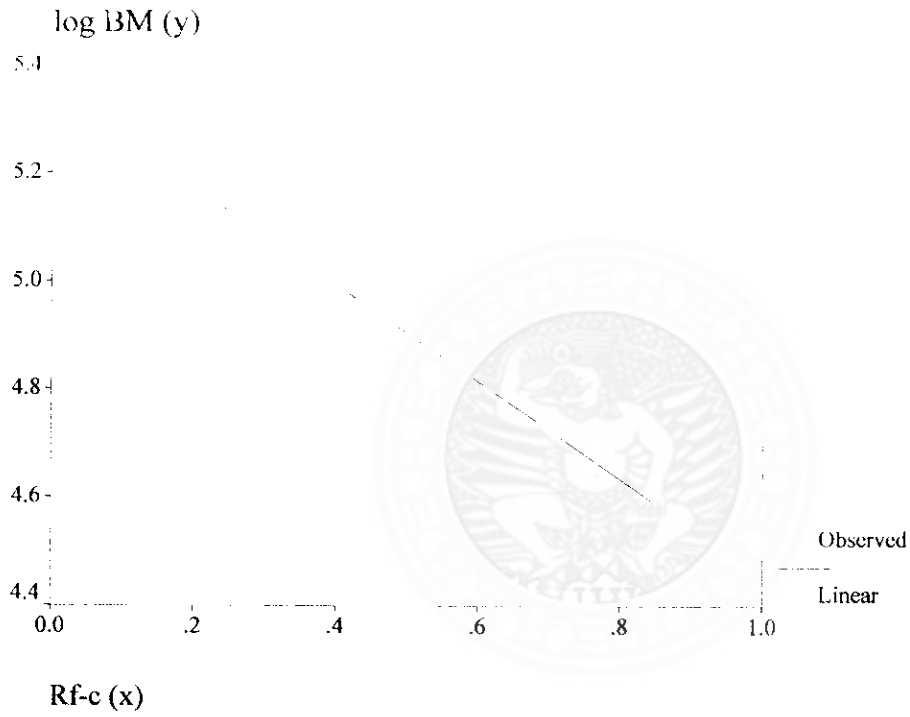
a. Dependent Variable: log BM (y)

Curve Fit

MODEL: MOD\_6.

Independent: Rf\_c

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
LOG_BM	LIN	.994	4	620.74	.000	5.3532	-.8996



Regression

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf-c (x) <sup>a</sup>		Enter

- a. All requested variables entered.
- b. Dependent Variable: log BM (y)

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.997 <sup>a</sup>	.994	.992	.026408

- a. Predictors: (Constant), Rf-c (x)

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.433	1	.433	620.744	.000 <sup>a</sup>
	Residual	.003	4	.001		
	Total	.436	5			

- a. Predictors: (Constant), Rf-c (x)
- b. Dependent Variable: log BM (y)

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.353	.022		247.216	.000
	Rf-c (x)	-.900	.036	-.997	-24.915	.000

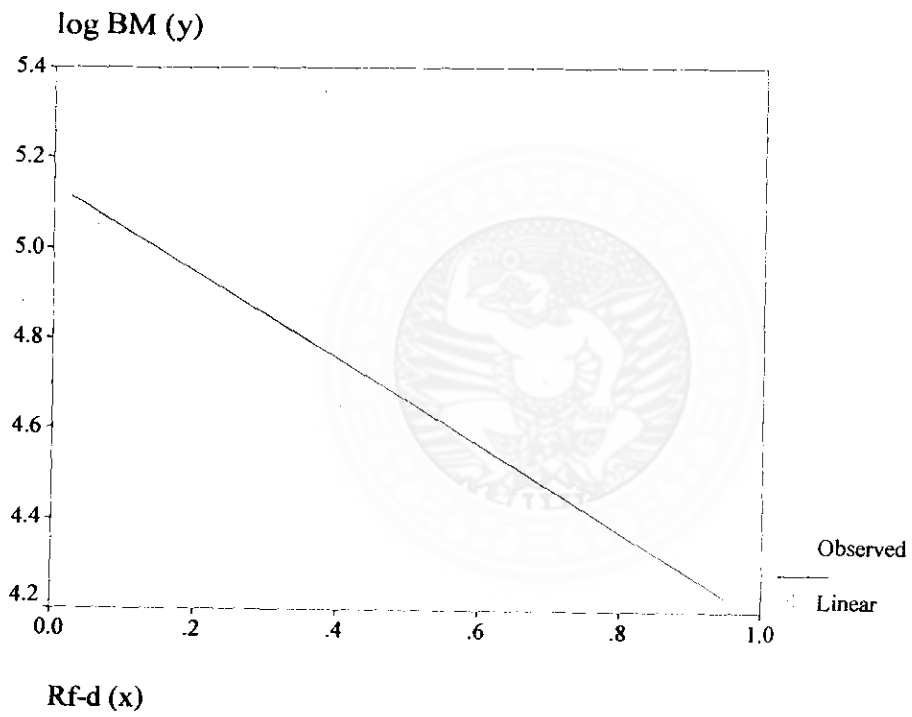
- a. Dependent Variable: log BM (y)

## Curve Fit

MODEL: MOD\_7.

Independent: RF\_D

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
LOG_BM	LIN	.907	5	48.49	.001	5.1400	-.9561





Regression

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf-d (x) <sup>a</sup>	.	Enter

a. All requested variables entered.

b. Dependent Variable: log BM (y)

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.952 <sup>a</sup>	.907	.888	.114207

a. Predictors: (Constant), Rf-d (x)

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	.632	1	.632	48.488	.001 <sup>a</sup>
	Residual	.065	5	.013		
	Total	.698	6			

a. Predictors: (Constant), Rf-d (x)

b. Dependent Variable: log BM (y)

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.146	.064		79.695	.000
	Rf-d (x)	-.956	.137	-.952	-6.963	.001

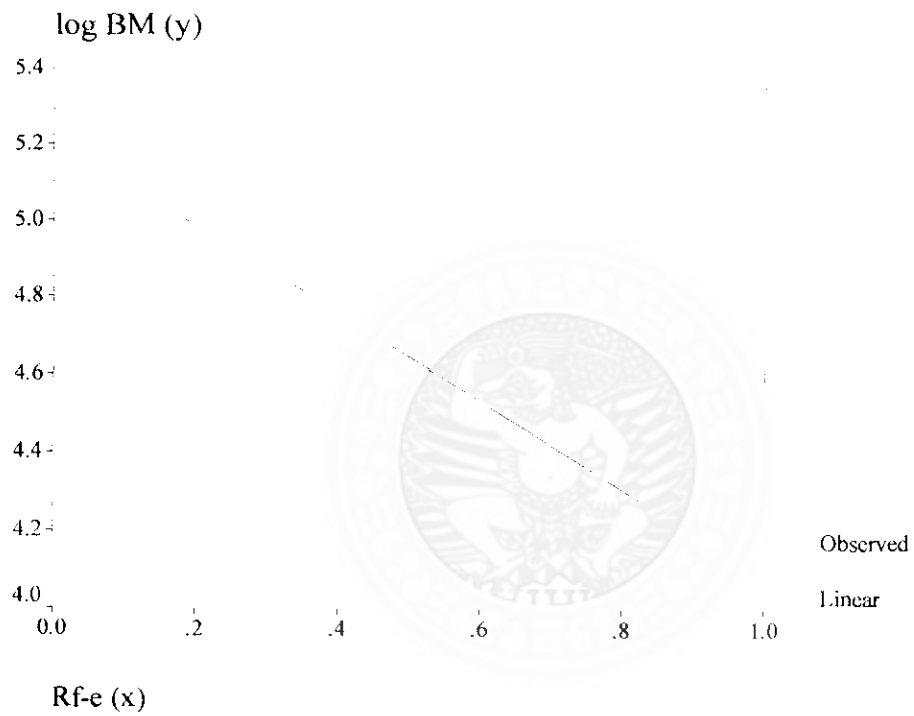
a. Dependent Variable: log BM (y)

### Curve Fit

MODEL: MOD\_8.

Independent: RF\_E

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
LOG_BM	LIN	.977	6	257.87	.000	5.2090	-1.1271



## Regression

Variables Entered/Removed<sup>b</sup>

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf-c (x) <sup>a</sup>	.	Enter

- a. All requested variables entered.  
b. Dependent Variable: log BM (y)

## Model Summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.989 <sup>a</sup>	.977	.973	.063543

- a. Predictors: (Constant), Rf-c (x)

ANOVA<sup>b</sup>

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.041	1	1.041	257.865	.000 <sup>a</sup>
	Residual	.024	6	.004		
	Total	1.065	7			

- a. Predictors: (Constant), Rf-c (x)  
b. Dependent Variable: log BM (y)

Coefficients<sup>a</sup>

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.209	.038		138.610	.000
	Rf-c (x)	-1.127	.070	-.989	-16.058	.000

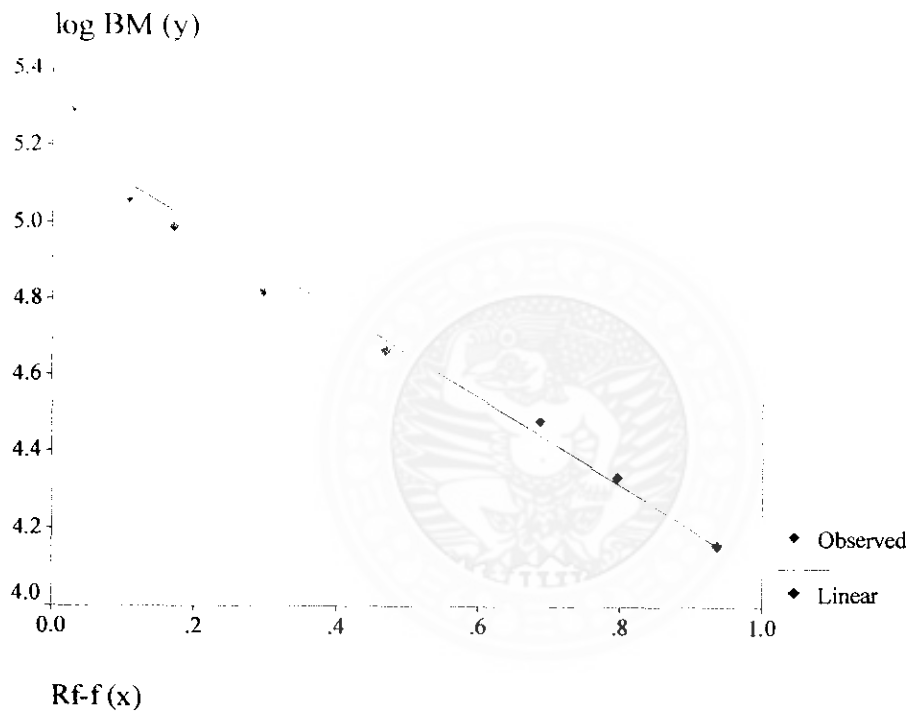
- a. Dependent Variable: log BM (y)

Curve Fit

MODEL: MOD\_1.

Independent: RF\_F

Dependent	Mth	Rsq	d.f.	F	Sigf	b0	b1
LOG_BM	LIN	.979	6	280.12	.000	5.2231	-1.1379



Regression

**Variables Entered/Removed<sup>b</sup>**

Model	Variables Entered	Variables Removed	Method
1	Rf-f(x) <sup>a</sup>		Enter

- a. All requested variables entered.
- b. Dependent Variable: log BM (y)

**Model Summary**

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate
1	.989 <sup>a</sup>	.979	.976	.061022

- a. Predictors: (Constant), Rf-f(x)

**ANOVA<sup>b</sup>**

Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	1.043	1	1.043	280.119	.000 <sup>a</sup>
	Residual	.022	6	.004		
	Total	1.065	7			

- a. Predictors: (Constant), Rf-f(x)
- b. Dependent Variable: log BM (y)

**Coefficients<sup>a</sup>**

Model		Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.
		B	Std. Error	Beta		
1	(Constant)	5.223	.037		142.141	.000
	Rf-f(x)	-1.138	.068	-.989	-16.737	.000

- a. Dependent Variable: log BM (y)