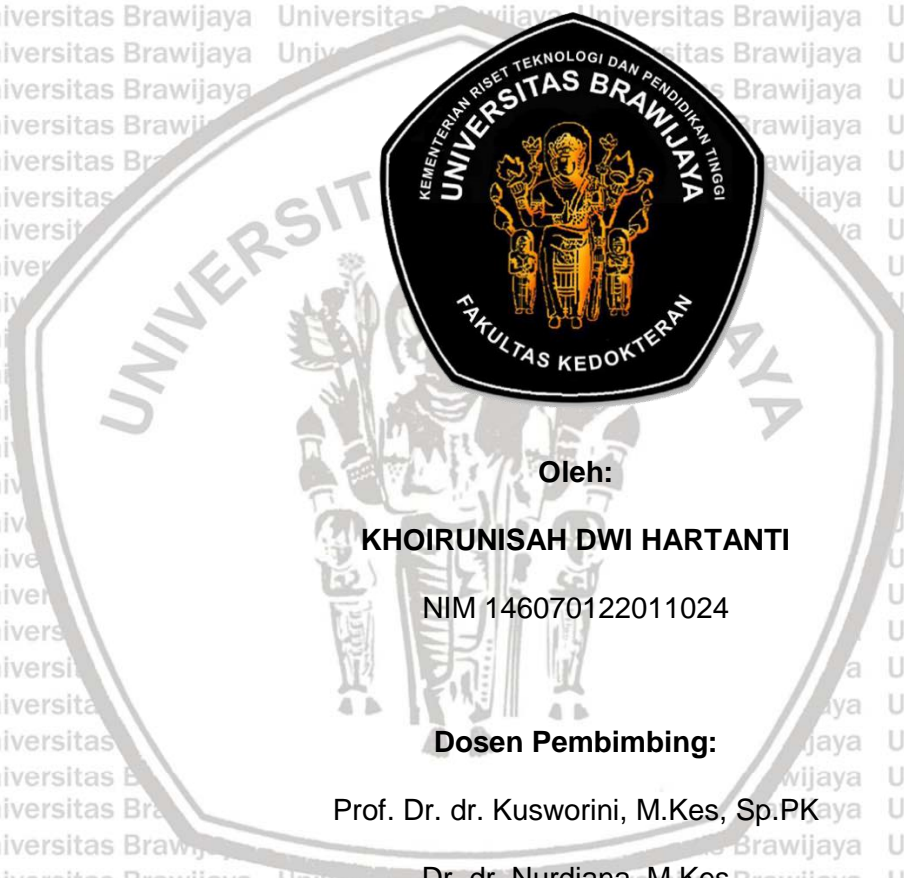


**EFEK PEMBERIAN ESCALATING DOSE IMMUNOTHERAPY (EDI)
MENGUNAKAN SELF ANTIGEN dsDNA TERHADAP JUMLAH SEL-T
HELPER 2 DAN KADAR INTERLEUKIN-4 PADA MENCIT PRISTANE
INDUCED LUPUS (PIL)**

TESIS

Untuk Memenuhi Persyaratan Memperoleh Gelar Magister



Oleh:

KHOIRUNISAH DWI HARTANTI

NIM 146070122011024

Dosen Pembimbing:

Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK

Dr. dr. Nurdiana, M.Kes

PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIK

**PROGRAM PASCASARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2018

TESIS
EFEK PEMBERIAN ESCALATING DOSE IMMUNOTHERAPY (EDI)
MENGGUNAKAN SELF ANTIGEN dsDNA TERHADAP JUMLAH SEL T
HELPER 2 DAN KADAR INTERLEUKIN-4 PADA MENCIT PRISTANE
INDUCED LUPUS (PIL)

Oleh:

Khoirunisah Dwi Hartanti, dr

Dipertahankan di depan penguji
pada tanggal : 6 Januari 2018
dan dinyatakan memenuhi syarat

Komisi Pembimbing,



Prof. Dr. dr. Kusworini Handono, M. Kes., SpPK.
Ketua



Dr. dr. Nurdiana, M. Kes.
Anggota

Penguji,



Dr. Husnul Khotimah Ssi, M. Kes.
Penguji 1



Dr. dr. Retty Ratnawati, M. Sc.
Penguji 2

Malang,
Universitas Brawijaya
Dekan,



Dr. dr. Sri Andarini, M. Kes
NIP. 195804141987012001

PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah TESIS ini tidak terdapat karya ilmiah yang diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu Perguruan Tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah TESIS ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur PLAGIASI, saya bersedia TESIS ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (MAGISTER) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku. (UU NO.20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang, Januari 2018

Mahasiswa,

Nama : Khoirunisah Dwi Hartanti
 NIM : 146070122011024
 PS : Ilmu Biomedik
 Prog : Pascasarjana
 Fak. : Kedokteran UB



IDENTITAS TIM PENGUJI TUGAS AKHIR

JUDUL TESIS:

EFEK PEMBERIAN ESCALATING DOSE IMMUNOTHERAPY (EDI) MENGGUNAKAN SELF ANTIGEN dsDNA TERHADAP JUMLAH SEL T HELPER 2 (Th2) DAN KADAR INTERLEUKIN-4 (IL-4) PADA MENCIT PRISTANE INDUCED LUPUS (PIL)

Nama Mahasiswa : Khoirunisah Dwi Hartanti

NIM : 146070122011024

Program Studi : Ilmu Biomedik

KOMISI PEMBIMBING:

Ketua : Prof. Dr. dr.Kusworini Handono, M.Kes., SpPK

Anggota : Dr. dr. Nurdiana, M.Kes

TIM DOSEN PENGUJI:

Dosen Penguji 1 : Dr. Husnul Khotimah S.si, M.Kes

Dosen Penguji 2 : Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc

TIM MONITORING EVALUASI:

Tanggal Ujian :

SK Penguji :



KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur kepada Allah SWT karena rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan Tesis dengan judul “Efek Pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) Menggunakan Self Antigen dsDNA terhadap Jumlah Sel T *Helper* 2 (Th2) dan Kadar Interleukin-4 (IL-4) pada Mencit *Pristane Induced Lupus* (PIL)”.

Penulis mengucapkan terimakasih banyak kepada:

1. Rektor Universitas Brwaijaya atas kesempatan yang diberikan untuk mengikuti Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik di Unniversitas Brawijaya.
2. Dr. dr. Sri Andarini, M.Kes, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan kesempatan untuk menyelesaikan Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik di Fakultas kedokteran Universtas Brawijaya.
3. dr. Hidayat Sujuti, SpM., PhD, sebagai Ketua Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, dan sekaligus penguji kedua dari penulis, atas dukungan yang telah diberikan kepada penulis.
4. Sekertaris Program Pendidikan Magister Ilmu Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Dr. Husnul Khotimah, S. Si, M.Kes.
5. Prof. Dr. dr. Kusworini Handono, M.Kes, SpPK, selaku dosen pembimbing pertama yang banyak sekali memberikan bantuan, dukungan, bimbingan dan kesabaran dalam menyelesaikan tesis ini.
6. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes, selaku dosen pembimbing kedua yang dengan sabar memberikan tuntunan, masukan, dan dukungan dalam menyelesaikan tesis ini.
7. Prof. Dr. dr. Mulyohadi Ali, Sp.FK selaku penguji yang telah memberikan saran dan arahan dalam penulisan tesis ini.

8. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc selaku penguji yang telah memberikan saran dan arahan dalam penulisan tesis ini.

9. Dr. Husnul Khotimah, S.si, M.Kes selaku penguji yang telah memberikan saran dan arahan dalam penulisan tesis ini.

10. Tim peneliti, Analis Laboratorium, Petugas Laboratorium dan Komunitas Parahita Peduli Lupus Malang, atas dukungan dan kerjasamanya.

11. Dosen-dosen yang telah mengajar dalam Program Studi Biomedik, Mas Yayan yang banyak membantu administrasi.

12. Keluarga: Bapak, Ibu, dan Kak Agung, saudara-saudara, juga teman seperjuangan: dr. Retna Gumilang, dr. Syaiful Arifin, dr. Thoha Muhajir, dan dr. Naya Adi serta teman-teman satu angkatan dalam Program studi Biomedik, dan teman-teman lain yang selalu mendoakan dan mendukung selesainya tesis ini.

Penulis menyadari banyaknya kekurangan dalam penulisan tesis ini, namun penulis berharap tesis ini dapat bermanfaat bagi dunia kesehatan di Indonesia dan dunia. Semoga Allah SWT memberikan anugerah dan berkah bagi kita semua.

Malang, Januari 2018

Penulis

RINGKASAN

Khoirunisah Dwi Hartanti, NIM. 146070122011024, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Efek Pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) Menggunakan *Self Antigen* dsDNA terhadap Jumlah Sel T *Helper* 2 (Th2) dan Kadar Interleukin-4 (IL-4) pada Mencit *Pristane Induced Lupus* (PIL). Komisi Pembimbing Ketua: Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK; Anggota : Dr. dr. Nurdiana, M.Kes.

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah suatu penyakit autoimun sistemik yang bersifat kronis dan melibatkan kerusakan multi organ. Pada LES terjadi aktivasi yang berlebihan dari sel T dan sel B menyebabkan aktivitas LES meningkat. *Escalating Dose (Antigen-Spesifik) Immunotherapy / EDI* adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjektikan autoantigen (self-antigen) dengan dosis yang bertahap. Metode EDI telah diteliti pada penyakit autoimun *multiple sclerosis* dan terbukti mampu mengembalikan toleransi imun dengan menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif termasuk sel T dan sel B. Peningkatan proliferasi sel Th2 akibat pengenalan *self antigen* oleh APC berkontribusi pada hiperaktivitas sel B autoreaktif yang berperan penting pada produksi autoantibodi pada LES. IL-4 sebagai salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 berperan dalam meningkatkan diferensiasi sel B dan juga sel T, terutama sel T-*helper* 2 (Th2). Beberapa penelitian menunjukkan kadar IFN γ yang meningkat pada serum darah pasien LES dan ketidakseimbangan sitokin Th1 (IFN γ) dan Th2 (IL-4) berhubungan dengan peningkatan aktivitas penyakit lupus pada mencit model lupus.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian terapi EDI menggunakan *self-antigen* dsDNA dalam berbagai dosis pada mencit Balb/c *pristane induced lupus* (PIL) terhadap persentase sel Th2, kadar IL-4, serta rasio kadar IFN γ /IL-4. Metode penelitian yang dilakukan adalah desain eksperimen murni di laboratorium secara *in vivo*. Mencit betina Balb/c berusia 6-8 minggu dibagi kelompok kontrol negatif (mencit normal, n=5) dan kelompok mencit *pristane induced lupus* (PIL). Kelompok mencit PIL diberi injeksi 0,5 cc (782 μ g/ml) *pristane* secara i.p. Dua belas minggu paska injeksi *pristane*, mencit dievaluasi manifestasi klinis dan serologis (kadar anti-dsDNA). Mencit yang menunjukkan tanda-tanda lupus atau mencit PIL dibagi menjadi empat kelompok diantaranya kelompok kontrol positif (n=5): mencit PIL tanpa terapi EDI dsDNA, kelompok terapi A (n=5): mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis I (0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml), kelompok terapi B (n=5): mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis II (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml), dan kelompok terapi C (n=5): mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis III (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan. Persentase sel Th2 diukur menggunakan metode flowcytometry dari limpa sedangkan kadar IL-4 dan IFN- γ diukur menggunakan metode ELISA dari serum darah mencit. Analisis data dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji beda dilakukan dengan uji *One Way ANOVA* jika data terdistribusi normal dan homogen dan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen. Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian injeksi *pristane* secara IP dosis tunggal dapat menginduksi tanda-tanda lupus yaitu penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas dan peningkatan kadar anti-dsDNA secara signifikan. Hasil menunjukkan rata-rata persentase sel Th2 pada kelompok terapi A (3,28 \pm 0,64), B (3,31 % \pm 1,12), dan C (3,44 % \pm 0,52) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok K(+)(4,31 % \pm 0,39) meskipun tidak signifikan. Kadar IL4 pada kelompok terapi A (3,17 \pm 0,42; p=0.037), B (4,22 \pm 3,61; p=0.024), dan C (5,02 \pm 3,42; p=0.005) cenderung meningkat dibandingkan kelompok positif (1,60 \pm 0,51) secara signifikan (p<0,05). Rasio IFN γ /IL-4 pada kelompok terapi A (3601.11 \pm 1070.77; p=0.003), B (2934.61 \pm 1083.00; p=0.001) dan C (2953.56 \pm 1584.28; p=0.001) mengalami penurunan signifikan jika dibandingkan kelompok K(+)(7814.15 \pm 2331.95) yang menunjukkan pemberian terapi EDI dsDNA dapat menurunkan rasio IFN γ /IL-4.

Pada penelitian ini pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL dapat menurunkan jumlah sel Th2 melalui peningkatan sel T-Reg dan produksi sitokin imunomodulator IL-10 dan TGF- β . Pada penelitian sebelumnya, pemberian imunoterapi dengan antigen spesifik dengan metode EDI terbukti dapat menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif. Sel Treg memiliki peran penting dalam pengembangan terapi toleransi dengan antigen spesifik dan induksi sitokin IL10 sebagai imunomodulator. Peningkatan kadar IL-4 pada mencit PIL akibat pemberian EDI dsDNA diduga tidak hanya karena adanya produksi IL-4 oleh sel Th2 tetapi juga produksi dari sel-sel lain seperti sel mast, sel basofil, dan sel B. Peningkatan kadar IL-4 ini sebagai regulator untuk menekan aktivitas sel Th1 yang berlebih. Aktivitas Th1 salah satunya ditandai dengan produksi IFN- γ . Th2 juga memproduksi sitokin IL-4 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag. Aktivitas Th2 kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1. Menurunnya rasio IFN γ /IL-4 pada mencit PIL yang diberikan terapi EDI dsDNA menjelaskan hasil pengukuran kadar IL-4 yang meningkat pada penelitian ini. Peningkatan kadar IL-4 pada kelompok mencit yang diberi terapi EDI dsDNA diduga sebagai kompensasi untuk menekan produksi sitokin IFN- γ lupus. Mengembalikan keseimbangan produksi IFN- γ dan IL-4 diharapkan dapat menjadi target terapi untuk menghambat kerusakan organ pada LES dan pada penelitian ini, pemberian terapi EDI dsDNA pada mencit PIL berhasil mengembalikan keseimbangan IFN- γ /IL-4 mendekati mencit normal. Pemberian EDI dsDNA tidak dapat menurunkan kadar IL-4 pada mencit PIL. Efek pemberian EDI dsDNA pada mencit PIL menunjukkan penurunan jumlah sel Th2 dan penurunan rasio IFN γ /IL-4 dengan dosis terbaik didapatkan pada kelompok dosis II (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml).



SUMMARY

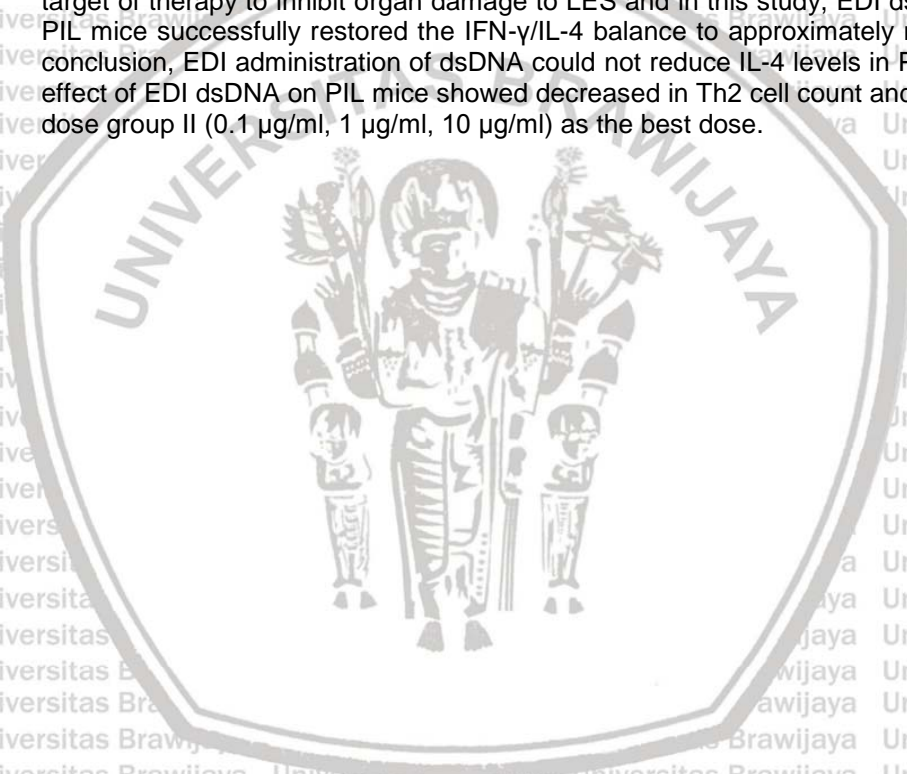
Khoirunisah Dwi Hartanti, NIM. 146070122011024. Biomedical Science Master Degree, Medical Faculty of Universitas Brawijaya. 2017. Effect of Escalating Dose Antigen Specific Therapy with dsDNA on Th2 Cell Number and Serum Interleukine-4 Levels in Pristane Induced Lupus Mice. Supervisor Chairman: Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, Member: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is chronic autoimmune diseases which involve multi-organ damage. Previous studies found that in LES patient, excessive activation of T cells caused LES exacerbation. Escalating Dose (Antigen-Specific) Immunotherapy / EDI is a therapeutic method for suppressing the immune response through the tolerance mechanism by injecting autoantigen (self-antigen). This method has been studied in autoimmune multiple sclerosis with Myelin Basic Protein injection and has been shown to be able to restore immune tolerance by inducing activation and function of T-reg cells to increased level of IL-10 and TGF- β cytokine that can regulate autoreactive cells including autoreactive T cells and B cells. The increased proliferation of Th2 cells due to the introduction of self-antigen by APC contributes to the autoreactive B cell hyperactivity that plays an important role in the production of autoantibodies in LES. IL-4 as one of the cytokines produced by Th2 cells plays a role in increasing the differentiation of B cells as well as T cells, especially T-helper 2 (Th2) cells. Several studies have shown that elevated IFN- γ levels in blood serum of LES patients and imbalance of Th1 (IFN- γ) and Th2 (IL-4) cytokines are associated with increased lupus disease activity in lupus model mice.

This study was aim to determine the effect of EDI therapy using self-antigen dsDNA in various doses to *pristane* induced lupus (PIL) Balb/c mice towards Th2 cell percentages, IL-4 levels, and IFN γ /IL-4 ratio. This research uses true experimental study design in laboratory with post-test-only control group design. Samples were selected using simple random sampling method. Balb/c female mice 6-8 weeks old and 20-30 grams body weight separated randomly to negative control group (healthy mice) and pristane induced lupus (PIL) mice group. PIL mice groups were injected 0.5 cc (782 μ g / ml) pristane intraperitoneally. Twelve weeks after the injection of pristane, the mice were evaluated for clinical and serological manifestations (anti-dsDNA levels). Mice with lupus signs (PIL mice) were divided into four groups; positive control group: PIL mice without EDI dsDNA therapy, treatment A: PIL mice with EDI dsDNA therapy dose I (0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml), treatment B: PIL mice with EDI dsDNA therapy dose dose II (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml), and treatment C: PIL mice with EDI dsDNA therapy dose III (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) was administered once every week respectively. In addition, dsDNA has complexed with the cationic polymer polyethylenimine (PEI)₂ before injection. This study was measured some variables including percentages of Th2 cells in spleen mice using flowcytometry method and IL-4 and IFN- γ levels measured using ELISA (eBioscience). The data obtained were analyzed first using the normality and homogeneity test of variance with confidence level of 95%. Comparable tests performed by One Way ANOVA test if the data were normal distributed and homogenous and Kruskal Wallis test if the data were not normally distributed and or not homogeneous. Analysis can be continued post hoc test to know the differences between groups.

The results of this study showed that a single dose of IP dose injection could induce signs of lupus including weight loss, hair loss, decreased activity and significantly increased anti-dsDNA levels. The results showed that the average percentage of Th2 cells in treatment group A (3.28 \pm 0.64), B (3.31% \pm 1.12), and C (3.44% \pm 0.52) tended to decrease compared to positive group (K+) (4.31% \pm 0.39) although not significant. IL4 Levels in treatment A (3.17 \pm 0.42, p = 0.037), B (4.22 \pm 3.61, p = 0.024), and C (5.02 \pm 3.42; p = 0.005) tends to increase compared to positive group (1.60 \pm 0.51) significantly (p < 0.05). The IFN- γ /IL-4 ratio in treatment group A (3601.11 \pm 1070.77, p = 0.003), B (2934.61 \pm 1083.00; p = 0.001) and C (2953.56 \pm 1584.28; p = 0.001) decreased significantly when compared to positive group (K+) (7814.15 \pm 2331.95) suggesting dsDNA EDI therapy may decrease the IFN γ /IL-4 ratio.

In this study, EDI dsDNA in the PIL mice group could decrease the number of Th2 cells through increased T-Reg cells and production of IL-10 and TGF- β immunomodulatory cytokines. In previous studies, administration of immunotherapy with specific antigens with EDI methods was shown to induce T-Reg activation and function for IL-10 and TGF- β cytokine secretion that work suppresses autoreactive immune cells. T-Reg cells have an important role in the development of tolerance therapy with specific antigens and induction of IL10 cytokines as immunomodulators. Increased levels of IL-4 in PIL mice due to EDI dsDNA therapy are suspected not only because of the production of IL-4 by Th2 cells but also the production of other cells such as mast cells, basophils, and B cells. This increase in levels of IL-4 suggested as a regulator to suppress excess activity of Th1 cells. Th1 activity is one of them characterized by the production of IFN- γ . Th2 also produces IL-4 cytokines that are antagonistic to IFN- γ and suppress macrophage activation. Th2 activity may function as a physiological regulator of the immune response by inhibiting the potentially harmful effects of Th1 responses. The decrease in IFN- γ /IL-4 ratio in PIL mice given dsDNA EDI therapy explains the increased IL-4 measurement results in this study. Increased levels of IL-4 in the mice group treated with dsDNA EDI were thought to be compensatory for suppressing the production of IFN- γ lupus cytokines. Restoring the balance of IFN- γ and IL-4 production is expected to be a target of therapy to inhibit organ damage to LES and in this study, EDI dsDNA therapy in PIL mice successfully restored the IFN- γ /IL-4 balance to approximately normal mice. As conclusion, EDI administration of dsDNA could not reduce IL-4 levels in PIL mice and the effect of EDI dsDNA on PIL mice showed decreased in Th2 cell count and IFN- γ /IL-4 ratio dose group II (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) as the best dose.



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI TUGAS AKHIR.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
RINGKASAN.....	vii
SUMMARY.....	ix
DAFTAR ISI.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR TABEL.....	xv
DAFTAR SINGKATAN.....	xvi
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.2.1 Rumusan Masalah Umum.....	5
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1 Tujuan Umum.....	5
1.3.2 Tujuan Khusus.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1 Manfaat Akademik.....	6
1.4.2 Manfaat Praktis.....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Lupus Eritematosus Sistemik (LES).....	7
2.1.1 Definisi LES.....	7
2.1.2 Epidemiologi LES.....	7
2.1.3 Faktor Risiko LES.....	9
2.1.4 Patogenesis LES.....	10
2.1.5 Manifestasi Klinis LES.....	13
2.1.6 Diagnosis LES.....	14
2.1.7 Penatalaksanaan Penyakit LES.....	15
2.2 Toleransi Sistem Imun.....	18
2.2.1 Mekanisme Toleransi Imun.....	18



2.2.2 Kegagalan Toleransi Imun pada LES.....	21
2.3 dsDNA.....	28
2.3.1 dsDNA.....	28
2.3.2 Self Antigen dsDNA pada LES.....	30
2.4 <i>Escalating Dose Antigen Specific Immunotherapy</i> (EDI).....	33
2.5 Sel T.....	37
2.5.1 Sel T- <i>helper</i> 2 (Th2).....	37
2.5.2 Peran Sel T- <i>helper</i> 2 (Th2) pada LES.....	38
2.6 Peran Interleukin 4 (IL-4).....	43
2.6.1 Interleukin-4 (IL-4).....	43
2.6.2 Peran Interleukin-4 pada LES.....	44
2.7 Interferon- γ (IFN- γ).....	48
2.8 Peran Sel Dendritik pada Patogenesis Pasien LES.....	50
2.9 Ketidakseimbangan Sel T Regulator dan Sel T- <i>Helper</i> 17 pada Penyakit LES.....	52
2.10 <i>Pristane</i>	55
2.9.1 Mekanisme <i>Pristane</i> Menginduksi Lupus.....	55
2.9.2 Manifestasi Klinis Mencit Model Lupus yang Diinduksi <i>Pristane</i>	60
2.10 Kerangka Teori.....	64
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS.....	65
3.1 Kerangka Konsep.....	65
3.2 Hipotesis.....	67
BAB IV METODE PENELITIAN.....	69
4.1 Desain Penelitian.....	69
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	69
4.3 Objek dan Sampel.....	71
4.4 Variabel Penelitian.....	71
4.5 Definisi Operasional.....	72
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	74
4.7 Prosedur Penelitian.....	75
4.7.1 Persiapan Hewan Coba.....	75
4.7.2 Mencit <i>Pristane</i> Induced Lupus (Mencit PIL).....	76
4.7.3 Isolasi dsDNA.....	76
4.7.4 Prosedur Nanodrop.....	77
4.7.5 Preparasi dan Injeksi dsDNA.....	78

4.7.4 Pengukuran Jumlah Sel Th2.....	80
4.7.5 Pengukuran Kadar IL-4.....	81
4.7.6 Pengukuran Kadar IFN- γ	81
4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data.....	82
4.9 Skema Alur Penelitian.....	84
BAB V HASIL DAN ANALISIS DATA.....	85
5.1 Identifikasi Karakteristik Mencit Balb/c <i>Pristane Induced Lupus</i> (PIL).....	86
5.1.1 Manifestasi Klinis Mencit Balb/c <i>Pritane Induced Pristane</i>	86
5.1.2 Manifestasi Serologis Mencit Balb/c Induksi <i>Pristane</i>	88
5.2 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Jumlah sel T <i>Helper 2</i> (Th2) pada Mencit PIL.....	90
5.3 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Kadar Interleukin 4 (IL-4) pada Mencit PIL.....	92
5.4 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Rasio IFN γ /IL-4 pada Mencit PIL.....	94
BAB VI PEMBAHASAN.....	97
6.1 Manifestasi Mencit <i>Pristane Induced Lupus</i> (PIL).....	97
6.2 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Jumlah sel Th2 pada mencit PIL.....	101
6.3 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar IL-4 pada serum mencit PIL.....	107
6.4 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Rasio Kadar IFN γ /IL-4 pada Serum Mencit PIL.....	110
6.5 Keterbatasan Peneltian.....	114
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	116
7.1 Kesimpulan.....	116
7.1.1 Kesimpulan Umum.....	116
7.1.2 Kesimpulan Khusus.....	116
7.2 Saran.....	116
DAFTAR PUSTAKA.....	118
LAMPIRAN.....	133

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Jumlah Kasus dan Meninggal Akibat Lupus pada Pasien Rawat Inap di Rumah Sakit di Indonesia Tahun 2014-2016	9
Gambar 2.2. Lima fase pada Lupus eritematosus sistemik	10
Gambar 2.3. Patogenesis LES	21
Gambar 2.4 Respon Seluler pada Perkembangan LES	26
Gambar 2.5. Sensor asam nukleat pada LES	32
Gambar 2.6. Struktur kimia pristan (2,6,10,14-tetramethylpentadecane)	56
Gambar 2.7. Mekanisme pristan dalam menginduksi lupus	58
Gambar 2.8. Jalur stimulasi produksi IFN tipe I dan sitokin pro inflamasi.	59
Gambar 2.9 Kerangka Teori Penelitian	64
Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian	82
Gambar 5.1 Manifestasi Klinis Mencit PIL Paska Injeksi Tunggal Pristane secara Intraperitoneal	86
Gambar 5.2 Hasil Pemeriksaan Persentase Sel Th2 (CD4+IL4+) dengan Metode Flowcytometry	90
Gambar 5.3 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Persentase Jumlah Sel Th2	91
Gambar 5.4 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar IL-4	93
Gambar 5.5 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Rasio IFN γ /IL4	95

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kriteria SLICC 2012	15
Tabel 2.2 Rekomendasi Terapi LES dengan Manifestasi Organ Ringan dan Sedang	15
Tabel 2.3 Autoantibodi pada Hewan Model Lupus dengan Induksi Pristan	61
Tabel 4.1 Konsentrasi DNA dengan Pengukuran Nanodrop	78
Tabel 4.2 Pengenceran DNA dengan Larutan PEI	80
Tabel 5.1 Rata-rata Berat Badan Mencit yang Diukur secara Berkala	87
Tabel 5.2 Evaluasi Manifestasi Klinis Setelah Pemberian EDI dsDNA	88
Tabel 5.3 Rata-Rata Hasil Pengukuran Kadar anti-dsDNA Pada Mencit Normal dan Mencit PIL	89



DAFTAR SINGKATAN

- dsDNA : *Double strand DNA*
- ANA : *Anti Nuclear Antibody*
- Anti-ds DNA : *Anti Double strand DNA*
- anti-Sm : *Antigen Smith*
- AP-1 : *Activator Protein-1 (AP-1)*
- APC : *Antigen Presenting Cell*
- EDI : *Escalating Dose (Antigen-Specific) Immunotherapy*
- FoxP3 : *Forkhead Box P3*
- IFN- γ : *interferon- γ*
- IFN-I : *Interferon tipe I*
- IL : *Interleukin*
- IL-4 : *Interleukin 4*
- IL-17 : *Interleukin 17*
- IL-6 : *Interleukin 6*
- IL-10 : *Interleukin 10*
- TGF β : *Transforming Growth Factor beta*
- IRF : *Interferon Regulatory Factor*
- LES : *Lupus Eritematosus Sistemik*
- MHC : *Major Histocompatibility Complex*
- NZBW : *New Zealand Black and New Zealand White Mice*
- pDCs : *Sel dendritik plasmasitoid (pDCs)*
- PEI : *Polyethylenimine*
- snRNP : *Small Nuclear Ribonucleoprotein*
- Th : *T helper*
- Th1 : *T helper 1*
- Th2 : *T helper 2*
- Th17 : *T helper 17 (Th17)*
- TLR7 : *Toll-Like Receptor 7*
- TLR9 : *Toll-Like Receptor 9*
- TMPD : *Tetramethylpentadecane*
- TNF- α : *tumor necrosis factor α*
- Treg : *T regulator*
- BAFF : *B cell-activating factor*

DAFTAR PUSTAKA

Abbas K A, Lichtmant A H, Pillai S. 2007. *Cellular and Molecular Immunology*. Sixth ed. Philadelphia: W B Saunders Company.

Abbas K A, Lichtmant A H, Pillai S. 2012. *Cellular and Molecular Immunology*. Seventh ed. Philadelphia: W B Saunders Company.

Afzali B., Lombardi G., Lechler R. I., Lord G. M. 2007. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and autoimmune disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 148: 32-46

Akahoshi, M., Hitoshi Nakashima, Yosuke Tanaka, Tsutomu Kohsaka, Shuji Nagano, Eiichi Ohgami, Yojiro Arinobu, Kunihiro Yamaoka, Hiroaki Niiro, Michiya Shinozaki, Hideki Hirakata, Takahiko Horiuchi, Takeshi Otsuka, and Yoshiyuki Niho. 1999. Th1/Th2 balance of peripheral t helper cells in Systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 42(8):1644–1648

Amerio P, Frezzolini A, Abeni D, Teolfoli P, Girardelli CR, De Pita O et al. 2002. Increased IL-18 in patients with systemic lupus erythematosus: Relations with Th-1, Th-2, proinflammatory cytokines and disease activity. IL -18 is a marker of disease activity but does not correlate with proinflammatory cytokines, *Clin Exp Rheumatol*. 20: 535-538.

Anderson, P. O., Barbara A. Manzo, Anette Sundstedt, Sophie Minaee, Alistair Symonds, Sabah Khalid, Maria E. Rodriguez-Cabezas, Kirsty Nicolson, Suling Li, David C. Wraith, Ping Wang Dr. 2006. Persistent antigenic stimulation alters the transcription program in T cells, resulting in antigen-specific tolerance. *Eur. J. Immunol*. 36,1374–1385

Apostolidis, S. A., Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. 2011. IL-17-producing T cells in lupus nephritis. *Lupus* 20, 120–124

Arbuckle MR, McClain MT, Rubertone MV, Scofield RH, Dennis GJ, James JA, et al. 2003. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *New Engl J Med*. 349(16):1526–33.

Baratawidjaja, Karnen Garna. 2006. *Imunologi Dasar* edisi ke-7: 229-233. Balai Penerbit FKUI: Jakarta

Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. 2011. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*. 29:185–214.

Baudino L, Azeredo da Silveira S, Nakata M, Izui S. 2006. Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer Semin Immun*. 28(2):175–84.

Belot, A., Paul R. Kasher, Eleanor W. Trotter, Anne-Perrine Foray, Anne-Laure Debaud, Gillian I. Rice, Marcin Szykiewicz, Marie-Therese Zobot, Isabelle Rouvet, Sanjeev S. Bhaskar, Sarah B. Daly, Jonathan E.



- Dickerson. *et al*, 2013. Protein kinase C δ deficiency causes Mendelian systemic lupus erythematosus with B cell defective apoptosis and hyperproliferation. *Arthritis Rheum.* 65, 2161–2171.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197:711–723.
- Bertsias, G., Ioannidis, J. P., Boletis, J., Bombardieri, S., Cervera, R., Dostal, C., *et al*. 2008. EULAR recommendations for the management of systemic lupus erythematosus. Report of a Task Force of the EULAR Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutics. *Ann Rheum Dis* 67(2):195-205
- Boeltz, Sebastian., Deborah Kienhoefer and Markus H Hoffmann. 2013. Wolves in Sheep's Clothing: How Chemically Inert Hydrocarbon Oils Induce Autoimmunity. *Immunome Res* 10:1
- Bratawidjaya K G. 2012. *Imunologi Dasar* Edisi ke-10. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. 2007. Beneficial suicide: Why neutrophils die to make NETs. *Nat Rev Microbiol.* 5:577–582.
- Bruns A, Blass S, Hausdorf G, Burmester GR, Hiepe F. 2000. Nucleosomes are major T and B cell autoantigens in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 43:2307–2315..
- Burks, A. W., Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, Nelson H, Akdis CA. 2013. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131, 1288–1296.
- Burton, B.R., Graham J. Britton, Hai Fang, Johan Verhagen, Ben Smithers, Catherine A. Sabatos-Peyton, Laura J. Carney, Julian Gough, Stephan Strobel & David C. Wraith. 2014. Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy. *Nature Communications* 5:4741
- Butler, J. M. 2005. *Genetics and Genomics of STR Marker*. 2nd ed. New York: Elsevier Academic Press.
- Calvani, N., Caricchio, R., Tucci, M., *et al*. 2005. Induction of apoptosis by the hydrocarbon oil pristane: Implications for Pristane-induced lupus. *Journal of Immunology*, 175(7): 4777-4782
- Campbell, J. D., Buckland KF, McMillan SJ, Kearley J, Oldfield WL, Stern LJ, Grönlund H, van Hage M, Reynolds CJ, Boyton RJ, Cobbold SP, Kay AB, Altmann DM, Lloyd CM, Larché M. 2009. Peptide immunotherapy in

allergic asthma generates IL-10-dependent immunological tolerance associated with linked epitope suppression. *J. Exp. Med.* 206, 1535–1547

Campbell, N.A., Reece, J.B., & Mitchell, L.G. 2004. *Biologi*. Jilid 3. Edisi Kelima. Alih Bahasa: Wasmen. Jakarta: Penerbit Erlangga.

Castellano, G., Cesira Cafiero, Chiara Divella, Fabio Sallustio, Margherita Gigante, Paola Pontrelli, Giuseppe De Palma, Michele Rossini, Giuseppe Grandaliano and Loreto Gesualdo. 2015. Local synthesis of interferon- α in lupus nephritis is associated with type I interferons signature and LMP7 induction in renal tubular epithelial cells. *Arthritis Res. Ther.* 17, 72

Celhar, T., Hopkins R, Thornhill SI, De Magalhaes R, Hwang SH, Lee HY, Yasuga H, Jones LA, Casco J, Lee B, Thamboo TP, *et al.* 2015. RNA sensing by conventional dendritic cells is central to the development of lupus nephritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 112, E6195–E6204.

Chavele, K. M. & Ehrenstein, M. R. 2011. Regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *FEBS Lett.* 585, 3603–3610

Choi, Jinyoung., Sang Taek Kim, and Joe Craft. 2012. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an Update. *Current Opinion of Immunology* 24 (6): 651-657.

Choubey, D. 2012. Interferon-inducible Ifi200-family genes as modifiers of lupus susceptibility. *Immunol. Lett.* 147, 10–17

Chowdhary, V.R., Grande, J.P., Luthra, H.S., David, C.S. 2007. Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane induced lupus. *Rheumatology*, 46(9): 1405-1410

Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ. 2006. Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity* 25:417-428.

Chun H-Y, Chung J-W, Kim H-A, Yun J-M, Jeon J-Y, Ye Y-M *et al.* 2007 Cytokine IL-6 and IL-10 as biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immuno*; 27: 461–6.

Crispin, J. C. & Tsokos, G. C. 2009. Human TCR- $\alpha\beta$ + CD4⁻ CD8⁻ T cells can derive from CD8⁺ T cells and display an inflammatory effector phenotype. *J. Immunol.* 183, 4675–4681.

Crispin, J. C., Oukka M, Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kytтарыс VC, Juang YT, Tsokos GC. 2008. Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *J. Immunol.* 181, 8761–8766.

Cruse JM, Lewis RE. 2004. Atlas of immunology. 2nd ed. Boca Raton, Florida: CRC Press

Csiszar A, Nagy G, Gergely P, Pozsonyi T, Pcsik E. 2000. Increased interferon-gamma (IFN- γ), IL-10 and decreased IL-4 mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with Systemic Lupus Erythematosus (SLE). *Clin Exp Immunol*;122:464–70.

Cui, G.M., Liu, G., Liu, W., Kan, B., Mao, Y.Q., Wei, Y.Q. 2006. Experimental study of pristane-induced murine lupus model. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 37(2): 309-312

Deshmukh US, Bagavant H, Lewis J, Gaskin F, Fu SM. 2005. Epitope spreading within lupus-associated ribonucleoprotein antigens. *Clin Immunol* 117:112–120.

Diamond B, Bloom O, Al Abed Y, Kowal C, Huerta PT, Volpe BT. 2011 Moving towards a cure: blocking pathogenic antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Intern Med*. 269(1):36–44.

Dieker, J., Luuk Hilbrands, Astrid Thielen, Henry Dijkman, Jo H Berden, and Johan van der Vlag. 2015. Enhanced activation of dendritic cells by autologous apoptotic microvesicles in MRL/lpr mice. *Arthritis Res. Ther.* 17, 103.

Dieker, J., Tel J, Pieterse E, Thielen A, Rother N, Bakker M, Fransen J, Dijkman HB, Berden JH, de Vries JM, Hilbrands LB, van der Vlag J. 2016. Circulating apoptotic microparticles in systemic lupus erythematosus patients drive the activation of dendritic cell subsets and prime neutrophils for NETosis. *Arthritis Rheumatol.* 68, 462–472.

Direktorat Jenderal Pencegahan dan Pengendalian Penyakit Tidak Menular. Dirjen P2P. 2016. Kementerian Kesehatan RI, *Pedoman Pengendalian Penyakit Lupus Eritematosus Sistemik (LES)*.

Dolf S, Bijl M, Huitema MG, Limburg PC, Kallenberg CGM, Abdulahad WH. 2011. Disturbed Th1, Th2, Th17 and Treg balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 141: 197–204.

Doreau, A., Belot, A., Bastid J., Riche B., Trescol-Biemont, Marie-Claude, Ranchin B., Fabien N., Cochat P., Pouteil-Noble C., Trolliet P. 2009. Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nature Immunology Volume 10 Number 7: 778-785.*

Duty JA, Szodoray P, Zheng NY, Koelsch KA, Zhang Q, Swiatkowski M, Mathias M, Garman L, Helms C, Nakken B, Smith K, Farris AD, Wilson PC. 2009. Functional anergy in a subpopulation of naive B cells from healthy humans that express autoreactive immunoglobulin receptors. *J Exp Med* 206:139–151

Elewa EA, Omya Zakaria, Enas I. Mohamed, Ghada Boghdadi. 2014. The role of interleukins 4, 17 and interferon gamma as biomarkers in patients with Systemic Lupus Erythematosus and their correlation with disease activity. *The Egyptian Rheumatologist* 36, 21–27

Elias K. M., Laurence A., Davidson Todd S., et al. 2008. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhance FoxP3 expression through a STAT3/STAT5 independent signaling pathway. *Blood Journal*, 111 (3): 1012-1019

Enyedy, E. J. Nambiar MP, Liossis SN, Dennis G, Kammer GM, Tsokos GC. 2001. Fc ϵ receptor type I γ chain replaces the deficient T cell receptor ζ chain in T cells of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 44, 1114–1121.

Eriksson C, Rantapää-Dahlqvist S. 2014. Cytokines in relation to autoantibodies before onset of symptoms for systemic lupus erythematosus. *Lupus*; **23**: 691–6.

Farkas, L., Beiske, K., Lund-Johansen, F., Brandtzaeg, P. & Jahnsen, F. L. 2001. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- α/β -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am. J. Pathol.* 159, 237–243.

Fernandes-Alnemri T, Yu JW, Juliana C, Solorzano L, Kang S, Wu J, Datta P, McCormick M, Huang L, McDermott E, Eisenlohr L, Landel CP, Alnemri ES. 2010. The AIM2 inflammasome is critical for innate immunity to *Francisella tularensis*. *Nat Immunol*; 11:385–393.

Fernandez, D. R. Telarico T, Bonilla E, Li Q, Banerjee S, Middleton FA, Phillips PE, Crow MK, Oess S, Muller-Esterl W, Perl A. 2009. Activation of mammalian target of rapamycin controls the loss of TCR ζ in lupus T cells through HRES-1/Rab4-regulated lysosomal degradation. *J. Immunol.* 182, 2063–2073.

Fitzgerald FK, Burden DW. 2014. Evaluation of the synergy rapid plant DNA isolation Chemistry. *Random Primers.* 13:1–7.

Fonslow BR, Stein BD, Webb KJ, Xu T, Choi J, Kyu S *et al.* 2013. Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *Curr Mol Med*; 10: 54–56.

Forger F, Matthias T, Oppermann M, Becker H, Helmke K. 2004. Clinical significance of anti-dsDNA antibody isotypes: IgG/IgM ratio of anti-dsDNA antibodies as a prognostic marker for lupus nephritis. *Lupus* 13(1):36–44.

Fousteri, G., Dave A, Bot A, Juntti T, Omid S, von Herrath M. 2010. Subcutaneous insulin B:9-23/IFA immunisation induces Tregs that control late-stage prediabetes in NOD mice through IL-10 and IFN γ . *Diabetologia* 53, 1958–1970.

Gabrysova, L., Nicolson KS, Streeter HB, Verhagen J, Sabatos-Peyton CA, Morgan DJ, Wraith DC. 2009. Negative feedback control of the

autoimmune response through antigen-induced differentiation of IL-10-secreting Th1 cells. *J. Exp. Med.* 206, 1755–1767

Gaipl, U. S., Beyer TD, Heyder P, Kuenkele S, Böttcher A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. 2004. Cooperation between C1q and DNase I in the clearance of necrotic cell-derived chromatin. *Arthritis Rheum.* 50, 640–649.

Garcia-Romo, Simone Caielli, Barbara Vega, John Connolly, Florence Allantaz, Zhaohui Xu, Marilyn Punaro, Jeanine Baisch, Cristiana Guiducci, Robert L. Coffman, Franck J. Barrat, Jacques Banchereau, and Virginia Pascual. 2011. Netting Neutrophils Are Major Inducers of Type I IFN Production in Pediatric Systemic Lupus Erythematosus. *Sci Transl Med.* 3(73): 73ra20.

Giles BM and Susan A. Boackle. 2013. Linking complement and anti-dsDNA antibodies in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Immunol Res.* 55(0): 10–21.

Guiducci. 2010. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: lesson from animal models. *Arthritis Res Ther* 13:241

Guimaraes, Poliana Macedo., Bruna Miglioranza Scavuzzi, Nicole Perugini Stadlober, Lorena Flor da Rosa Santos Silva, Marcell Alysson Batisti Lozovoy, Tathiana Mayumi Veiga Iriyoda, Neide Tomimura Costa, Edna Maria Vissoci Reiche, Michael Maes, Isaias Dichi, Andre´a Name Colado Sima˜ o. 2017. Cytokines in systemic lupus erythematosus: Far beyond Th1/Th2 dualism. *Immunology and Cell Biology* accepted article preview 26 June 2017; doi: 10.1038/icb.2017.53.

Gunawan B. 2007. Stres dan sistem imun tubuh: suatu pendekatan psikoneuroimunologi. *CDK*;154:13-6.

Gunther M, Lipka J, Malek A, Gutsch D, Kreyling W, Aigner A. 2011. Polyethylenimines for RNA mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. *Eur J Pharm Biopharm.* 77:438–449.

Guo Y, Chai Q, Zhao Y, Li P, Qiao J, Huang J. 2015. Increased activation of toll-like receptors-7 and -8 of peripheral blood mononuclear cells and upregulated serum cytokines in patients with pediatric systemic lupus erythematosus. *Int J Clin Exp Med.* 8: 20472–20480.

Harley JB, Harley IT, Guthridge JM, James JA. 2006. The curiously suspicious: a role for Epstein-Barr virus in lupus. *Lupus* 15:768–777.

Herman S, Angelika Kny, Christine Schorne, Ju¨ rgen Pfatschbacher, Birgit Niederreiter, Martin Herrmann, Rikard Holmdahl, Gu¨ nter Steiner & Markus H. Hoffmann. 2012. Cell death and cytokine production induced by autoimmunogenic hydrocarbon oils. *Autoimmunity.* 45(8): 602–611

Honda, K., Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, Taya C, Taniguchi T. 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88–IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature* 434, 1035–1040

Hornung, V. et al. 2009. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 458, 514–518.

Huang, L., Henrique P. Lemos, Lingqian Li, MingHui Li, Phillip R. Chandler, Babak Baban, Tracy L. McGaha, Buvana Ravishankar, Jeffrey R. Leell, David H. Munn, and Andrew L. Mellor. 2012. Engineering DNA nanoparticles as immunomodulatory reagents that activate regulatory T cells. *J Immunol.* 188(10): 4913–4920

Intra J, Salem AK. 2008. Characterization of the transgene expression generated by branched and linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles in vitro and after intraperitoneal injection in vivo. *J Control Release.* 130:129–138.

Ioannou Y, Isenberg DA. 2000. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum*;43:1431–1442.

Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. 2009. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 461:788–792.

Ishikawa, H. & Barber, G. N. 2008. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature* 455, 674–678.

Janko, C., Sandra Franz, Luis E. Munoz, Stefan Siebig, Silke Winkler, Georg Schett, Kirsten Lauber, Ahmed Sheriff, Johan van der Vlag and Martin Herrmann. 2011. CRP/anti-CRP antibodies assembly on the surfaces of cell remnants switches their phagocytic clearance toward inflammation. *Front. Immunol.* 2, 70.

Jin, O., Kavikondala S, Sun L, Fu R, Mok MY, Chan A, Yeung J, Lau CS. 2008. Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient CD83 expression. *Lupus* 17, 654–662.

Juang, Y. T. Wang Y, Solomou EE, Li Y, Mawrin C, Tenbrock K, Kytтары VC, Tsokos GC. 2005. Systemic lupus erythematosus serum IgG increases CREM binding to the IL-2 promoter and suppresses IL-2 production through CaMKIV. *J. Clin. Invest.* 115, 996–1005.

Kalim H, Handono K, Khalasha T, Pratama MZ, Iman Dantara TW, Wulandari AP, et al. 2017. Immune modulation effects of curcumin in pristane-induced lupus mice. *Indian J Rheumatol* 0;0:0.

Kalim, Handono, 2000. HLA Klas II Dan Kerentanan Genetik Terhadap Lupus Eritematosus Sistemik Di Indonesia. *Acta Med Ind* XXXII, 11-15

Kawai T, Akira S. Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol* 2006;7:131–137.

Kawamoto M, Harigai M, Hara M, Kawaguchi Y, Tezuka K, Tanaka M, *et al.* 2006. Expression and function of inducible costimulator in patients with Systemic Lupus Erythematosus: possible involvement in excessive interferon-gamma and antidouble-stranded DNA antibody production. *Arthritis Res Ther*;8:R62.

Kawamoto, I, Suzuki, H. 2004. Essential Roles of CD8CD122 Regulatory T cells in the Maintenance of T Cell Homeostasis. *J Exp Med.* 2009: 1123-34

Kimura, A. dan Kishimoto, T. 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40: 1830-1835

Kresno S B. 2010. *Imunologi Diagnosis dan Prosedur Laboratorium*. Jakarta: Badan Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.

Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H. J., Herzer, P., Tenbrock, K., Schenider, M. 2015. The Diagnosis and Treatment of Systemic Lupus Erythematosus. *Dtsch Arztebl Int* 112(25):423-32

Kyttaris, V. C., Juang, Y. T., Tenbrock, K., Weinstein, A. & Tsokos, G. C. 2004. Cyclic adenosine 5'-monophosphate response element modulator is responsible for the decreased expression of c-fos and activator protein-1 binding in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 173, 3557–3563.

Kyttaris, V. C., Kampagianni, O. & Tsokos, G. C. 2013. Treatment with anti-interleukin 23 antibody ameliorates disease in lupus-prone mice. *Biomed. Res.Int.*, 861028.

Lai Kwan Lam, Q., King Hung Ko, O., Zheng, B.J. & Lu, L. 2008. Local BAFF gene silencing suppresses Th17-cell generation and ameliorates autoimmune arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 14993–14998

Lande R, Gregorio J, Facchinetti V, Chatterjee B, Wang YH, Homey B, Cao W, Wang YH, Su B, Nestle FO, Zal T, Mellman I, Schröder JM, Liu YJ, Gilliet M. 2007. Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*; 449:564–569.

Larche, M. & Wraith, D. C. 2005. Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases. *Nat. Med.* 11, S69–S76

Lauwerys, BR, Houssiau, FA. 2003. Involvement of Cytokines in The Pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. In: Cytokines And Chemokines. *Autoimmune Disease*: 237-251

Leadbetter, E. A., Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. 2002. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Tolllike receptors. *Nature* 416, 603–607.

Leiss, H., B Niederreiter, T Bandur, B Schwarzecker, S Blu, G Steiner, W Ulrich, JS Smolen and GH Stummvoll. 2013. Pristane-induced lupus as a model of human lupus arthritis: evolvement of autoantibodies, internal organ and joint inflammation. *Lupus* 22: 778–792

Leonard, D. *et al.* 2015. Activated T cells enhance interferon- α production by plasmacytoid dendritic cells stimulated with RNA-containing immune complexes. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 1728–1734.

Lewis R. 2003. Human Genetics: Concepts and applications. Boston: The McGraw-Hills Company, Inc.

Lit LC, Wong CK, Li KM, Tam LS, Lam CW, Lo YM. 2007. Elevated gene expression of Th1/Th2 associated transcription factors is correlated with disease activity in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *J Rheumatol*;34:89–9-6.

Liu, Z. & Davidson, A. 2013. IFN α inducible models of murine SLE. *Front. Immunol.* 4, 306.

Lu, R. *et al.* 2016. Dysregulation of innate and adaptive serum mediators precedes systemic lupus erythematosus classification and improves prognostic accuracy of autoantibodies. *J. Autoimmun.* 74,182–193.

Ma, J., Yu, J., Tao, X., Cai, L., Wang, J., Zheng, S.G. 2010. The imbalance between regulatory T cell and IL-17-secreting CD4+ T cells in lupus patients. *Clinical Rheumatology*, 29(11): 1251-1258

Maddur S, Janakiraman Vani, Jordan D, *et al.* 2010. Dendritic Cells in Autoimmune Disease. *Arthritis Journal*,Vol 3:1-7

Manzi, S., Sanchez-Guerrero, J., Merrill, J. T., Furie, R., Gladman, D., Navarra, S. V., *et al.* 2012 Effects of belimumab, a B lymphocyte stimulator-specific inhibitor, on disease activity across multiple organ domains in patients with systemic lupus erythematosus: combined results from two phase III trials. *Ann Rheum Dis* 71:1833–8.

Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD. 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J. Clin. Invest*,115:407–417.

Miyake K, Akahoshi M, Nakashima H. Th subset balance in lupus nephritis. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 980286.

Mizutani, A., Shaheen, V.M., Yoshida, H., *et al.* 2005. Pristane-induced autoimmunity in germ-free mice. *Clinical Immunology*, 114(2): 110-118

Mok C, Lau S. 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol.* 56:481-90.

Monrad, Sheeta, Killen Paul. 2008. The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy*, vol 10:R5, page1186

Morgan ME, Suttmuller RP, Witteveen HJ, van Duivenvoorde LM, Zanelli E, Melief CJ, Snijders A, Offringa R, de Vries RR, Toes RE. 2003. CD25p cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 48:1452–1460.

Morris SC, Gause WC, Finkelman FD. 2000. IL-4 suppression of in vivo T cell activation and antibody production. *J Immunol.* 164:1734.

Mortensen ES, Fenton KA, Rekvig OP. 2008. Lupus nephritis: the central role of nucleosomes revealed. *Am J Pathol* 172:275–283.

Mozaffarian, N., Wiedeman, A. E. & Stevens, A. M. 2008 Active systemic lupus erythematosus is associated with failure of antigen-presenting cells to express programmed death ligand-1. *Rheumatology (Oxford)* 47, 1335–1341.

Munoz LE, Gaip US, Franz S, Sheriff A, Voll RE, Kalden JR, Herrmann M. 2005. SLE-a disease of clearance deficiency? *Rheumatology*;44:1101-07.

Munroe, M. E., Lu R, Zhao YD, Fife DA, Robertson JM, Guthridge JM, Niewold TB, Tsokos GC, Keith MP, Harley JB, James JA.. 2016. Altered type II interferon precedes autoantibody accrual and elevated type I interferon activity prior to systemic lupus erythematosus classification. *Ann. Rheum. Dis.* 75, 2014–2021.

Nakashima H, Akahoshi M, Masutani K. 2006. Th1/Th2 balance of SLE patients with lupus nephritis. *Rinsho Byori.* 54(7):706-13.

Neil MO, McPartlin J, Arthure K, Riedel S, Mc Millan ND. 2011. Comparison of the TLDA with the nanodrop and the reference Qubit system. *J Phys Conference Series.* 307(1):1–6.

Papadimitraki, E. D., Choulaki C, Koutala E, Bertias G, Tsatsanis C, Gergianaki I, Raptopoulou A, Kritikos HD, Mamalaki C, Sidiropoulos P, Boumpas DT. 2006. Expansion of Toll-like receptor 9-expressing B cells in active systemic lupus erythematosus: implications for the induction and maintenance of the autoimmune process. *ArthritisRheum.* 54, 3601–3611.

Peng SL, Moslehi J, Craft J. 1997. Roles of interferon-g and interleukin-4 in murine lupus. *J Clin Invest*;99:1936–46.

Pestka S, Krause CD, Walter MR. 2004. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol. Rev*;202:8–32.

Petri M, Orbaí AM, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR, Bruce IN, Isenberg D, Wallace DJ, Nived O, Sturfelt G, Ramsey-Goldman R, Bae SC *et al.* 2012. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 64(8):2677-86.

Postal M, Peliçari KO, Sinicato NA, Marini R, Costallat LTL, Appenzeller S. 2013. Th1/Th2 cytokine profile in childhood-onset systemic lupus erythematosus. *Cytokine*; 61: 785–91.

Postal, M., Costallat, L. T., Appenzeller, S. 2012. Biological therapy in systemic lupus erythematosus. *Int J Rheum* 2012:5786471:1-9.

Qiao, B., J. Wu, Y. W. Chu, Y. Wang, D. P. Wang, H. S. Wu and S. D. 2005. Xiong. Induction of systemic lupus erythematosus-like syndrome in syngeneic mice by immunization with activated lymphocyte-derived DNA. *Rheumatology* 44:1108–1114.

Racanelli V, Prete M, Musaraj G, Dammacco F, Perosa F. 2011. Autoantibodies to intracellular antigens: generation and pathogenetic role. *Autoimmun Rev*; 10(8):503–8.

Reeves, Pui Y. Lee, Jason S. Weinstein, Minoru Satoh, and Li Lu. 2009. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol* 30(9): 455–464.

Rossi, M. and Young, J. W. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of Immunology*, vol. 175, no. 3, pp. 1373–1381

Rottman, J. B., & Willis, C. R. 2010. Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Vet Pathol* 47(4):664-76

Rudloff, I., Godsell J, Nold-Petry CA, Harris J, Hoi A, Morand EF, Nold MF. 2015. Brief report: interleukin-38 exerts antiinflammatory functions and is associated with disease activity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.* 67, 3219–3225.

Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 101:455-458

Sakaguchi, S. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cells*, 775-787

Satoh, M., Treadwell, E.L., Reeves, W.H. 1995. Pristane induces high titers of anti-Su and anti-nRNP/Sm autoantibodies in BALB/c mice. Quantitation by antigen capture ELISAs based on monospecific human autoimmune sera. *J Immunol Methods*, 182(1): 51-62

Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, Weber G, Kastner B, Akira S, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Krug A. 2006. U1 small nuclear ribonucleoprotein

immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood* 2006;107:3229–3234.

Sawla P., Hossain, A., Hahn, B.H., Singh, R.P. 2012. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus (SLE): role of peptide tolerance. *Autoimmun. Rev.* 11, 611-614.

Sayed, M., Eman Nofal, Sahar Al Mokadem, Inas Al Makhzangy, Hala Gaballah and Hossneia Akl. 2006. Correlative Study of Serum Th1/Th2 Cytokines Levels in Patients with Systemic Lupus Erythematosus with SLEDAI. *Egyptian Dermatology Online Journal* 4 (1): 3

Schlee, M. & Hartmann, G. 2016. Discriminating self from non-self in nucleic acid sensing. *Nat. Rev. Immunol.* 16, 566–580.

Schwartz A, Wada T, Kinoshita K, Tesch G, Kelly VR. 1998. IFN-g receptor signaling is essential for the initiation, acceleration, and destruction of autoimmune kidney disease in MRL-Faspr mice. *J Immunol*;161:494–503.

Segal R, Bermas BL, Dayan M, Kalush F, Shearer GM, Mozes E. 1997. Kinetics of cytokine production in experimental systemic lupus erythematosus: involvement of T helper cell 1/T helper cell 2-type cytokines in disease. *J Immunol*;158:3009–16.

Shah, K., Lee, W.W., Lee, S.H., Kang, S.W., Craft, J., Kang, I. 2010. Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Research and Therapy*, 12(2): R53

Shiroiwa W, Tsukamoto K, Ohtsuji M, Lin Q, Ida A, Koderia S, *et al.* 2007. IL-4R alpha polymorphism in regulation of IL-4 synthesis by T cells: implication in susceptibility to a subset of murine lupus. *Int Immunol*;19:175–83.

Singh RP, Saxena V, Zang S, Li L, Finkelman FD, Witte DP, *et al.* 2003. Differential contribution of IL-4 and STAT6 vs STAT4 to the development of lupus nephritis. *J Immunol*;170:4818–25.

Situasi Lupus di Indonesia. 2017. PUSDATIN: Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. KEMENKES RI. ISSN: 2442-7569

Solomou, E. E., Juang, Y. T., Gourley, M. F., Kammer, G. M. & Tsokos, G. C. 2001. Molecular basis of deficient IL-2 production in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.* 166, 4216–4222.

Stanfield W.D, J.S Colome, R.J Cano. 2006. *Schaum's Easy Outlines Biologi Molekuler dan Sel.* Varian Fahmi, penerjemah. Schaum's Easy Outlines Molecular and Cell Biologi. Jakarta: Erlangga.

Sugimoto K, Morimoto S, Kaneko H, Nozawa K, Tokano Y, Takasaki Y, *et al.* 2002. Decreased IL-4 producing CD4 T cells in patients with active

Systemic Lupus Erythematosus-relation to IL-12R expression. *Autoimmunity* 35:381–7.

Sumariyono. Spektrum autoantibodi pada LES dan hubungannya dengan gambaran klinik. In: Setiyohadi B, Kasjmir YI, editors. Naskah lengkap temu ilmiah reumatologi ASEAN meeting on gout and hyperuricemia. Jakarta: EGC; 2003.p.149-53.

Sunderkotter C., Nikolic T, Dillon MJ, Van Rooijen N, Stehling M, Drevets DA, Leenen PJ. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J. Immunol* 2004;172:4410–4417.

Supranto, J. 2000. Statistik (Teori dan Aplikasi), Edisi Keenam. Jakarta: Erlangga.

Suryo. 2011. Genetika Manusia. Universitas Gajah Mada: Yogyakarta.

Susianti dan Handono. 2012. Perkembangan Petanda Biologik Lupus Nefritis. Malang: UB Press.

Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. 2015. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine* 72: 146–153.

Tarzi, M., Klunker S, Texier C, Verhoef A, Stapel SO, Akdis CA, Maillere B, Kay AB, Larché M. 2006. Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signalling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy* 36, 465–474

Theofilopoulos AN, Koundouris S, Kono DH, Lawson BR. 2001. The role of IFN-gamma in systemic lupus erythematosus: a challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res* 3: 136–41.

Theofilopoulos, A. N., Kono, D. H., Beutler, B. & Baccala, R. 2011. Intracellular nucleic acid sensors and autoimmunity. *J. Interferon Cytokine Res.* 31, 867–886.

Tsokos, G.C., 2011. Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus.N Engl J Med* 365:2110-2121

Tsokos, George C., Caroline Gordon, Josef S. Smolen. 2007. Systemic Lupus Erythematosus: A Companion to Rheumatology. 1st Edition. Elsevier Health Sciences

Tsokos, George C., Mindy S. Lo, Patricia Costa Reis and Kathleen E. Sullivan. 2016. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nature reviews (rheumatology)*: (12) 716-730

Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Meister S, Munoz L, Heyder P, De Marchis F, Bianchi ME, Kirschning C, Wagner H, Manfredi AA, Kalder JR, Schett G,



- Rovere-Querini P, Herrmann M, Voll RE. 2008. Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *J Exp Med* 205:3007–3018.
- Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM. 2005. Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J. Exp. Med*;202:1575–1585.
- Wallace, Daniel J. 2007. The Clinical Presentation of Systemic Lupus Erythematosus; Differential Diagnosis and Disease Association. In: Wallace, Daniel J, Hahn, Bevrá Hannahs. *Dubois' Lupus Erythematosus* 7th ed. California: Lippincott Williams & Walkins
- Wang, D., Drenker, M., Eiz-Vesper, B., Werfel, T. & Wittmann, M. 2008. Evidence for a pathogenetic role of interleukin-18 in cutaneous lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 58, 3205–3215.
- Weckerle, C. E., Mangale D, Franek BS, Kelly JA, Kumabe M, James JA, Moser KL, Harley JB, Niewold TB. 2012. Large-scale analysis of tumor necrosis factor α levels in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 64, 2947–2952.
- Wen Z, Lin Xu, Wei Xu, Zhinan Yin, Xiaoming Gao, Sidong Xiong. 2013. Interleukin-17 Expression Positively Correlates with Disease Severity of Lupus Nephritis by Increasing Anti-Double-Stranded DNA Antibody Production in a Lupus Model Induced by Activated Lymphocyte Derived DNA. *PLoS ONE* 8(3): e58161
- Wen, Z., L Xu, W Xu and S Xiong. 2012. Production of anti-double-stranded DNA antibodies in activated lymphocyte derived DNA induced lupus model was dependent on CD4+ T cells. *Lupus* 21: 508.
- Wichainun R, Nuntana Kasitanon, Suparaporn Wangkaew, Sith Hongsongkiat, Waraporn Sukitawut and Worawit Louthrenoo. 2013. Sensitivity and specificity of ANA and anti-dsDNA in the diagnosis of systemic lupus erythematosus: A comparison using control sera obtained from healthy individuals and patients with multiple medical problems. *Asian Pac J Allergy Immunol*;31:292-8
- Wilber, A., O'Connor, T. P., Lu, M. L., Karimi, A. & Schneider, M. C. 2003. Dnase13 deficiency in lupus-prone MRL and NZB/W F1 mice. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 46–52
- Wong CK, Ho CY, Li EK, Lam CW. 2000. Elevation of proinflammatory cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 cytokine (IL-4) concentrations in patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus*;9:589–93
- Xu, D., Liu, H., Komai-Koma, M., Campbell, C., McSharry, C., Alexander, J., Liew, F.Y. 2003. CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress differentiation

and functions of Th1 and Th2 cells, *Leishmania* major infection, and colitis in mice. *Journal of Immunology*, 170: 394-399

Yang P, An H, Liu X, Wen M, Zheng Y, Rui Y, Cao X. 2010. The cytosolic nucleic acid sensor LRRFIP1 mediates the production of type I interferon via a beta-catenin-dependent pathway. *Nat Immunol.* 11:487-494.

Yang, J., Yang, X., Zou, H., Cu, Y., Li, M. 2011. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Oxford Journal Rheumatology*, 50(8): 1366-1372

Yap DYH, Lai KN, Yap DYH, Lai KN. 2010. Cytokines and their roles in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus: from basics to recent advances. *J Biomed Biotechnol.* 365083.

Yarilina, A., Park-Min, K. H., Antoniv, T., Hu, X. & Ivashkiv, L. B. 2008. TNF activates an IRF1-dependent autocrine loop leading to sustained expression of chemokines and STAT1-dependent type I interferon response genes. *Nat. Immunol.* 9, 378-387.

Yu HH, Liu PH, Lin YC, Chen WJ, Lee JH, Wang LC, et al. 2010. Interleukin 4 and STAT6 gene polymorphisms are associated with Systemic Lupus Erythematosus in Chinese patients. *Lupus*;19:1219-28.

Yuwono, Triwibowo. 2005. *Biologi Molekuler*. Penerbit Erlangga: Jakarta

Zhang, M., Yanhang Hong, Wenjuan Chen, and Chun Wang. 2016. Polymers for DNA Vaccine Delivery. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 3 (2), pp 108-125.

Zhu, Jiankun, Mohan, Chandra. 2007. SLE 1, 2, 3 Genetic Dissection of Lupus. In: Shurin, Michael R, Smolkin, Yuri R. 2007. *Immune Mediated Disease – From Theory to Therapy*. Springer: New York

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) atau lebih dikenal dengan Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun kronis dan kompleks yang juga ditandai respon imun hiperaktif dan produksi autoantibodi abnormal yang akhirnya menyebabkan kerusakan jaringan dan organ (Zhu *et al.*, 2007; Sawla *et al.*, 2012). Organisasi Kesehatan Dunia atau WHO mencatat jumlah penderita penyakit lupus di seluruh dunia dewasa ini sekitar lima juta orang. Di Indonesia, tren penyakit lupus pada pasien rawat inap rumah sakit meningkat sejak tahun 2014-2016. Jumlah kasus lupus tahun 2016 meningkat hampir dua kali lipat dibanding tahun 2014. Terdapat sekitar 1.250.000 penderita lupus di Indonesia (asumsi prevalensi 0.5% berdasarkan penelitian Kalim, dkk) dan sangat sedikit yang menyadari bahwa dirinya menderita penyakit lupus. Manifestasi penyakit LES sangat beragam dengan perjalanan penyakit yang bervariasi dan memiliki risiko kematian yang lebih tinggi (hingga 67% lebih tinggi dari populasi normal), sehingga memerlukan pengobatan yang lama dan seumur hidup. Untuk itu, diperlukan pengenalan dini serta penatalaksanaan yang tepat (Kemenkes, 2017).

Salah satu konsep penting pada patogenesis LES adalah ketidakseimbangan antara apoptosis sel dan pembersihan bahan apoptosis.

Pada manusia, sekitar 1 miliar neutrofil mengalami apoptosis setiap hari dan apoptosis sel dapat meningkat akibat terpapar sinar ultraviolet, infeksi, dan paparan toksin, yang hal tersebut diketahui terkait dengan terjadinya penyakit

LES. Debris-debris apoptosis yang menetap dan mengandung asam nukleat dapat merangsang respons inflamasi melalui aktivasi reseptor pengenalan asam nukleat, seperti anggota keluarga *Toll-like Receptor* (TLR) (Theofilopoulos *et al.*, 2011).

LES ditandai dengan hilangnya toleransi secara global dengan aktivasi sel T autoreaktif dan sel B yang menyebabkan produksi autoantibodi patogen dan kerusakan jaringan (Choi *et al.*, 2012). Adanya abnormalitas sistem imun ini diakibatkan oleh adanya gangguan pada fungsi sel *T-regulator* (Treg) dalam meregulasi respon imun dan hal ini berdampak pada hiperaktivasi berbagai jalur sel *T helper* (Th). Sel dendritik dapat mengenali berbagai jenis *self antigen*, khususnya dsDNA yang memiliki peran penting dalam patogenesis LES, dan melalui aktivasi sel B akan merangsang pembentukan antibodi terhadap *self antigen* dsDNA (Guiducci *et al.*, 2010). Banyak penyakit autoimun menghasilkan produksi autoantibodi, namun antibodi anti-dsDNA sangat spesifik untuk penyakit LES. Penelitian terbaru menunjukkan spesifisitas anti-dsDNA sebesar 100% pada pasien sehat dan 97% pada pasien dengan berbagai masalah kesehatan multipel (Wichainun *et al.*, 2013)..

Terapi LES yang ada saat ini diantaranya obat-obatan immunosupresan dan steroid yang ternyata masih belum menunjukkan hasil memuaskan. Penggunaan obat-obatan steroid yang harus dikonsumsi jangka panjang juga masih menimbulkan banyak efek samping pada penderita LES (Guiducci *et al.*, 2010). Selain itu, penggunaan agen-agen biologis memang sedang dikembangkan agar memberikan keluaran klinis yang lebih baik tetapi harganya masih sangat mahal dan tidak mudah terjangkau oleh sebagian besar pasien LES di Indonesia. Oleh karena itu, masih diperlukan pengembangan terapi LES

dalam menginduksi dan memperbaiki regulasi sistem imun terhadap autoantigen sehingga dapat memperbaiki kondisi klinis pasien LES secara maksimal (Kalim *et al.*, 2013).

Dewasa ini didapatkan penelitian-penelitian yang berhasil menemukan adanya suatu metode terapi imunologi pada penyakit alergi dan autoimun, yaitu *Escalating Dose (Antigen-Specific) Immunotherapy* (EDI). EDI adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjeksikan autoantigen (*self-antigen*) yang menstimulus pembentukan autoantibodi dengan dosis yang bertahap hingga memunculkan efek desensitisasi. Pemberian dosis yang bertahap dan meningkat ini dilakukan untuk menghindari efek-efek yang merugikan dari yang paling ringan sampai yang paling berat, syok anafilaksis (Larche and Wraith, 2005).

Sel Treg memiliki peran penting dalam pengembangan terapi toleransi dengan antigen spesifik. Induksi sitokin IL10 sebagai imunomodulator menunjukkan efektivitas imunoterapi baik pada tikus maupun manusia (Tarzi *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009; Fousteri *et al.*, 2010). Selama proses imunoterapi, stimulasi kronis pada sel CD4 dengan pemberian peptida antigen mengubah program transkripsi (Anderson *et al.*, 2006) sehingga sel T patogen yang berubah menjadi anergi, sekresi IL10, sel dengan fenotip regulator yang mampu mencegah autoimunitas (Gabrysova *et al.*, 2009).

Penelitian terbaru dilakukan oleh Burton *et al.*, 2014 membuktikan keamanan imunoterapi menggunakan antigen spesifik dengan metode *Elicit Dose Immunotherapy* (EDI). Penelitian dilakukan pada *autoimmune encephalomyelitis model* (EAE) dari *multiple sklerosis* dengan pemberian terapi menggunakan protein MBP (*Myelin Basic Protein*). Penelitian tersebut

membuktikan aktivasi sel T CD4 yang berlebihan dapat dihindari dengan memberikan imunoterapi dengan dosis rendah terlebih dahulu. Dengan menggunakan protokol EDI, pemberian antigen spesifik mampu mencapai dosis tertinggi yang dibutuhkan untuk menginduksi IL10 tanpa meningkatkan sitokin inflamasi lainnya. Terapi dengan metode ini menunjukkan efek anergi sel, supresi sel, dan peningkatan ekspresi IL10 (Burton *et al.*, 2014).

Berdasarkan pada keberhasilan penelitian tersebut, peneliti ingin mengetahui efek pemberian *self antigen* dsDNA dengan metode EDI sebagai imunoterapi pada penyakit autoimun LES. Penelitian mengenai metode EDI *self antigen* dsDNA pada lupus dewasa ini belum pernah dilakukan. Tujuan penelitian ini adalah mengeksplorasi penggunaan *self antigen dsDNA* dengan metode EDI dalam memperbaiki regulasi sistem imun pada penyakit LES. Peningkatan proliferasi sel Th2 akibat pengenalan *self antigen* oleh APC berkontribusi pada hiperaktivitas sel B autoreaktif yang berperan penting pada produksi autoantibodi pada LES. IL-4 adalah salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th2. IL-4 adalah sitokin yang berperan dalam meningkatkan diferensiasi sel B dan juga sel T, terutama sel T-*helper* 2 (Th2). Pembentukan autoantibodi oleh sel B berperan penting pada patogenesis LES dan adanya penyimpangan kompleks sitokin yang berhubungan dengan sel B berkontribusi sangat kuat mempengaruhi hilangnya toleransi dan berefek pada kerusakan akhir organ pada penyakit LES (Tsokos *et al.*, 2007). Beberapa penelitian menunjukkan kadar IFN γ yang meningkat pada serum darah pasien LES dan ketidakseimbangan sitokin Th1 (IFN γ) dan Th2 (IL-4) berhubungan dengan peningkatan aktivitas penyakit lupus pada mencit model lupus (Guimaraes *et al.*, 2017). IL-4 dapat mencegah aktivasi makrofag yang diinduksi oleh IFN- γ , oleh karena itu IL-4 mempunyai efek yang berlawanan

dengan IFN- γ (Bratawidjaya, 2012). Dengan demikian, pemberian EDI *self-antigen dsDNA* diharapkan dapat menurunkan proliferasi sel Th2, menurunkan kadar IL-4, serta menurunkan rasio sitokin IFN γ /IL-4 pada LES.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Rumusan Masalah Umum

Apakah pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat memperbaiki regulasi sistem imun penyakit lupus eritematosus sistemik (LES) pada mencit *pristane induced lupus* (PIL)?

1.2.2 Rumusan Masalah Khusus

- 1 Apakah pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat menurunkan persentase sel Th2 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL)?
- 2 Apakah pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat menurunkan kadar IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL)?
- 3 Apakah pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat menurunkan rasio kadar IFN γ /IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL)?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum penelitian ini adalah membuktikan efek pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dalam memperbaiki regulasi sistem imun penyakit lupus eritematosus sistemik (LES) pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut

- 1 Membuktikan efek pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dalam menurunkan persentase sel Th2 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

2. Membuktikan efek pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dalam menurunkan kadar Interleukin-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

3. Membuktikan efek pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dalam menurunkan rasio kadar FNY/IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat Keilmuan:

Dapat menambah informasi mengenai pilihan terapi lupus khususnya tentang penggunaan metode *Escalating Dose Antigen Specific Immunotherapy* menggunakan *Self Antigen dsDNA* dalam memperbaiki regulasi sistem imun pada lupus eritematosus sistemik.

Manfaat Aplikatif:

Dapat dijadikan dasar untuk pertimbangan klinisi kesehatan sebagai suatu alternatif terapi yang efektif pada penyakit lupus eritematosus sistemik dengan metode *Escalating Dose Antigen Specific Immunotherapy* menggunakan *Self Antigen dsDNA* apabila telah melalui tahapan-tahapan penelitian yang seharusnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lupus Eritematosus Sistemik (LES)

2.1.1 Definisi LES

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) atau yang lebih dikenal dengan Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun kompleks yang ditandai autoantibodi terhadap inti sel dan melibatkan banyak sistem organ (Suarjana, 2014). LES juga ditandai respon imun hiperaktif dan produksi abnormal autoantibodi yang akhirnya menyebabkan kerusakan jaringan dan organ (Sawla *et al.*, 2012). Menurut Perhimpunan Reumatologi Indonesia (2011), LES adalah penyakit autoimun yang belum jelas penyebabnya dengan manifestasi klinis dan perjalanan penyakit yang beragam. Banyak faktor diduga menjadi faktor risiko penyakit LES diantaranya faktor lingkungan, genetik, dan hormonal (Mok and Lau, 2003).

2.1.2 Epidemiologi LES

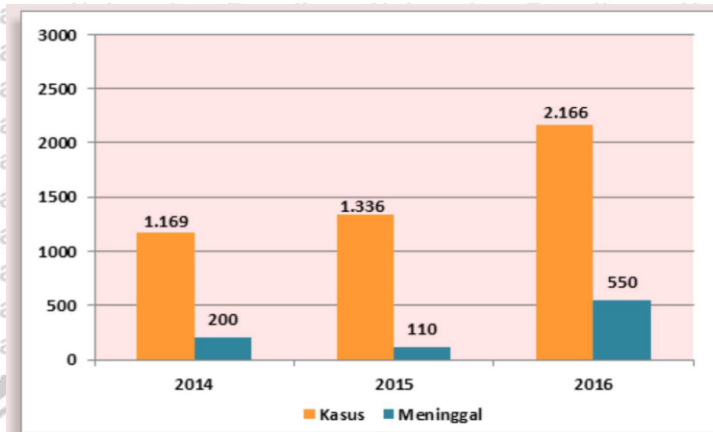
Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan suatu penyakit autoimun sistemik yang akhir-akhir ini semakin sering dijumpai. Meskipun secara umum angka harapan hidup 10 tahun penderita LES meningkat hingga mencapai 90% pada tahun 2000 di negara maju, penelitian Kalim dan kawan-kawan (2000) menunjukkan bahwa penderita LES di Indonesia mempunyai harapan hidup yang masih rendah, yakni untuk 5 tahun 70% dan untuk 10 tahun 55% (Kalim dkk, 2000). Manifestasi penyakit LES sangat luas, meliputi keterlibatan kulit dan mukosa, sendi, darah, jantung, paru, ginjal, susunan saraf pusat dan sistem imun. Oleh karena itu, manifestasi penyakit LES sangat beragam dengan

perjalanan penyakit yang bervariasi dan memiliki risiko kematian yang lebih tinggi (hingga 67% lebih tinggi dari populasi normal), sehingga memerlukan pengobatan yang lama dan seumur hidup. Untuk itu, diperlukan pengenalan dini serta penatalaksanaan yang tepat (Kemenkes, 2017).

Organisasi Kesehatan Dunia atau WHO mencatat jumlah penderita penyakit lupus di seluruh dunia dewasa ini mencapai lima juta orang. Sebagian besar dialami oleh perempuan usia produktif dan setiap tahunnya tercatat penambahan penderita sebanyak lebih dari seratus ribu orang. Dari sekitar 1.250.000 penderita lupus di Indonesia (asumsi prevalensi 0.5% berdasarkan penelitian Kalim, dkk), sangat sedikit yang menyadari bahwa dirinya menderita penyakit lupus. Hal ini terjadi karena gejala yang ditimbulkan setiap penderitanya dapat berbeda-beda (Kemenkes, 2017).

Berdasarkan data Sistem Informasi Rumah Sakit (SIRS) Online, berdasarkan rumah sakit yang melaporkan datanya pada tahun 2016, diketahui bahwa terdapat 2166 pasien rawat inap dengan penyakit lupus dan 550 pasien diantaranya meninggal dunia. Tren penyakit lupus pada pasien rawat inap rumah sakit meningkat sejak tahun 2014-2016. Jumlah kasus lupus tahun 2016 meningkat hampir dua kali lipat dibanding tahun 2014, yaitu sebanyak 1.169 kasus. Jumlah kematian akibat lupus pada pasien rawat inap dirumah sakit meningkat lebih tinggi dibandingkan dengan tahun 2014. Jumlah pasien meninggal akibat lupus tahun 2015 (110 kematian) menurun dibandingkan tahun 2014. Namun jumlah ini meningkat drastis pada tahun 2016, yaitu sebanyak 550 kematian. Tingginya kematian akibat lupus ini perlu mendapat perhatian khusus karena sekitar 25% dari pasien rawat inap di rumah sakit di Indonesia tahun 2016 berakhir pada kematian. Tren jumlah kasus dan kematian pada pasien

rawat inap di rumah sakit di Indonesia tahun 2014-2016 dapat dilihat pada Gambar 2.1 (Kemenkes, 2017).



Sumber: SIRS Online, Ditjen Pelayanan Kesehatan, Kementerian Kesehatan, 2017

Gambar 2.1. Jumlah Kasus dan Meninggal Akibat Lupus pada Pasien Rawat Inap di Rumah Sakit di Indonesia Tahun 2014-2016

Pada tahun 2016, perhimpunan LES Indonesia (PESLI) mendapatkan rata-rata insiden kasus baru LES dari data delapan rumah sakit adalah sebesar 10.5%. Penyakit ini kebanyakan menyerang wanita usia 15-50 tahun (usia masa produktif). Namun, lupus juga dapat menyerang anak-anak dan pria. Lupus dapat menyerang usia remaja hingga orang tua. Pasien rawat inap di rumah sakit di Indonesia pada kurun waktu 2014-2016 terbanyak pada pasien dengan usia 44-46 tahun, diikuti kelompok pasien dengan usia 14-44 tahun. Jumlah pasien LES di Indonesia secara pasti sampai saat ini masih belum diketahui secara pasti (Kemenkes, 2017).

2.1.3 Faktor Risiko LES

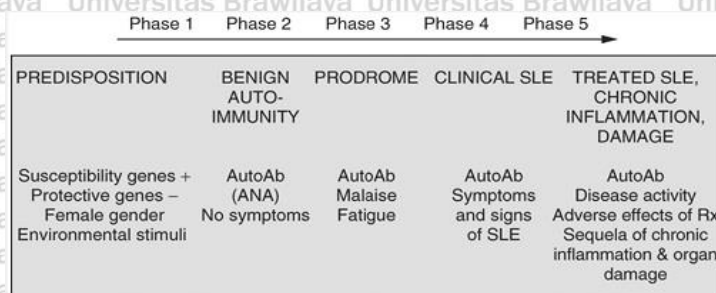
Penyakit LES adalah penyakit inflamasi autoimun kronis yang belum diketahui jelas penyebabnya, memiliki gambaran klinis dengan variasi yang luas, dan manifestasi perjalanan penyakit yang beragam. Faktor genetik, imunologik dan hormonal, serta lingkungan diduga berperan dalam perjalanan penyakit.

Faktor risiko penyakit LES diantaranya:

1. Faktor genetik. Diketahui sekitar 7% pasien LES memiliki keluarga dekat (orang tua atau saudara kandung) yang juga terdiagnosis LES. Oleh karena itu, faktor genetik merupakan faktor risiko LES. Sejauh ini diketahui terdapat sekitar 30 variasi gen yang dikaitkan dengan kejadian LES.
2. Faktor lingkungan, diantaranya infeksi, stress, makanan, antibiotik (khususnya kelompok sulfa dan penisilin), cahaya ultraviolet (matahari) dan penggunaan obat-obat tertentu, merokok, paparan Kristal silica, merupakan faktor-faktor yang meningkatkan kejadian LES.
3. Faktor hormonal. Perempuan lebih sering terkena penyakit LES dibandingkan dengan laki-laki. Meningkatnya angka kejadian penyakit LES sebelum periode menstruasi atau selama kehamilan mendukung dugaan bahwa hormon, khususnya estrogen menjadi pencetus penyakit LES. Namun, hingga saat ini belum diketahui secara pasti peran hormon yang menjadi penyebab besarnya prevalensi LES pada perempuan pada periode tertentu (Dirjen P2P, 2016).

2.1.4 Patogenesis LES

Perjalanan penyakit LES perlu melalui beberapa tahapan yang panjang (Gambar 2.2) (Hahn, 2007). Gejala LES baru akan muncul dalam hitungan bulan sampai tahun.



Gambar 2.2. Lima fase pada Lupus eritematosus sistemik (Hahn, 2007)

Patogenesis LES hingga saat ini belum dapat diketahui dengan jelas.

Imunopatologi lupus ditandai dengan produksi autoantibodi. Antibodi yang diproduksi dapat mengikat nukleosom (DNA dan histon) dan membentuk kompleks imun *in situ* termasuk di ginjal. Baik kompleks imun yang dibentuk dalam sirkulasi atau *insitu* berperan dalam terjadinya kerusakan ginjal, kulit, pleksus koroid di otak dan jaringan lainnya (Mok and Lau, 2003; Setiyohadi and Kasjmir, 2003). Faktor genetik dan faktor lingkungan dengan jenis kelamin wanita sangat kuat mempengaruhi patogenesis LES. Faktor-faktor tersebut memicu kegagalan toleransi imunologis yang bermanifestasi pada respon imun terhadap antigen inti endogen (Bertsias *et al.*, 2012).

LES ditandai dengan hilangnya toleransi imun secara global dengan aktivasi sel T autoreaktif dan sel B yang menyebabkan produksi autoantibodi patogen dan kerusakan jaringan (Choi *et al.*, 2012). Pada LES terjadi gangguan mekanisme regulasi imun seperti gangguan pembersihan sel-sel apoptosis dan kompleks imun (Musai, 2010; Suarjana, 2014). Pada LES terjadi aktivasi sel B poliklonal, meningkatnya jumlah sel yang menghasilkan antibodi, *hypergammaglobulinemia*, produksi autoantibodi dan terbentuknya kompleks imun. Aktivasi sel B poliklonal akan menyebabkan produksi antibodi yang tidak spesifik yang dapat bereaksi terhadap berbagai jenis antigen termasuk *self antigen* (Mok and Lau, 2003). Di samping itu, sitokin diduga juga ikut berperan dalam patogenesis LES. Keseimbangan sitokin Th1/Th2 serta Th17 telah ditunjukkan berkaitan dengan berbagai manifestasi klinis LES (Sayed, 2008).

Kompleks antigen-antibodi yang gagal dibersihkan akan menumpuk di jaringan dan menyebabkan aktivasi sistem komplemen dan atau mediator inflamasi lainnya, serta kemotaksis limfosit dan polimorfonuklear, pelepasan

sitokin, kemokin, enzim proteolitik, sehingga memicu kerusakan organ (Hahn, 2013). Kerusakan jaringan pada LES disebabkan utamanya oleh penumpukan kompleks imun. Kompleks imun terbentuk karena autoantibodi antinuklear terikat pada materi nuklear di darah dan jaringan. Kompleks imun ini tidak dapat dibersihkan dengan baik pada LES karena reseptor Fc dan komplemen yang mengalami penurunan jumlah maupun fungsinya (Tsokos, 2011).

Sintesis dan sekresi autoantibodi pada pasien LES diperantarai oleh interaksi antara sel T *helper* CD4+ dan *double negative T cells* (CD4- CD8-) dengan sel B. Terjadi kegagalan fungsi dari aktivitas supresi sel T *suppressor* dan sel NK terhadap aktivitas sel B. Sel T *suppressor* dan sel NK pada pasien LES tidak mampu mengatur sintesis dari imunoglobulin poliklonal dan produksi autoantibodi. Gagalnya supresi terhadap sel B menjadi salah satu faktor yang menyebabkan penyakit LES berlangsung terus menerus (Mok and Lau, 2003). Pembersihan (*clearance*) dari kompleks imun oleh sistem fagosit-makrofag juga mengalami gangguan pada LES sehingga terjadi kegagalan eliminasi kompleks imun dari sirkulasi dan jaringan. Hal ini diduga akibat dari penurunan jumlah CR1 yang merupakan reseptor untuk komplemen dan terjadi gangguan fungsi dari reseptor antibodi pada permukaan sel. Gangguan pembersihan ini juga diduga akibat tidakadkuatnya fagositosis penumpukan antibodi IgG2 dan IgG3 (Mok and Lau, 2003; Munoz, 2005).

Aktivasi sel T dan sel B memerlukan stimulasi oleh antigen spesifik.

Bahan kimia yang iritatif seperti *pristane*, DNA, dan fosfolipid dinding sel bakteri, antigen virus dapat menginduksi produksi autoantibodi anti-DNA pada mencit.

Selain itu, *self antigen* seperti kompleks protein-DNA dan protein-RNA juga dapat menginduksi produksi autoantibodi. *Self antigen* ditangkap oleh *antigen*

presenting cell (APC) atau diikat oleh antibodi pada permukaan sel B. APC dan sel B memproses antigen menjadi peptida kemudian menyajikannya pada sel T melalui molekul HLA (*Human Leukocyte Antigen*) pada permukaan sel. Sel T menjadi aktif dan dapat merangsang sel B untuk memproduksi autoantibodi yang patogenik. Selain stimulasi melalui kontak langsung, interaksi dengan APC, aktivasi sel T dan sel B dibantu oleh berbagai sitokin dan membutuhkan molekul tambahan seperti sistem CD40/CD40L dan B7/CD28/CTLA4 untuk memberikan sinyal kedua dalam proses aktivasi (Mok dan Lau, 2003).

DNA atau RNA sebagai *self antigen* dapat berikatan dengan TLR (*toll like receptors*) dan mengaktifasi respon imun *innate* diantaranya sel dendritik dan makrofag. Sel dendritik yang teraktivasi akan berubah dari tolerogenik menjadi sel dendritik pro inflamasi yang mensekresi sitokin inflamasi (IFN-I). Sel makrofag/monosit yang teraktivasi juga akan mensekresikan sitokin inflamasi diantaranya TNF- α , IL-1, IL-12, serta IL-23. Aktivasi sel limfosit B juga dapat terjadi secara langsung dengan aktivasi oleh DNA/RNA melalui jalur TLR dan IFN α . Selain itu aktivasi sel B dapat dibantu oleh sel T untuk mensekresi autoantibodi juga maturasinya menjadi sel plasma oleh BlyS (B-lymphocyte stimulator)/BAFF (B cell-activating factor), IL-6, dan beberapa sitokin lainnya (Hahn, 2013).

2.1.5 Manifestasi Klinis LES

LES adalah penyakit yang ditandai abnormalitas sistem imun disertai kelainan banyak organ (Zhu *et al.*, 2007). Tingginya produksi autoantibodi terhadap antigen inti, seperti *double-strand* DNA (ds-DNA) dan kromatin, menyebabkan kerusakan organ pada LES dan menjadi ciri-ciri utama LES (Lauwerys, 2003; Zhu *et al.*, 2007). Penderita lupus biasanya mengeluh lemah,

demam, malaise, anoreksia dan berat badan menurun. Gejala klinis yang timbul bervariasi dari ringan, berat, bahkan sampai dapat mengancam jiwa (Wallace, 2007; Zhu *et al.*, 2007). Gagal ginjal dan kerentanan infeksi akibat pemberian imunoterapi menjadi penyebab tersering kematian pasien LES (Baratawidjaja, 2003).

Manifestasi klinis LES dapat digolongkan menjadi beberapa golongan, diantaranya, gejala sistemik berupa demam, penurunan berat badan; muskuloskeletal: arthritis, arthralgia, nodul subkutan, mialgia; *Cardiorespiratory*: miokarditis, kardiomegali, lupus pneumonia; Genitourinaria: sindroma nefrotik; Gastrointestinal: disfagia, mual, diare, perdarahan; *Hemic-lymphatic*: anemia, adenopati, leukopenia; Serologis: hipoalbumin, positif palsu VDRL, ANA, anti-dsDNA, anti-SSA. Penyakit LES sering mengalami overlap dengan gejala penyakit lain diantaranya skleroderma, rheumatoid arthritis, serta akibat konsumsi obat-obatan tertentu diantaranya hydralazine dan procainamide (Wallace, 2007).

2.1.6 Diagnosis LES

Diagnosis LES dapat dilakukan dengan penilaian klinis dan laboratorium.

Kriteria diagnostik LES pada jaman dulu menggunakan kriteria dari *American College of Rheumatology* (ACR) pada tahun 1997. Dewasa ini, kriteria untuk diagnosis LES beralih menggunakan kriteria terbaru dari *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) tahun 2012, Kriteria SLICC 2012 adalah kriteria yang lebih kompleks dan dapat digunakan bila kriteria ACR tidak dapat mengklasifikasikan LES. Kriteria SLICC 2012 dijelaskan lebih lanjut pada Tabel 2.1. Diagnosis LES tegak jika didapatkan lebih dari sama dengan 4 kriteria (sedikitnya 1 kriteria klinis ditambah 1 kriteria laboratorium) atau jika didapatkan

biopsy ginjal lupus nefritis ditambah ANA atau anti-DNA yang positif (Petri *et al.*, 2012).

Tabel 2.1 Kriteria SLICC 2012

Kriteria Klinis	Kriteria Imunologi
1. Acute Cutaneous Lupus	1. ANA
2. Chronic Cutaneous Lupus	2. Anti-DNA
3. Ulkus mulut atau hidung	3. Anti-Sm
4. Alopesia tanpa skar	4. Antifosfolipid Ab
5. Artritis	5. Kadar komplemen yang rendah (C3, C4, CH50)
6. Serositis	6. Direct Coomb Test (Tidak dihitung jika ada hemolytic anemia)
7. Ginjal	
8. Neurologis	
9. Hemolytic anemia	
10. Leukopenia	
11. Trombositopenia (<100.000/mm ³)	

2.1.7 Penatalaksanaan Penyakit LES

Pada umumnya, penelitian-penelitian mengenai terapi lupus merekomendasikan terapi pada LES, sebagai berikut (tabel 2.2):

Tabel 2.2 Rekomendasi Terapi LES dengan Manifestasi Organ Ringan dan Sedang.

Indikasi	Medikasi
Lini pertama dan terapi dasar	Hidroklorokuin, atau Klorokuin, Atau Jika indikasi, berikan NSAID dan/atau glukokortikoid Azathiopin Atau
Jika tidak memberikan respons atau tidak ada penurunan pada glukokortikoid $\leq 7,5$ mg mungkin untuk jangka panjang	Atau Methotexate Atau Mycophenolate mofetil

Terapi tambahan pada LES positif autoantibodi dengan aktivitas penyakit tinggi meskipun dengan terapi standar
Keterangan: TB, Tinggi Badan; BB, Berat Badan; mg, miligram; kg, kilogram; LES, Lupus Eritematosus Sistemik; NSAID, *Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug*; S.C., *Subcutaneous*; I.V., *Intravenous* (Kuhn *et al.*, 2015).

Agan antimalaria direkomendasikan pada setiap terapi pasien LES selama tidak ada kontraindikasi. Kerja dari antimalaria berdasarkan pada hambatannya pada aktivasi TLR intraseluler. Hidroksiklorokuin dan klorokuin merupakan terapi yang telah diakui pada LES. Obat-obat tersebut memiliki efikasi yang bagus terhadap artritis dan lesi kulit LES spesifik, anti malaria menjaga remisi LES, serta menurunkan kerusakan organ dan flare pada LES (Kuhn *et al.*, 2015). Pada pasien LES tanpa manifestasi organ, terapi jangka panjang antimalaria seharusnya sudah cukup. Akan tetapi, onset antimalaria yang lambat menyebabkan kebanyakan pasien membutuhkan tambahan medikasi jangka pendek yang efektif, antara lain NSAID atau glukokortikoid. Jika pemberian glukokortikoid setara dengan prednisolon 5-7,5 mg/hari tidak dapat diturunkan atau dilanjutkan dengan dalam periode waktu yang memungkinkan, pemberian azathiopin, metotreksat, atau mikofenolat mofetil dapat direkomendasikan (Bertsias *et al.*, 2008). Dengan demikian, pasien bisa memerlukan banyak obat yang harus dikonsumsi dan penggunaannya kebanyakan dalam jangka panjang (bertahun-tahun) hingga seumur hidup. Selain itu, penggunaan immunosupresan tentunya membuat pasien menjadi lebih rentan terhadap infeksi bakteri dan jamur.

Obat lain yang dianggap sebagai pilihan terapi yang efektif adalah belimumab. Pada tahun 2012, belimumab telah diakui sebagai terapi tambahan untuk pasien dewasa dengan LES positif autoantibodi yang telah mendapatkan terapi standar namun masih menunjukkan aktivitas penyakit yang tinggi, pasien dengan intoleransi dan tidak dapat menerima glukokortikoid dosis tinggi. Akan tetapi, obat ini memiliki efek samping yang dapat muncul antara lain mual, diare, infeksi bakteri dan virus (seperti bronkitis, sistitis dan faringitis), serta reaksi

hipersensitivitas. Data mengenai efikasi belimumab pada praktik klinis rutin pun masih terbatas (Manzi *et al.*, 2012).

Dalam beberapa dekade terakhir, perkembangan mengenai strategi target terapi LES telah berkembang dengan pesat seiring dengan semakin ditemukannya perkembangan dalam patogenesis LES. Kemajuan perkembangan tersebut mengarahkan kepada munculnya strategi pendekatan baru yang menargetkan pada suatu molekul spesifik yang berperan dalam patogenesis LES, yang disebut sebagai terapi agen biologis. Terapi agen biologis adalah suatu terapi yang menggunakan antibodi monoklonal yang dapat menetralkan atau menghambat kerja suatu molekul baik reseptor atau ligan atau pun sitokin-sitokin tertentu. Beberapa strategi pada terapi biologis adalah dengan menargetkan sel B, menargetkan sel T, memblokir kostimulator, menghambat sitokin dan menghambat komplemen (Postal *et al.*, 2012).

Sebagian besar terapi agen biologis ditujukan kepada molekul yang berhubungan dengan aktivasi sel B dan sel T. Terapi tersebut dibuktikan memiliki efek yang lebih baik dibandingkan dengan terapi konvensional yang menggunakan kortikosteroid dan immunosupresan, dinilai dari beberapa kasus. Pada kasus-kasus LES yang gagal diterapi menggunakan pengobatan konvensional, agen biologis ditemukan mampu memperbaiki kondisi klinis LES pada pasien tersebut. Meskipun demikian, masih belum semua agen biologis tersebut dapat digunakan karena masih dalam tahap uji trial klinik (Postal *et al.*, 2012).

Disregulasi sitokin terjadi pada hewan coba model LES dan pasien LES. Terapi dengan melakukan pendekatan terhadap sitokin menjadi hal yang menjanjikan. Pada LES terjadi disregulasi pada sitokin-sitokin seperti TNF- α ,

IFN- α , IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-10, IL-15 dan IL-18 yang berperan penting pada proses inflamasi yang memicu kerusakan organ dan jaringan. Sitokin-sitokin tersebut dianggap mampu menjadi target potensial untuk mengurangi inflamasi kronis pada LES (Postal *et al.*, 2012). Akan tetapi, penelitian mengenai terapi dengan target sitokin juga masih banyak dibuktikan dalam penelitian pre klinik dan kandidat terapi ini membutuhkan biaya yang mahal. Oleh karena itu, diperlukan suatu metode pengobatan maupun pencegahan baru yang dapat menginduksi dan memperbaiki regulasi sistem imun terhadap *self antigen* sehingga meminimalkan resiko pengobatan konvensional dan memperbaiki kondisi klinis pasien LES secara maksimal (Kalim *et al.*, 2013).

2.2 Toleransi Imun

2.2.1 Mekanisme Toleransi Imun

Toleransi Immunologi (*Immunological Tolerance*) adalah ketidakmampuan dari sistem imun untuk memberikan respon terhadap suatu antigen dikarenakan telah mendapat induksi dari antigen yang sama sebelumnya. Sel limfosit yang dikenalkan dengan antigen dapat menjadi aktif dan memicu respons imun, ataupun dapat menjadi tidak aktif atau tereliminasi dan memicu toleransi. Antigen yang menyebabkan toleransi disebut tolerogen (*tolerogenic antigens*). Toleransi terhadap antigen yang diproduksi tubuh (*self-antigen*) disebut sebagai *self-tolerance* (Abbas *et al.*, 2007).

Sistem imun pada dasarnya dipegang oleh dua sel utama, yakni sel limfosit B (berperan dalam respons humoral) dan sel limfosit T (berperan dalam respons seluler). Ketidakmampuan kedua sel-sel tersebut dalam memberikan respons terhadap antigen spesifik dikenal dengan istilah anergi. *Lymphocyte anergy* (disebut *clonal anergy*) adalah kegagalan dari klonal sel B ataupun sel T

untuk bereaksi terhadap antigen sehingga dapat mempertahankan toleransi imunologi terhadap antigen tubuh sendiri (Cruse & Lewis, 2003).

Proses induksi toleransi (*induced tolerance*) terdapat dua jenis, yakni toleransi sentral dan toleransi perifer. Toleransi sentral adalah toleransi yang timbul selama perkembangan dari sel limfosit, sementara toleransi perifer adalah toleransi yang timbul setelah sel limfosit meninggalkan organ limfoid primer. Toleransi sentral terjadi pada organ primer/sentral dari perkembangan sel limfosit, yakni timus untuk sel T dan sumsum tulang untuk sel B. Selama perkembangan sel B dan sel T di sumsum tulang dan thymus, kehadiran antigen yang terdapat pada organ tersebut umumnya adalah *self-antigen*. Hal ini dikarenakan antigen asing dari lingkungan luar, tidak akan ditransport ke dalam timus, melainkan ditangkap dan ditransportasikan menuju organ limfoid perifer (Abbas *et al.*, 2007).

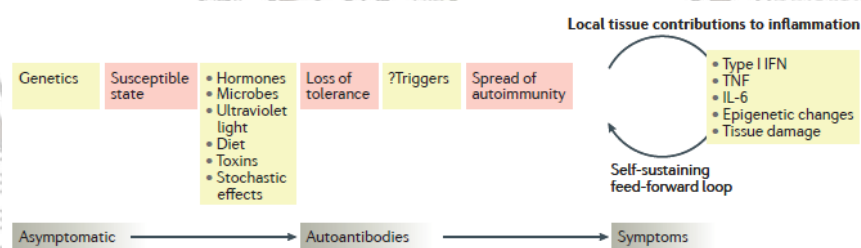
Paparan terhadap *self antigen* dengan dosis tinggi akan memicu sel limfosit muda (*immature*) mengalami beberapa kemungkinan selama toleransi sentral, yakni sel tersebut akan apoptosis (disebut juga *clonal deletion*), beberapa sel B muda yang tidak mati akan mengalami perubahan pada reseptor mereka sehingga tidak mengenali *self antigen* (proses ini disebut juga *receptor editing*), dan beberapa CD4+ akan berdeferensiasi menjadi sel T regulator (biasa disebut sel T suppressor) yang kemudian bermigrasi ke organ perifer dan mencegah respons terhadap *self antigen*. Toleransi perifer terjadi saat limfosit dewasa yang mampu mengenal *self antigen* kehilangan kemampuannya dalam memberikan respons (disebut anergi), mengalami penurunan viabilitas sel, dan mengalami apoptosis (Abbas *et al.*, 2007).

Sel B dapat menjadi toleran terhadap suatu antigen melalui empat tahapan peristiwa, yaitu *clonal abortion*, *clonal exhaustion*, *functional deletion*, dan *AFC blockade*. *Clonal abortion* terjadi saat pertama kali sel B yang belum matang bertemu dengan suatu antigen dalam jumlah yang kecil. Kondisi seperti ini diduga dapat memicu pembatalan sel B menjadi matur untuk memicu respons imun. Peristiwa *clonal exhaustion* terjadi jika terjadi paparan terhadap suatu antigen yang bersifat *T-independent* dapat menyebabkan terjadinya *clonal exhaustion*. Hal tersebut mengakibatkan AFC (*antibody-forming cells*) dari sel B yang terbentuk berusia pendek dan akhirnya tidak tersedia lagi sel yang dapat merespon antigen. Peristiwa delesi fungsional disebabkan oleh keberadaan antigen yang bergantung maupun yang tidak bergantung terhadap sel T. Terjadinya delesi fungsional disebabkan oleh tidak adanya bantuan dari sel T untuk melawan antigen tersebut sehingga sel B tidak dapat merespon secara normal. Paparan dosis antigen yang sangat besar dapat mengakibatkan terjadinya penghambatan pembentukan sel AFC sehingga antibodi tidak terbentuk (Abbas *et al.*, 2007).

Mekanisme toleransi sel T secara umum memiliki kemiripan dengan sel B. Tahapan-tahapan toleransi sel T diantaranya *clonal abortion*, *functional abortion*, dan sel T *suppression*. *Clonal abortion* adalah tahapan dimana sel T imatur dapat dihambat proses pematangannya dengan cara yang mirip dengan sel B. *Functional deletion* terjadi saat sel T yang matang fungsinya dihambat oleh paparan terhadap antibodi. Sel T *suppression* dapat menghambat fungsi sel T matur untuk mengenali antigen (Abbas *et al.*, 2007).

2.2.2 Kegagalan Toleransi Sistem Imun pada LES

Toleransi imunologis adalah salah satu mekanisme normal yang dimiliki oleh sistem imun secara normal. Sistem imun dapat bereaksi terhadap berbagai macam jenis mikroba (*non self antigen*) namun tidak bereaksi melawan antigen yang berasal dari tubuh sendiri (*self antigen*). Hal ini dikarenakan sel limfosit memiliki kemampuan untuk mengenali *self antigen* yang didapatkannya saat proses menuju maturasi. Mekanisme ini sangat penting dalam menjaga keseimbangan sistem tubuh. Apabila mekanisme ini gagal, maka akan terjadi suatu autoimunitas, yaitu sistem imun dari individu dapat menyerang sel dan jaringan dari individu itu sendiri. Penelitian tentang induksi toleransi dewasa ini banyak dilakukan untuk menemukan cara yang aman untuk mentoleransi pasien autoimun terhadap *self antigen* mereka. Hal ini biasanya dilakukan dengan memberikan terapi injeksi alergen secara berkala dengan formulasi khusus atau pemberian injeksi *self antigen* untuk mengembalikan regulasi imun (Abbas *et al*, 2012).



Gambar 2.3 Patogenesis LES

Perkembangan penyakit LES dapat dibagi menjadi beberapa tahapan. Faktor genetik dan lingkungan berperan pada perkembangan penyakit ini. Pemicu seperti infeksi menyebabkan autoimunitas, tetapi unsur-unsur yang menyebabkan hilangnya toleransi dan autoimunitas belum dapat dijelaskan dengan baik. Perubahan epigenetic, deposisi imun kompleks dan autoantibodi yang memperantarai kerusakan jaringan menyebabkan inflamasi kronis dan kerusakan organ ireversibel. (Tsokos *et al.*, 2016)

Patogenesis LES bergantung pada hilangnya toleransi imun dan produksi autoantibodi yang terus menerus (Gambar 2.3). LES umumnya merupakan kondisi yang berlangsung seumur hidup. Salah satu konsep kunci

dalam patogenesis LES adalah ketidakseimbangan antara apoptosis sel dan pembersihan bahan apoptosis. Antigen inti sel biasanya tidak dapat dikenali oleh sistem imun, namun selama apoptosis, membran sel membentuk blebs yang mengandung material seluler terfragmentasi, termasuk antigen inti sel (Tsokos *et al.*, 2016). Debris apoptosis tersebut biasanya dibersihkan dengan cepat dan tidak akan dapat dikenali oleh sistem imun. Pada manusia, sekitar 1 miliar neutrofil mengalami apoptosis setiap hari dan apoptosis sel dapat meningkat akibat terpapar sinar ultraviolet, infeksi, dan paparan toksin, yang hal tersebut diketahui terkait dengan terjadinya penyakit LES (Theofilopoulos *et al.*, 2011).

LES dianggap sebagai penyakit yang disebabkan oleh hilangnya toleransi sel B dan sel T. Sel B autoreaktif pertama kali ditemukan berperan pada patogenesis LES pada tahun 1950an ketika antibodi anti-DNA ditemukan sebagai komponen utama LES, dan penelitian-penelitian terbaru telah membuktikannya lebih jauh. Sel T juga diketahui berperan pada patogenesis LES. Aktivasi sel T secara spontan adalah karakteristik penyakit LES: jaringan mencit dan manusia dengan LES diinfiltrasi oleh sel T CD4+ (Duty *et al.*, 2009; Röttman and Willis, 2010)

Respon imun adaptif pasien LES berbeda dengan seseorang tanpa penyakit LES. Respon imun yang diperantarai sel B dan sel T bertujuan untuk melawan antigen asing. Akan tetapi, respon imun yang diperantarai sel B dan sel T pada LES justru melawan *self antigen* akibat adanya penumpukan autoantigen yang gagal dibersihkan. Adanya respon dari sel T-*Regulator* mungkin dapat menekan atau mengurangi respon sel B maupun sel T. Sebenarnya, ada banyak bukti bahwa respons imun pada LES pada dasarnya adalah umpan balik positif yang mana sel imun yang berperan diaktivasi terus-menerus secara langsung

atau tidak langsung dengan adanya kompleks antigen autoantibodi (Christensen *et al.*, 2006). Setelah diinisiasi, respons autoimun dapat menyebar melalui pengaruh autoantigen ke autoantigen lainnya (misalnya, “*epitope spreading*”), sehingga menyebabkan eksaserbasi (Deshmukh *et al.*, 2005). Dengan demikian, pasien LES ditandai oleh hilangnya toleransi sel B dan T terhadap *self antigen*, yang menyebabkan produksi autoantibodi dan inflamasi (Rottman and Willis, 2010).

Terlepas dari berbagai gejala klinis yang muncul pada LES, baik pada mencit maupun manusia, autoantibodi secara langsung melawan jumlah autoantigen yang relatif kecil, terutama berasal dari inti sel. Antibodi tidak hanya terbentuk melawan DNA, ribonukleoprotein, dan fosfolipid namun juga dapat melawan kompleks imun yang dihasilkan. Meskipun alasan mengapa pasien LES dapat memproduksi autoantibodi terhadap antigen inti sel tetap harus dibuktikan, infeksi *Epstein-Barr Virus* (EBV) diketahui belakangan ini dianggap sebagai faktor risikonya. Hipotesisnya adalah setelah infeksi EBV, pasien awalnya memproduksi antibodi melawan antigen EBV-1 namun kemudian bereaksi silang dengan ribonukleoprotein Sm dan Ro, sehingga membentuk kompleks imun antibodi-autoantigen. Respons imun berikutnya terhadap kompleks antibodi-autoantigen ini memicu penyebaran epitope kemudian menghasilkan produksi antibodi melawan sejumlah antigen inti sel yang baru, (Harley *et al.*, 2006) termasuk nukleosom (Mortensen *et al.*, 2008). Menariknya, nukleosom dari sel apoptosis dapat mengaktifkan *antigen-presenting cells* (APC) (Urbonaviciute *et al.*, 2008) dan merupakan autoantigen yang poten untuk dikenali sel B dan sel T (Bruns *et al.*, 2000). Kemampuan nukleosom yang dibawa oleh sel apoptosis untuk menginduksi aktivasi APC bergantung pada kehadiran mediator

proinflammasi HMGB1 (*high-mobility group box protein-1*). Apabila kompleks nukleosom-HMGB1 ditemukan pada sirkulasi pasien LES, menunjukkan pasien tersebut memiliki tingkat apoptosis endogen yang tinggi (Urbonaviciute *et al.*, 2008). Dengan demikian, paparan agen infeksi yang memicu produksi antibodi antiviral yang bereaksi silang dengan antigen inti sel pada sel apoptosis adalah satu mekanisme yang mengapa pasien LES dapat memproduksi autoantibodi. Masih terdapat faktor predisposisi lain yang dihipotesiskan berperan terhadap timbulnya autoimmunitas pada LES (Rottman and Willis, 2010).

Salah satu alasan mengapa mencit LES dan pasien LES dapat memproduksi autoimmunitas terhadap antigen inti sel adalah kegagalan toleransi sentral dari sel B. Pada manusia dan mencit yang sehat, sel B imatur yang spesifik dapat mengenali antigen inti akan mengalami pengeditan reseptor atau menjadi anergi sehingga terjadi toleransi terhadap antigen inti sel. Sebaliknya, pada mencit lupus terjadi kegagalan untuk menghapus atau menonaktifkan sel B autoreaktif yang spesifik untuk DNA/kromatin dan RNA dengan kata lain terjadi kegagalan pada induksi toleransi sentral (Rottman and Willis, 2010).

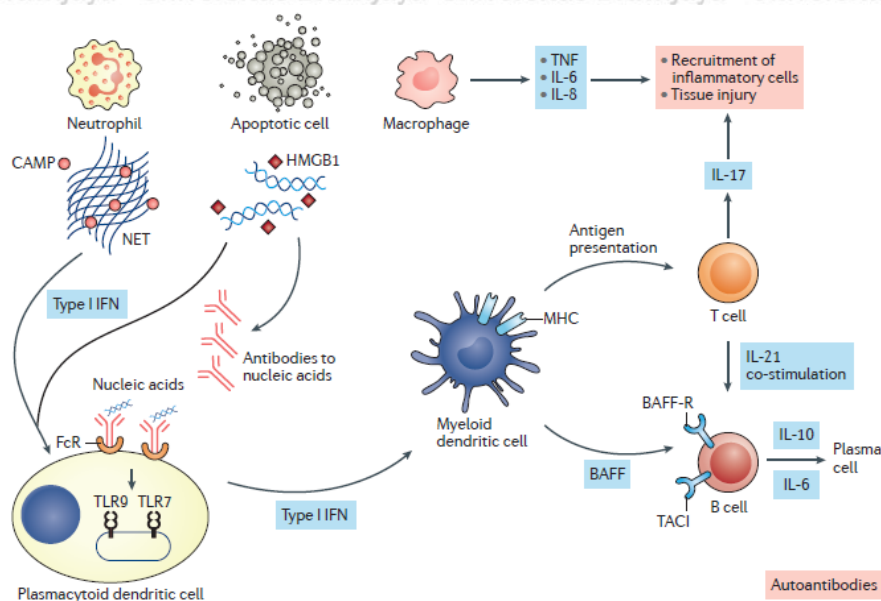
Pada LES diperkirakan juga terjadi kegagalan toleransi perifer sel B. Sel T-Regulator (T-Reg) berperan penting dalam menginduksi toleransi perifer sehingga penurunan sel T-Reg menyebabkan peningkatan produksi autoantibodi pada penyakit autoimun seperti LES (Morgan *et al.*, 2003). Induksi peningkatan sel T-Reg dapat menekan produksi autoantibodi secara *in vitro* dan *in vivo*. Satu mekanisme sel T regulator menghambat fungsi sel B autoreaktif pada mencit dan manusia adalah dengan menginduksi apoptosis melalui mekanisme kontak sel secara langsung. Pasien LES yang baru terdiagnosis diketahui mengalami penurunan jumlah sel CD4+CD25+. Sel T-Reg Foxp3+ pada pasien LES

mengalami penurunan kemampuan dalam menekan proliferasi sel CD4 dan CD8. Dengan demikian, pada pasien LES maupun mencit LES, kegagalan toleransi terhadap *self antigen* disebabkan oleh beranekacam penyebab. Abnormalitas fungsi dan genetik menjadi salah satu predisposisi LES (Rottman and Willis, 2010).

Pada LES terjadi regulasi epigenetik sehingga DNA pada pasien LES mengalami hipometilasi. DNA hipometilasi dari sel limfosit T pasien LES menyebabkan aktivasi sel T autoreaktif, peningkatan apoptosis, akumulasi debris-debris apoptosis karena penurunan jumlah sel fagosit. Selain penurunan sel fagosit, mekanisme lain yang menjadi predisposisi LES adalah defisiensi genetik komplemen C1q, C4, dan/atau C2 sehingga menghambat konversi C3 dan mengganggu pembersihan kompleks imun. Hal tersebut menyebabkan paparan antigen inti sel secara terus-menerus dan menjadi predisposisi hilangnya toleransi *self*. Karena apoptosis adalah proses fisiologis yang normal, tidak jelas mengapa individu yang biasanya toleran berkembang menjadi autoimun terhadap komponen inti sel mereka sendiri. Satu hipotesis yang menerangkan hal tersebut adalah bahwa pada pasien LES, debris apoptosis diproses dengan cara yang berbeda sehingga menyebabkan mereka menjadi imunogenik (Rottman and Willis, 2010).

Debris-debris apoptosis yang menetap dan mengandung asam nukleat dapat merangsang respons inflamasi melalui aktivasi reseptor pengenalan asam nukleat, seperti anggota keluarga *Toll-like Receptor* (TLR) (Theofilopoulos *et al.*, 2011). Reseptor pengenalan asam nukleat mengendalikan retrovirus endogen, mengenali patogen virus, dan pertahanan melawan bakteri intraselular, dan sangat terkait dengan produksi interferon tipe I (IFN). Defek pada jalur ini dewasa

ini memiliki peran penting pada patogenesis LES, karena keduanya meningkatkan kerentanan penyakit dan secara langsung menyebabkan LES (Tsokos *et al.*, 2016).



Gambar 2.4 Respon Seluler pada Perkembangan LES (Tsokos *et al.*, 2016)

Kontribusi seluler terhadap pengembangan SLE. Neutrofil dan sel apoptosis berada pada awal patogenesis lupus eritematosus sistemik (LES). Sel-sel tersebut memiliki ligan untuk memicu ekspresi interferon tipe I (IFNs). Neutrofil mewakili sel inflamasi yang berperan penting pada kerusakan organ; sel-sel ini juga dapat menghasilkan *neutrophil extracellular traps* (NET), sumber *citruinated peptide* dan antigen asam nukleat, melalui NETosis. Banyak sel dapat menghasilkan IFNs tipe I, namun IFN tipe I paling banyak diproduksi oleh sel dendritik plasmositoid. Debris apoptosis dapat mengaktifkan ekspresi sitokin inflamasi sehingga terjadi perekrutan sel inflamasi ke dalam jaringan. Baik sel T dan sel B berperan pada timbulnya autoreaktivitas sehingga sel B memproduksi autoantibodi. Produksi IL-17 oleh sel T juga berkontribusi terhadap infiltrasi neutrofil pada organ. BAFF, B-cell activating factor; BAFF-R, BAFF receptor; CAMP, cathelicidin antimicrobial peptide; FcR, Fc receptor; MHC, major histocompatibility complex; TACI, transmembrane activator and cyclophilin ligand interactor; TLR, Toll-like receptor.

IFN Tipe I dan sitokin inflamasi lainnya meningkatkan diferensiasi B-sel dan hilangnya toleransi. Sel B dapat merespons asam nukleat melalui pengenalan antigen langsung dan melalui reseptor IgM permukaan untuk protein yang membentuk kompleks dengan asam nukleat. Begitu autoantibodi terbentuk, sel B juga dapat mengambil asam nukleat melalui reseptor Fc dan reseptor sel B yang mengenali Fc (faktor rheumatoid) (Leadbetter *et al.*, 2002). Setelah

diaktifkan, sel B ini matang, berkembang, dan mulai mengeluarkan lebih banyak antibodi, yang meningkatkan respon imun adaptif (Gambar 2.4). Kelainan sel T dan sel B telah lama dijelaskan pada LES dan dianggap penting dalam proses penyakit. Autoantibodi yang diidentifikasi pada LES umumnya memiliki afinitas tinggi dan merupakan antibodi IgG yang bermutasi secara somatik (Tsokos *et al.*, 2016).

LES ditandai dengan produksi antibodi terhadap berbagai antigen sendiri, namun khususnya lebih terkait dengan anti-dsDNA. Antibodi Anti-dsDNA diproduksi sebelum timbulnya penyakit klinis dan berkaitan dengan meningkatnya manifestasi lupus yang parah seperti glomerulonephritis (Giles and Boackle, 2013). LES adalah penyakit autoimun yang melibatkan banyak komponen sistem imun dan menghasilkan produksi autoantibodi terhadap berbagai antigen termasuk diantaranya, namun tidak terbatas pada, DNA beruntai ganda (dsDNA), protein pengikat RNA (RBPs), dan fosfolipid (Diamond *et al.*, 2011). Banyak penyakit autoimun menghasilkan produksi autoantibodi, namun antibodi anti-dsDNA sangat spesifik untuk penyakit LES. Penelitian terbaru menunjukkan spesifisitas anti-dsDNA sebesar 100% pada pasien sehat dan 97% pada pasien dengan berbagai masalah kesehatan multipel (Wichainun *et al.*, 2013). Antibodi anti-dsDNA di LES pertama kali ditemukan pada tahun 1957 di dalam darah dan kemudian ditemukan di ginjal pasien nephritis (Tsokos *et al.*, 2016). Kehadiran antibodi ini dalam darah pasien lupus selama beberapa tahun sebelum manifestasi klinis pertama muncul menunjukkan anti-dsDNA mungkin berperan dalam perkembangan klinis penyakit LES (Arbuckle *et al.*, 2003).

Sel B dan sel T merupakan sistem kekebalan adaptif yang dilakukan pengeditan dan penghapusan reseptor selama proses perkembangan sel untuk memastikan bahwa sel yang reaktif terhadap antigen diri sendiri atau sel autoreaktif tidak dilepaskan ke sirkulasi perifer. Meskipun demikian, beberapa sel autoreaktif dapat melepaskan diri dari mekanisme toleransi dan memasuki sirkulasi perifer. Adanya sel B autoreaktif pada individu sehat menyebabkan terbentuknya autoantibodi yang bersifat sementara, termasuk yang memiliki spesifisitas anti-dsDNA, setelah infeksi (Racanelli *et al.*, 2011). Salah satu faktor yang mempengaruhi potensi patogenik auto-antibodi anti-dsDNA adalah isotype antibodi yang dimiliki: manusia dengan penyakit aktif berkaitan dengan isotype IgG dan bukan IgM atau IgA (Forger *et al.*, 2004), dan pada model mencit lupus, subkelas IgG2a lebih patogenik daripada IgG1 karena dapat mengaktivasi komplemen dan Fc *receptor* dengan lebih efisien (Baudino *et al.*, 2006).

2.3 dsDNA

2.3.1 dsDNA

Deoxyribonucleic acid (DNA) adalah suatu materi yang terdapat pada tubuh manusia dan semua makhluk hidup yang diwarisi secara turun menurun.

Semua sel pada tubuh memiliki DNA yang sama dan sebagian besar terdapat pada nukleus. DNA juga dapat ditemukan pada mitokondria (Campbell *et al.*, 2004). Struktur dari DNA terdiri dari gugus fosfat, gula deoksiribosa dan basa nitrogen. Informasi yang dibawa oleh DNA bergantung pada urutan basa nitrogen yang terdiri dari Adenin (A), Timin (T), Guanin (G) dan Sitosin (C). Basa pada DNA selalu berpasangan yaitu A-T dan G-C (Lewis, 2003; Stansfield *et al.*, 2006). Masing-masing pasangan basa melekat pada molekul gula (deoksiribosa) dan fosfat membentuk unit nukleotida. Nukleotida tersusun berpasangan pada

baris panjang yang berbentuk spiral yang sering disebut *double helix* (Suryo, 2011).

DNA dapat bereplikasi dan memperbanyak jumlahnya ketika akan terjadi pembelahan sel sehingga tiap sel baru akan memiliki DNA yang sama seperti sel yang lama. Proses replikasi DNA dimulai ketika untaian DNA dibuka dan dipisahkan oleh enzim helikase sehingga terjadi pemisahan antara untaian satu dengan untaian lainnya (Stanfield *et al.*, 2002). Selanjutnya, tiap untaian DNA

yang terpisah tersebut menjadi dasar cetakan (*template*) pasangan basa baru yang prosesnya dibantu oleh enzim DNA *polymerase*. Enzim ini akan memasangkan basa-basa yang sesuai dengan templatnya (Yuwono, 2005).

Fungsi DNA adalah untuk bereplikasi dan mensintesis protein. Replikasi diperlukan untuk memberikan informasi yang sama pada tiap sel baru ketika terjadi pembelahan. Dalam proses sintesis protein, DNA menyediakan informasi genetik yang diperlukan oleh sel untuk dapat berfungsi secara fungsional dan struktural. Informasi dari DNA diturunkan dari generasi ke generasi dan merupakan kombinasi dari ayah dan ibu (Butler, 2005).

DNA dapat dicampur dengan kationik poliamin *polyethylenimine*/PEI (DNP) sebagai larutan pembawa yang menghantarkan DNA. Larutan ini mengoptimalkan efisiensi dan stabilitas DNA (Intra and Salem, 2008; Gunther *et al.*, 2011). Sel akan menangkap DNP melalui proses fagositosis dan endositosis kemudian dsDNA akan dilepaskan ke sitoplasma karena polimer kationik dari PEI akan merusak vesikel endositik melalui efek "proton-sponge" (Gunther *et al.*, 2011). DNP akan ditangkap oleh sel dendritik, makrofag atau sel B. DNP akan menstimulasi sel dendritik untuk mengekspresikanIDO dan juga sel selain sel dendritik juga mengekspresikanIDO. InduksiIDO ini dipicu sinyal dari IFN α β

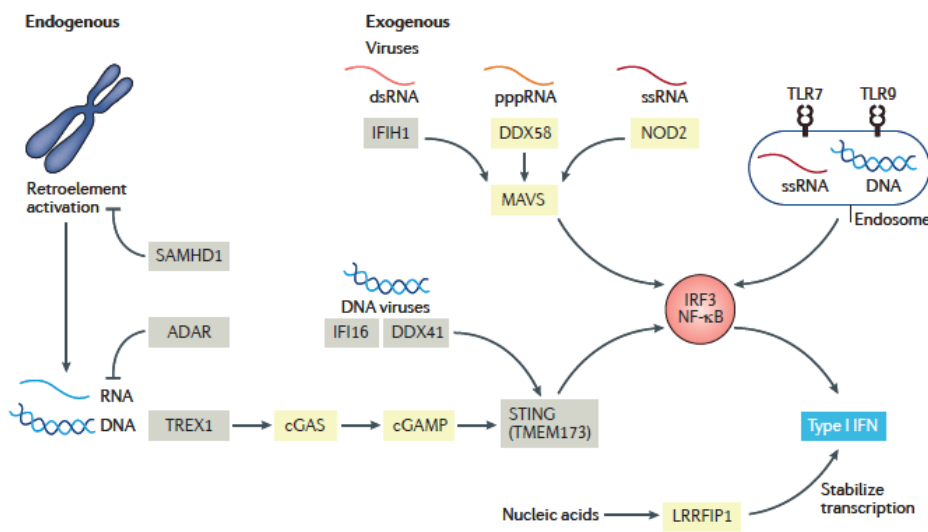
(IFN tipe I). Sel dendritik akan mencerna DNP kemudian memicu pelepasan IFN tipe I yang dapat menginduksi CD19+ DC mengekspresikanIDO melalui jalur autokrin maupun parakrin (Huang *et al.*, 2012). dsDNA dapat ditangkap oleh TLR9/MyD88 yang menghasilkan sinyal untuk melepaskan IFN $\alpha\beta$. DNA juga memiliki sensor pada sitosol diantaranya DDX41/STING, LRRFIP/ β -catenin, AIM2/ASC sebagai jalur untuk menginduksi pelepasan IFN $\alpha\beta$ (Ishikawa *et al.*, 2009; Fernandez *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010; Barbalat *et al.*, 2011). Hal ini menunjukkan bahwa pelepasan IFN $\alpha\beta$ tidak hanya bergantung pada jalur TLR9/MyD88 (Huang *et al.*, 2012).

2.3.2 Self antigen-dsDNA pada LES

Penelitian terdahulu yang dilakukan Christense *et al* menunjukkan bahwa self antigen dsDNA yang menjadi penyusun kompleks imun dapat memicu aktivasi sel dendritik plasmasitoid pada pasien LES sehingga terbentuk autoantibodi dsDNA (Means, 2005). Disregulasi dari pembersihan debris-debris apoptosis menjadi karakteristik penyakit LES sehingga terjadi paparan dari antigen tubuh sendiri. Akumulasi debris ini akan memicu TLRs dan sensor asam nukleat. Sel-sel yang mengekspresikan TLR diantaranya sel B, beberapa sel T, sel dendritik (DC), makrofag, serta beberapa sel non imun diantaranya sel epitel dan fibroblast. Beberapa jalur telah berevolusi untuk mencegah aktivasi sistem imun dalam melawan debris-debris seluler endogen. Sel-sel apoptosis akan dilapisi dengan komponen komplemen C1q, protein C-reaktif, pentraxin 3, dan serum amyloid P, yang meningkatkan fagositosis tanpa stimulasi imun (Gaipl *et al.*, 2004; Janko *et al.*, 2011). Selain itu, terdapat DNase I yang berkontribusi dalam degradasi kromatin (Gaipl *et al.*, 2004). Akan tetapi, aktivitas DNase I pada pasien dengan LES dan pada mencit model lupus diketahui mengalami

penurunan (Wilber *et al.*, 2003). Beberapa mutasi genetik diteliti pada keluarga penderita LES diantaranya mutasi pada DNase I serta PRKCD yang mengkode enzim kinase C δ (enzim yang mengaktivasi pada banyak jalur apoptosis) (Belot *et al.*, 2013).

Sel apoptosis sebagian besar akan dibersihkan oleh sel-sel didalam kompartemen retikuloendotelial (RES) (Dieker *et al.*, 2015). Mencit model lupus dapat menjadi model yang baik untuk mempelajari peran TLR. TLR3, TLR7, TLR8, dan TLR9 berada pada retikulum endoplasma. Transfer TLR ke endosom diregulasi oleh protein trafficking unc-93 homologue B1 (UNC93B1). Didalam plasmacytoid DCs (pDCs), UNC93b1 membawa kompleks DNA besar ke endosom awal dimana terdapat TLR9 dan IRF7 yang berperan pada ekspresi IFN. DNA monomer kecil akan dibawa ke endosom akhir dimana terdapat TLR9 dan NF- κ B yang berperan pada ekspresi sitokin proinflamasi (Honda *et al.*, 2005). TLR9 adalah reseptor untuk DNA yang mengandung motif sekuen *unmethylated* CpG. Pasien LES aktif memiliki lebih banyak sel B dan monosit yang mengekspresi TLR9 dibandingkan pasien LES dengan aktivitas penyakit yang lebih rendah serta jumlah ini berkorelasi dengan peningkatan kadar antibodi anti-dsDNA (Papadimitraki *et al.*, 2006).



Gambar 2.5. Sensor asam nukleat pada LES

Respon imun terhadap asam nukleat pada LES dibuktikan berperan. TLR dibatasi oleh vesikel-vesikel dan berespon primer pada endositosis asam nukleat. Sensor-sensor sitoplasma mengenali asam nukleat endogen mirip dengan virus. Respon-respon tersebut bertemu pada dua faktor transkripsi yaitu IRF3 dan NF-κB yang responsible untuk menginduksi ekspresi IFN tipe I dan sitokin-sitokin inflamasi yang lain. (Tsokos *et al.*, 2016)

Asam nukleat akan dikenali sensor yang juga terdapat pada sitosol (Tsokos *et al.*, 2016). Sensor asam nukleat pada sitosol mengenali infeksi virus dan mengawali pertahanan tubuh dengan memproduksi IFN tipe I. Sensor-sensor ini juga dapat mendeteksi ligan-ligan endogen dan meningkatkan inflamasi yang tidak tergantung adanya infeksi. Jalur sinyal untuk sensor ini mengarah pada stimulator dari gen protein IFN yaitu STING yang dikode oleh TMEM173 (Ishikawa and Barber, 2008). Perlindungan tambahan adanya efek dari asam nukleat endogen adalah adanya enzim nuklease yang mendegradasi asam nukleat. Sensor-sensor ini bekerja didalam sitoplasma berkomplemen fungsinya dengan TLR endosomal. Sensor pada sitosol mengaktifasi baik produksi IFN maupun sitokin inflamasi (Schlee and Hartmann, 2016). Terdapat sensor untuk DNA diantaranya TREX1 yang akan mengaktifkan STING, dan masih ada sensor yang lainnya tetapi mekanismenya belum diketahui dengan baik (Tsokos *et al.*, 2016). STING akan mengaktifkan NF-κB atau IRF 3 yang

akan meningkatkan produksi IFN tipe 1 (Hornung *et al.*, 2009). Mencit model lupus mendukung peran kunci dari jalur-jalur ini untuk mempelajari etiopatogenesis dari LES (Choubey, 2012).

Penelitian yang dilakukan oleh Qiao *et al* tahun 2005 membuktikan bahwa pemberian injeksi DNA dari limfosit yang teraktivasi pada mencit Balb/c dapat menginduksi kondisi lupus. Kadar dsDNA yang dibutuhkan agar mencit Balb/C dapat terinduksi lupus adalah sebesar 50 µg per mencit (Qiao *et al.*, 2005).

Dengan memberikan injeksi DNA dari limfosit yang teraktivasi sebesar 50 µg per mencit, menyebabkan peningkatan kadar antibodi anti-dsDNA yang signifikan serta kadar antibodi anti-ENA juga mengalami peningkatan. Selain peningkatan antibodi. Hasil histopatologi jaringan ginjal juga menunjukkan adanya glomerulonephritis dan deposisi antibodi IgG dan komplemen C3 pada ginjal. Proteinuria juga dilaporkan meningkat dengan pemberian DNA sebanyak 50 µg per mencit (Qiao *et al.*, 2005). DNA dapat memicu pembentukan anti-dsDNA dengan bantuan pengenalan dari sel T CD4+ (Wen *et al.*, 2012). Penelitian selanjutnya menunjukkan pemberian injeksi DNA pada mencit Balb/C juga menyebabkan peningkatan kadar sitokin IL-17 yang berperan penting pada patogenesis lupus dan berkorelasi positif dengan peningkatan kadar anti-dsDNA (Wen *et al.*, 2013).

2.4 Escalating Dose Antigen Specific Immunotherapy (EDI)

Escalating Dose (Antigen-Spesifik) *Immunotherapy* adalah salah satu metode terapi untuk menginduksi supresi respon imun melalui mekanisme toleransi. Metode ini dilakukan dengan cara menginjeksikan autoantigen (*self-antigen*) yang menstimulus pembentukan autoantibodi dengan dosis yang bertahap hingga memunculkan efek toleransi. Pemberian dosis yang bertahap

dan meningkat ini dilakukan untuk menghindari efek samping dari pemberian terapi dari yang paling ringan seperti gatal-gatal sampai yang paling berat, seperti syok anafilaksis (Larche and Wraith, 2005). Tujuan utama dari terapi penyakit autoimun adalah menekan respon imun terhadap *self-antigen* tanpa menurunkan kemampuan sel imun untuk melawan antigen asing (*non-self*). Injeksi *self-antigen* dengan dosis yang bertahap dibuktikan dapat menginduksi sel regulator pada respon imun yaitu T-Reg untuk dapat mensupresi sel T yang autoreaktif (Sakaguchi, 2000).

Metode *Escalating Dose Antigen-Specific Immunotherapy* merupakan suatu metode yang berpeluang besar sebagai terapi penyembuhan penyakit autoimun meskipun penelitian tentang hal ini masih terbatas. Penelitian yang dilakukan Seddon dan Mason pada penyakit autoimun tiroiditis dengan menginjeksi autoantigen tiroid ternyata mampu menginduksi sel T-reg. Penelitian lain yang dilakukan oleh Thorstenson menunjukkan bahwa pemberian secara oral dan injeksi antigen ovalbumin mampu menginduksi T-Reg (Sakaguchi, 2000).

Escalating Dose Antigen-Specific Immunotherapy juga telah dikembangkan adalah terhadap autoimun *Multiple Sclerosis*. Injeksi subkutan *Myelin Basic Protein* (MBP) mampu menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif. Penggunaan metode terapi ini terhadap penurunan progresivitas penyakit LES belum pernah dilakukan, maka perlu dieksplorasi lebih lanjut lagi mengenai penggunaan metode *EDI-Antigen-Specific Immunotherapy* menggunakan autoantigen dsDNA dalam menurunkan progresivitas dari penyakit LES (Kawamoto, 2004).

Sel Treg memiliki peran penting dalam pengembangan terapi toleransi dengan antigen spesifik. Induksi sitokin IL10 sebagai imunomodulator menunjukkan efektivitas imunoterapi baik pada tikus maupun manusia (Tarzi *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009; Foustero *et al.*, 2010). Selama proses imunoterapi, stimulasi kronis pada sel CD4 dengan pemberian peptida antigen mengubah program transkripsi (Anderson *et al.*, 2006) sehingga sel Th1 patogen yang berubah menjadi anergi, sekresi IL10, dan terdapat sel dengan fenotip regulator yang mampu mencegah autoimunitas (Gabrysova *et al.*, 2009).

Pada prakteknya, imunoterapi dengan antigen yang spesifik menggunakan peningkatan dosis yang bertahap pada awal terapi kemudian mempertahankan pada dosis tinggi dapat mencapai desensitisasi terhadap alergi (Burks *et al.*, 2013). Sudah disetujui bahwa menggunakan metode peningkatan dosis yang bertahap ini akan meminimalisir risiko efek samping dari imunoterapi yang bervariasi mulai dari gejala yang ringan hingga anafilaksis. Banyak faktor-faktor yang mempengaruhi efek dari imunoterapi antigen spesifik baik antigen diri sendiri ataupun antigen asing. Faktor tersebut diantaranya pemilihan antigen (protein atau peptida), dosis antigen, dan frekuensi pemberian (Larache and Wraith, 2005).

Penelitian terbaru dilakukan oleh Burton *et al.*, 2014 membuktikan keamanan imunoterapi menggunakan antigen spesifik dengan metode *Elicit Dose Immunotherapy* (EDI). Penelitian dilakukan pada *autoimmune encephalomyelitis model* (EAE) dari *multiple sclerosis* dengan pemberian terapi menggunakan protein MBP (*Myelin Basic Protein*). Dosis MBP yang diberikan bertahap dari 0.08 µg-0.8 µg-8 µg-3x80 µg dengan konsentrasi 0.01 µg/ml-0.1 µg/ml-1 µg/ml-10 µg/ml-100 µg/ml. Penelitian tersebut membuktikan aktivasi sel

T CD4 yang berlebihan dapat dihindari dengan memberikan imunoterapi dengan dosis rendah terlebih dahulu tetapi tetap mampu menginduksi sel menjadi anergi.

Dengan menggunakan protocol EDI, pemberian antigen spesifik mampu mencapai dosis tertinggi yang dibutuhkan untuk menginduksi IL10 tanpa meningkatkan sitokin inflamasi lainnya. Fenotip sel T CD4 yang diinduksi EDI juga dibandingkan dengan sel yang diinduksi dengan dosis antigen yang sama berulang-ulang. Kedua metode tersebut sama-sama menunjukkan efek anergi sel, supresi sel, dan peningkatan ekspresi IL10. Akan tetapi, pada penelitian ini produksi IL10 pada sel yang diberikan paparan antigen dengan metode EDI menunjukkan kadar yang lebih tinggi dibanding dengan metode pemberian antigen berulang-ulang dengan dosis yang sama. Dengan demikian, pemberian antigen dengan dosis yang bertahap lebih baik dalam menginduksi toleransi sel serta meminimalisir efek samping yang mungkin terjadi (Burton *et al.*, 2014).

Pemberian imunoterapi antigen spesifik dengan menggunakan metode EDI juga dibuktikan dapat memicu perubahan transkripsi. Sel T CD4 yang diberi terapi metode ini menunjukkan ekspresi molekul kostimulator negatif dan faktor-faktor transkripsi. Faktor transkripsi yang termasuk didalamnya juga yang berhubungan dengan ekspresi IL10, diantaranya Maf, Ahr dan Nfil3. Hasil penelitian ini juga menunjukkan induksi diferensiasi sel T regulator dengan adanya fenotip sel Tr1 yang mensekresi IL-10. Korelasi paling penting yang ditunjukkan pada penelitian ini adalah pemberian imunoterapi dengan metode EDI yang efektif telah menginduksi molekul costimulatory negatif, diantaranya PD-1, LAG-3 dan faktor transkripsi diantaranya TIM-3 and TIGIT. PD-1 dan LAG-3 disebut marker sel anergi yang lebih baik dibanding lainnya. TIGIT dan TIM-3

lebih menunjukkan adanya fenotip sel yang dapat mensekresi IL-10 karena adanya imunoterapi (Burton *et al.*, 2014).

2.5 Sel T

Sel progenitor yang berasal sumsum tulang yang bermigrasi ke timus berdiferensiasi menjadi sel T. Sel T merupakan imunitas selular yang berperan pada sistem imun spesifik. Sel T terdiri atas sel CD4+, CD8+, sel T naif, NKT, dan Tr/Treg/Ts/Th3. Sel T naif yang terpajan dengan kompleks antigen MHC dan dipresentasikan APC atau rangsangan sitokin spesifik, akan berkembang menjadi subset sel T berupa CD4+ dan CD8+ dengan fungsi efektor yang berlainan. Dari timus, sel T naif dibawa darah ke organ limfoid perifer (Bratawidjaya, 2012). Sel naif yang terpajan dengan antigen akan berkembang menjadi sel Th0 yang dipengaruhi oleh mekanisme autokrin dari IL-2 untuk berproliferasi yang akan berdiferensiasi menjadi Th1 dan Th2 (Abbas, 2007). Sitokin terpenting yang dihasilkan sel Th1 pada fase efektor adalah IFN- γ . IFN- γ akan memacu aktifitas pembunuhan mikroba sel-sel fagosit dengan meningkatkan destruksi intrasel pada mikroba yang difagositosis. Fungsi pokok efektor Th1 adalah sebagai pertahanan infeksi dimana proses fagositosis sangat diperlukan (Bratawidjaya, 2012).

2.5.1 Sel T-helper 2 (Th2)

Atas pengaruh sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan dengan antigen, Th0 berkembang menjadi sel Th2 yang merangsang sel B untuk meningkatkan produksi antibodi (Bratawidjaya, 2012). Diferensiasi Th2 muncul sebagai respon terhadap alergi dan parasit, melibatkan reseptor sel T, IL-4, faktor transkripsi GATA-3 dan STAT6. IL-4 menstimulasi produksi IgE yang berfungsi dalam opsonisasi parasite sehingga Th2 adalah mediator untuk

reaksi alergi dan pertahanan infeksi terhadap parasit. Th2 juga memproduksi sitokin seperti IL-4, IL-13, dan IL-10 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag. Jadi Th2 kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1. Pertumbuhan yang berlebihan dan tak terkontrol dari Th2 berhubungan dengan berkurangnya imunitas seluler terhadap infeksi mikroba intraseluler (Abbas, 2012).

Pada beberapa kondisi, seperti infeksi cacing, IL-4 yang diproduksi sel mast dibawa ke organ limfoid dan eosinofil, yang ikut terlibat dalam perkembangan Th2. Kemungkinan lain adalah antigen yang menstimulasi sel CD4+ mensekresi sejumlah kecil IL-4 dari aktivasi awal sel tersebut. Jika antigen tetap ada dan dengan konsentrasi yang tinggi, maka konsentrasi lokal IL-4 berangsur-angsur akan meningkat. Jika antigen tidak memicu inflamasi dengan disertai produksi IL-12, maka akan menghasilkan peningkatan diferensiasi sel ke subset Th2. Apabila sel Th2 telah berkembang, maka IL-4 akan memperkuat reaksi dan menghambat perkembangan sel Th1 dan sel Th17 (Abbas, 2012).

2.5.2 Peran Sel T-helper 2 (Th2) pada LES

Sel T merupakan sel yang dianggap menjadi pusat patogenesis dari LES karena hubungan mereka dengan protein MHC. Hilangnya toleransi sel-sel T menjadi ciri-ciri penyakit autoimun. Secara konsep, hilangnya toleransi ini berlangsung secara terpusat pada saat pengenalan antigen di timus atau di perifer, tetapi model hewan coba telah menunjukkan pentingnya hilangnya toleransi pada perifer. Sel Treg yang tidak efektif diidentifikasi baik oleh penelitian pada hewan coba maupun pada manusia (Chavele and Ehrenstein, 2011).

Banyak jalur yang menyebabkan toleransi sel T menjadi tidak efektif pada LES. Fenomena pertama yang dapat menjelaskannya adalah gangguan penghantaran sinyal melalui reseptor sel T. Sel T yang normal dapat menjadi gagal dalam toleransi jika berikatan dengan IgG dari pasien dengan LES (Juang *et al.*, 2005). Sel-sel T dalam pasien LES, CD3 rantai ζ (yang memperantarai sinyal melalui tyrosine-protein kinase ZAP-70) mengalami penurunan regulasi karena peningkatan aktivitas mTOR yang menyebabkan ZAP-70 digantikan oleh FcRy. FcRy kemudian lebih berikatan dengan tyrosine-protein kinase SYK dibandingkan protein ZAP-70. Hal tersebut menyebabkan aktivasi berlebih dari jalur sinyal reseptor sel T (Enyedy *et al.*, 2001).

Disamping adanya fenotip yang hiperaktivasi, produksi IL-2 dari sel T juga mengalami gangguan. Ekspresi IL-2 oleh sel T pada LES akibat penurunan level dari faktor transkripsi AP-1 dan supresi oleh cAMP-responsive element modulator (CREM α) (Solomou *et al.*, 2001; Kyttaris *et al.*, 2004). Terapi menggunakan rapamycin sebagai inhibitor mTOR secara *invivo* menunjukkan efektivitas secara klinis, dan menunjukkan kepentingan jalur ini pada patogenesis LES (Fernandez *et al.*, 2009). Sel T menyediakan lebih dari sekedar sinyal untuk switching class. Sel T menjadi poin kunci terjadinya autoreaktif sel B pada LES. Interaksi sel T dan sel B menjadi focus kunci penelitian LES dewasa ini karena interaksi mereka terjadi diluar lokasi biasanya, yaitu didalam organ limfoid sekunder (Tsokos *et al.*, 2016).

Perbedaan subset sel T *helper* berdasarkan jenis sitokin yang dihasilkannya. Sel Th1 memproduksi utamanya sitokin IFN γ dan IL-2 dan mempromosikan imunitas yang diperantarai sel. Sel Th2 mensekresi IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 yang berhubungan dengan respon imun humoral dan menginduksi

pembentukan antibodi. Ketidakseimbangan antara sitokin Th1 dan Th2 memiliki peran kunci pada induksi dan perkembangan beberapa penyakit-penyakit autoimun. Perbaikan keseimbangan Th1/Th2 dapat menjadi target untuk profilaksis dan terapi berbagai model penyakit-penyakit autoimun (Guimaraes *et al.*, 2017).

Pada pasien dengan LES, kadar serum sitokin Th2 seperti IL-4, IL-6, dan IL-10 meningkat. Sedangkan produksi sitokin Th1 diantaranya IL2 dan IFN γ menurun. Pada umumnya LES dipertimbangkan sebagai penyakit dengan predominan Th2. Akan tetapi beberapa hasil penelitian kontraindikasi dengan pernyataan tersebut. Beberapa penelitian menunjukkan kadar IFN γ yang meningkat pada serum darah manusia dan ketidakseimbangan berhubungan dengan peningkatan aktivitas penyakit lupus pada mencit model lupus (Alkahoshi *et al.*, 1999).

Kedua sel Th1 dan Th2 sama-sama berespon dan berperan dominan pada patogenesis kerusakan jaringan pada lupus. Faktanya, mencit model LES memiliki dua tahap aktivasi sel T dan sekresi sitokinnya, ekspresi sitokin Th1 muncul pertama kali diikuti induksi sitokin Th2. Pada penelitian oleh Alkahoshi *et al.*, dianalisis rasio Th1:Th2 pada sel Th darah perifer pasien LES dibandingkan kontrol normal. Deteksi sitokin intrasel dilakukan dengan metode flowcytometry yang digunakan untuk menentukan sel Th1 dan sel Th2 (Alkahoshi *et al.*, 1999).

Pada penelitian Alkahoshi *et al.*, rasio Th1/Th2 pada pasien LES tidak berbeda signifikan dengan pasien sehat sehingga disimpulkan pada pasien LES belum tentu terjadi pergeseran dominasi respon ke sel Th2. Pasien LES dengan proteinuria kronis mengalami peningkatan persentase sel Th1 perifer dibandingkan dengan kontrol sehat. Keseimbangan Th1/Th2 pasien LES dengan

Nefritis kelas IV menunjukkan pergeseran ke Th1 (Alkahoshi *et al.*, 1999). Data ini mendukung teori bahwa eksaserbasi nefritis pada LES di mediasi oleh sitokin Th1 seperti IFN γ . Telah dibuktikan bahwa IFN γ menjadi sitokin yang berperan penting pada perkembangan penyakit autoimun pada ginjal (Schwartz *et al.*, 1998).

Pada pasien LES, Hiperaktivitas sel B berhubungan dengan produksi sitokin Th2 yang mengawali produksi autoantibodi yang berlebihan. Akan tetapi peran sitokin Th1 juga sama-sama diketahui. Baik sitokin Th1 dan Th2 dapat berperan dalam mendukung ataupun menghambat penyakit autoimun. Penelitian sebelumnya menunjukkan peningkatan IFN γ dan IL8 dan keduanya berkorelasi positif (Amerio *et al.*, 2002). Pada penelitian Sayed *et al.*, IFN γ menunjukkan korelasi negatif dengan sitokin Th2 (IL4 dan IL10) (Sayed *et al.*, 2008).

Penelitian terakhir menunjukkan kadar sitokin mengalami perubahan pada LES. Tingginya sitokin proinflamasi kemungkinan mencetuskan eksaserbasi dari respon inflamasi, apoptosis dan produksi autoantibodi yang mengawali dan mempertahankan aktivitas penyakit (Yap *et al.*, 2010; Postal *et al.*, 2013). Umumnya sudah disepakati adanya predominansi keterlibatan respon Th2 atau respon Th1 dan Th2 yang mengarahkan pada autoimun LES (Theofilopoulos *et al.*, 2001; Dolff *et al.*, 2011; Miyake *et al.*, 2011). LES dan aktivitas penyakit ditandai dengan profil Th1, Th17, dan Treg bersamaan dengan penurunan produksi IL-4. Tingkat serum sitokin dan profilnya di LES sedikit dimodulasi oleh status vitamin D, BMI dan TNF β Ncol polymorphism, terutama oleh genotip TNFB1/B1. Ketiga faktor ini dapat memperburuk Th1 dan Th17 dan respon IL-6 pada LES. Peningkatan Th1 ditambah dengan peningkatan Th17 namun menurunkan aktivitas Th2 dan peningkatan kadar IL-10 bisa menjadi

target obat baru di LES. Hasil ini menunjukkan bahwa strategi modulasi sitokin memiliki potensi untuk pengobatan LES serta profil Th1, Th17, dan Treg bersamaan dengan penurunan produksi IL-4 dapat dijanjikan sebagai biomarker aktivitas penyakit (Guimaraes *et al.*, 2017).

Penelitian terbaru dilakukan oleh Gumaraes et al (2017), dengan temuan utama dari penelitiannya adalah bahwa kadar sitokin dalam plasma diantaranya IL-6, IL-12, IL-17, IFN- γ , dan IL-10 secara signifikan lebih tinggi sedangkan IL-4

lebih rendah pada LES jika dibandingkan dengan kontrol. Selain itu, peneliti menemukan bahwa profil Th1 / Th2 dan Th1 + Th17 /Th2 secara signifikan lebih tinggi di LES, padahal tidak ada perbedaan signifikan dalam profil sitokin pro-

inflamasi (Guimaraes *et al.*, 2017). Data penelitian tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan tingkat tinggi IFN- γ berhubungan dengan aktivitas penyakit pada LES (Csiszár *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2007).

IFN- γ memberikan efek patogennya dengan mendorong sitokin proinflamasi lainnya, menginduksi apoptosis pada sel ginjal, dan mempromosikannya kerusakan jaringan bila diproduksi berlebihan. IFN- γ menginduksi percepatan

progresivitas LES, sementara anti-IFN- γ antibodi menunda aktivitas penyakit, menunjukkan potensi patogenik IFN- γ di LES (Fonslow *et al.*, 2013). Selain itu, penelitian lain menemukan bahwa penurunan kadar IL-4, sitokin Th2,

diperkirakan terjadi pada LES dan berhubungan negatif dengan tingkat keparahan penyakit. Peningkatan ekspresi IL-4 pada model murine dari LES telah ditunjukkan mengarah pada hipotesis bahwa IL-4 juga bisa terjadi

meningkat pada LES manusia dengan respons Th2 yang dominan (Peng *et al.*, 1997). Namun, penelitian terbaru ditunjukkan baik tidak ada perubahan pada IL-4 pada pasien LES (Talaat *et al.*, 2015) atau penurunan kadar IL-4 yang signifikan

(Eriksson and Dahlqvist, 2014). Studi menunjukkan bahwa penurunan kadar IL-4 akan terjadi pada LES sebagai akibat stimulus IL-4 itu sendiri dalam memproduksi antibodi *non complement-fixing* oleh sel B. Sebaliknya, auto-antibodi di LES secara dominan merupakan *complement-fixing* IgG1 dan IgG3 (Csiszar et al., 2000 Guo et al., 2015);

2.6 Peran Interleukin-4 (IL-4)

2.6.1 Interleukin-4 (IL-4)

Interleukin-4 dahulu disebut BSF-1, diproduksi oleh sel T, mastosit, dan sel B CD5+. IL-4 merupakan sitokin anti inflamasi yang menstimulasi respon imun humoral untuk melawan patogen ekstraseluler (Kresno, 2010). Sumber utama IL-4 adalah sel T CD4+, khususnya Th2, bahkan produksi IL-4 dianggap sebagai kriteria untuk mengklasifikasikan sel T dalam golongan sel Th2, dan IL-4 berfungsi sebagai faktor pertumbuhan autokrin bagi sel Th2 (Abbas, 2012). IL-4 merangsang sel B meningkatkan produksi IgG dan IgE dan meningkatkan ekspresi MHC-II dan merangsang isotipe sel B dalam pengalihan IgE. IgE sangat berperan pada reaksi alergi, oleh karena itu reaksi alergi akan timbul apabila IL-4 diproduksi berlebihan (Abbas, 2012).

Aktivitas IL-4 tidak terbatas pada sel B, tetapi juga pada sel T, makrofag, granulosit, mastosit, prekursor eritrosit dan megakariosit. IL-4 merupakan sitokin petanda sel Th2, merupakan stimulus utama perkembangan Th2 dari sel CD4+ naif (Bratawidjaya, 2012). IL-4 dapat berfungsi sebagai faktor pertumbuhan sel T dan menginduksi sel T untuk mengekspresikan reseptor IL-2 dan memproduksi IL-2. Tetapi ia juga dapat merupakan antagonis bagi IL-2 pada beberapa jenis sel lain. Reseptor IL-4 telah dapat dideteksi pada permukaan sel hemopoetik, fibroblast, sel epitel, otot, neuroblast, dan sel stroma (Abbas, 2007). IL-4

mempunyai efek inhibisi terhadap sitokin proinflamasi melalui supresi IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, dan MIP-1 α . IL-4 mencegah aktivasi makrofag yang diinduksi oleh IFN- γ , oleh karena itu IL-4 mempunyai efek yang berlawanan dengan IFN- γ (Bratawidjaya, 2012).

2.6.1 Peran Interleukin-4 pada LES

Sitokin-sitokin terlarut berkontribusi pada kerentanan penyakit LES serta sangat kuat mempengaruhi hilangnya toleransi dan efek kerusakan akhir pada organ. Banyak kadar sitokin yang mengalami peningkatan pada LES diantaranya TNF, IL4, IL6, dan IL10 dan efek utamanya adalah memacu produksi autoantibodi dan inflamasi (Tsokos *et al.*, 2016). IFN tipe I dan IFN tipe II menjadi sitokin yang memiliki peran kunci dalam patogenesis LES (seperti penyakit autoimun lainnya) dan peningkatan kadarnya mengawali pembentukan autoantibodi (Lu *et al.*, 2016; Monroe *et al.*, 2016). IFN α salah satu anggota IFN tipe I yang diproduksi sebagai bagian dari respon imun alami dari infeksi virus, memiliki banyak efek konsisten seperti peningkatan regulasi dari B-cell activating factor (BAFF, yang juga disebut TNF ligand superfamily member 13B or BLYS), penurunan fungsi sel Treg dan induksi dari sel-sel plasma (Liu and Davidson, 2013). Akan tetapi, uji klinis terapi inhibisi IFN saja tidak menunjukkan hasil yang memuaskan (Wang *et al.*, 2008; Rudolf *et al.*, 2015).

LES adalah penyakit autoimun sistemik yang muncul sebagai konsekuensi dari kegagalan beberapa mekanisme imunologi (Singh *et al.*, 2003).

LES ditandai dengan disfungsi sel T dan aktivasi sel B. IL-4 adalah sitokin yang meningkatkan tidak hanya diferensiasi sel B tetapi juga sel T, terutama sel T-helper 2 (Th2) (Tsokos *et al.*, 2007). Sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 diantaranya IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13 adalah sitokin yang memainkan peran

penting dalam berbagai fungsi sel B, diantaranya proliferasi, aktivasi, dan perubahan isotipe. Sitokin-sitokin tersebut juga menginduksi diferensiasi sel T naif ke sel Th2. Pembentukan autoantibodi berperan penting pada patogenesis SLE dan adanya penyimpangan kompleks sitokin yang berhubungan dengan sel B berkontribusi pada penyakit LES (Tsokos *et al.*, 2007). Frekuensi sel IL-4-positif di PBMC pada LES juga diketahui meningkat dibandingkan kontrol sehat (Funauchi *et al.*, 1998).

Interleukin 4 (IL-4) merupakan sitokin yang disekresi oleh sel Th2, sel NK, sel Mast, dan sel Basofil. IL-4 dan memiliki peran penting dalam mengatur diferensiasi sel T naif yang distimulasi antigen untuk berkembang menjadi sel Th2 yang memproduksi IL-4 melalui sinyal yang diperantarai IL-4R (Shirowa *et al.*, 2007). Ekspresi IL-4 yang meningkat menyebabkan peningkatan dan pengaktifan sel B autoreaktif dan dengan demikian dapat berkontribusi pada perkembangan dan keparahan dari penyakit yang diperantarai autoantibodi (Morris *et al.*, 2000). IL-4 dapat mencegah apoptosis sel B dan meningkatkan ketahanan hidup sel B. IL-4 juga bertanggung jawab pada perubahan isotipe antibodi menjadi IgG1 dan IgE (Tsokos *et al.*, 2007). Autoantibodi patogen pada menciit lupus umumnya termasuk pada subkelas IgG2a dan IgG3 yang dipicu oleh sitokin tipe 1 yaitu IFN- γ dan ditekan oleh sitokin tipe 2 diantaranya IL-4. Akan tetapi, IL-4 dapat meningkatkan autoimunitas dengan cara menghambat apoptosis sel B autoreaktif tetapi juga menghambat autoimunitas dengan menginduksi produksi sitokin regulator, TGF- β . Sitokin tipe 1 dan 2 juga dapat langsung berperan pada kerusakan organ tahap akhir. Misalnya, sitokin tipe 1 IFN- γ dapat memperburuk proses inflamasi pada organ, sedangkan sitokin tipe 2 dapat memperparah fibrosis jaringan. Masih menjadi perdebatan apakah sitokin

IFN- γ ataukah IL-4 yang lebih berperan pada lupus. Ekspresi berlebihan dari IL-4 pada mencit transgenik menunjukkan efek protektif tetapi juga penelitian lain menunjukkan efek dalam memacu perkembangan penyakit lupus (Singh et al., 2003).

Penelitian terakhir mengenai peran IL-4 pada perkembangan lupus menunjukkan penghambatan IL-4 dengan pemberian terapi antibodi anti-IL4 atau dengan menghambat sinyal STAT6 dapat menghambat perkembangan glomerulosclerosis dan mencegah perkembangan ESRD pada mencit NZM²⁴¹⁰ meskipun kadar IgG anti dsDNA tinggi (Singh et al., 2003). Molekul STAT adalah protein pada sitoplasma yang berperan pada respon sitokin tipe-1 dan tipe-2 dan memediasi banyak respon sitokin. Protein ini aktif setelah terjadi fosforilasi *Janus kinase family* dari *tyrosine kinases* akibat ikatan sitokin dengan reseptornya. Sebagai contoh, protein STAT 6 aktif setelah IL-4 berikatan dengan reseptor IL-4R pada permukaan sel dan hal ini penting untuk perkembangan sel yang mensekresi sitokin tipe 2 seperti IL-4 dan IL-13 (Singh et al., 2003).

Data mengenai peran IL-4 pada perkembangan lupus masih memiliki konflik pendapat (Tsokos et al., 2007). Sitokin ini juga diperkirakan memiliki peran dalam menyupresi sel T. IL-4 dapat memperparah autoimunitas yang diperantarai sel B tetapi juga dapat menghambat aktivasi sel T dalam beberapa sistem secara *in vivo* (Morris et al., 2000). Penelitian Morris et al, 2000 menunjukkan IL-4 memiliki efek immunosupresi saat proses aktivasi sel T. Peningkatan kadar IL-4 menyebabkan sel T helper autoreaktif yang baru terbentuk mengalami delesi atau menjadi kurang responsif terhadap kontak dengan autoantigen (Morris et al., 2000).

Beberapa penelitian menunjukkan peningkatan kadar IL-4 pada serum beberapa pasien lupus. Selain itu, isolasi sel B dari pasien lupus menunjukkan produksi dari faktor terlarut dengan aktivitas seperti IL-4. Sebaliknya, penelitian lain juga menunjukkan jumlah normal mRNA IL-4 dari PBMC pasien lupus dan jumlah sel T-CD4 yang memproduksi IL-4 juga mengalami penurunan signifikan pada pasien lupus. Polimorfisme pada gen promotor IL-4 dan gen reseptor IL-4 berkaitan dengan perkembangan LES. Suatu penelitian lain menunjukkan ditemukannya sel IL-4-positif pada biopsi ginjal pasien dengan nefritis lupus yang aktif, tetapi penelitian lain menunjukkan ekspresi mRNA IL-4 dan IL-4R berkorelasi negatif dengan derajat kerusakan glomerular (Tsokos *et al.*, 2007). Dengan demikian, IL-4 mungkin memiliki banyak peran dalam perkembangan lupus diantaranya, produksi autoantibodi melalui efeknya secara langsung pada sel B, melawan autoimun melalui efek supresor sel T atau menyebabkan kerusakan jaringan melalui efeknya secara langsung pada organ target (Tsokos *et al.*, 2007).

Pada penelitian yang dilakukan Elewa *et al.*, dibuktikan bahwa IL-4 merupakan sitokin yang sangat sensitive pada pasien LES dan ketika dibandingkan kadarnya antara kelompok LES dan kelompok kontrol, kadarnya secara signifikan lebih rendah pada pasien LES (Elewa *et al.*, 2014). Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan supresi ekspresi IL-4 pada pasien LES (Sugimoto *et al.*, 2002; Lit *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010). Csisza *et al.*, juga menemukan bahwa jumlah transkripsi mRNA dari IL-4 mengalami penurunan signifikan pada kelompok LES (Csisza *et al.*, 2000). Disisi lain, juga dilaporkan terdapat peningkatan kadar serum IL4 pada pasien LES (Wong *et al.*, 2000; Kawamoto *et al.*, 2006).

Studi menemukan bahwa penurunan kadar IL-4, sitokin Th2, diperkirakan terjadi pada LES dan berhubungan negatif dengan tingkat keparahan penyakit.

Peningkatan ekspresi IL-4 pada model murine dari LES telah ditunjukkan mengarah pada hipotesis bahwa IL-4 juga bisa terjadi meningkat pada LES manusia dengan respons Th2 yang dominan (Peng *et al.*, 1997). Namun, penelitian terbaru ditunjukkan baik tidak ada perubahan pada IL-4 pada pasien LES (Talaat *et al.*, 2015) atau penurunan kadar IL-4 yang signifikan (Eriksson and Dahlqvist, 2014). Studi menunjukkan bahwa penurunan kadar IL-4 akan terjadi pada LES sebagai akibat stimulus IL-4 itu sendiri dalam memproduksi antibodi *non complement-fixing* oleh sel B. Sebaliknya, auto-antibodi di LES secara dominan merupakan *complement-fixing* IgG2 dan IgG3 (Csiszar *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2015);

IL-4 mempromosikan produksi autoantibodi oleh sel B sehingga menjadi alasan mengapa kadarnya meningkat pada pasien LES. Akan tetapi, ketika kadarnya tidak meningkat seperti penelitian yang dilakukan oleh Elewa *et al.* tahun 2014 mungkin dikarenakan IL-4 menyediakan bantuan untuk sel B dalam memproduksi antibodi tipe *non complement fixing* sedangkan autoantibodi pada LES merupakan tipe *complement fixing* (Csisza *et al.*, 2000). Ditambah lagi, predominansi sel Th1 pada pasien LES dan ketidakseimbangan antara Th1/Th2 kemungkinan dapat membatasi sekresi IL-4 (Yu *et al.*, 2010).

2.7 Interferon- γ (IFN- γ)

Interferon gamma (IFN- γ) adalah suatu glikoprotein 20-25 kd yang disekresi sel T dan sel NK sebagai respon terhadap berbagai rangsangan.

Sitokin ini mempunyai banyak efek dan mempengaruhi banyak sel imun dan non imun, termasuk kemampuannya menghambat proliferasi sel Th2 dan

mencetuskan peralihan klas Ig (meningkatkan produksi IgG2a). Produksi IFN- γ

pada suatu respon imun mengakibatkan kecenderungan ekspansi sel-sel Th1

dan merangsang fagositosis makrofag terhadap mikroba intraseluler dan parasit.

IFN- γ mencetuskan atau meningkatkan ekspresi MHC klas II pada sel-sel imun

dan nonimun, sehingga dapat mencetuskan autoimunitas (Susiani dan Handono,

2012).

Peran IFN- γ pada patogenesis LES sangat kompleks. Pemberian IFN- γ

pada mencit NZB/NZWF1 mempercepat berkembangnya glomerulonefritis,

sementara pemberian mencit tersebut dengan antibody yang menetralkan IFN- γ

atau cDNA yang menyandi IFN- γ R/Fc menimbulkan remisi kelainan ginjalnya.

Penelitian pada manusia didapatkan peningkatan mRNA IFN- γ pada sel

mononuclear darah tepi penderita lupus dan peningkatan kadar IFN- γ intraseluler

pada sel T CD4 penderita nefritis lupus. Penelitian *microarray* menunjukkan

adanya peningkatan 13 gen IFN- γ pada sel mononuclear penderita LES

dibanding pada sel yang orang normal. Sel T penderita lupus juga terbukti

memberikan respon kuat dari IFN- γ akibat suatu rangsangan. Pada penderita

lupus ditemukan pula adanya kaitan IFN- γ dengan aktivitas penyakit, yang

menunjukkan peningkatan produksi IFN- γ menyebabkan eksaserbasi penyakit

LES (Susiani dan Handono, 2012).

Efek pleiotropik IFN- γ mungkin dapat menjelaskan efek yang berbeda

pada berbagai penelitian hewan coba dan manusia dan hal ini menunjukkan

bahwa baik peningkatan maupun penurunan IFN- γ penting dalam patogenesis

lupus pada tahap yang berbeda. Kadar IFN- γ yang tinggi pada awal penyakit

dapat meningkatkan ekspresi HLA klas II, berperan pada hilangnya toleransi

pada antigen sendiri dan mencetuskan terbentuknya autoantibodi patogenik.

Pada tahap penyakit selanjutnya, produksi IFN- γ yang lebih rendah dapat menyebabkan peningkatan sitokin Th2 yang selanjutnya mengakibatkan peningkatan aktivitas sel B. IFN- γ juga dapat memperkuat mekanisme efektor yang berkaitan dengan kerusakan jaringan (Susiani dan Handono, 2012).

2.8 Peran Sel Dendritik pada Patogenesis Pasien LES

Sel dendritik dapat berperan sebagai *antigen presenting cell* (APC) yang berperan penting dalam regulasi respon imun adaptif. Sel dendritik mampu menangkap antigen, memprosesnya, dan mempresentasikannya ke permukaan sel dengan bantuan molekul kostimulator (Wieder *et al.*, 2003). Sel dendritik mengekspresikan CD80, CD86 (B7.1 dan B7.2) dan CD40 yang merupakan molekul kostimulator (Kapsenberg, 2003). Keberadaan sel dendritik hanya 1%-3% dari peripheral blood mononuclear cells (PBMC), tetapi di distribusikan di dalam berbagai jenis jaringan (Ferreira *et al.*, 2010).

Sel dendritik di perifer dapat dibedakan menjadi dua subset yang diidentifikasi berdasarkan ekspresi CD11c, yaitu CD11c+ myeloid dendritic cells (M-DC) dan CD11c- *plasmacytoid dendritic cells* (P-DC) (Rossi dan Young, 2005). Kelainan genetik pada penderita LES dapat mengakibatkan gangguan fungsi sel dendritik diantaranya, saat proses pengambilan antigen, maturasi, dan kemampuan mempresentasikan antigen (Monrad *et al.*, 2008). Sel dendritik juga memiliki peran dalam menginduksi toleransi imun baik sentral maupun perifer (Maddur *et al.*, 2010).

Pada LES semua jalur menyebabkan asam nukleat endogen yang memediasi produksi interferon- α (IFN α). Peningkatan produksi autoantigen selama apoptosis (terkait UV dan/atau spontan), menurunnya bersih, deregulasi penanganan dan presentasi, semuanya penting untuk inisiasi respon

autoimun. Nukleosom mengandung ligan endogen berbahaya yang dapat mengikat reseptor molekul patogen terkait yang menyebabkan apoptosis dan aktivasi sel dendritik dan sel B, serta produksi IFN dan autoantibodi. Reseptor permukaan sel seperti BCR dan FcR1a memfasilitasi endositosis asam nukleat yang mengandung bahan atau kompleks imun dan mengikat reseptor endosomal dari innate imunitas seperti TLRs. Pada tahap awal penyakit, ketika autoantibodi dan kompleks imun mungkin belum terbentuk, peptida antimikroba yang dilepaskan oleh jaringan yang rusak seperti LL37 dan *neutrophil extracellular traps*, mungkin mengikat asam nukleat dan menghambat degradasi dan dengan demikian memfasilitasi endositosis dan stimulasi TLR-9/07 di *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs). Meningkatnya jumlah dari asam nukleat endogen akibat apoptosis merangsang produksi IFN dan menyebabkan autoimunitas dengan merusak toleransi melalui aktivasi dan promosi pematangan sel dendritik konvensional (*myeloid dendritic cells*). Produksi autoantibodi oleh sel B dalam lupus didorong oleh ketersediaan antigen endogen dan sebagian besar tergantung pada bantuan sel T, yang dimediasi oleh interaksi sel permukaan (CD40L/CD40) dan sitokin (IL-21). Kromatin yang mengandung kompleks imun merangsang sel B karena gabungan silang BCR/TLRDC, reseptor sel BCR, B, FcR, Fc reseptor, UV, TLR (Bertias, 2012).

Kegagalan presentasi antigen oleh sel-sel dendritik (DCs) memicu hilangnya toleransi sel T dan sel B pada LES serta pada penyakit autoimun yang lain (Tsokos *et al.*, 2016). Pasien dengan LES menunjukkan banyak ketidaknormalan pada sel dendritik. Termasuk penurunan jumlah sel dendritik konvensional yang tersirkulasi tetapi jumlah pDCs meningkat (Jin *et al.*, 2008).

Subset pDC ini merupakan sel yang pertama kali bertanggung jawab pada

sekresi IFN tipe I akibat respon TLR7 dan TLR9 terhadap asam nukleat. pDC juga menangkap kompleks imun, melalui FcγRIIIa, dan mengakses TLR7 dan TLR9 pada kompartemen endosomal dalam sel (Batteuz *et al.*, 1999). Pada LES sel dendritik konvensional memicu autoreaktivitas dibanding toleransi imun (Mozaffarian *et al.*, 2008). Kemudian, sel-sel T yang aktif juga mendorong peningkatan produksi IFN oleh pDCs (Leonard *et al.*, 2015). DC konvensional telah terbukti sangat penting untuk pengembangan nefritis pada mencit model lupus (Celhar *et al.*, 2015). Dengan demikian, kedua jenis DC dianggap sangat penting untuk proses penyakit di LES (Tsokos *et al.*, 2016).

2.9 Ketidakseimbangan Sel T Regulator dan Sel T Helper 17 pada Penyakit LES

Sel Treg merupakan subpopulasi dari sel limfosit T CD4⁺ yang berperan dalam menghambat aktivitas sel imun, menginduksi toleransi imun sehingga dapat menghambat proses autoimun. Sel Treg ini dapat diidentifikasi pada darah perifer melalui berbagai marker permukaan, diantaranya CD4⁺ CD25⁺ dan marker intraseluler *forkhead box P3* (FoxP3) (Elias *et al.*, 2008). Sel Treg memiliki fungsi supresif terhadap respon inflamasi dengan cara memproduksi sitokin TGF-β dan IL-10. Kedua sitokin tersebut telah dibuktikan dapat menekan aktivitas dari sel imun lainnya (Afzali *et al.*, 2007). Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan juga membuktikan sel Treg dapat berperan secara langsung dalam menghambat aktivitas sel Th1, Th2, Th17, dan aktivitas dari sel B (Xu *et al.*, 2003).

Aktivasi dari sel Treg juga dimediasi oleh sitokin TGF-β. TGF-β dapat berikatan dengan reseptor TGF-β pada sel T naif sehingga faktor transkripsi STAT5 teraktivasi. Fosforilasi dari STAT5 tersebut mengakibatkan aktivasi dari

faktor transkripsi FoxP3 yang merupakan penanda dari diferensiasi sel T-reg. Sel T-reg yang telah aktif akan mengekspresikan marker sel diantaranya CD4+ CD25+ FoxP3+ dan dapat menghasilkan sitokin TGF- β dan IL-10 (Elias *et al.*, 2008).

Pada kondisi inflamasi yang kronis seperti LES, terjadi peningkatan kadar sitokin IL-6 akibat aktivasi berbagai macam sel imun, seperti makrofag dan sel T.

Produksi sitokin ini dapat menghambat aktivasi dari FoxP3 sehingga proses diferensiasi sel T-reg juga dapat terhambat. TGF- β sendiri dapat mengaktifasi

STAT5 sehingga terjadi aktivasi FoxP3 dan diferensiasi sel T naif menjadi sel Treg. Akan tetapi, TGF- β yang bekerja bersama-sama dengan IL-6 justru akan

mengaktifasi STAT3 yang malah menginduksi terbentuknya faktor transkripsi *retinoid-related orphan receptor* γ t (ROR γ t) dan ROR α (Kimura *et al.*, 2010).

Kedua faktor transkripsi tersebut justru akan menghambat pembentukan faktor transkripsi FoxP3 sehingga proses diferensiasi sel T naif menjadi sel Treg akan

terhambat. Kedua faktor transkripsi tersebut juga menyebabkan terbentuknya transkripsi dari sitokin IL-17 yang merupakan marker dari sel Th17.

Pembentukan sel Th17 akibat adanya produksi sitokin IL-6 pada LES akan merangsang semakin parahnya proses inflamasi. Dikatakan bahwa

keseimbangan antara Treg dan Th17 merupakan hal yang penting dalam patogenesis LES kronis (Ma *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2011). Peningkatan

aktivitas Th17 beserta penurunan aktivitas Treg akibat IL-6 berkorelasi positif dengan tingkat keparahan pada pasien LES (Shah *et al.*, 2010). Oleh karena itu,

agen yang dapat mengembalikan keseimbangan peran Th17 dan Treg merupakan target yang potensial untuk memperbaiki gejala LES (Guimarez *et*

al., 2017).

Sel Th17 adalah subset sel T CD4+ yang dapat memproduksi sitokin IL-17. Th17 ditemukan dapat menginfiltrasi ginjal pasien dengan lupus nefritis dan lesi jaringan kulit pada pasien LES (Crispin *et al.*, 2008). Sel T CD4- CD8- diduga dapat menjadi sumber ekspresi IL17 pada LES (Apostolidis *et al.*, 2011). Sel T negatif ganda tersebut ditemukan berkembang pada pasien LES dan ditemukan juga terjadi pada hewan coba. Hal tersebut berkontribusi pada hilangnya toleransi imun (Crispin and Tsokos, 2009) karena sel tersebut mengekspresikan IL-1 β dan IFN γ , dan mempromosikan diferensiasi sel B dan produksi autoantibodi (Tsokos *et al.*, 2016).

Penelitian oleh Doreau *et al* (2009) juga menunjukkan bahwa baik sitokin IL-17A maupun BAFF memiliki kemampuan dan efisiensi yang sama dalam proliferasi dan diferensiasi serta mencegah apoptosis dari sel B. Kombinasi kerja antara IL-17A dan BAFF secara sinergis diketahui akan menghasilkan efek yang lebih baik dalam aktivasi sel B dibandingkan dengan IL-17A atau BAFF yang bekerja secara independen. BAFF juga telah diketahui mampu meningkatkan proliferasi dari sel penghasil IL-17A yaitu sel Th17 sehingga BAFF mampu meningkatkan produksi IL-17A (Lai *et al.*, 2008).

Pasien dengan LES juga mengalami ketidakseimbangan profil sitokin sel T. Hal ini ditandai dengan menurunnya IL-2 dan meningkatnya kadar IL17 (Talaat *et al.*, 2015). Produksi IL2 terganggu pada beberapa dari tiap tahapannya (Solomou *et al.*, 2001; Kyttaris *et al.*, 2004). IL2 juga sangat penting untuk perkembangan dan peningkatan fungsi dari sel Treg serta berperan dalam membatasi ekspresi IL17. Pada LES, IL17 memediasi kerusakan jaringan lokal melalui induksi sitokin inflamasi dan kemokin dan merekrut sel-sel imun yang lain. Diferensiasi sel Th17 yang memproduksi IL17 bergantung pada IL23 dan

antibodi anti-IL23 yang memperberat penyakit pada mencit model lupus (Kyttaris *et al.*, 2013).

2.10 *Pristane*

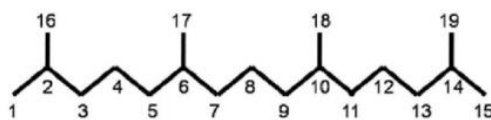
2.10.1 Mekanisme *Pristane* Menginduksi Lupus

Induksi lupus bisa dilakukan pada strain mencit normal yang tidak mengalami modifikasi genetik. Pembentukan mencit ini didasarkan pada teori bahwa lupus tidak hanya didapat dari faktor genetik saja melainkan juga dari faktor lingkungan. Pengembangan hewan model lupus dari strain mencit normal ini dapat dicapai dengan sejumlah metode, seperti manipulasi genetik gen tunggal (baik dengan overekspresi maupun delesi), injeksi serum autoimun atau limfosit dari mencit rentan LES, vaksinasi dengan debris apoptosis sel dendritik, imunisasi dengan antigen lupus prototipikal seperti DNA dan kompleks RNA-protein atau antigen lain yang dikenal untuk menginduksi lupus, atau suntikan *pristane* (minyak hidrokarbon) (Rottman dan Willis, 2010).

Saat ini, pengembangan model hewan coba lupus induksi yang sudah pernah dilakukan yaitu dengan menggunakan induksi *pristane*, dan beberapa obat-obatan seperti Hydralazin, isoniazid, procainamide, α -methyl dopa. Model induksi menggunakan obat-obatan diatas sudah dilakukan oleh penelitian sebelumnya dan menunjukkan bahwa mencit yang diinduksi oleh obat-obatan tersebut menunjukkan hasil ANA Test yang positif, namun penelitian ini menunjukkan angka kematian mencit yang cukup tinggi. Induksi lupus dengan injeksi tunggal *pristane* pada mencit diketahui berhasil memunculkan penyakit dengan sebagian besar manifestasi lupus pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Perkembangan glomerulonefritis dan produksi autoantibodi, khususnya

antibodi antinuklear dan anti dsDNA pada hampir semua strain hewan model lupus memiliki persamaan (Stanford dan Peng, 2012).

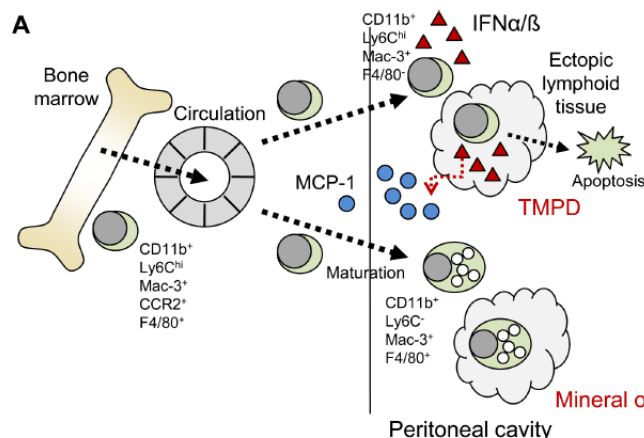
Minyak hidrokarbon TMPD (2,6,10,14-tetramethylpentadecane), atau yang lebih dikenal dengan sebutan *pristane*, menginduksi inflamasi kronis ketika diinjeksikan kedalam rongga peritoneal. Mencit Balb/c yang diberikan injeksi minyak hidrokarbon (*pristane*) sebanyak 0,5 ml secara intraperitoneal, menunjukkan bahwa mencit normal dapat mengalami sindrom autoimun seperti lupus. *Pristane* menghentikan pertumbuhan sel dan memicu kematian sel secara apoptosis melalui jalur mitokondria dengan aktivasi caspase. Terbentuknya autoantigen inti yang dipicu oleh pemberian *pristane* tersebut memicu perkembangan autoimunitas. *Pristane* (Tetramethylpentadecane/TMPD) merupakan alkanin isoprenoid yang ditemukan pada tumbuhan dan organisme laut (alga, plankton) yang dapat menginduksi LES pada hewan bila diberikan secara intraperitoneal (Calvani *et al.*, 2005). Gambar 2.6 menunjukkan struktur kimia *pristane* (2,6,10,14-tetramethylpentadecane) (Reeves *et al.*, 2009).



Gambar 2.6. Struktur kimia *pristane* (2,6,10,14-tetramethylpentadecane)

(Reeves *et al.*, 2009)

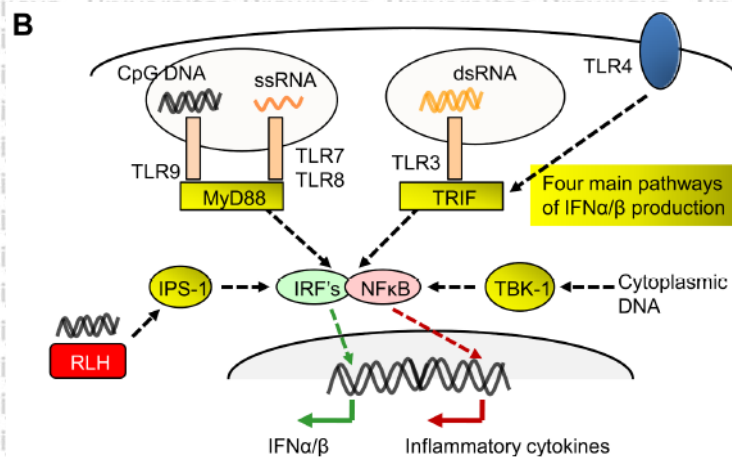
Induksi *pristane* menyebabkan produksi yang abnormal dari IFN α dan β yang berperan penting pada patogenesis lupus. Produksi berlebihan dari IFN tipe I sesuai dengan patogenesis penting dari terjadinya LES pada manusia (Ioannou and Isenberg, 2000). Produksi abnormal dari IFN tipe I (IFN α dan β) didapatkan pada mencit yang diinduksi *pristane* dan tidak didapatkan pada zat lain untuk menginduksi lupus seperti minyak mineral. Dalam hal munculnya manifestasi



Gambar 2.7. Mekanisme pristane dalam menginduksi lupus

Pristane menstimulasi produksi IFN α and IFN β oleh monosit imatur (Ly6Chi). IFN tipe I yang dapat menginduksi kemokin MCP-1 (CCI2) timbul akibat injeksi *pristane* intraperitoneal dan memicu monosit imatur mengekspresikan CD11b, Ly6Chi, Mac-3, F4/80, dan CCR2 (reseptor untuk MCP-1) dari sum-sum tulang. Sel monosit ini kemudian masuk ke sirkulasi dan terekruit kedalam kavum peritoneum. Sel-sel tersebut bertahan selama tiga hari hingga menyebabkan apoptosis. Pada mencit yang diinjeksi minyak mineral, monosit menjadi matur di rongga peritoneum dengan mengekspresikan CD11b+, Ly6C-, Mac-3+, F4/80+ tetapi tidak menghasilkan IFN α and IFN β seperti ketika diinjeksi *pristane*. (Reeves *et al.*, 2009)

Mekanisme produksi berlebihan dari IFN tipe I pada LES masih dalam penelitian. Sel-sel mamalia yang memiliki beberapa reseptor innate menginisiasi produksi IFN tipe I sebagai respon adanya patogen yang berhubungan dengan pola molekuler (Kawai and Akira, 2006). Sel dapat mengenali asam nukleat endogen diperkirakan karena adanya TLR 7 dan TLR 8 mengenali ssRNA virus, dan TLR 9 merupakan sensor dari unmethylated CpG DNA (Means *et al.*, 2005; Vollmer *et al.*, 2005; Savarese *et al.*, 2006). TLR endosomal ini memicu sekresi IFN tipe I melalui sekresi molekul adaptor yaitu MyD88. TLR3 dan TLR4 memediasi produksi IFN tipe I melalui protein adapter TRIF yang berikatan dengan dsRNA atau lipopolisakarida. Didalam sitoplasma, DNA mengaktifasi jalur dependen TBK-1 (Gambar 2.8) (Kawai and Akira, 2006).



Gambar 2.8. Jalur stimulasi produksi IFN tipe I dan sitokin pro inflamasi.

IFN tipe I dan sitokin-sitokin pro inflamasi dapat distimulasi melalui 4 macam jalur selular dengan protein adaptor atau perantara sinyal yang berbeda-beda diantaranya melalui TRIF (TLR 3 dan 4), MyD88 (TLR 7,8 dan 9), IPS-1 (Rig-I like helicases, (RLH)), dan TBK1 (reseptor belum diketahui dengan jelas). Pengenalan motif unmethylated CpG DNA pada endosome oleh TLR 9 atau ssRNA oleh TLR7 atau TLR 8 mengakibatkan aktivasi ekspresi gen IFN α and IFN β melalui jalur yang melibatkan protein adaptor MyD88, beberapa kinase dan faktor transkripsi regulator interferon (IRF) 7. Sebaliknya, pengenalan di endosomal dari dsRNA oleh TLR 3 atau LPS oleh TNF4 mengaktifkan jalur TRIF, kinase, dan IRF3. Pengenalan dsRNA (virus) oleh RLH Rig-I atau Mda5 mengaktifkan jalur IPS-1, IRF3 dan IRF7. DNA sitoplasma dideteksi oleh reseptor tertentu yang mengaktifkan kinase TBK-1 yang menyebabkan ekspresi IFN α and IFN β . Semua jalur ini bertemu pada NF κ B. Induksi IFN α and IFN β oleh *pristane* lebih bergantung pada jalur TLR7-MyD88-IRF7 tetapi jalur lainnya juga tidak dapat dihilangkan. (Reeves *et al*, 2009)

Mencit yang diinduksi *pristane* dapat menjadi hewan coba model lupus dengan disregulasi produksi IFN tipe I. IFN tipe I akan berikatan dengan reseptor IFNAR dan menghasilkan sinyal untuk terbentuknya autoantibodi terhadap antigen inti sel yang berperan penting pada patogenesis lupus. IFN tipe I pada mencit diproduksi sebagian besar oleh monosit imatur melalui jalur TLR7-MyD88.

Sebagian besar IFN-I diproduksi oleh monosit yang belum matang, bukan PDC, dan produksinya dimediasi secara eksklusif oleh jalur TLR7-MyD88. Produksi autoantibodi terkonsentrasi pada jaringan limfoid ektopik yang diinduksi oleh *pristane*. Peradangan kronis pada kavum peritoneum akibat injeksi *pristane* ini mungkin merupakan tempat interaksi sel T dan sel B, namun peran penting ligan TLR dan mekanisme yang bertanggung jawab atas disregulasi sel B autoreaktif tetap menjadi hal penting untuk diteliti (Reeves *et al.*, 2009).

Kemungkinan mekanisme lain dari *pristane* yaitu induksi kematian sel dan akumulasi sel-sel apoptosis. *Pristane* memiliki efek sitotoksik bergantung dosis yaitu diatas 150 µl dan dilaporkan menginduksi kematian sel in vitro dan in vivo (Herman *et al.*, 2012). Pada tikus, *pristane* menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria. Selain itu, tampaknya terdapat keterlibatan protein Fas, karena injeksi *pristane* meregulasi ekspresi Fas dan Fas-L dalam sel peritoneal. Ada juga bukti *pristane* yang akan tergabung dalam membran sel dan karena itu dapat memiliki pengaruh yang merugikan pada membran integritas (Boeltz *et al.*, 2013).

Pristane dapat menginduksi pembentukan *neutrophil extracellular traps* (NETs) pada neutrofil polimorfonuklear dari darah tikus dan mencit. Hal ini merupakan temuan penting, karena NETs telah terlibat dalam patogenesis lupus Peptida antimikroba (AMP), seperti cathelicidins, berhubungan dengan NETs dan mampu mengikat asam nukleat, melindungi dari degradasi oleh nucleases, dan meningkatkan serapan ke TLR pada endosomes yang mungkin berkontribusi pada patogenesis LES (Garcia *et al.*, 2011).

2.10.2 Manifestasi Klinis Mencit Model Lupus yang Diinduksi *Pristane*

Pristane dapat memicu autoantibodi dan manifestasi klinis LES (Calvani *et al.*, 2005). Mencit BALB/c yang diberikan injeksi *pristane* menyebabkan gambaran yang memenuhi kriteria lupus yaitu artritis, ANA, anti-dsDNA, anti-Sm, *immune complex mediated glomerulonephritis*, *pulmonary capillaritis* (*pulmonary vasculitis*) dan didapatkan IFN tipe 1 pada darah perifer. Inflamasi pada perikardium dan pleura juga terjadi. Mencit dengan injeksi *pristane* memenuhi 4 kriteria ACR 1997 untuk penegakan LES, yaitu anti ds DNA, artritis, lupus nefritis, dan vaskulitis. Seperti LES pada manusia, LES pada mencit juga cenderung

terjadi pada mencit betina. Injeksi *pristane* intraperitoneal pada mencit BALB/c akan menyebabkan glomerulonefritis, arthritis, ANA dan pembentukan berbagai autoantibodi lupus seperti anti-dsDNA dan anti-Sm. *Pristane* dapat menginduksi terbentuknya auto antibodi IgG yang menarget komponen inti sel diantaranya double-stranded (ds) DNA, single-stranded (ss) DNA, chromatin, Sm, RNP, Su, and ribosomal P (Reeves *et al.*, 2009).

Berikut ini beberapa autoantibodi yang diproduksi pada hewan model lupus dengan induksi *pristane*:

Tabel 2.3 Autoantibodi pada Hewan Model Lupus dengan Induksi *Pristane* (Reeves *et al.*, 2009)

Autoantibody	Autoantigen	Nucleic acid component	Frequency in BALB/c mice	Frequency in B6 mice
Anti-Sm*	U1, U2, U4-U6, and U5 snRNPs (proteins B', B, D, E, F, G)	U1, U2, U4, U6, U5 small nuclear RNAs	20-40%	10%
Anti-RNP	U1 snRNP (proteins A, C, 70K)	U1 small nuclear RNA	50-90%	25%
Anti-ribosomal P*	Ribosomal P0, P1, P2 proteins	Ribosomal RNAs	0% ^a	20%
Anti-Su	Argonaute 2 protein	Micro-RNAs	50-70%	25%
Anti-dsDNA*	Native DNA	Native DNA	40%	0%
Anti-chromatin	DNA-histone complexes	DNA	60%	0%

*specific for the diagnosis of SLE.
^aBALB/cByJ 0%; BALB/cJ 5-10%.

Penelitian yang dilakukan oleh Cui, *et al.* (2006) menunjukkan bahwa injeksi tunggal 0,5 mL *pristane* pada mencit BALB/c secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar autoantibodi anti-dsDNA dan ANA pada bulan ke-3 dan bulan ke-4. Penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa pada bulan ke-8 paska injeksi sebesar 87,5% mencit dideteksi mengalami peningkatan anti-dsDNA dan 47% mencit mengalami peningkatan ANA (Cui, *et al.*, 2006). Penelitian lain yang dilakukan oleh Chowdhary, *et al.* (2007) menunjukkan bahwa induksi *pristane* pada mencit juga akan meningkatkan produksi ANA pada 4 dari 11 mencit yang diinjeksi oleh *pristane* setelah 2 minggu paska injeksi. Pada penelitian tersebut

tidak hanya didapatkan adanya peningkatan ANA saja tetapi juga didapatkan manifestasi glomerulonefritis dan juga *haemorrhagic pulmonary capillaritis* pada mencit yang diinjeksi oleh *pristane* (Chowdhary *et al.*, 2007). Meskipun autoantibodi muncul pada bulan ke-3 atau ke-4, produksi IFN tipe I telah ada sejak dua minggu paska injeksi *pristane* (Reeves *et al.*, 2009).

Autoantibodi yang didapatkan meningkat ternyata bukan hanya ANA atau anti-dsDNA saja melainkan pada beberapa penelitian lain didapatkan bahwa autoantibodi lain juga meningkat pada mencit yang diinjeksi oleh *pristane*.

Penelitian yang dilakukan oleh Satoh, *et al.* (1995) menemukan bahwa 100% mencit BALB/c yang diinjeksi oleh *pristane* mengalami peningkatan autoantibodi tersebut setelah diukur menggunakan ELISA. Penelitian lain yang dilakukan oleh Mizutani, *et al.*, (2005) hanya menemukan 40% hingga 43% peningkatan dari autoantibodi tersebut (Satoh, *et al.*, 1995; Mizutani, *et al.*, 2005).

Hampir seluruh strain mencit ternyata memiliki suseptibilitas terhadap munculnya autoantibodi LES setelah diinduksi oleh *pristane*, meliputi anti-Sn, anti-dsDNA, dan anti ribosomal P. Munculnya autoantibodi ini memang hampir ada pada semua strain mencit namun memiliki onset yang berbeda-beda. Dua strain mencit yang memiliki onset yang cepat dan paling menyerupai gambaran klinis LES pada manusia adalah mencit strain BALB/c dan SJL/J. Oleh karena itu, kedua mencit tersebut selalu digunakan dalam penelitian (Satoh *et al.*, 2000).

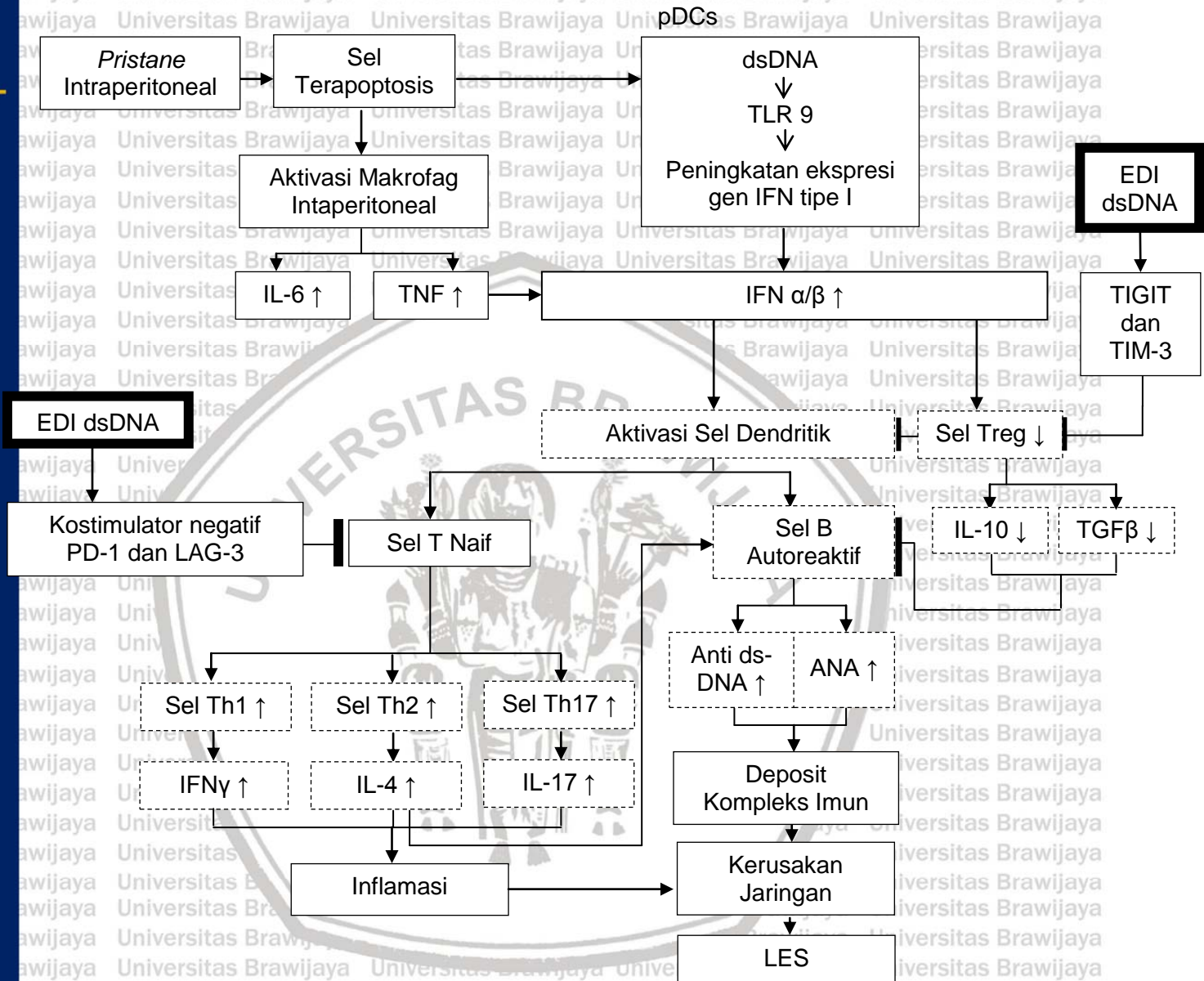
Pada penelitian yang dilakukan oleh Heiss *et al.*, 2013, sebanyak 57 tikus Balb/c diberikan injeksi *pristane* kemudian diukur kadar autoantibodi pada serum (anti-chromatin-, -histone-, -Sm-, -dsDNA) dan juga manifestasi klinis yang timbul.

Mencit *pristane induced lupus* (PIL), mencit Balb/c yang diberi injeksi *pristane*, menunjukkan klinis artritis dimulai dari tiga bulan paska injeksi *pristane* dan

arthritis terjadi pada 79% mencit. Klinis arthritis yang terjadi berkorelasi dengan daerah peradangan, erosi, kerusakan tulang rawan, jumlah osteoklas dan total skor keparahan arthritis. Serum autoantibodi juga mengalami peningkatan secara signifikan pada semua mencit PIL. Mencit PIL dengan klinis arthritis juga menunjukkan tanda-tanda lupus pada paru (100%) dan ginjal (46%) (Leiss *et al.*, 2013).

Dalam satu bulan setelah injeksi *pristane*, baik antibodi anti-histone dan anti-chromatin ditemukan pada >20% mencit dan setelah dua bulan didapatkan lebih dari 50% mencit PIL yang positif mengalami peningkatan antibodi tersebut secara signifikan. Setelah delapan bulan, 100% mencit PIL positif mengalami peningkatan anti-chromatin dan 93% positif mengalami peningkatan anti-histone. Antibodi anti-Sm juga mulai positif pada tiga bulan setelah injeksi *pristane* dan setelah delapan bulan 80% mencit PIL positif mengalami peningkatan anti-Sm. Kadar ANA yang diperiksa menggunakan *immunofluorescence* (IF) menunjukkan 24% mengalami peningkatan kadar ANA dengan titer rendah (24%). Hasil IF ANA menunjukkan pola homogenous (60%) dan speckled (40%). Kadar antibodi anti-dsDNA juga mengalami peningkatan dan didapatkan pada 47% serum mencit PIL. Mencit PIL Balb/c juga menunjukkan peningkatan kadar *rheumatoid factor* (RF) secara signifikan dalam dua bulan paska injeksi dibanding mencit normal. Sebagai tambahan, kadar anti-CCP juga mengalami peningkatan pada 100% mencit PIL setelah 8 bulan paska injeksi *pristane* (Leiss *et al.*, 2013).

2.11 Kerangka Teori



Gambar 2.9 Kerangka Teori Penelitian

Mencit *BALB/c* betina yang diinduksi *pristane* 0,5 mL secara intraperitoneal. Hewan coba ini akan memiliki manifestasi mirip LES. Injeksi *pristane* menyebabkan peningkatan apoptosis sel-sel limfoid di rongga peritoneum. Apoptosis sel ini menghasilkan produk-produk inti sel seperti dsDNA. Antigen *self* yang terlalu banyak akan menimbulkan gangguan mekanisme klierens atau pembersihan sehingga terjadi kegagalan toleransi imun melawan antigen *self* dan memicu sel B autoreaktif yang memproduksi banyak autoantibodi seperti ANA dan dsDNA. dsDNA dari hasil apoptosis dapat ditangkap oleh *plasmacytoid dendritic cells* (pDCs) kemudian berikatan dengan TLR-9 dan memicu produksi IFN tipe I. IFN-I terdiri dari IFN α dan IFN β . Sitokin ini berperan penting menyebabkan hilangnya mekanisme toleransi pada LES. IFN tipe I akan meningkatkan aktivasi sel dendritik, meningkatkan jumlah sel T autoreaktif, dan secara tidak langsung meningkatkan jumlah sel B autoreaktif melalui bantuan dari sel CD4+ Th2. IFN α/β juga dapat secara langsung menurunkan jumlah sel T-Reg sebagai sel yang dapat menekan aktivitas berlebih dari sel T dan sel B. Sel Th seperti Th2 akan diaktivasi oleh sel dendritik (DC) maupun sel APC lainnya dan merangsang terjadinya respon inflamasi, aktivasi sel makrofag, serta aktivasi sel limfosit B. IL-4 merupakan sitokin yang dihasilkan oleh sel Th2 memiliki peran penting dalam meregulasi diferensiasi sel T naif yang distimulasi antigen untuk berkembang menjadi sel Th2 yang memproduksi IL-4 melalui sinyal yang diperantarai IL-4R (Shiroyiwa *et al.*, 2007). IL-4 juga dapat memicu sel B untuk menghasilkan autoantibodi. Peningkatan jumlah sel B autoreaktif akan meningkatkan jumlah antibodi dan imun kompleks sebagai faktor pencetus terjadinya kerusakan jaringan pada lupus. Beberapa penelitian menunjukkan kadar IFN γ yang meningkat pada serum darah pasien

LES dan ketidakseimbangan sitokin Th1 (IFN γ) dan Th2 (IL-4) berhubungan dengan peningkatan aktivitas penyakit lupus pada mencit model lupus (Guimaraes et al., 2017).

Escalating Dose (Antigen-Spesifik) *Immunotherapy* adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjektikan autoantigen (*self-antigen*) yang menstimulus pembentukan autoantibodi dengan dosis yang bertahap hingga memunculkan efek toleransi.

Pemberian dosis yang bertahap dan meningkat ini dilakukan untuk menghindari efek-efek yang merugikan dari yang paling ringan seperti gatal-gatal sampai yang paling berat, syok anafilaksis. Pemberian EDI *self antigen* dsDNA dapat mengembalikan toleransi imun, memperbaiki fungsi sel dendritik, memicu sel T menjadi anergi, dan meningkatkan jumlah sel T-Reg. Sel Treg membantu menekan aktivitas berlebihan dari sel T dan sel B autoreaktif. Aplikasi metode EDI menggunakan *self antigen* dsDNA diharapkan dapat mengembalikan toleransi imun khususnya menurunkan jumlah sel Th2, menurunkan sitokin yang diproduksi yaitu IL-4, serta mengembalikan keseimbangan rasio sitokin IFN γ /IL-

4.

3.2 Hipotesis Penelitian

3.2.1 Hipotesis Umum

Pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dapat memperbaiki regulasi sistem imun penyakit lupus eritematosus sistemik (LES) pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

3.2.2 Hipotesis Khusus

1. Pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dapat menurunkan persentase sel Th2 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

2 Pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dapat menurunkan kadar IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

3 Pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dapat menurunkan rasio kadar IFN γ /IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *post test only controlled group*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan mencit Balb/c sebagai subjek penelitian. Peneliti mengukur pengaruh perlakuan (intervensi) pada kelompok eksperimen dengan cara membandingkan kelompok eksperimen dengan kelompok kontrol. Intervensi pada penelitian ini adalah pemberian terapi EDI dsDNA pada mencit *Pristane Induced Lupus/PIL*. Sebanyak enam puluh mencit Balb/c betina usia 6-8 minggu dibagi secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok mencit *Pristane Induced Lupus/PIL*: mencit yang diinduksi LES dengan diberikan injeksi *pristane* sebanyak 0,5 ml secara intraperitoneal dan kelompok kontrol negatif: mencit normal tanpa diinjeksi *pristan* maupun diberikan intervensi berupa terapi EDI dsDNA.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

4.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 6 bulan, mulai dari bulan Januari hingga bulan Juni 2017.

4.2.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi, Laboratorium Parasit, dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

4.3 Objek dan Sampel

Sampel penelitian ini adalah mencit strain Balb/c. Sebanyak enam puluh mencit Balb/c betina usia 6-8 minggu dibagi secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL: mencit yang diinduksi LES dengan diberikan injeksi *pristan* sebanyak 0,5 ml secara intraperitoneal dan kelompok kontrol negatif: mencit normal tanpa diinjeksi *pristan* maupun diberikan terapi EDI dsDNA. Mencit PIL kemudian dibagi secara acak menjadi empat kelompok diantaranya:

1. Kelompok kontrol positif: mencit PIL tanpa terapi EDI dsDNA
2. Kelompok terapi A: mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis I (0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.
3. Kelompok terapi B: mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis II (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.
4. Kelompok terapi C: mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis III (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan (Burton *et al.*, 2014).

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Berikut ini merupakan kriteria inklusi mencit subjek penelitian ini:

1. Mencit strain Balb/C betina dengan tanda klinis lupus (*Pristane Induced Lupus*)
2. Umur 6-8 minggu karena pada usia ini mencit Balb/C dianggap dewasa sehingga kadar hormon lebih stabil (Gunawan, 2007).
3. Berat badan rata-rata 20-30 gram

Berikut ini adalah kriteria eksklusi subjek penelitian

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan
2. Mencit yang mati bukan karena lupus selama penelitian berlangsung.

Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel dilakukan menggunakan rumus

Federer, 1977 sebagai berikut (Supranto, 2000):

$$(t-1)(r-1) \geq 15 \quad r : \text{jumlah ulangan} \quad t : \text{jumlah perlakuan}$$

Pada penelitian ini, mencit akan dibagi menjadi lima perlakuan sehingga didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$(5-1)(r-1) \geq 15 \quad | \quad r \geq 4,75 \text{ dibulatkan menjadi } 5 \text{ ekor}$$

Untuk lima perlakuan, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak 5 ekor

untuk tiap perlakuan. Kelompok kontrol positif dan kelompok terapi adalah mencit

Pristane Induced Lupus/PIL (mencit yang sudah menunjukkan manifestasi lupus).

4.4 Variabel Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian EDI *self antigen*

dsDNA dengan berbagai dosis yang dibagi menjadi tiga kelompok sebagai

berikut:

1. Kelompok terapi A: mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis I (0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.
2. Kelompok terapi B: mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis II (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.
3. Kelompok terapi C: mencit PIL dengan terapi EDI dsDNA dosis III (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah:

1. Kadar IL-4 pada serum darah mencit menggunakan metode ELISA

2. Persentase sel Th2 dengan marker CD4⁺IL4⁺ dari sampel jaringan lien menggunakan metode *flowcytometry*

3. Rasio kadar IFN γ /IL-4 pada serum darah

4.5 Definisi Operasional

a. Mencit BALB/c adalah salah satu strain mencit yang sering digunakan dalam penelitian laboratorium untuk menguji zat pengobatan dan mempelajari patogenesis satu penyakit pada manusia, karena mencit ini

memiliki onset yang cepat dan paling menyerupai gambaran klinis LES

pada manusia (Sato *et al.*, 2000). Mencit BALB/c pada penelitian ini

didapatkan dan mendapat surat keterangan dari Universitas Islam

Negeri Malang.

b. Mencit PIL (*Pristane Induced Lupus*) adalah mencit galur Balb/C betina yang diberikan injeksi pristan sebanyak 0.5 ml (782 μ g/ml) secara intraperitoneal kemudian ditunggu selama 12 minggu. Mencit PIL adalah mencit yang telah menunjukkan klinis lupus. Klinis lupus yang diukur diantaranya klinis penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas, dan peningkatan autoantibodi anti-dsDNA (Rottman & Willis, 2010; Leiss *et al.*, 2013).

c. *Pristane (tetramethylpentadecane)* merupakan alkana isoprenoid yang digunakan untuk menginduksi lupus pada mencit. *Pristane* didapatkan dari Sigma Aldrich, USA dengan konsentrasi larutan sebesar 782 μ g/ml (Sigma-Aldrich, Singapore, katalog 1921-70-6).

d. Aktivitas mencit diukur dari banyaknya putaran yang dihabiskan mencit untuk berpindah dari ujung kandang ke ujung kandang sisi lainnya secara manual selama kurun waktu 30 menit. Normalnya mencit sehat

dapat melakukan sebanyak 150-300 putaran dalam waktu 15 menit (Suwendar *et al.*, 2004).

e. Bulu rontok pada mencit ditandai dengan terdapatnya daerah alopesia pada bagian tubuh mencit.

f. *Self antigen* dsDNA merupakan antigen yang digunakan dengan metode *Escalating Dose* dan didapatkan dengan prosedur isolasi DNA dari darah mencit. Isolasi DNA dilakukan dengan metode isolasi sesuai dengan protokol dari NucleoSpin® Blood MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Germany. Hasil isolasi kemudian dicampur dengan *polyethylenimine* (PEI) sesuai dengan protokol dari *in vivo jetPEI®: DNA & siRNA Delivery Protocol*.

g. *Polyethylenimine* (PEI) adalah polimer kationik sebagai reagen *adjuvant* yang dapat mengantarkan nukleotida. Antigen dsDNA dicampur dengan PEI dengan prosedur yang dilakukan sesuai dengan protokol *in vivo jetPEI: DNA & siRNA Delivery Protocol*, 2009. *In vivo-jetPEI®* didapatkan dari Polyplus-transfection Inc. New York, USA.

h. Jumlah sel Th2 adalah persentase sel *T-helper* 2 yang ditandai dengan marker sel CD4 (CD4-FITC *biologend antibody*) dan IL4 (IL-4-PE *biologend antibody*) dalam spleen yang diukur dengan metode *flowcytometry*. Hasil yang diperoleh berupa persentase (%) sel yang mengekspresikan CD4+ IL-4+ yang diukur di dalam 10.000 sel limfosit.

i. Kadar interleukin 4 (IL-4) adalah kadar IL-4 (pg/ml) yang diukur dari serum darah mencit sesuai menggunakan *protocol IL-4 mouse elisa kit* eBioscience.

j. Rasio IFN γ /IL-4 adalah perbandingan kadar IFN γ dengan kadar IL-4 yang diukur dari serum darah mencit.

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Alat : Kandang mencit, timbangan, handscoon, kain steril

Bahan : Hewan coba mencit Balb/c, pakan mencit standar (PAR-S) dan tepung,
air mineral

4.6.2 Pemberian Pristane

Alat : *Handscoon, spuit 1cc, kain steril*

Bahan : Pristane, alkohol 70%, kapas

4.6.4 Isolasi dsDNA

Alat : Sentrifugator, Micropipet, Incubator, alat vortex

Bahan : Darah mencit, NucleoSpin® Blood MACHEREY-NAGEL GmbH & Co.
KG Germany

4.6.5 Preparasi dan Injeksi dsDNA

Alat : Micropipet, ependorf, alat vortex, NanoDrop 2000 Spectrophotometer
handscoon, spuit 1cc, kain steril

Bahan : dsDNA, Invivo Jet-PEI, Aquades steril

4.6.6 Pengukuran Persentase Sel Th2

Alat : Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, vortex, sentrifus, flowsitometer,
tabung ependorf, kapas, kertas penyerap, cawan, kuvet fcm

Bahan : PBS, *cell staining buffer* (CSB) (Biolegend, USA, katalog 420201),
permeabilization wash buffer (10x) (Biolegend, USA, katalog 421002),
fixation buffer (Biolegend, USA, katalog 420801, FITC anti mouse CD4
(Biolegend, USA), PE antimouse IL-4 (Biolegend, USA, Katalog 504104),
phobol myrsitate acetate (PMA) (Sigma-Aldrich, katalog P-8139),

ionomycin (BD Bioscience, katalog I-0634), *golgiplug* (BD Bioscience, katalog 555029).

4.6.7 Pengukuran Kadar IL-4

Alat : Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, vortex, sentrifus, plate, ELISA reader.

Bahan : *Anti-mouse IL-4 ELISA Kit (eBioscience, USA)*, *Biotin-conjugated, wash buffer, Streptavidin-HRP, TMB Substrate Solution, Stop Solution*

4.6.8 Pengukuran Kadar IFN- γ

Alat : Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, vortex, sentrifus, plate, ELISA reader.

Bahan : *Anti-mouse IFN- γ ELISA Kit (eBioscience, USA)*, *Biotin-conjugated, wash buffer, Streptavidin-HRP, TMB Substrate Solution, Stop Solution*

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/C yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit Balb/C dipilih karena penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit Balb/C dapat memberikan gambaran imunologis seperti yang terjadi pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Mencit diberikan makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang. Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama tujuh hari. Mencit diberi makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang yang berisi sekam. Selama proses aklimatisasi mencit diberikan pakan, minum, dan penggantian sekam secara rutin sesuai standar

laboratorium Farmakologi FKUB. Pemberian minum mencit juga diberikan tiap hari dengan menggunakan air masak yang ditempatkan pada botol minum hewan. Air minum dilakukan penggantian setiap hari. Sekam yang terdapat dalam kandang mencit dilakukan penggantian setiap 3 hari sekali.

4.7.2 Mencit *Pristane Induced Lupus (Mencit PIL)*

Sebanyak lima puluh lima mencit BALB/c diberikan injeksi *pristane* secara intraperitoneal sebanyak 0,5 ml dengan konsentrasi 782 µg/ml. 12 minggu paska injeksi mencit dinilai tanda-tanda klinis lupus. Mencit yang menunjukkan tanda klinis lupus yang sama merupakan mencit PIL yang digunakan pada penelitian (Leiss *et al.*, 2013). Tanda-tanda klinis lupus diantaranya penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas, dan peningkatan autoantibodi anti-dsDNA (Rottman & Willis, 2010; Leiss *et al.*, 2013).

4.7.3 Isolasi dsDNA

Antigen ds-DNA diisolasi dari darah mencit yang sehat. Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan bahan dan prosedur dari NucleoSpin® Blood MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG *Germany*. 200 µl darah ditambahkan dengan 25 µl proteinase K dan kemudian ditambahkan larutan 200µl B3 yang digunakan untuk melisiskan sel darah dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10-15 menit. Setelah dilakukan *washing* ditambahkan 210µl larutan etanol 96%-100% dan kemudian dilakukan *vortex*. Larutan kemudian dipindahkan ke NucleoSpin® Blood Column yang diletakkan ke dalam Collection Tube. Dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g. Dipindahkan NucleoSpin® Blood Column kedalam Collection tube yang baru dan tambahkan 500 µl Buffer BW kemudian dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g. Ditambahkan 600 µl larutan B5 dan dilakukan sentrifugasi

selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g sebanyak dua kali. Pindahkan NucleoSpin® Blood Column keatas *microcentrifuge tube* dan tambahkan 100 µl Buffer BE yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 70°C. Dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 g selama 1 menit. Hasil isolasi DNA kemudian diukur konsentrasinya menggunakan nanodrop (Genomic DNA from blood: User manual, 2016).

4.7.4 Prosedur Nanodrop

NanoDrop 2000 Spectrophotometer [Thermo Scientific] dapat digunakan untuk mengetahui nilai absorbansi larutan. Alat sangat sensitif dan hanya membutuhkan volume sampel sebesar 2 µl untuk tiap kali pengukuran. Beberapa tipe pengukuran sampel, antara lain: asam nukleat (DNA/RNA), microarray, protein A280, protein&labels, BCA, modified Lowry, Bradford, dan Pierce 660 nm. Lama waktu pengukuran absorbansi yang relatif singkat (kurang dari 5 detik) tiap sampel akan mempersingkat waktu dalam pengukuran.

Rasio kemurnian DNA yang diukur dengan alat nanodrop adalah rasio nilai absorbansi DNA A260 dengan nilai absorbansi protein (kontaminan) A280. Hasil isolasi DNA yang murni didapat dengan kisaran nilai 1.8-2.0. Kemurnian DNA di atas 2 kemungkinan terkontaminasi dengan RNA dan di bawah 1.8 terkontaminasi protein dan larutan fenol (Neil *et al.* 2011). Tingkat rasio kemurnian DNA yang relatif baik diperoleh pada metode konvensional yang menunjukkan kecenderungan mendekati nilai kemurnian ideal 1.8-2.0, seperti yang dilaporkan Fitzgerald dan Burden (2014).

Konsentrasi DNA dihitung dari persamaan berikut:

$$1 \text{ OD}_{260} \text{ unit} = 50 \mu\text{g/ml}$$

1 absorbansi pada panjang gelombang 260 setara dengan kadar DNA sebesar 50 µg/ml. Alat nanodrop mengukur absorbansi cahaya pada panjang gelombang 260 dan menghitung kadar DNA sesuai dengan jumlah absorbansi cahaya. Persamaan ini dihitung absorbansi larutan standar yang sudah diketahui kadarnya.

Berikut adalah konsentrasi DNA yang didapatkan dari hasil isolasi DNA dengan metode yang telah dijelaskan.

Tabel 4.1 Konsentrasi DNA dengan Pengukuran Nanodrop

Kode Stok DNA	ng/µl
Stok DNA 1	73.7
Stok DNA 2	141.0
Stok DNA 3	238.2
Stok DNA 4	270.3

4.7.5 Preparasi dan Injeksi dsDNA

Kadar dsDNA yang dibutuhkan agar mencit Balb/C dapat terinduksi lupus adalah sebesar 50 µg per mencit (Qiao *et al.*, 2005). Kadar tersebut dapat meningkatkan kadar anti-dsDNA, anti-ENA, kadar sitokin IL-17, kondisi glomerulonephritis, dan proteinuria secara signifikan. Dengan demikian, dosis tersebut adalah dosis yang dapat menimbulkan manifestasi klinis lupus (Qiao *et al.*, 2005; Wen *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2013). Untuk tahap awal, dosis terapi maksimal EDI menggunakan dosis yang dapat menyebabkan manifestasi klinis lupus. Dengan konsep terapi desensitisasi, penelitian mengambil dosis dibawah dosis tersebut sesuai penentuan dosis yang dianjurkan pada terapi EDI *self antigen* yang dilakukan oleh Burton *et al* (2014) pada penyakit autoimun *multiple sclerosis* (Burton *et al.*, 2014). Dosis EDI dsDNA yang digunakan pada penelitian

ini sebesar 0.005 µg (0.01 µg/ml), 0.05 µg (0.1 µg/ml), 0.5 µg (1 µg/ml), 5 µg (10 µg/ml), dan 50 µg (100 µg/ml).

Agar dsDNA dapat dipastikan dapat memicu respon imun yang poten, kami menggunakan *polyethylenimine* (PEI) sebagai *adjuvant*. PEI adalah polimer kationik yang telah digunakan bertahun-tahun sebagai reagen yang dapat mengantarkan nukleotida. PEI adalah polimer yang terdiri dari pengulangan grup amine dan dua carbon aliphatic CH_2CH_2 spacer (Zhang *et al.*, 2016).

dsDNA dicampur dengan PEI (N/P=6), glukosa 10%, dan aquades steril hingga mencapai volume injeksi. Volume injeksi pada penelitian ini sebesar 500µl. Digunakan perbandingan N/P (DNA/polyethylenimine) sebesar 6 atau dengan kata lain 0,12 µl PEI per µg asam nukleat/DNA. dsDNA dicampurkan dengan glukosa 10%, PEI, dan aquades steril kemudian dilakukan vortex secara perlahan dan dilakukan *spindown*. Larutan diinkubasi terlebih dahulu selama 15 menit pada suhu ruang agar kompleks menjadi stabil. Larutan dipindahkan kedalam spuit 1cc kemudian diinjeksikan secara intraperitoneal sesuai dosis masing-masing kelompok perlakuan. Prosedur ini dilakukan sesuai dengan protokol *in vivo* jetPEI: DNA & siRNA *Delivery Protocol*, 2009 (Huang *et al.*, 2012).

Antigen dsDNA diencerkan dengan metode tersebut diatas sehingga mencapai lima konsentrasi yang digunakan sebagai dosis terapi dsDNA pada penelitian ini, diantaranya 0.01 µg/ml (0.005 µg dalam 500 µl), 0.1 µg/ml (0.05 µg dalam 500 µl), 1 µg/ml (0.5 µg dalam 500 µl), 10 µg/ml (5 µg dalam 500 µl), dan 100 µg/ml (50 µg dalam 500 µl). Pada tabel 4.2 dibawah ini dijelaskan rincian kebutuhan dsDNA, PEI, glukosa 10%, dan aquades steril untuk mencapai

masing-masing konsentrasi dsDNA yang dibutuhkan. Konsentrasi glukosa diakhir volume pengenceran sebesar 5%.

Tabel 4.2 Pengenceran DNA dengan Larutan PEI

Dosis dsDNA (µg)	dsDNA		PEI		Glukosa 10% (µl)	H ₂ O (µL)	Total Volume	Konsentrasi (µg/ml)	
	Stok dsDNA	Ds DNA (µl)	PEI (µl), N/P = 6	Stok Volume PEI (µl)					
0.005	Stok DNA 1 (1:10)	0.68	0.0006	Stok PEI (1:1000)	0.6	249.4	249.32	500	0.01
0.05	Stok DNA 1	0.68	0.006	Stok PEI (1:1000)	6	244	249.32	500	0.1
0.5	Stok DNA 2	3.55	0.06	Stok PEI (1:1000)	60	190	246.45	500	1
5	Stok DNA 3	21	0.6	Stok PEI	0.6	250	228.4	500	10
50	Stok DNA 4	185	6	Stok PEI	6	250	59	500	100

4.7.6 Pengukuran Persentase Sel Th2

Hasil homogenisasi jaringan spleen disentrifugasi untuk mendapatkan pellet cell. Pellet cell yang didapatkan disuspensikan ulang pada 1 ml Cell Staining Buffer. Sel disentrifus, lalu disuspensikan ulang dengan 0,5 ml Cell Staining Buffer yang sesuai sehingga konsentrasinya sesuai dengan yang dibutuhkan. Dilanjutkan dengan prosedur pewarnaan permukaan sel. Antibodi ditambahkan pada tabung berisi pellet cell dari prosedur sebelumnya sebagai berikut: FITC Anti-Mouse CD4 Antibody. Diinkubasi pada temperatur ruangan selama 15-20 menit dalam gelap. Dicuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan sentrifus pada 350x g selama 5 menit. Diulangi langkah tersebut. Sel disuspensikan ulang dalam 0,5 ml Cell Staining Buffer. Dilanjutkan segera ke proses pewarnaan intraseluler.

Prosedur Pewarnaan Imunofluoresen Intraseluler untuk sel T helper sebagai berikut. Ditambahkan 1 ml 1X Fix/Perm Solution pada tabung, di-vortex

dan diinkubasi pada temperatur ruangan dalam gelap selama 20 menit, lalu disentrifus pada 350 X g selama 5 menit sampai mengendap dan supernatant dibuang. Di cuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan sentrifus pada 350 X g selama 5 menit dan supernatant dibuang. Ditambahkan 20 ul PE Anti-Mouse IL-4 Antibodi untuk sel Th2 dan diinkubasikan pada temperatur ruangan dalam gelap selama 30 menit. Dicuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan pada 350 X g selama 5 menit sampai mengendap dan supernatant dibuang. Diulangi langkah tersebut. Disuspensikan ulang dalam 0,5 ml cell Staining Buffer lalu analisis dengan *flowcytometer* (Kalim *et al.*, 2017).

4.7.7 Pengukuran Kadar IL-4

Kadar IL-4 dari serum darah diukur dengan Mouse IL-4 ELISA kit yang dilakukan sesuai dengan protokol dari *eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc.* Prosedur ELISA untuk mengukur kadar IL-4 diawali dengan membuat pengenceran larutan standar berbagai konsentrasi. 50 μ l *sample diluent* ditambahkan ke setiap *well*, kemudian ditambahkan 50 μ l sampel. Tambahkan 50 μ l *biotin-conjugate* yang sudah diencerkan. Inkubasi pada suhu ruang selama dua jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 400 rpm. Lakukan *washing* dengan *wash buffer* yang telah diencerkan sebanyak tiga kali. Tambahkan substrat TMB sebanyak 100 μ l ke dalam setiap *well*. Inkubasi pada suhu ruang selama sepuluh menit di tempat gelap. Tambahkan *stop solution* ke dalam setiap *well*. Kadar IL-4 (pg/ml) kemudian segera dibaca pada ELISA Reader pada panjang gelombang 450 nm (Mouse IL-4 Coated ELISA Kit User Guide, 2017).

4.7.8 Pengukuran Kadar IFN- γ

Kadar IFN γ dari serum darah diukur dengan Mouse IFN γ ELISA kit yang dilakukan sesuai dengan protokol dari *eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc.*

Prosedur ELISA untuk mengukur kadar IFN γ diawali dengan membuat pengenceran larutan standar berbagai konsentrasi. 50 μ l *sample diluent* ditambahkan ke setiap *well*; kemudian ditambahkan 50 μ l sampel. Tambahkan 50 μ l *biotin-conjugate* yang sudah diencerkan. Inkubasi pada suhu ruang selama dua jam diatas *microplate shaker* dengan kecepatan 400 rpm. Lakukan *washing* dengan *wash buffer* yang telah diencerkan sebanyak tiga kali. Tambahkan substrat TMB sebanyak 100 μ l ke dalam setiap *well*. Inkubasi pada suhu ruang selama sepuluh menit di tempat gelap. Tambahkan *stop solution* ke dalam setiap *well*. Kadar IFN γ (ng/ml) kemudian segera dibaca pada ELISA Reader pada panjang gelombang 450 nm (Mouse IFN γ Coated ELISA Kit User Guide, 2017).

4.8 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran berat badan mencit secara berkala. Dilakukan uji beda antara berat badan mencit normal dengan berat badan mencit PIL. Produksi autoantibodi anti-dsDNA juga dievaluasi sebelum pemberian terapi EDI dsDNA. Dilakukan uji beda antara mencit normal dengan mencit PIL. Pengumpulan data juga dilakukan setelah pembedahan. Saat pembedahan dikumpulkan darah dari jantung mencit dan limpa untuk dilakukan pengukuran variabel. Hasil pengukuran variabel dibandingkan antar kelompok perlakuan. Variabel yang diukur adalah persentase Th2, kadar IL-4, dan perhitungan rasio kadar IFN γ /IL-4. Persentase Th2, kadar IL-4, dan rasio kadar IFN γ /IL-4 merupakan data numerik rasio. Dalam penelitian ini dilakukan uji beda persentase sel Th2, kadar IL4, dan rasio kadar IFN γ /IL-4 antara masing-masing kelompok perlakuan serta uji korelasi masing-masing variabel terhadap berat badan dan kadar anti-dsDNA

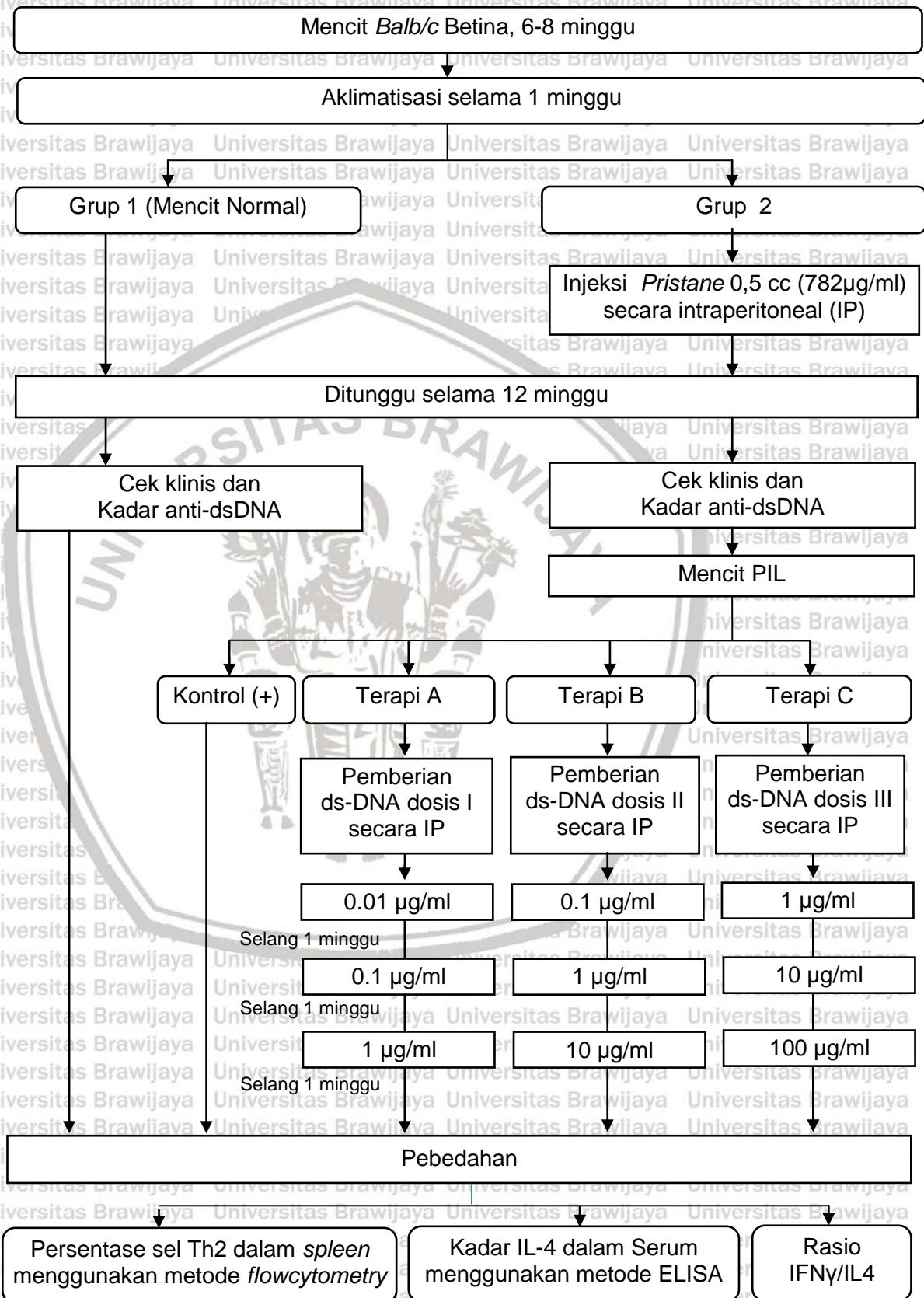
Uji normalitas digunakan dengan metode statistik uji *Shapiro-wilk* dengan $\alpha=0,05$. Jika didapatkan data p value $> 0,05$, maka data terdistribusi normal.

Kemudian dilanjutkan dengan uji homogenitas/ keragaman data menggunakan uji *Test Homogeneity of Variance* bertujuan untuk memperlihatkan bahwa sebaran data memiliki varian yang sama atau homogen. Data disebut homogen apabila didapatkan nilai signifikansi $\alpha > 0,05$. Jika data terdistribusi normal dan homogen, dapat dilakukan uji parametrik.

Jika data terdistribusi normal dan homogen maka dapat dilakukan uji parametrik One Way ANOVA untuk uji beda. Jika dari hasil uji ANOVA didapatkan nilai P signifikan ($p < 0,05$) maka dapat dilanjutkan uji Pos Hoc LSD/Tukey. Jika data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen maka dilakukan uji non parametrik Kruskal-Wallis uji beda. Uji korelasi dilakukan dengan uji *Pearson* jika data data terdistribusi normal dan homogen. Apabila data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen maka uji korelasi dilakukan dengan uji *Spearman*. Hubungan korelasi yang kuat ditunjukkan dengan koefisien korelasi yang mendekati nilai 1. Koefisien korelasi yang bernilai negatif artinya memiliki hubungan korelasi berbanding terbalik sedangkan nilai positif menunjukkan hubungan korelasi berbanding lurus.

Data ditampilkan dalam bentuk diagram batang dalam rerata \pm standar deviasi (SD). Perbedaan yang bermakna antar tiap kelompok ditunjukkan dengan notasi yang berbeda. Nilai $p < 0,05$ menunjukkan perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan. Analisis data pada penelitian ini dibantu dengan program SPSS 21 for Windows.

4.9 Skema Alur Penelitian



Gambar 4.1 Bagan Alur Penelitian

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* menggunakan mencit strain balb/c.

Sebanyak enam puluh mencit Balb/c betina usia 6-8 minggu dibagi secara acak menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol negatif: mencit normal tanpa

diinjeksi *pristane* maupun diberikan terapi EDI dsDNA dan kelompok mencit

Pristane Induced Lupus/PIL: mencit yang diinduksi LES dengan diberikan injeksi

pristan sebanyak 0,5 ml (728 μ g/ml) secara intraperitoneal. Mencit PIL kemudian

dibagi secara acak menjadi empat kelompok diantaranya: kelompok kontrol

positif: mencit PIL tanpa terapi EDI dsDNA, kelompok terapi A: mencit PIL

dengan terapi EDI dsDNA dosis I (0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml) diberikan satu

kali setiap minggu secara berurutan, kelompok terapi B: mencit PIL dengan

terapi EDI dsDNA dosis II (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) diberikan satu kali setiap

minggu secara berurutan dan kelompok terapi C: mencit PIL dengan terapi EDI

dsDNA dosis III (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) diberikan satu kali setiap minggu

secara berurutan. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian

terapi EDI dsDNA dengan injeksi secara intraperitoneal pada mencit PIL dalam

mengembalikan regulasi sistem imun. Pada penelitian ini peneliti fokus pada efek

pemberian EDI dsDNA pada persentase jumlah sel Th2 melalui marker

CD4⁺IL4⁺, kadar sitokin IL-4, serta rasio IFN γ /IL-4.

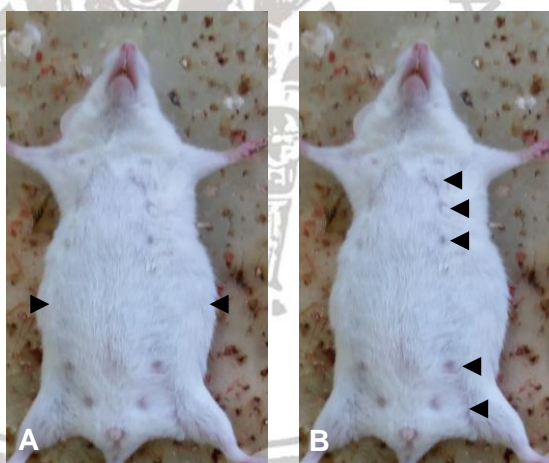
5.1 Identifikasi Karakteristik Mencit Balb/c *Pristane Induced Lupus* (PIL)

5.1.1 Manifestasi Klinis Mencit Balb/c *Pritane Induced Pristane*

Mencit Balb/c *Pristane Induced Lupus*/PIL adalah mencit betina galur Balb/c usia 6-8 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang diberikan injeksi *pristane* secara intraperitoneal sebanyak 0,5 cc (782 µg/ml) dosis tunggal kemudian ditunggu selama 12 minggu hingga muncul manifestasi lupus.

Penentuan hewan coba LES ditandai dengan adanya hasil dari manifestasi klinis dan laboratorium. Manifestasi LES yang ditemukan pada mencit PIL pada penelitian ini antara lain penurunan berat badan (70%), bulu rontok (60%), penurunan aktivitas (50%), asites (10%) dan peningkatan kadar anti-dsDNA.

Beberapa gambaran manifestasi klinis LES pada mencit PIL pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar 5.1



Gambar 5.1 Manifestasi Klinis Mencit PIL Paska Injeksi Tunggal *Pristane* secara Intraperitoneal. Beberapa manifestasi klinis LES yang ditemukan 12 minggu paska injeksi 0,5 ml *pristan* dosis tunggal secara intraperitoneal diantaranya asites (panah hitam) (A) dan alopesia (panah hitam) (B)

Berat-badan mencit Balb/c pada penelitian ini diukur secara berkala untuk mengevaluasi adanya peningkatan maupun penurunan berat badan mencit sebelum dan setelah diinjeksi *pristane*. Rata-rata hasil pengukuran berat badan secara berkala pada mencit normal dan mencit PIL disajikan pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Rata-rata Berat Badan Mencit yang Diukur secara Berkala

BB (g)	Adaptasi	Sebelum Injeksi <i>Pristane</i>	4 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	12 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>
Mencit Normal (n=5)	21.0 ± 2.00	26.2 ± 2.71	31.3 ± 3.98	36.8 ± 3.37
Mencit PIL (n=20)	20.6 ± 1.97	25.0 ± 3.59	31.5 ± 4.14	30.5 ± 4.16
Sig.	P=0.527*	P=0.402*	P=0.947**	P=0.002**

*=*Mann whitney test* **=*Independent t-test*

Hasil uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan data berat badan mencit yang saat adaptasi dan sebelum injeksi *pristane* secara berkala pada mencit normal dan mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* memiliki persebaran tidak normal ($P < 0,05$). Kemudian untuk hasil uji homogenitas data Berat Badan (BB) menunjukkan data homogen ($P > 0,05$). Oleh karena data berat badan mencit yang normal dan mencit PIL saat adaptasi dan sebelum injeksi *pristane* secara berkala menunjukkan persebaran tidak normal dan homogen maka uji beda berat badan (BB) dilakukan dengan uji non parametrik *Mann whitney*. Hasil uji *Mann whitney* berat badan mencit saat adaptasi ($P = 0,527$) dan sebelum injeksi *pristane* ($P = 0,402$) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara mencit normal dan mencit PIL.

Hasil uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan data berat badan mencit yang saat setelah diinduksi *Pristane* pada minggu ke-4 dan minggu ke-12 secara berkala pada mencit normal dan mencit lupus induksi *Pristane* memiliki persebaran normal ($P > 0,05$). Kemudian untuk hasil uji homogenitas data berat badan (BB) menunjukkan data homogen ($P > 0,05$). Oleh karena data berat badan mencit yang normal dan diinduksi *pristane* pada minggu ke-4 dan minggu ke-12 secara berkala menunjukkan persebaran normal dan homogen maka uji beda berat badan (BB) dilakukan dengan uji parametrik

Independent T-test. Hasil uji *Independent T-test* berat badan mencit pada minggu ke-4 ($P=0,947$) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara mencit normal dan mencit PIL. Hasil uji *Independent T-test* berat badan mencit pada minggu ke-12 ($P=0,002$) menunjukkan perbedaan yang bermakna antara mencit normal dan mencit PIL yang mana BB mencit PIL lebih rendah dibanding kelompok mencit normal.

Setelah pemberian EDI dsDNA, dilakukan evaluasi mengenai manifestasi klinis lupus pada mencit. Hasil pengamatan manifestasi klinis tidak menunjukkan perubahan sehingga tidak dapat dilakukan evaluasi pengaruh EDI dsDNA terhadap perubahan manifestasi klinis lupus. Evaluasi manifestasi klinis dilakukan setelah pemberian terapi EDI dsDNA selama tiga minggu sehingga perubahan manifestasi klinis belum tampak. Data mengenai manifestasi klinis lupus setelah pemberian EDI dsDNA disajikan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Evaluasi Manifestasi Klinis Setelah Pemberian EDI dsDNA

	BB (g)	Bulu Rontok		Penurunan Aktivitas	
		Pre	Post	Pre	Post
K (-) n=5	37.7 ± 4.5	0/5	0/5	0%	0%
K (+) n=5	29.0 ± 2.8	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)
A n=5	33.2 ± 2.3	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)
B n=5	29.0 ± 3.2	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)
C n=5	32.5 ± 3.3	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)

Keterangan: K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat (n=5), K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL (n=5), A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis I (n=5), B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis II (n=5), C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis III (n=5).

5.1.2 Manifestasi Serologis Mencit Balb/c Induksi *Pristane*

Manifestasi serologis pada mencit PIL diukur untuk mengetahui peningkatan kadar autoantibodi pada mencit PIL dibandingkan kelompok mencit

normal. Rata-rata kadar anti-dsDNA diperoleh dari mencit normal dan mencit PIL. Pengukuran anti-dsDNA dilakukan dengan metode ELISA pada setiap kelompok. Hasil pengukuran kadar anti-dsDNA antara mencit normal dan mencit PIL ditunjukkan pada tabel 5.3.

Tabel 5.3 Rata-Rata Hasil Pengukuran Kadar anti-dsDNA Pada Mencit Normal dan Mencit PIL

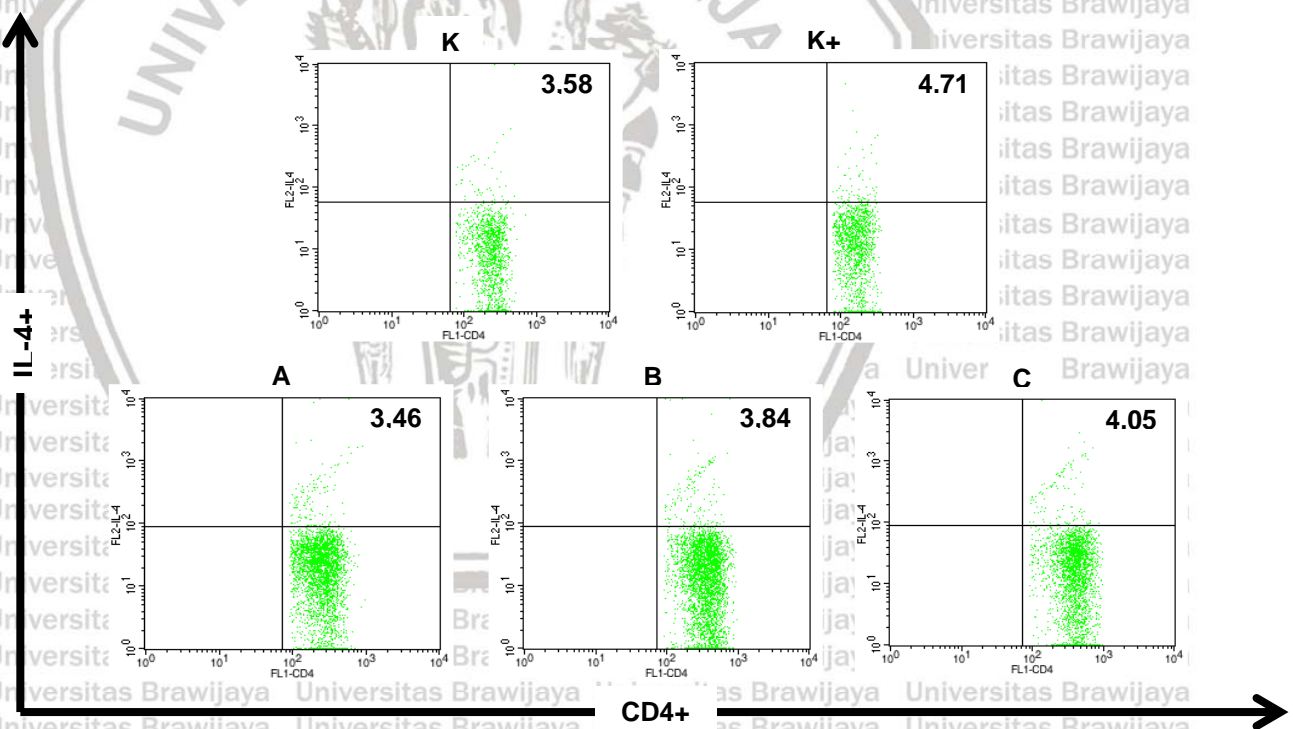
Kelompok	Kadar anti-dsDNA (ng/ml)
Mencit Normal (n=5)	7.85 ± 5.00 ^a
Mencit PIL (n=5)	80.36 ± 47.29 ^b

Hasil uji normalitas data menunjukkan kadar anti-dsDNA memiliki persebaran normal ($P > 0,05$). Hasil uji homogenitas data kadar ANA menunjukkan data homogen ($p = 0,998$) tetapi hasil uji kadar anti-dsDNA menunjukkan data tidak homogen ($p = 0,001$). Oleh karena data ANA yang menunjukkan persebaran normal dan homogen maka uji beda kadar ANA dilakukan dengan uji parametrik *Independent T-test*. Hasil uji *Independent T-test* kadar ANA menunjukkan peningkatan kadar ANA pada kelompok mencit PIL ($34,88 \pm 7,52$) dibandingkan kelompok mencit normal ($30,68 \pm 7,70$) tetapi tidak berbeda secara signifikan ($p = 0,362$). Oleh karena analisis data kadar anti-dsDNA menunjukkan data memiliki persebaran normal tetapi tidak homogen maka uji beda pada antara kadar anti-dsDNA pada kelompok mencit normal dengan mencit PIL dilakukan dengan uji non parametrik *Mann-whitney*. Hasil uji *Mann-whitney* kadar anti-dsDNA menunjukkan peningkatan kadar anti-dsDNA pada kelompok mencit PIL ($80,36 \pm 47,29$) dibandingkan kelompok mencit normal ($7,85 \pm 5,00$) secara signifikan ($p = 0,023$). Hal ini menandakan pemberian

pristane 0.5 cc (782 μ g/ml) dosis tunggal secara intraperitoneal berhasil menginduksi peningkatan kadar autoantibodi pada mencit PIL.

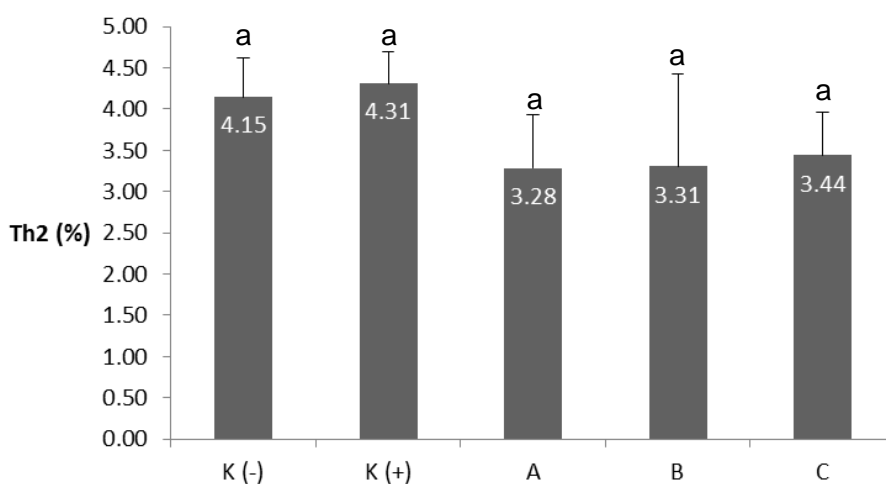
5.2 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Jumlah sel T *Helper* 2 (Th2) pada Mencit PIL

Persentase jumlah sel T *Helper* 2 (Th2) diukur dengan menggunakan metode *flowcytometry* dari jaringan limpa mencit. Hasil pengukuran berupa persentase jumlah sel dengan marker CD4⁺IL4⁺ dan kemudian dibandingkan rata-rata persentase jumlah sel Th2 antar kelompok. Hasil *flowcymetry* representatif dari setiap kelompok ditunjukkan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Hasil Pemeriksaan Persentase Sel Th2 (CD4⁺IL4⁺) dengan Metode Flowcytometry. K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat (n=5), K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* (n=5), A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis I (n=5), B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis II (n=5), C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis III (n=5).

Setelah mendapatkan persentase jumlah sel Th2 dengan metode *flowcytometry* dari setiap sampel, dilakukan perhitungan rata-rata persentase sel Th2 untuk setiap kelompok. Rata-rata persentase jumlah sel T-helper 2 dari masing-masing kelompok ditunjukkan pada gambar 5.3. Rata-rata tertinggi persentase sel Th2 didapatkan pada kelompok kontrol positif (K (+)) sedangkan rata-rata terendah ditunjukkan pada kelompok A. Untuk menilai perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji beda parametrik *One-way ANOVA*.



Gambar 5.3 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Persentase Sel Th2

(CD4+IL4+). K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat (n=5), K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* (n=5), A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis I (n=5), B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis II (n=5), C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis III (n=5).

Uji beda dilakukan dengan uji *One-way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 0,05 (α) dan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji normalitas data menggunakan *Saphiro-Wilk* menunjukkan data memiliki persebaran normal ($P>0,05$) sedangkan dari hasil uji homogenitas *levene* menunjukkan data bersifat homogen dengan nilai $p=0,228$ ($P>0,05$). Dari kedua uji tersebut dapat

disimpulkan bahwa data persentase jumlah sel Th2 terdistribusi normal dan homogeny sehingga syarat uji parametrik *One-way Anova* terpenuhi.

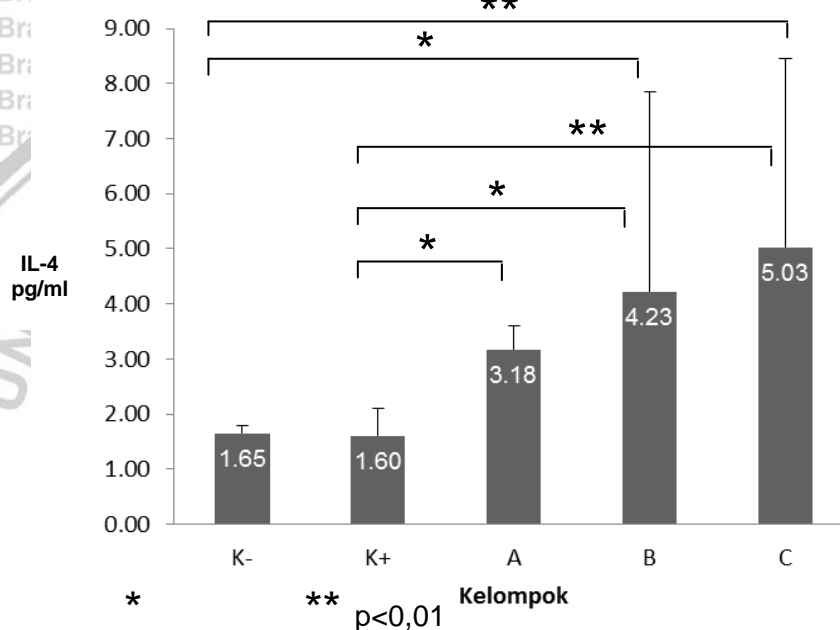
Pada tahap selanjutnya dilakukan uji *One-Way Anova* karena didapatkan persebaran data normal dan homogen. Dari hasil *One-Way Anova* didapatkan nilai *p* tidak signifikan, yaitu 0,132 yang berarti tidak terdapat setidaknya dua kelompok yang berbeda secara signifikan. Rata-rata persentase sel Th2 pada kelompok positif (K+) ($4,31 \% \pm 0,39$) mengalami kenaikan dibanding kelompok negatif (K-) ($4,15 \% \pm 0,47$) meskipun tidak signifikan. Rata-rata persentase sel Th2 pada kelompok terapi A ($3,28 \pm 0,64$), B ($3,31 \% \pm 1,12$), dan C ($3,44 \% \pm 0,52$) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+). Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna persentase sel Th2 antara kelompok terapi A, B, maupun C.

Manifestasi serologis LES yang diukur pada penelitian ini adalah peningkatan kadar anti-dsDNA. Untuk mengetahui pengaruh pemberian EDI dsDNA terhadap manifestasi serologis mencit PIL, dilakukan pengukuran terhadap kadar anti-dsDNA (data tidak ditampilkan) setelah pemberian EDI dsDNA. Untuk mengetahui hubungan antara persentase sel Th2 dengan kadar anti-dsDNA, maka dilakukan uji korelasi antara persentase sel Th2 dengan kadar anti-dsDNA. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,794 ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat korelasi yang bermakna antara persentase sel Th2 dengan kadar anti-dsDNA.

5.3 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Kadar Interleukin 4 (IL-4) pada Mencit PIL

Interleukin-4 atau IL-4 merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th2. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran sitokin IL-4 pada serum darah

hewan coba dengan metode ELISA. Rata-rata hasil pengukuran kadar sitokin IL-4 pada setiap kelompok perlakuan disajikan pada gambar 5.4. Rata-rata tertinggi kadar IL-4 didapatkan pada kelompok terapi C sedangkan rata-rata terendah ditunjukkan pada kelompok kontrol positif (K (+)). Untuk menilai perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji beda parametrik *One-way ANOVA*.



Gambar 5.4 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar Interleukin-4.

K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat (n=5), K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* (n=5), A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis I (n=5), B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis II (n=5), C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis III (n=5).

Uji beda dilakukan dengan uji *One-way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 0,05 (α) dan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji normalitas data menggunakan *Saphiro-Wilk* menunjukkan data memiliki persebaran normal ($P > 0,05$) sedangkan dari hasil uji homogenitas *levene* menunjukkan data bersifat homogen dengan nilai $p = 0,073$ ($P > 0,05$). Dari kedua uji tersebut dapat

disimpulkan bahwa data kadar IL-4 terdistribusi normal dan homogen sehingga syarat uji parametrik One-way Anova terpenuhi.

Pada tahap selanjutnya dilakukan uji *One-Way Anova* karena didapatkan persebaran data normal dan homogen. Dari hasil *One-Way Anova* didapatkan nilai *p* yang signifikan, yaitu 0,016 yang berarti terdapat setidaknya dua kelompok yang berbeda secara signifikan. Uji *Post Hoc LSD* selanjutnya diperlukan untuk mengetahui nilai perbedaan antar kelompok. Dari hasil uji *post-hoc LSD multiple comparasions* didapatkan kadar IL4 pada kelompok kontrol negatif tidak berbeda secara signifikan dengan kelompok kontrol positif ($1,65 \pm 0,13$ vs $1,60 \pm 0,51$; $p=0.839$). Kadar IL4 pada kelompok terapi A ($3,17 \pm 0,42$; $p=0.037$), B ($4,22 \pm 3,61$; $p=0.024$), dan C ($5,02 \pm 3,42$; $p=0.005$) cenderung meningkat dibandingkan kelompok positif secara signifikan ($p<0,05$). Hal ini menunjukkan pemberian terapi EDI dsDNA dapat berpengaruh pada peningkatan kadar IL-4 pada mencit PIL. Tidak didapatkan perbedaan kadar IL-4 yang signifikan antara terapi A, B, dan C ($p<0.05$). Jika dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif, kadar IL-4 pada terapi A tidak berbeda secara signifikan ($p=0.055$) sedangkan terapi B ($p=0.036$) dan C ($p=0.007$) menunjukkan perbedaan secara signifikan. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi 0,403 ($p>0,05$) yang berarti tidak terdapat korelasi yang bermakna antara kadar IL-4 dengan kadar anti-dsDNA.

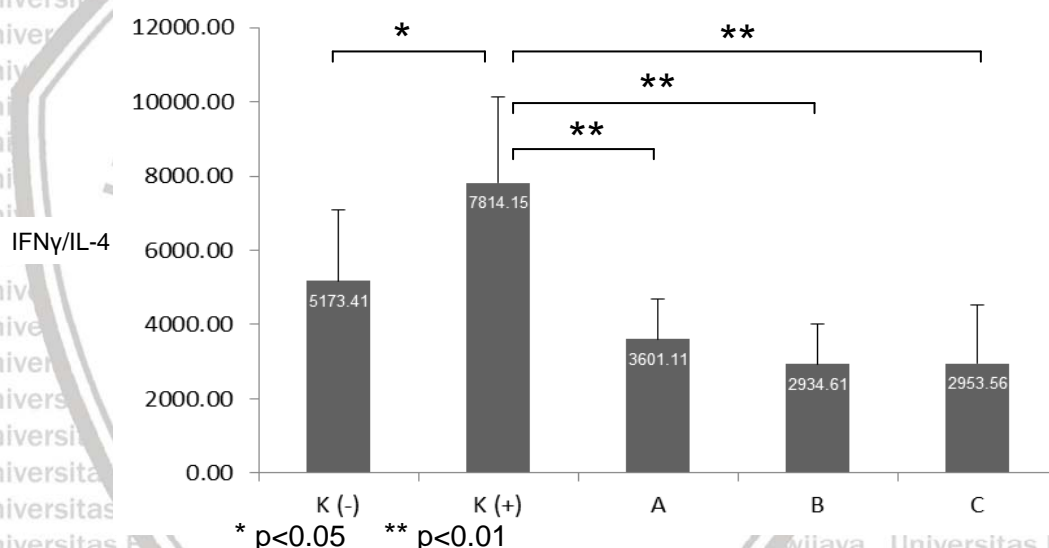
5.4 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Rasio IFN γ /IL-4 pada

Mencit PIL

Interleukin-4 atau IL-4 merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 sedangkan interferon-gamma atau IFN γ merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th1. Pada penelitian ini, peneliti juga ingin berfokus pada efek pemberian terapi EDI dsDNA pada keseimbangan sitokin IFN γ yang

diukur dalam serum darah dengan sitokin IL-4 yang juga diukur dalam serum darah. Keseimbangan tersebut diukur dengan menghitung rasio dari kadar IFN γ dibagi dengan kadar IL-4 (IFN γ /IL-4).

Setelah menhitung rasio IFN γ /IL-4, dilakukan perhitungan rata-rata IFN γ /IL-4 tiap kelompok. Hasil perhitungan rata-rata rasio IFN γ /IL-4 tiap kelompok ditampilkan pada gambar 5.5. Rata-rata rasio IFN γ /IL-4 tertinggi didapatkan pada kelompok kontrol positif (K(+)) sedangkan rata-rata terendah didapatkan pada kelompok terapi B. Untuk menilai perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji beda parametrik *One-way ANOVA*.



Gambar 5.5 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Rasio IFN γ /IL4. K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat (n=5), K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* (n=5), A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis I (n=5), B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis II (n=5), C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis III (n=5).

Uji beda dilakukan dengan uji *One-way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 0,05 (α) dan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji normalitas data menggunakan Saphiro-Wilk menunjukkan data memiliki persebaran normal ($P>0,05$) sedangkan dari hasil uji homogenitas levene menunjukkan data

bersifat homogen dengan nilai $p= 0,079$ ($P>0,05$). Dari kedua uji tersebut dapat disimpulkan bahwa data rasio IFN γ /IL-4 terdistribusi normal dan homogen sehingga syarat uji parametrik One-way Anova terpenuhi.

Pada tahap selanjutnya dilakukan uji *One-Way Anova* karena didapatkan persebaran data normal dan homogen. Dari hasil *One-Way Anova* didapatkan nilai p yang signifikan, yaitu 0,004 yang berarti terdapat setidaknya dua kelompok yang berbeda secara signifikan. Uji *Post Hoc* LSD selanjutnya diperlukan untuk mengetahui nilai perbedaan antar kelompok. Dari hasil uji *post-hoc* LSD *multiple comparasions* didapatkan rasio IFN γ /IL-4 pada kelompok kontrol positif meningkat secara signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (7814.15 ± 2331.95 vs 5173.41 ± 1914.47 ; $p=0.041$). Hal ini menunjukkan pemberian *pristane* mengganggu keseimbangan sitokin IFN γ dengan sitokin IL-4 dengan dominasi IFN γ . Rasio IFN γ /IL-4 pada kelompok terapi A (3601.11 ± 1070.77 ; $p=0.003$), B (2934.61 ± 1083.00 ; $p=0.001$) dan C (2953.56 ± 1584.28 ; $p=0.001$) mengalami penurunan signifikan jika dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan pemberian terapi EDI dsDNA dapat menurunkan rasio IFN γ /IL-4. Kelompok terapi A, B, maupun C tidak berbeda signifikan jika dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p=0.203$; $p=0.077$; $p=0.080$; secara berurutan). Rasio IFN γ /IL-4 antara kelompok terapi A, B maupun C tidak berbeda secara signifikan.

BAB VI

PEMBAHASAN

6.1 Manifestasi Mencit *Pristane Induced Lupus* (PIL)

Patogenesis LES bergantung pada hilangnya toleransi imun dan produksi autoantibodi terhadap antigen inti sel yang terus menerus (Tsokos *et al.*, 2016). Salah satu konsep kunci dalam patogenesis LES adalah ketidakseimbangan antara apoptosis sel dan pembersihan bahan apoptosis (Theofilopoulos *et al.*, 2011). Penelitian menunjukkan injeksi *pristane* secara intraperitoneal pada mencit berhasil menginduksi penyakit lupus (Rottman dan Willis, 2010). Manifestasi Perkembangan glomerulonefritis dan produksi autoantibodi, khususnya antibodi antinuklear dan anti dsDNA pada hampir semua strain hewan model lupus memiliki persamaan (Stanford dan Peng, 2012). *Pristane* menghentikan pertumbuhan sel dan memicu kematian sel secara apoptosis melalui jalur mitokondria dengan aktivasi caspase. Dosis *pristane* sebanyak 0,5 cc (782 μ g/ml) secara intraperitoneal merupakan dosis yang cukup untuk menginduksi apoptosis berlebihan dan terus menerus pada sel limfoid mesenterikal pada intraperitoneal sehingga menghasilkan paparan antigen inti sel yang cukup untuk memicu terjadinya autoimunitas (Calvani *et al.*, 2005). Penelitian yang dilakukan oleh Cui, *et al.* (2006) menunjukkan bahwa injeksi dosis tunggal *pristane* dengan dosis 0.5 mL pada mencit BALB/c secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar autoantibodi anti-dsDNA dan ANA mulai bulan ke-3 setelah injeksi dimana 87,5% mencit dideteksi mengalami peningkatan anti-dsDNA (Cui, *et al.*, 2006). Dalam hal munculnya manifestasi klinis yang sesuai dengan kriteria lupus, mencit lupus yang diinduksi *pristane*

menjadi model lupus yang lebih baik daripada model lain (Reeves *et al.*, 2009).

Pada penelitian ini pemberian injeksi *pristane* secara intraperitoneal berhasil menginduksi manifestasi LES pada mencit Balb/c. Manifestasi yang muncul diantaranya penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas, dan peningkatan autoantibodi (anti-dsDNA).

Berat badan mencit pada penelitian ini diukur secara berkala. Mencit normal (tanpa diinjeksi *pristane*) menunjukkan peningkatan berat badan sedangkan mencit yang diberi injeksi *pristane* tidak menunjukkan peningkatan berat badan dan bahkan mengalami penurunan berat badan. Pada minggu ke-12 paska injeksi *pristane*, rata-rata berat badan kelompok mencit injeksi *pristane* lebih rendah secara signifikan dibanding kelompok mencit normal (tanpa injeksi *pristane*). Dengan demikian, dapat disimpulkan injeksi *pristane* berpengaruh pada berat badan mencit pada penelitian ini. Mencit injeksi *pristane* pada penelitian ini juga mengalami bulu rontok yang ditandai dengan adanya daerah *alopecia* pada tubuh mencit. Mencit yang telah terinduksi lupus juga tampak mengalami penurunan aktivitas. Pada mencit yang diinjeksi *pristane* didapatkan peningkatan kadar anti-dsDNA secara signifikan. Hal ini menunjukkan injeksi *pristane* berhasil memicu pembentukan autoantibodi pada mencit.

Injeksi *pristane* pada hewan coba juga dapat memunculkan patofisiologi yang mirip dengan patofisiologi LES pada manusia seperti keterlibatan sitokin IFN-I, disregulasi sel plasma hingga terbentuknya autoantibodi ANA dan anti-dsDNA (Rottman dan Willis, 2010). Injeksi *pristane* secara intraperitoneal mampu meningkatkan sitokin IFN tipe I (IFN α dan IFN β). Peningkatan IFN tipe I terjadi juga pada pasien LES dan diketahui sejak 30 tahun lalu (Reeves *et al.*, 2009).

Eksresi IFN tipe I berkontribusi pada hilangnya toleransi sistem imun. Eksresi

gen yang memproduksi IFN tipe I juga berkaitan dengan keparahan penyakit, nefritis, dan terbentuknya antibodi melawan antigen inti diantaranya dsDNA, sm, atau RNP (Reeves *et al.*, 2009).

Injeksi *pristane* pada penelitian sebelumnya terbukti dapat menurunkan sel T-Reg. Pada penelitian ini, jumlah sel T-reg pada kelompok mencit yang diinjeksi *pristane* juga mengalami penurunan dibanding mencit normal (data tidak ditampilkan). Adanya kelainan sistem kekebalan tubuh disebabkan oleh terganggunya fungsi sel regulator T (T-reg) dalam mengatur respon imun dan ini mempengaruhi hiperaktivasi berbagai sel T pembantu (Th). Sel Th Th1, Th2, dan Th17 akan diaktifkan oleh sel dendritik (DC) dan sel APC lainnya dan merangsang terjadinya respon inflamasi, aktivasi sel makrofag, dan aktivasi limfosit sel B. Sel dendritik dapat mengenali berbagai jenis antigen diri terutama dsDNA yang memiliki peran penting dalam patogenesis LES, dan melalui aktivasi sel B akan merangsang terbentuknya antibodi terhadap self-antigen dsDNA. Kehadiran autoantibodi patogen ini akan mengakibatkan kerusakan jaringan akibat deposisi kompleks imun.

Tanda utama LES adalah tingginya produksi autoantibodi terhadap antigen inti, seperti double-strand DNA (ds-DNA) dan kromatin, yang mengakibatkan kerusakan organ yang diperantarai antibodi (Zhu *et al.*, 2007; Lauwerys, 2003). Autoantibodi merupakan kelainan imunologis yang menjadi dasar patogenesis dari LES. Penumpukan autoantibodi di jaringan membutuhkan aktifasi sistem komplemen dan atau mediator inflamasi lainnya, serta kemotaksis limfosit dan polimorfonuklear, pelepasan sitokin, kemokin, enzim proteolitik, sehingga menyebabkan kerusakan organ (Hahn, 2013). Penderita LES umumnya mengeluh lemah, demam, malaise, anoreksia dan berat badan

menurun. Manifestasinya bisa ringan, berat, bahkan sampai dapat mengancam jiwa (Wallace, 2007; Zhu, 2007).

Pada penelitian ini, pemberian imunoterapi dengan *self antigen* dsDNA dengan metode EDI pada kelompok mencit PIL menunjukkan penurunan kadar anti-dsDNA. Kehadiran autoantibodi patogen dalam hal ini anti-dsDNA akan mengakibatkan kerusakan jaringan akibat deposisi kompleks imun. Penurunan autoantibodi anti-dsDNA diharapkan dapat menurunkan kerusakan jaringan akibat deposisi kompleks imun sehingga manifestasi klinis yang timbul akibat kerusakan jaringan diantaranya lemah, malaise, dan berat badan menurun mengalami perbaikan. Manifestasi klinis pada kelompok mencit PIL setelah diberi terapi EDI dsDNA tidak menunjukkan perubahan sehingga tidak dapat dievaluasi. Proses perbaikan manifestasi klinis ini mungkin membutuhkan waktu sehingga pengaruh pemberian EDI dsDNA pada mencit PIL belum menunjukkan perbaikan manifestasi klinis secara signifikan.

Pemberian terapi EDI dsDNA pada penelitian ini dilakukan diharapkan dapat mengembalikan toleransi sel B pada LES sehingga produksi antibodi terhadap *self antigen* dsDNA dapat mengalami penurunan. Pada penelitian ini, pemberian imunoterapi dengan *self antigen* dsDNA dengan metode EDI pada kelompok mencit PIL menunjukkan penurunan kadar anti-dsDNA (data tidak ditampilkan). Pemberian imunoterapi menggunakan *self antigen* dengan metode EDI diketahui mampu menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif (Burton *et al.*, 2014). Pada penelitian ini pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL berhasil menekan respon sel B dalam memproduksi autoantibodi anti-dsDNA melalui peningkatan sel T-reg dan peningkatan sekresi TGF- β . Pada penelitian

ini, pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL berhasil meningkatkan jumlah sel T-Reg dan peningkatan sitokin TGF- β (data tidak ditampilkan).

Aktivasi sel Treg juga dimediasi oleh sitokin TGF- β . TGF- β mengikat reseptor TGF- β pada sel T naif sehingga mengaktifkan faktor transkripsi STAT5 sehingga memicu diferensiasi sel Treg. Sel Treg berperan langsung dalam menghambat aktivitas sel B. Penghambatan aktivitas sel B oleh T-reg menghambat terbentuknya antibodi terhadap self-antigen dsDNA.

6.2 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Jumlah sel Th2 pada mencit PIL

LES dianggap sebagai penyakit yang disebabkan oleh hilangnya toleransi sel B dan sel T. Sel B autoreaktif pertama kali ditemukan berperan pada patogenesis LES pada tahun 1950an ketika antibodi anti-DNA ditemukan sebagai komponen utama LES, dan penelitian-penelitian terbaru telah membuktikannya lebih jauh. Sel T juga diketahui berperan pada patogenesis LES (Duty *et al.*, 2009; Rottman and Willis, 2010). Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa injeksi *pristane* secara intraperitoneal telah mampu menginduksi terbentuknya sel B dan sel T auto-reaktif dan memicu terbentuknya autoantibodi (Reeves *et al.*, 2009). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini.

Injeksi *pristane* secara intraperitoneal pada kelompok kontrol positif (mencit PIL) menunjukkan peningkatan jumlah sel Th2 dibandingkan kelompok kontrol ($4,15\% \pm 0,47$ vs $4,31\% \pm 0,39$; $p > 0,05$) meskipun tidak signifikan.

Mencit LES dan pasien LES dapat memproduksi autoimmunitas terhadap antigen inti sel karena terjadi kegagalan toleransi sentral dari sel B. Pada manusia dan mencit yang sehat, sel B imatur yang spesifik dapat mengenali antigen inti akan mengalami pengeditan reseptor atau menjadi anergi sehingga terjadi toleransi terhadap antigen inti sel. Sebaliknya, pada mencit lupus terjadi

kegagalan untuk menghapus atau menonaktifkan sel B autoreaktif yang spesifik untuk DNA/kromatin dan RNA dengan kata lain terjadi kegagalan pada induksi toleransi sentral. Kegagalan toleransi sentral juga terjadi pada sel T dengan mekanisme yang sama (Rottman and Willis, 2010).

Pada LES diperkirakan juga terjadi kegagalan toleransi perifer sel B dan sel T. Sel T-Regulator (T-Reg) berperan penting dalam menginduksi toleransi perifer sehingga penurunan sel T-Reg menyebabkan peningkatan produksi autoantibodi pada penyakit autoimun seperti LES (Morgan *et al.*, 2003). Induksi peningkatan sel T-Reg dapat menekan produksi autoantibodi secara *in vitro* dan *in vivo*. Satu mekanisme sel T-regulator menghambat fungsi sel B dan sel T autoreaktif pada mencit dan manusia adalah dengan menginduksi apoptosis melalui mekanisme kontak sel secara langsung. Pasien LES yang baru terdiagnosis diketahui mengalami penurunan jumlah sel CD4+CD25+. Sel T-Reg Foxp3+ pada pasien LES mengalami penurunan kemampuan dalam menekan proliferasi sel CD4 dan CD8. Dengan demikian, T-reg yang menurun menyebabkan kegagalan dalam menghambat fungsi sel B maupun sel T yang autoreaktif pada mencit dan manusia yang mengalami LES.

Sel T merupakan sel yang dianggap menjadi pusat patogenesis dari LES karena hubungan mereka dengan protein MHC. Hilangnya toleransi sel-sel T menjadi ciri-ciri penyakit autoimun. Secara konsep, hilangnya toleransi ini berlangsung secara terpusat pada saat pengenalan antigen di timus atau di perifer, tetapi model hewan coba telah menunjukkan pentingnya hilangnya toleransi pada perifer. Sel Treg yang tidak efektif diidentifikasi baik oleh penelitian pada hewan coba maupun pada manusia (Chavele and Ehrenstein, 2011).

Pada umumnya LES dipertimbangkan sebagai penyakit dengan predominan Th2. Atas pengaruh sitokin IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 yang dilepas sel mast yang terpajan dengan antigen, Th0 berkembang menjadi sel Th2 yang merangsang sel B untuk meningkatkan produksi antibodi. Diferensiasi Th2 melibatkan reseptor sel T, IL-4, faktor transkripsi GATA3 dan STAT6 (Bratawidjaya, 2012). Hilangnya toleransi imun, banyaknya antigen, meningkatnya sel T helper, terganggunya supresi sel B dan perubahan respon imun dari Th1 ke Th2 menyebabkan hiperreaktivitas sel B dan terbentuknya autoantibodi (mok and Lau, 2003).

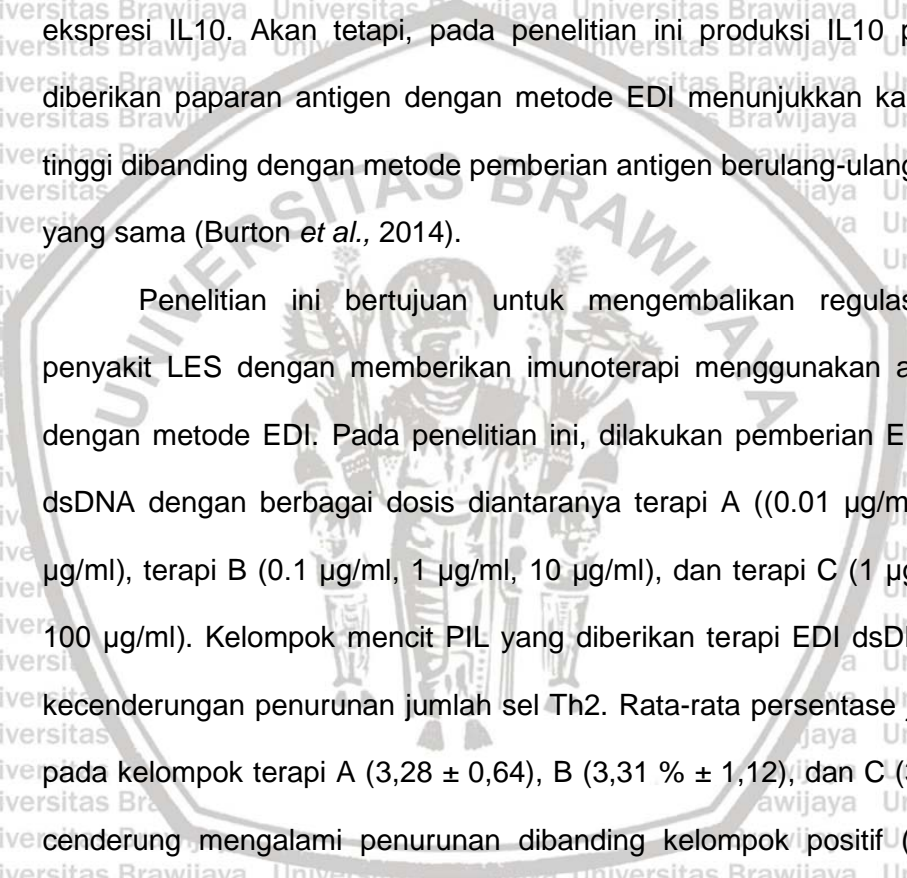
Tujuan utama dari terapi penyakit autoimun adalah membatasi respon imun terhadap self-antigen tanpa menurunkan kemampuan sel imun untuk mengenali antigen asing (*non-self*). Injeksi *self-antigen* dengan dosis yang bertahap dapat menginduksi sel regulator pada respon imun yaitu T-Reg untuk mensupresi Sel T yang autoreaktif (Sakaguchi, 2000). *Escalating Dose* (Antigen-Spesifik) *Immunotherapy* adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjeksikan autoantigen (*self-antigen*) yang menstimulus pembentukan autoantibodi dengan dosis yang bertahap hingga memunculkan efek toleransi. *Escalating Dose Antigen-Specific Immunotherapy* lain yang telah dikembangkan adalah terhadap autoimun *Multiple Sclerosis*. Injeksi subkutan *Myelin Basic Protein* mampu menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif (Burton *et al.*, 2014).

Penelitian dilakukan pada *autoimmune encephalomyelitis model* (EAE) dari *multiple sclerosis* dengan pemberian terapi menggunakan protein MBP (*Myelin Basic Protein*). Dosis MBP yang diberikan bertahap dari konsentrasi 0.01

repository.ub.ac.id

µg/ml-0.1 µg/ml-1 µg/ml-10 µg/ml-100 µg/ml. Dengan menggunakan protokol EDI, pemberian antigen spesifik mampu mencapai dosis tertinggi yang dibutuhkan untuk menginduksi IL10 tanpa meningkatkan sitokin inflamasi lainnya. Fenotip sel T CD4 yang diinduksi EDI juga dibandingkan dengan sel yang diinduksi dengan dosis antigen yang sama berulang-ulang. Kedua metode tersebut sama-sama menunjukkan efek anergi sel, supresi sel, dan peningkatan ekspresi IL10. Akan tetapi, pada penelitian ini produksi IL10 pada sel yang diberikan paparan antigen dengan metode EDI menunjukkan kadar yang lebih tinggi dibanding dengan metode pemberian antigen berulang-ulang dengan dosis yang sama (Burton *et al.*, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengembalikan regulasi imun pada penyakit LES dengan memberikan imunoterapi menggunakan antigen dsDNA dengan metode EDI. Pada penelitian ini, dilakukan pemberian EDI self antigen dsDNA dengan berbagai dosis diantaranya terapi A ((0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml), terapi B (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml), dan terapi C (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml). Kelompok mencit PIL yang diberikan terapi EDI dsDNA mengalami kecenderungan penurunan jumlah sel Th2. Rata-rata persentase jumlah sel Th2 pada kelompok terapi A ($3,28 \pm 0,64$), B ($3,31 \% \pm 1,12$), dan C ($3,44 \% \pm 0,52$) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+) meskipun tidak signifikan ($p < 0,05$). Akan tetapi, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara persentase jumlah sel Th2 antara kelompok terapi A, B, maupun C. Penurunan ini menunjukkan pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL mampu menurunkan jumlah sel Th2. Pada penelitian sebelumnya, pemberian imunoterapi dengan antigen spesifik dengan metode EDI terbukti dapat menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan



TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif (Burton *et al.*, 2014). Dengan demikian, pada penelitian ini pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL dapat menurunkan jumlah sel Th2 melalui peningkatan sel T-Reg pada produksi sitokin imunomodulator IL-10 dan TGF β . Sel T-reg memiliki fungsi penekan terhadap respons inflamasi dengan memproduksi sitokin TGF- β dan IL-10 dimana keduanya sitokin ini terbukti dapat mengurangi aktivitas sel imun lainnya.

Sel Treg memiliki peran penting dalam pengembangan terapi toleransi dengan antigen spesifik. Induksi sitokin IL10 sebagai imunomodulator menunjukkan efektivitas imunoterapi baik pada tikus maupun manusia (Tarzi *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009; Foustari *et al.*, 2010). Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan juga membuktikan bahwa sel Treg ini berperan secara langsung dalam menghambat aktivitas sel Th1, Th2, Th17, dan aktivitas dari sel B (Xu *et al.*, 2003).

Pemberian imunoterapi antigen spesifik dengan menggunakan metode EDI juga dibuktikan dapat memicu perubahan faktor transkripsi. Selama proses imunoterapi, stimulasi kronis pada sel CD4 dengan pemberian peptida antigen mengubah program transkripsi (Anderson *et al.*, 2006) dengan sel Th1 patogen yang berubah menjadi anergi, sekresi IL10, sel dengan fenotip regulator yang mampu mencegah autoimunitas (Gabrysova *et al.*, 2009). Penelitian yang dilakukan oleh Burton *et al* dengan memberikan EDI MBP pada penyakit multipel sklerosis juga menunjukkan sel T CD4 yang diberi terapi metode ini menunjukkan ekspresi molekul kostimulator negatif dan faktor-faktor transkripsi.

Hasil penelitian oleh Burton *et al* (2014) juga menunjukkan induksi diferensiasi sel T regulator dengan adanya fenotip sel T yang mensekresi IL-10. Korelasi lain yang ditunjukkan pada penelitian Burton *et al* adalah pemberian imunoterapi

dengan metode EDI yang efektif telah menginduksi molekul kostimulator negatif, diantaranya PD-1 dan LAG-3. Molekul kostimulator tersebut berhubungan dengan kelelahan sel T. PD-1 dan LAG-3 disebut marker sel anergi. Selain itu, pemberian EDI dapat meningkatkan faktor transkripsi TIGIT dan TIM-3 yang menyebabkan perubahan fenotip menjadi sel yang dapat mensekresi IL-10 (Burton *et al.*, 2014).

Pada penelitian ini, pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL berhasil meningkatkan jumlah sel T-Reg dan peningkatan sitokin TGF- β (data tidak ditampilkan). Aktivasi sel Treg juga dimediasi oleh sitokin TGF- β . TGF- β mengikat reseptor TGF- β pada sel T naif sehingga mengaktifkan faktor transkripsi STAT5 sehingga memicu diferensiasi sel Treg. Sel Treg berperan langsung dalam menghambat aktivitas sel T termasuk sel Th2. Penghambatan aktivitas sel Th2 dapat menghambat fungsi Th2 dalam memicu sel B untuk berubah menjadi sel plasma dan membentuk antibodi terhadap self-antigen dsDNA.

Korelasi jumlah sel Th2 dengan kadar anti-dsDNA pada penelitian ini tidak menunjukkan hubungan korelasi yang signifikan. Akan tetapi, jumlah sel Th2 dan kadar anti-dsDNA sama sama menunjukkan penurunan karena pemberian EDI dsDNA. Korelasi yang tidak signifikan diduga karena banyak faktor yang mempengaruhi hubungan Th2 dalam memicu produksi autoantibodi. Th2 mengaktifkan sel B untuk berubah menjadi sel plasma untuk kemudian dapat memproduksi anti-dsDNA. Pada penelitian ini jumlah sel B juga mengalami penurunan pada mencit PIL yang diberi terapi EDI dsDNA dibandingkan mencit PIL tanpa terapi (data tidak ditampilkan). Akan tetapi, produksi anti-dsDNA juga

dapat terjadi dari aktivasi sel B secara langsung oleh antigen tanpa melalui jalur aktivasi sel Th2.

6.3 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar IL-4 pada serum mencit PIL

Interleukin 4 (IL-4) merupakan tipe *hematopoietin superfamily* yang disekresi oleh sel Th2, sel NK, sel Mast, dan sel Basofil (Tsokos *et al.*, 2007).

Sitokin ini diperkirakan memiliki peran dalam menyupresi sel T. IL-4 dapat memperparah autoimunitas yang diperantarai sel B tetapi juga dapat menghambat aktivasi sel T dalam beberapa sistem secara *in vivo* (Morris *et al.*, 2000).

Pada penelitian ini, diukur kadar IL-4 untuk mengetahui efek pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar IL-4 pada serum mencit PIL. Kadar IL-4 mencit PIL ($1,60 \pm 0,51$) tidak berbeda signifikan dengan mencit kelompok kontrol negatif ($1,65 \pm 0,13$) dengan rata-rata IL-4 kelompok kontrol positif sedikit menurun dibanding kelompok kontrol negatif. Beberapa penelitian menunjukkan peningkatan kadar IL-4 pada serum beberapa pasien lupus (Wong *et al.*, 2000; Kawamoto *et al.*, 2006). Selain itu, isolasi sel B dari pasien lupus menunjukkan produksi dari faktor terlarut dengan aktivitas seperti IL-4. Terdapat beberapa penelitian yang mendukung hasil penelitian ini. Terdapat penelitian yang menunjukkan mRNA IL-4 dari PBMC pasien lupus memiliki jumlah yang normal dan jumlah sel T CD4 yang memproduksi IL-4 mengalami penurunan signifikan pada pasien lupus (Tsokos *et al.*, 2007).

Pada penelitian yang dilakukan Elewa *et al.* dibuktikan bahwa IL-4 merupakan sitokin yang sangat sensitif pada pasien LES dan ketika dibandingkan kadarnya antara kelompok LES dan kelompok kontrol, kadarnya secara signifikan lebih rendah pada pasien LES (Elewa *et al.*, 2014). Hal tersebut

juga sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan supresi ekspresi IL-4 pada pasien LES (Sugimoto *et al.*, 2002; Lit *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010).

Csisza *et al.*, juga menemukan bahwa jumlah transkripsi mRNA dari IL-4 mengalami penurunan signifikan pada kelompok LES (Csisza *et al.*, 2000).

Escalating Dose (Antigen-Spesifik) Immunotherapy adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjeksikan autoantigen (*self-antigen*) yang menstimulus pembentukan autoantibodi dengan dosis yang bertahap hingga memunculkan efek toleransi.

Pada penelitian ini, dilakukan pemberian EDI self antigen dsDNA dengan berbagai dosis diantaranya terapi A ((0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml), terapi B (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml), dan terapi C (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml).

Escalating Dose Antigen-Spesifik Immunotherapy lain yang telah dikembangkan adalah terhadap autoimun *Multiple Sclerosis*. Injeksi subkutan *Myelin Basic Protein* mampu menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF-β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif.

Kadar IL4 pada kelompok terapi A ($3,17 \pm 0,42$; $p=0.037$), B ($4,22 \pm 3,61$; $p=0.024$), dan C ($5,02 \pm 3,42$; $p=0.005$) cenderung meningkat dibandingkan kelompok positif secara signifikan ($p<0,05$). Akan tetapi, tidak didapatkan perbedaan kadar IL-4 yang signifikan antara terapi A, B, dan C ($p<0.05$). Hal ini menunjukkan pemberian terapi EDI dsDNA berefek pada peningkatan kadar IL-4 pada mencit PIL.

Peningkatan kadar IL-4 ini diduga tidak hanya karena adanya produksi IL-4 oleh sel Th2 tetapi juga produksi IL-4 dari sel-sel lain seperti sel mast, sel basofil, dan sel B. Peningkatan kadar IL-4 ini sebagai regulator untuk menekan aktivitas sel Th1 yang berlebih. Aktivitas Th1 salah satunya ditandai dengan

produksi IFN- γ . Pada penelitian ini kadar IFN- γ berhasil mengalami penurunan pada kelompok mencit PIL yang diberi terapi EDI dsDNA. Th2 juga memproduksi sitokin seperti IL-4 dan IL-13 yang bersifat antagonis terhadap IFN- γ dan menekan aktivasi makrofag. Jadi Th2 kemungkinan berfungsi sebagai regulator fisiologis pada respon imun dengan menghambat efek yang mungkin membahayakan dari respon Th1 (Abbas, 2012).

IL-4 memiliki peran pada produksi antibodi oleh sel B. IL-4 bertanggung jawab pada perubahan isotipe antibodi menjadi IgG1 dan IgE. Akan tetapi, autoantibodi patogen pada mencit lupus umumnya termasuk pada subkelas IgG2a dan IgG3. Antibodi dengan subkelas IgG2a dan IgG3 dipicu oleh sitokin tipe 1 yaitu IFN- γ akan tetapi ditekan oleh sitokin tipe 2 diantaranya IL-4 (Tsokos *et al.*, 2007). IL-4 mempunyai efek inhibisi terhadap sitokin proinflamasi melalui supresi IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, dan MIP-1 α . IL-4 mencegah aktivasi makrofag yang diinduksi oleh IFN- γ , oleh karena itu IL-4 mempunyai efek yang berlawanan dengan IFN- γ (Bratawidjaya, 2012). IL-4 memperantarai penghambatan produksi IFN- γ oleh sel CD4+ melalui beberapa mekanisme (Wurtz *et al.*, 2004).

Peningkatan kadar IL-4 pada kelompok mencit yang diberi terapi EDI dsDNA diduga sebagai kompensasi untuk menekan sitokin IFN- γ lupus. Pada penelitian ini, dilakukan juga pengukuran pada kadar IFN- γ (data tidak ditampilkan). Kadar IFN- γ pada kelompok mencit PIL yang diberi terapi EDI dsDNA berhasil mengalami penurunan.

IL-4 juga diketahui dapat menghambat autoimunitas dengan membantu menginduksi produksi sitokin regulator, TGF- β . Beberapa penelitian menunjukkan ekspresi berlebihan dari IL-4 pada mencit transgenik menunjukkan efek protektif pada perkembangan penyakit lupus (Singh *et al.*, 2003). IL-4

memang memiliki peran pada produksi antibodi oleh sel B tetapi IL-4 memicu antibodi dengan isotipe IgG1 dan IgE sedangkan isotipe antibodi patogenik pada lupus adalah IgG2a dan IgG3 (Tsokos *et al.*, 2007). Selain IL-4 terdapat sitokin lain yang mempengaruhi produksi anti-dsDNA diantaranya sitokin IL-17A maupun BAFF. IL-17A dan BAFF memiliki kemampuan dalam meningkatkan proliferasi dan diferensiasi serta mencegah apoptosis dari sel B (Doreau *et al.*, 2009).

6.4 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Rasio Kadar IFN γ /IL-4 pada Serum

Mencit PIL

Beberapa penelitian menunjukkan kadar IFN γ yang meningkat pada serum darah pasien LES dan ketidakseimbangan sitokin Th1 (IFN γ) dan Th2 (IL-4) berhubungan dengan peningkatan aktivitas penyakit lupus pada mencit model lupus (Guimaraes *et al.*, 2017). Kedua sel Th1 dan Th2 sama-sama merespon dan berperan dominan pada patogenesis kerusakan jaringan pada lupus. Faktanya, mencit model LES memiliki dua tahap aktivasi sel T dan sekresi sitokinya, ekspresi sitokin Th1 muncul pertama kali diikuti induksi sitokin Th2 (Alkahoshi *et al.*, 1999). Pada penelitian Alkahoshi *et al.*, (1999) pasien LES dengan proteinuria kronis mengalami peningkatan persentase sel Th1 perifer dibandingkan dengan kontrol sehat. Keseimbangan Th1/Th2 pasien LES dengan Nefritis kelas IV menunjukkan pergeseran ke Th1 (Alkahoshi *et al.*, 1999). Data ini mendukung teori bahwa eksaserbasi nefritis pada LES di mediasi oleh sitokin Th1 seperti IFN γ . Telah dibuktikan bahwa IFN γ menjadi sitokin yang berperan penting pada perkembangan penyakit autoimun pada ginjal (Schwartz *et al.*, 1998).

Pada pasien LES, hiperaktivitas sel B berhubungan dengan produksi sitokin Th2 yang mengawali produksi autoantibodi yang berlebihan. Akan tetapi peran sitokin Th1 juga sama-sama diketahui. Baik sitokin Th1 dan Th2 dapat berperan dalam mendukung ataupun menghambat penyakit autoimun. Penelitian sebelumnya menunjukkan peningkatan IFN- γ dan IL8 pada LES (Amerio *et al.*, 2002). Pada penelitian Sayed *et al.*, IFN- γ menunjukkan korelasi negatif dengan sitokin Th2 (IL4 dan IL10) (Sayed *et al.*, 2008). Penelitian terakhir menunjukkan kadar sitokin mengalami perubahan pada LES. Tingginya sitokin proinflamasi kemungkinan mencetuskan eksaserbasi dari respon inflamasi, apoptosis dan produksi autoantibodi yang mengawali dan mempertahankan aktivitas penyakit (Yap *et al.*, 2010; Postal *et al.*, 2013). LES dan aktivitas penyakit ditandai dengan profil Th1, Th17, dan Treg bersamaan dengan penurunan produksi IL-4. Peningkatan Th1 ditambah dengan peningkatan Th17 namun menurunkan aktivitas Th2 dan peningkatan kadar IL-10 bisa menjadi target obat baru di LES. Hasil ini menunjukkan bahwa strategi modulasi sitokin memiliki potensi untuk pengobatan LES serta profil Th1, Th17, dan Treg bersamaan dengan penurunan produksi IL-4 dapat dijanjikan sebagai biomarker aktivitas penyakit (Guimaraes *et al.*, 2017).

Interleukin-4 atau IL-4 merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th2 sedangkan interferon-gamma atau IFN γ merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th1. Pada penelitian ini, dilakukan evaluasi efek pemberian terapi EDI dsDNA pada keseimbangan sitokin yang dihasilkan oleh Th1 (IFN γ) yang diukur dalam serum darah dengan sitokin yang dihasilkan oleh Th2 (IL-4) yang juga diukur dalam serum darah. Keseimbangan tersebut diukur dengan menghitung rasio dari kadar IFN- γ dibagi dengan kadar IL-4 (IFN γ /IL-4).

Pada penelitian ini, didapatkan rasio IFN γ /IL-4 pada kelompok kontrol positif meningkat secara signifikan dibanding kelompok kontrol negatif (7814.15 ± 2331.95 vs 5173.41 ± 1914.47 ; $p=0.041$). Hal ini menunjukkan pemberian *pristane* mengganggu keseimbangan sitokin IFN γ dengan sitokin IL-4 dengan dominasi produksi sitokin IFN γ .

Penelitian ini bertujuan untuk mengembalikan regulasi imun pada penyakit LES dengan memberikan imunoterapi menggunakan antigen dsDNA dengan metode EDI. Pada penelitian ini, dilakukan pemberian EDI self antigen dsDNA dengan berbagai dosis diantaranya terapi A ($0.01 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$), terapi B ($0.1 \mu\text{g/ml}$, $1 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$), dan terapi C ($1 \mu\text{g/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$). Rasio IFN γ /IL-4 pada kelompok terapi A (3601.11 ± 1070.77 ; $p=0.003$), B (2934.61 ± 1083.00 ; $p=0.001$) dan C (2953.56 ± 1584.28 ; $p=0.001$) mengalami penurunan signifikan jika dibandingkan kelompok kontrol positif. Hal ini menunjukkan pemberian terapi EDI dsDNA dapat menurunkan rasio IFN γ /IL-4. Akan tetapi, rasio IFN γ /IL-4 pada kelompok terapi A, B, maupun C tidak berbeda signifikan jika dibandingkan kelompok kontrol negatif ($p=0.203$; $p=0.077$; $p=0.080$; secara berurutan). Rasio IFN γ /IL-4 antara kelompok terapi A, B maupun C tidak berbeda secara signifikan. Hal tersebut menunjukkan pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit PIL tersebut mampu menurunkan rasio IFN γ /IL-4 mendekati normal.

Penelitian terbaru dilakukan oleh Guimaraes *et al*, dengan temuan utama dari penelitiannya adalah bahwa kadar sitokin dalam plasma diantaranya IL-6, IL-12, IL-17, dan IFN- γ secara signifikan lebih tinggi sedangkan IL-4 lebih rendah pada LES jika dibandingkan dengan kontrol. Selain itu, peneliti menemukan bahwa profil Th1 / Th2 dan Th1 + Th17 / Th2 secara signifikan lebih tinggi di LES,

padahal tidak ada perbedaan signifikan dalam profil sitokin pro-inflamasi (Guimaraes *et al.*, 2017). Data penelitian tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan tingkat tinggi IFN- γ berhubungan dengan aktivitas penyakit pada LES (Csiszár *et al.*, 2000; Chun *et al.*, 2007). IFN- γ memberikan efek patogennya dengan mendorong sitokin proinflamasi lainnya, menginduksi apoptosis pada sel ginjal, dan mempromosikannya kerusakan jaringan bila diproduksi berlebihan. IFN- γ menginduksi percepatan progresivitas LES, sementara anti-IFN- γ antibodi menunda aktivitas penyakit, menunjukkan potensi patogenik IFN- γ di LES (Fonslow *et al.*, 2013). Selain itu, penelitian lain menemukan bahwa penurunan kadar IL-4, sitokin Th2, diperkirakan terjadi pada LES dan berhubungan negatif dengan tingkat keparahan penyakit.

IL-4 mempunyai efek inhibisi terhadap sitokin proinflamasi melalui supresi IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, dan MIP-1 α . IL-4 mencegah aktivasi makrofag yang diinduksi oleh IFN- γ , oleh karena itu IL-4 mempunyai efek yang berlawanan dengan IFN- γ (Bratawidjaya, 2012). Menurunnya rasio IFN γ /IL-4 pada mencit PIL yang diberikan terapi EDI dsDNA menjelaskan hasil pengukuran kadar IL-4 yang meningkat pada penelitian ini. Peningkatan kadar IL-4 pada kelompok mencit yang diberi terapi EDI dsDNA diduga sebagai kompensasi untuk menekan produksi sitokin IFN- γ lupus (Singh *et al.*, 2003). Pada penelitian ini, dilakukan juga pengukuran pada kadar IFN- γ (data tidak ditampilkan). Kadar IFN- γ pada kelompok mencit PIL yang diberi terapi EDI dsDNA berhasil mengalami penurunan. Mengembalikan keseimbangan produksi IFN- γ dan IL-4 diharapkan dapat menjadi target terapi untuk menghambat kerusakan organ pada LES. Pada penelitian ini, pemberian terapi EDI dsDNA pada mencit PIL berhasil mengembalikan keseimbangan IFN γ /IL-4 mendekati mencit normal.

Dominasi Th1 ataupun dominasi Th2 pada LES tergantung dari tahapan penyakit LES itu sendiri. Kadar IFN- γ yang tinggi pada awal penyakit dapat meningkatkan ekspresi HLA kelas II, berperan pada hilangnya toleransi pada antigen sendiri dan mencetuskan terbentuknya autoantibodi patogenik. Pada tahap penyakit selanjutnya, produksi IFN- γ yang lebih rendah dapat menyebabkan peningkatan sitokin Th2 yang selanjutnya mengakibatkan peningkatan aktivitas sel B (Susianti dan Handono, 2012). Sitokin Th1 dapat menekan aktivitas sitokin Th2 begitupula sebaliknya. Pada lupus nefritis, dominasi sitokin Th1 dapat berkembang kearah *diffuse lupus nephritis* (DLN) sedangkan dominasi sitokin Th2 menyebabkan perkembangan kearah membranous lupus nephritis (MLN) (Nakashima *et al.*, 2006). Dengan demikian, keseimbangan sitokin Th1/Th2 mendekati normal diperlukan agar terjadi remisi pada penyakit LES.

6.5 Keterbatasan Penelitian

Pada penelitian ini hanya digunakan tiga macam dosis terapi EDI dsDNA sehingga hal ini menjadi keterbatasan penelitian dalam menentukan dosis pemberian EDI dsDNA yang efektif. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mencari dosis efektif dan dosis toksik dari pemberian EDI dsDNA pada mencit *pristine induced lupus*. Selain itu, pengaruh dalam perubahan klinis pada penelitian ini tidak dapat dievaluasi karena perubahan klinis pada lupus memerlukan waktu setelah terjadi perubahan secara imunologis. Penelitian lebih lanjut diperlukan dengan waktu penelitian yang diperpanjang agar dapat mengamati perubahan klinis setelah pemberian terapi EDI dsDNA pada mencit PIL. Terlepas dari berbagai keterbatasan penelitian ini, penelitian ini menunjukkan pemberian EDI dsDNA pada mencit PIL menunjukkan keberhasilan

terapi dengan metode ini dapat mengembalikan regulasi imun pada LES sehingga diperlukan penelitian lebih lanjut agar metode terapi ini benar-benar dapat diaplikasikan pada penyakit LES.

Penelitian ini membuktikan pemberian EDI dsDNA pada mencit PBL memiliki efek pada penurunan sel Th2, peningkatan kadar IL-4, serta penurunan rasio IFN γ /IL-4. Pada penelitian ini juga dibuktikan pemberian EDI dsDNA dapat mengembalikan toleransi perifer dengan meningkatkan jumlah sel T-reg (data tidak ditampilkan). Peningkatan sel T-reg menjadi salah satu faktor dari penurunan sel Th2 karena sel T-reg dapat menekan aktivitas sel Th2 yang autoreaktif dengan kontak sel secara langsung. Penelitian yang dilakukan oleh Burton *et al* dengan memberikan EDI MBP pada penyakit multipel sklerosis menunjukkan induksi diferensiasi sel T regulator dengan adanya fenotip sel T yang mensekresi IL-10. Hasil penelitian oleh Burton *et al* juga menunjukkan pemberian imunoterapi dengan metode EDI telah menginduksi molekul kostimulator negatif, diantaranya PD-1 dan LAG-3. Molekul kostimulator tersebut berhubungan dengan kelelahan sel T. PD-1 dan LAG-3 disebut marker sel anergi (Burton *et al.*, 2014). Pada penelitian ini, penurunan sel Th2 juga diduga karena pemberian imunoterapi dengan metode EDI berpotensi menginduksi anergi sel T atau kelelahan sel T. Akan tetapi, pada penelitian ini belum dilakukan pengukuran ekspresi kostimulator negatif pada sel T setelah pemberian terapi EDI dsDNA karena penelitian ini memang belum ditujukan untuk melihat pengaruh tersebut. Hal tersebut bukan merupakan kelemahan dari penelitian ini tetapi dapat menjadi saran untuk penelitian lebih lanjut agar dapat mempelajari hal tersebut.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Kesimpulan Umum

Pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat memperbaiki regulasi sistem imun penyakit lupus eritematosus sistemik (LES) pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).

7.1.2 Kesimpulan Khusus

1. Pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat menurunkan persentase sel Th2 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL) dengan dosis terbaik didapatkan pada kelompok dosis II (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml).
2. Pemberian EDI *self-antigen dsDNA* tidak dapat menurunkan kadar IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL).
3. Pemberian EDI *self-antigen dsDNA* dapat menurunkan rasio kadar IFN γ /IL-4 pada mencit *pristane induced lupus* (PIL) dengan dosis terbaik didapatkan pada kelompok dosis II (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml).

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan eksplorasi dosis terapi *Escalating Dose Immunotherapy* menggunakan *Self Antigen dsDNA* untuk mengetahui dosis efektif dan dosis toksik.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan waktu penelitian yang diperpanjang untuk mengetahui perubahan klinis LES setelah pemberian EDI *dsDNA*.

3. Perlu dilakukan penelitian mengenai efek pemberian EDI dsDNA terhadap ekspresi kostimulator negatif pada sel T.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Lembar Persetujuan Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS KEDOKTERAN
KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN

Jalan Veteran Malang - 65145, Jawa Timur - Indonesia
Telp. (62) (0341) 551611 Ext. 168; 569117; 567192 - Fax. (62) (0341) 564755
http://www.fk.ub.ac.id e-mail : kep.fk@ub.ac.id

KETERANGAN KELAIKAN ETIK
("ETHICAL CLEARANCE")

No. 336 / EC / KEPK / 09 / 2016

KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA, SETELAH MEMPELAJARI DENGAN SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG DIUSULKAN, DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA PENELITIAN DENGAN

JUDUL : Pengembangan Metode Elicit Dose Antigen Specific Immunotherapy Menggunakan Self Antigen dsDNA sebagai Terapi Baru Perbaikan Regulasi Sistem Imun Pada Lupus Eritematosus Sistemik.

PENELITI UTAMA : Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, SpPK

ANGGOTA : Dr. dr. Sri Poeranto, M.Kes., Sp.ParK
Dr. dr. Nurdiana, M.Kes
Syaiful Arifin
Thoah Muhajir Albaar
Naya Adi Dharmesta
Khoirunisah Dwi Hartanti
Retna Gumilang
Nafisa Naaz Nisha
Nur Farinah Samad
Priscilla Christina Natan
Muhammad Hazim

UNIT / LEMBAGA : Fakultas Kedokteran – Universitas Brawijaya

TEMPAT PENELITIAN : Laboratorium Sentral Biomedik dan Laboratorium Farmakologi
Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

DINYATAKAN LAIK ETIK.



Catatan :

Keterangan Laik Etik Ini Berlaku 1 (Satu) Tahun Sejak Tanggal Dikeluarkan
Pada Akhir Penelitian, Laporan Pelaksanaan Penelitian Harus Diserahkan Kepada KEPK-FKUB Dalam Bentuk

Lampiran 2. Hasil Analisis Data

1. Lampiran Analisis Statistik Manifestasi Klinis (Berat Badan (BB))

Mencit Normal Dan Mencit PIL Secara Berkala

a. Uji Deskriptif Berat Badan Mencit

	Kelompok	n	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Adaptasi	Mencit Normal	5	21.0000	2.00000	.81650
	Mencit PIL	20	20.6250	1.97402	.40294
Sebelum Injeksi <i>Pristane</i>	Mencit Normal	5	26.1667	2.71416	1.10805
	Mencit PIL	20	24.9583	3.59322	.73346
4 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Mencit Normal	5	31.3333	3.98330	1.62617
	Mencit PIL	20	31.4583	4.13867	.84480
12 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Mencit Normal	5	36.8333	3.37145	1.37639
	Mencit PIL	20	30.4583	4.15963	.84908

b. Uji Normalitas

Kelompok	Shapiro-Wilk	
	Statistic	Sig.
Adaptasi	Mencit Normal	.976 .933
	Mencit PIL	.890 .013
Sebelum Injeksi	Mencit Normal	.859 .184
	Mencit PIL	.859 .003
4 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Mencit Normal	.944 .689
	Mencit PIL	.963 .511
12 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Mencit Normal	.976 .931
	Mencit PIL	.957 .381

c. Uji Homogenitas

		Levene's Test for Equality of Variances	
		F	Sig.
Adaptasi	Equal variances assumed	.175	.679
	Equal variances not assumed		
Sebelum Injeksi <i>Pristane</i>	Equal variances assumed	.064	.802
	Equal variances not assumed		
4 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Equal variances assumed	.072	.791
	Equal variances not assumed		
12 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Equal variances assumed	.612	.441
	Equal variances not assumed		

d. Uji Mann-whitney

Test Statistics ^a		
	Adaptasi	Sebelum Injeksi
Mann-Whitney U	59.500	55.000
Wilcoxon W	359.500	355.000
Z	-.659	-.893
Asymp. Sig. (2-tailed)	.510	.372
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.527 ^b	.402 ^b

a. Grouping Variable: Kelompok

b. Not corrected for ties.

e. Independent Samples Test

		Independent Samples Test						
		t-test for Equality of Means						
		t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
							Lower	Upper
4 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Equal variances assumed	-.067	28	.947	-.12500	1.87657	-3.96898	3.71898
	Equal variances not assumed	-.068	7.937	.947	-.12500	1.83252	-4.35662	4.10662
12 Minggu Setelah Injeksi <i>Pristane</i>	Equal variances assumed	3.466	28	.002	6.37500	1.83953	2.60690	10.14310
	Equal variances not assumed	3.942	9.239	.003	6.37500	1.61721	2.73097	10.01903

2. Lampiran Analisis Statistik Manifestasi Serologis (Kadar Anti-dsDNA) Mencit PIL

a. Uji Deskriptif Kadar anti-dsDNA Mencit PIL

Group	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Anti_ds DNA				
Mencit Normal	5	7.8509	5.00367	2.50184
Mencit PIL	5	80.3581	47.29211	23.64606

b. Uji Normalitas Kadar anti-dsDNA Mencit PIL

Group	Shapiro-Wilk	
	Statistic	Sig.
Anti_dsDNA		
Mencit Normal	.848	.218
Mencit PIL	.923	.553

c. Uji Homogenitas Kadar anti-dsDNA Mencit PIL

Levene's Test for Equality of Variances		
	F	Sig.
Anti_dsDNA		
Equal variances assumed	31.582	.001
Equal variances not assumed		

d. Uji Mann-Whitney Kadar anti-dsDNA Mencit PIL

Anti_dsDNA	
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029

3. Hasil Analisis Data Persentase Sel Th2

a. Hasil Uji Deskriptif

	Descriptive		
	N	Mean	Std. Deviation
K (-)	5	4.1475	.46985
K (+)	5	4.3125	.38767
A	5	3.2825	.64562
B	5	3.3075	1.11933
C	5	3.4400	.52192
Total	25	3.6980	.75481

b. Hasil Uji Normalitas

Variabel	Kelompok	Shapiro-Wilk	
		Statistic	Sig.
Persentase Sel Th2	K (-)	.984	.923
	K (+)	.916	.512
	A	.893	.396
	B	.962	.792
	C	.987	.939

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows. Sig. significance (p value): T-helper 2

K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat

K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL*

A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis I

B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis II

C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis III

c. Hasil Uji Homogenitas

Variabel	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Persentase Sel Th2	1.592	4	15	.228

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows.

Sig. significance (p value); df, degrees of freedom; Th2: T-helper 2

d. Hasil Uji One-Way ANOVA

Variabel		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Persentase Sel Th2	Between Groups	3.885	4	.971	2.100	.132
	Within Groups	6.940	15	.463		
	Total	10.825	19			

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows.

Sig. significance (p value); df, degrees of freedom; Th2: T-helper 2; IL-4: Interleukin 4.

4. Hasil Analisis Data Kadar Interleukin-4 (IL-4)

a. Hasil Uji Deskriptif

	Descriptive		
	N	Mean	Std. Deviation
K (-)	5	1.6500	.12910
K (+)	5	1.6000	.50990
A	5	3.1750	.42720
B	5	4.2250	3.61513
C	5	5.0250	3.42284
Total	25	3.1350	2.43900

b. Hasil Uji Normalitas

Variabel	Kelompok	Shapiro-Wilk	
		Statistic	Sig.
Kadar IL4	K (-)	.992	.969
	K (+)	.984	.923
	A	.996	.988
	B	.828	.162
	C	.847	.217

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak *IBM SPSS Statistics 22 for Windows*. Sig. *significance (p value)*; IL-4: Interleukin 4.

K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat

K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL*

A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis I

B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis II

C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus/PIL* dan diberi EDI dsDNA dosis III

c. Hasil Uji Homogenitas

Variabel	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Kadar IL-4	2.677	4	15	.073

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak *IBM SPSS Statistics 22 for Windows*. Sig. *significance (p value)*; df, *degrees of freedom*; Th2: T-helper 2; IL-4: Interleukin 4.

d. Hasil Uji One-Way ANOVA

Variabel		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kadar IL-4	Between Groups	.644	4	.161	4.354	.016
	Within Groups	.555	15	.037		
	Total	1.199	19			

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak *IBM SPSS Statistics 22 for Windows*. Sig. *significance (p value)*; df, *degrees of freedom*; IL-4: Interleukin 4.

e. Hasil Uji Post-Hoc Rasio Kadar IL-4

Dependent Variable: IL-4

LSD

		Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Difference (I-J)	Lower Bound
K (-)	K (+)	.02814	.13598	.839	-.2617	.3180
	A	-.28232	.13598	.055	-.5722	.0075
	B	-.31279*	.13598	.036	-.6026	-.0230
	C	-.42244*	.13598	.007	-.7123	-.1326
K (+)	K (-)	-.02814	.13598	.839	-.3180	.2617
	A	-.31046*	.13598	.037	-.6003	-.0206
	B	-.34093*	.13598	.024	-.6308	-.0511
	C	-.45058*	.13598	.005	-.7404	-.1607
A	K (-)	.28232	.13598	.055	-.0075	.5722
	K (+)	.31046*	.13598	.037	.0206	.6003
	B	-.03047	.13598	.826	-.3203	.2594
	C	-.14012	.13598	.319	-.4300	.1497
B	K (-)	.31279*	.13598	.036	.0230	.6026
	K (+)	.34093*	.13598	.024	.0511	.6308
	A	.03047	.13598	.826	-.2594	.3203
	C	-.10965	.13598	.433	-.3995	.1802
C	K (-)	.42244*	.13598	.007	.1326	.7123
	K (+)	.45058*	.13598	.005	.1607	.7404
	A	.14012	.13598	.319	-.1497	.4300
	B	.10965	.13598	.433	-.1802	.3995

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows.

Sig. significance (p value); IL-4: Interleukin 4.

K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat

K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus*/PILA = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis IB = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis IIC = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis III

5. Hasil Analisis Data Rasio Kadar IFN γ /IL-4

a. Hasil Uji Deskriptif

Descriptive			
	N	Mean	Std. Deviation
K (-)	5	5173.4069	1914.47497
K (+)	5	7814.1498	2331.94768
A	5	3601.1057	1070.76632
B	5	2934.6087	1083.00177
C	5	2953.5647	1584.27870
Total	25	4495.3671	2407.72034

b. Hasil Uji Normalitas

Variabel	Kelompok	Shapiro-Wilk	
		Statistic	Sig.
Rasio IFN γ /IL4	K (-)	.847	.216
	K (+)	.974	.865
	A	.970	.843
	B	.978	.888
	C	.960	.778

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows. Sig. significance (*p* value); IL-4: Interleukin 4; IFN γ : Interferon- γ .

K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat

K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL

A = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis I

B = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis II

C = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis III

c. Hasil Uji Homogenitas

Variabel	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Rasio IFN γ /IL4	2.592	4	15	.079

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows.

Sig. significance (*p* value); df, degrees of freedom; IL-4: Interleukin 4; IFN γ : Interferon- γ .

d. Hasil Uji One-Way ANOVA

Variabel		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Rasio IFN γ /IL4	Between Groups	68347527.759	4	17086881.940	6.132	.004
	Within Groups	41797700.094	15	2786513.340		
	Total	110145227.853	19			

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows.

Sig. significance (*p* value); df, degrees of freedom; Th2: IL-4: Interleukin 4; IFN γ : Interferon- γ .

e. Hasil Uji Post-Hoc Rasio IFN γ /IL-4Dependent Variable: Rasio IFN γ /IL-4

LSD

		Mean	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
		Difference (I-J)			Lower Bound	Upper Bound
K (-)	K (+)	-2640.74298*	1180.36294	.041	-5156.6270	-124.8589
	A	1572.30121	1180.36294	.203	-943.5828	4088.1853
	B	2238.79818	1180.36294	.077	-277.0859	4754.6822
	C	2219.84220	1180.36294	.080	-296.0419	4735.7262
K (+)	K (-)	2640.74298*	1180.36294	.041	124.8589	5156.6270
	A	4213.04419*	1180.36294	.003	1697.1601	6728.9282
	B	4879.54116*	1180.36294	.001	2363.6571	7395.4252
	C	4860.58518*	1180.36294	.001	2344.7011	7376.4692
A	K (-)	-1572.30121	1180.36294	.203	-4088.1853	943.5828
	K (+)	-4213.04419*	1180.36294	.003	-6728.9282	-1697.1601
	B	666.49696	1180.36294	.581	-1849.3871	3182.3810
	C	647.54099	1180.36294	.591	-1868.3431	3163.4250
B	K (-)	-2238.79818	1180.36294	.077	-4754.6822	277.0859
	K (+)	-4879.54116*	1180.36294	.001	-7395.4252	-2363.6571
	A	-666.49696	1180.36294	.581	-3182.3810	1849.3871
	C	-18.95598	1180.36294	.987	-2534.8400	2496.9281
C	K (-)	-2219.84220	1180.36294	.080	-4735.7262	296.0419
	K (+)	-4860.58518*	1180.36294	.001	-7376.4692	-2344.7011
	A	-647.54099	1180.36294	.591	-3163.4250	1868.3431
	B	18.95598	1180.36294	.987	-2496.9281	2534.8400

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Keterangan: Analisis data menggunakan perangkat lunak IBM SPSS Statistics 22 for Windows.

Sig. significance (p value); IL-4: Interleukin 4; IFN γ : Interferon- γ .

K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat

K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit *Pristane Induced Lupus*/PILA = Kelompok terapi A, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis IB = Kelompok terapi B, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis IIC = Kelompok terapi C, mencit *Pristane Induced Lupus*/PIL dan diberi EDI dsDNA dosis III

6. Hasil Analisis Data Berat Badan setelah Pemberian Terapi EDI

dsDNA

a. Hasil Uji Deskriptif

	Descriptive		
	N	Mean	Std. Deviation
K (-)	5	37.6667	4.50185
K (+)	5	29.0000	2.75681
A	5	33.1667	2.31661
B	5	29.0000	3.22490
C	5	32.5000	3.27109
Total	25	32.2667	4.47162

b. Hasil Uji Normalitas

Kelompok	Tests of Normality		
	Shapiro-Wilk		
	Statistic	Sig.	
K (-)	.975	.923	
K (+)	.971	.899	
BB	A	.823	.094
	B	.804	.064
	C	.894	.340

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

c. Hasil Uji Homogenitas

Test of Homogeneity of Variances

BB	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
	.693	4	25	.604

d. Hasil Uji One-Way ANOVA

ANOVA					
BB	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	308.200	4	77.050	7.090	.001
Within Groups	271.667	25	10.867		
Total	579.867	29			

e. Hasil Uji Post Hoc

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BB

LSD

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
K (+)	K (+)	8.66667 [*]	1.90321	.000	4.7469	12.5864
	A	4.50000 [*]	1.90321	.026	.5803	8.4197
	B	8.66667 [*]	1.90321	.000	4.7469	12.5864
	C	5.16667 [*]	1.90321	.012	1.2469	9.0864
K (-)	K (-)	-8.66667 [*]	1.90321	.000	-12.5864	-4.7469
	A	-4.16667 [*]	1.90321	.038	-8.0864	-.2469
	B	.00000	1.90321	1.000	-3.9197	3.9197
	C	-3.50000	1.90321	.078	-7.4197	.4197
A	K (-)	-4.50000 [*]	1.90321	.026	-8.4197	-.5803
	K (+)	4.16667 [*]	1.90321	.038	.2469	8.0864
	B	4.16667 [*]	1.90321	.038	.2469	8.0864
	C	.66667	1.90321	.729	-3.2531	4.5864
B	K (-)	-8.66667 [*]	1.90321	.000	-12.5864	-4.7469
	K (+)	.00000	1.90321	1.000	-3.9197	3.9197
	A	-4.16667 [*]	1.90321	.038	-8.0864	-.2469
	C	-3.50000	1.90321	.078	-7.4197	.4197
C	K (-)	-5.16667 [*]	1.90321	.012	-9.0864	-1.2469
	K (+)	3.50000	1.90321	.078	-.4197	7.4197
	A	-.66667	1.90321	.729	-4.5864	3.2531
	B	3.50000	1.90321	.078	-.4197	7.4197

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

7. Data Aktivitas Mencit *Pristane Induced Lupus (PIL)*

Perlakuan	Penurunan aktivitas			
	saat adaptasi	saat injeksi <i>pristane</i>	4 minggu setelah injeksi <i>pristane</i>	12 minggu setelah injeksi <i>pristane</i>
Mencit Normal				
1	300	310	610	203
2	310	320	630	210
3	320	330	650	217
4	330	340	670	223
5	340	350	690	230
6	350	360	710	237
Mencit PIL				
1	360	370	730	243
2	370	380	750	250
3	380	390	770	257
4	390	400	790	263
5	400	410	810	270
6	410	420	830	277
7	420	430	850	283
8	430	440	870	290
9	440	450	890	297
10	450	460	910	303
11	460	470	930	310
12	470	480	950	317
13	480	490	970	323
14	490	500	990	330
15	500	510	1010	337
16	510	520	1030	343
17	520	530	1050	350
18	530	540	1070	357
19	540	550	1090	363
20	550	560	1110	370
21	560	570	1130	377
22	570	580	1150	383
23	580	590	1170	390
24	590	600	1190	397

Pre EDI ds DNA

Post EDI dsDNA

K+

243

292

250

300

257

308

263

316

270

324

277

332

A

283

340

290

348

297

356

303

364

310

372

317

380

B

323

388

330

396

337

404

343

412

350

420

357

428

C

363

436

370

444

377

452

383

460

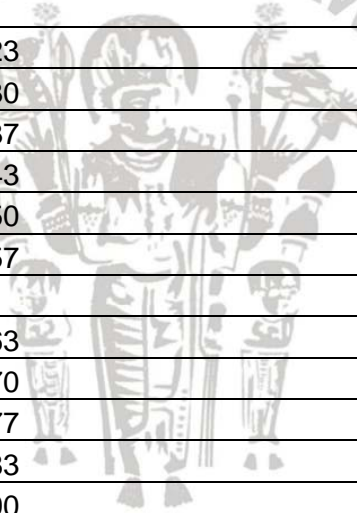
390

468

397

476

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



8. Hasil Uji Korelasi Persentase Sel Th2, Kadar IL-4, dan Rasio IFN γ /IL-4 terhadap Kadar anti-dsDNA (Manifestasi Serologis)

a. Uji Korelasi Pearson antara Persentase Sel Th2 dengan Kadar anti-dsDNA

		Anti-dsDNA	Th2
Anti-dsDNA	Pearson Correlation	1	.074
	Sig. (2-tailed)		.794
	N	25	25
Th2	Pearson Correlation	.074	1
	Sig. (2-tailed)	.794	
	N	25	25

b. Uji Korelasi Pearson antara Kadar IL-4 dengan Kadar anti-dsDNA

		Anti-dsDNA	IL4
Anti-dsDNA	Pearson Correlation	1	-.233
	Sig. (2-tailed)		.403
	N	25	25
IL4	Pearson Correlation	-.233	1
	Sig. (2-tailed)	.403	
	N	25	25

Lampiran 3. Tabel Data Penelitian

a. Manifestasi Klinis Dan Manifestasi Serologis Mencit *Pristane*

Induced Lupus (PIL)


	BB				Bulu Rontok		Aktivitas		Anti-dsDNA (ng/ml)
	Pre		Post		Pre	Post	Pre	Post	
	<i>Adaptasi</i>	<i>Sebelum Injeksi Pristane</i>	<i>4 Minggu Setelah Injeksi Pristane</i>	<i>12 Minggu Setelah Injeksi Pristane</i>					
Mancit Normal	21.0 ± 2.00	26.2 ± 2.71	31.3 ± 3.98	36.8 ± 3.37	Tidak ada	Tidak Ada	Tidak ada penurunan	Tidak ada penurunan	7.9 ± 5.0
Mencit PIL	20.6 ± 1.97	25.0 ± 3.59	31.5 ± 4.14	30.5 ± 4.16	Tidak ada	Ada	Tidak ada penurunan aktifitas	Ada penurunan aktifitas	80.4 ± 47.3

b. Efek Terapi EDI dsDNA Terhadap Mencit *Pristane Induced Lupus*

(PIL)

	BB (g)	Bulu Rontok		Penurunan Aktivitas		Anti-dsDNA (ng/ml)	Jumlah Sel Th2 (%)	Kadar IL-4 (pg/ml)	Rasio IFN γ /IL-4
		<i>Pre</i>	<i>Post</i>	<i>Pre</i>	<i>Post</i>				
K (-) n=5	37.7 ± 4.5	0/5	0/5	0%	0%	7.9 ± 5.0	4,15 ± 0,47	1,65 ± 0,13	5173.41 ± 1914.47
K (+) n=5	29.0 ± 2.8	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)	63.4 ± 40.5	4,31 ± 0,39	1,60 ± 0,51	7814.15 ± 2331.95
A n=5	33.2 ± 2.3	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)	61.7 ± 21.4	3,28 ± 0,64	3,17 ± 0,42	3601.11 ± 1070.77
B n=5	29.0 ± 3.2	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)	5.7 ± 4.7	3,31 ± 1,12	4,22 ± 3,61	2934.61 ± 1083.00
C n=5	32.5 ± 3.3	5/5	5/5	Menurun (100%)	Tetap (100%)	33.6 ± 31.6	3,44 ± 0,52	5,02 ± 3,42	2953.56 ± 1584.28

Lampiran 4. Bukti Submit Jurnal

 Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology	
Home	Author Instructions
Reviewer Instructions	Journal Home
Logout	
Manuscript #	AP-090218-0262
Current Revision #	0
Submission Date	2018-02-09 00:44:19
Current Stage	Awaiting Submission
Title	Desensitization of Self-Antigen dsDNA Inhibits B and T cell Functions by Modulating T-Reg cell as Regulator Immune System in Pristane-induced Lupus Mice Model
Running Title	SLE, dsDNA, escalating dose, T-reg
Manuscript Type	Original Article
Section	Basic Immunology
Corresponding Author	Prof. Kusworini Handono (Brawijaya University)
Contributing Authors	Dr. Nurdiana, Dr. Sri Poeranto, Dr. Syaiful Arifin, Dr. Kholrunisah Hartanti, Dr. Thoha Albasar, Dr. Retna Gumilang, Dr. Naya
Abstract	<p>Background: SLE is an autoimmune disease. Immunosuppressant and steroid therapy have not shown satisfactory results. Another method of therapy that is now also being developed is vaccines and escalating dose immunotherapy using self-antigen.</p> <p>Objective: The aim of this study was to develop a novel therapeutic method for improving immune system regulation in SLE using self-antigen dsDNA in pristane-induced lupus mice model.</p> <p>Methods: 25 female BALB/c mice were divided into 2 groups: 20 mice received a single i.p. injection of 0.5 cc pristane and 5 mice as healthy controls. 8 weeks after injection, 15 pristane-induced lupus mice were divided into three groups: 0,005 µg, 0,05 µg, and 0,5 µg. The doses would increase ten times every week. dsDNA were complexed with PEI. A total of 25 BALB/c mice were analyzed for autoantibodies dsDNA and ANA, proinflammatory cytokines IL-17, and TGF-β from serum using ELISA and T-Reg, Th17, B cell proliferation from spleen using flow cytometry.</p> <p>Results: Escalating dose antigen specific immunotherapy with dsDNA decreased ANA levels (30.42 vs 1.6 p=0.02) significantly, decreased anti-dsDNA (63.4 vs 5.6 p=0.03), decreased dendritic cell maturation (2.43 vs 0.75 p=0.02) and not significantly decreases Th17 cells (5,62 vs 3,62 p=0,18) but the result tend to get lower. Increased T-reg proliferation (10,57 vs 18,38 p=0,00) and level of TGF-β (261,02 vs 732 p=0,02) significantly compare to control positive.</p> <p>Conclusion: Desensitization using self-antigen dsDNA was able to modulate T-Reg and inhibit B and T cell functions in lupus mice model.</p> <p>Keywords: SLE, dsDNA, escalating dose, tolerance, T-regulator</p>

