

Bidang Unggulan *: Kesehatan Gigi
Kode/ Nama Rumpun Ilmu **: 312/ Imunologi

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**PERAN DAN FUNGSI IMMUNE SYSTEM (INNATE DAN ADAPTIVE IMMUNITY)
MELALUI PROLIFERASI SEL LIMFOSIT DAN EKSPRESI IL-10, IFN- γ , CD3, CD16,
CD19, CD59, CD4, CD8 PADA SEVERE EARLY CHILDHOOD CARIES**

TAHUN KE-2 DARI RENCANA 3 TAHUN

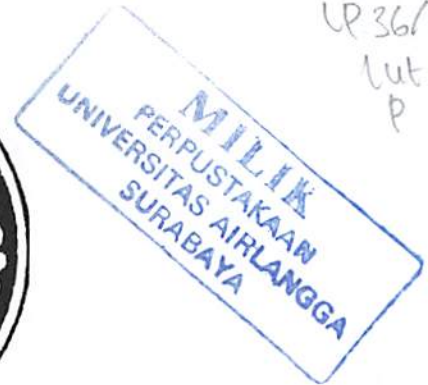
| | |
|---|-------------------|
| Dr. Muhammad Luthfi, drg., MKes. | 0006036704 |
| Priyawan Rachmadi, drg., Ph.D | 0018046009 |
| Aqsa Sjuhada Oki, drg., MKes. | 0003106903 |

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

Bidang Unggulan *: Kesehatan Gigi
Kode/ Nama Rumpun Ilmu **: 312/ Imunologi

**LAPORAN AKHIR TAHUN
PENELITIAN DASAR UNGGULAN PERGURUAN TINGGI
(PDUPT)**



**PERAN DAN FUNGSI IMMUNE SYSTEM (INNATE DAN ADAPTIVE IMMUNITY)
MELALUI PROLIFERASI SEL LIMFOSIT DAN EKSPRESI IL-10, IFN- γ , CD3, CD16,
CD19, CD59, CD4, CD8 PADA SEVERE EARLY CHILDHOOD CARIES**

TAHUN KE-2 DARI RENCANA 3 TAHUN

| | |
|---|-------------------|
| Dr. Muhammad Luthfi, drg., MKes. | 0006036704 |
| Priyawan Rachmadi, drg., Ph.D | 0018046009 |
| Aqsa Sjuhada Oki, drg., MKes. | 0003106903 |

**DIBIYAI OLEH:
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT
DIREKTORAT JENDRAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN
KEPADA MASYARAKAT
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : PERAN DAN FUNGSI IMMUNE SYSTEM (INNATE DAN ADAPTIVE IMMUNITY) MELALUI PROLIFERASI SEL LIMFOSIT DAN EKSPRESI IL-10, IFN-, CD3, CD16, CD56, CD19, CD4, CD8 PADA SEVERE EARLY CHILHOOD CARIES

Peneliti/Pelaksana

Nama Lengkap : Dr MUHAMMAD LUTHFI, M.Kes
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga
 NIDN : 0006036704
 Jabatan Fungsional : Lektor
 Program Studi : Kedokteran Gigi
 Nomor HP : 081357898957
 Alamat surel (e-mail) : m.luthfi@fkg.unair.ac.id

Anggota (1)

Nama Lengkap : PRIYAWAN RACHMADI Ph.D
 NIDN : 0018046009
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Anggota (2)

Nama Lengkap : AQSA SJUHADA OKI M.Kes
 NIDN : 0003106903
 Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

Institusi Mitra (jika ada)

Nama Institusi Mitra : -
 Alamat : -
 Penanggung Jawab : -
 Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 2 dari rencana 3 tahun
 Biaya Tahun Berjalan : Rp 100,000,000
 Biaya Keseluruhan : Rp 190,700,000



Mengetahui,
 Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi UNAIR

(Prof. Dr. Anita Yulianti, drg., M.Kes.)
 NIP/NIK 195807091985032001

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018
 Ketua,

(Dr. MUHAMMAD LUTHFI, M.Kes)
 NIP/NIK 196703061996011001

Menyetujui,
 Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi UNAIR

(Prof. Drs. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D.)
 NIP/NIK 196705071991021001

RINGKASAN

Karies gigi merupakan salah satu penyakit kronis, bersifat multifaktorial yang terjadi karena pergeseran mikrobiologi dalam biofilm. Pergeseran flora biofilm yang disebabkan kebersihan rongga mulut yang jelek, faktor genetik, dan perubahan kekebalan dalam waktu yang lama menyebabkan peningkatan *Streptococcus mutans* yang berakibat pada penurunan pH dan demineralisasi pada permukaan gigi. *Immune system* tubuh berfungsi untuk mempertahankan tubuh manusia dari *foreign invaders*. Sistem kekebalan tubuh yang terganggu dapat menyebabkan berbagai penyakit infeksi, peran *Immune system* tubuh menjadi semakin penting dalam memahami mekanisme pencegahan penyakit. Fungsi efektif dari *immune system* tubuh adalah untuk segera mengeradikasi agen infeksi dari tubuh. Hal ini dilakukan dengan tindakan sistem yang saling interaktif, yaitu *innate* (sangat spesifik) cepat tetapi non-spesifik dan *adaptive immune system*. **Tujuan** Mengidentifikasi faktor *immune respons* baik *innate* maupun *adaptive immunity* yang berperan pada terjadinya *severe early childhood caries*. **Target** dari penelitian ini pada tahun ke-2 adalah deteksi marker *innate immunity* melalui sel limfosit yang mengekspresikan CD3, CD16 dan CD59 dari saliva *severe early childhood caries* dan bebas karies **Metode** penelitian adalah melakukan deteksi ekspresi, CD3, CD16 dan CD19 menggunakan *flow cytometry* pada *severe early childhood caries* dan bebas karies. **Hasil:** Berdasarkan hasil analisis statistik ekspresi CD3, CD16 dan CD19 menunjukkan adanya perbedaan rerata antara kelompok S-ECC dengan kelompok Free Caries. Berdasarkan uji levene test ekspresi CD3 pada S-ecc dan Free Caries menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara 2 kelompok dengan nilai $P < 0.05$ yaitu sebesar 0.031. **Kesimpulan:** Terjadi peningkatan ekspresi CD3, CD16 dan CD19 pada saliva S-ECC

Key word : *severe early childhood caries* , *innate immunity*, *adaptive immunity*, Netrofil.



PRAKATA

Puji dan syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT sehingga kami bisa menyelesaikan laporan kemajuan penelitian dengan judul **“PERAN DAN FUNGSI IMMUNE SYSTEM (INNATE DAN ADAPTIVE IMMUNITY) MELALUI PROLIFERASI SEL LIMFOSIT DAN EKSPRESI IL-10, IFN- γ , CD3, CD16, CD56, CD19, CD4, CD8 PADA SEVERE EARLY CHILDHOOD CARIES.**

Penelitian ini merupakan penelitian tahun ke dua dengan tujuan menganalisis sebagai marker deteksi dini terjadinya *severe early childhood caries* melalui ekspresi, CD3, CD16 dan CD19 pada saliva *severe early childhood caries*.

Pada kesempatan ini kami mengucapkan banyak terima kasih kepada DIPA DITLITABMAS Tahun Anggaran 2018 sesuai dengan Surat Keputusan Rektor Universitas Airlangga Tentang Pelaksanaan Hibah Kegiatan Penelitian dan Program Pengabdian kepada Masyarakat Baru dan Lanjutan Dana DIPA Ditlibtamas Tahun Anggaran 2018 Nomor: 01/E/KPT/2018 perjanjian/ kontrak nomer: 200/UN3.14/LT/2018 yang telah membiayai penelitian pada tahun ke dua ini.

Terima kasih kami haturkan pula kepada LPI Universitas Airlangga yang telah memfasilitasi pengadakan, pengiriman proposal dan memberi wadah kepada kami untuk melakukan penelitian.

Akhir kata, kami meyakini masih banyaknya keterbatasan dalam hasil penelitian ini yang diakibatkan karena berbagai kendala yang harus dihadapi dalam pelaksanaannya. Sehubungan dengan hal tersebut kami siap menerima masukan dan saran untuk kesempurnaan penelitian ini.

Surabaya, 14 November 2018



DAFTAR ISI

| | |
|--|-----|
| Sampul..... | i |
| HalamanPengesahan..... | ii |
| Ringkasan..... | iii |
| Prakata..... | iv |
| Daftarisi..... | v |
| DaftarTabel..... | vii |
| DaftarGambar..... | vii |
| Lampiran..... | vii |
| BAB I. PENDAHULUAN | |
| 1.1. Latarbelakang..... | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah, urgensi penelitian..... | 2 |
| BAB II. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1. Karies gigi..... | 3 |
| 2.1.1. Komplikasi <i>Early Childhood Caries</i> | 3 |
| 2.1.2. Gangguan Pertumbuhan dan Bicara | 4 |
| 2.1.3. Gangguan Kognitif. | 4 |
| 2.1.4. Gangguan Pikologis..... | 4 |
| 2.1.5. Fokus Infeksi..... | 5 |
| 2.2. <i>Streptococcus mutans</i> | 5 |
| 2.3. <i>Immune System</i> | 6 |
| 2.3.1. <i>Innate Immune System</i> | 7 |
| 2.3.2. Perkemagan <i>Thymocytes</i> dan sel T Sub Set..... | 8 |
| BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT | |
| 3.1. Tujuan..... | 9 |
| 3.2. Manfaat..... | 9 |
| BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN | |
| TAHUN KE-2 | |
| 3.1. Isolasi Limfosit..... | 9 |
| 3.2. Kultur Limfosit dan Pemeliharaan..... | 10 |

| | |
|--|----|
| 3.3. Preservasi dan Penyimpanan Sel | 10 |
| 3.4. Regenerasi Sel..... | 10 |
| 3.5. Analisis Ekspresi CD3, CD16 dan CD19 dengan Flow Cytometry..... | 10 |

BAB V. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

| | |
|------------------|----|
| 5.1. Hasil..... | 12 |
| 5.2. Luaran..... | 15 |

BAB VI. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA.....15

BAB VII. KESIMPULAN DAN SARAN

| | |
|----------------------|----|
| 7.1. Kesimpulan..... | 15 |
| 7.2. Saran..... | 15 |

DAFTAR PUSTAKA..... 1

DAFTAR TABEL

| | Hal |
|---|------------|
| Tabel 5.1. Tabel 1. Hasil deteksi ekspresi data ekspresi CD3, CD16, CD19 hasil pemeriksaan menggunakan uji flow cytometry dalam persen (%) | 12 |
| Tabel 5.2. Rerata dan standard deviasi ekspresi CD3, CD16 dan CD19 setelah diinkubasi 24 jam yang dianalisis dengan uji Flow Cytometry dan uji statistik t test | 13 |
| Tabel. 5.3. independent test menggunakan levene test ekspresi CD3, CD16 dan CD19 setelah diinkubasi 24 jam yang dianalisis dengan uji Flow Cytometry antara S-ECC dan Free Caries | 13 |

DAFTAR GAMBAR

| | Hal |
|---|------------|
| Gambar 3.1. Grafik rerata ekspresi CD3, CD16 dan CD19 pada saliva setelah setelah diinkubasi 24 jam S- ECC dan Free Caries yang dianalisis dengan uji flow cytometry dan uji statistik t test | 13 |
| Gambar 3.2. Ekspresi CD3 (5.85%) dan ekspresi CD19 (7.99%) dari saliva severe Early Childhood Caries | 14 |
| Gambar 3.3. Ekspresi CD16 (0.30 %) dan ekspresi CD19 (6.79 %) dari saliva severe Early Childhood Caries | 14 |
| Gambar 3.4. Ekspresi CD3 (5.73 %) dan ekspresi CD19 (7.47 %) dari saliva anak Free Caries | 14 |
| Gambar 3.5. Ekspresi CD16 (0.42 %) dan ekspresi CD19 (6.65 %) dari saliva anak Free Caries | 15 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | Hal |
|--|------------|
| 1. Laik etik penelitian | 18 |
| 2. Bukti seminar | 19 |
| 3. Bukti accepted jurnal Dental Research Journal (DRJ) scopus Q2 | 20 |
| 4. Draft Artikel Ilmiah pro publish scopus Q4 | 21 |
| 5. Draft Artikel Ilmiah pro publish scopus Q4 | 27 |
| 6. Draft HAKI | 34 |



BAB I PENDAHULUAN

Latar Belakang

Karies gigi adalah hasil proses degradasi kimia pada permukaan gigi yang disebabkan oleh mikroba pada plak gigi yang menyebabkan hancurnya enamel, dentin atau sementum (Fejerskov, 2008). Karies gigi merupakan penyakit yang bersifat *irreversibel* yang perlu mendapat perhatian mengingat dampak yang ditimbulkannya sangat besar pada anak karena dapat menyebabkan gangguan kesehatan lebih jauh seperti kesulitan mengunyah, malnutrisi, gangguan gastrointestinal, gangguan pertumbuhan khususnya berat dan tinggi badan, artikulasi bicara, gangguan perkembangan sosial dan kognitif sehingga merupakan masalah terus menerus yang membebani anak-anak (Clarke *et al.*, 2006), serta menyebabkan gangguan psikologis (Moore *et al.*, 2004) dan apabila tidak diobati dapat menyebabkan efek lebih parah, yaitu kematian (Otto, 2007).

Prevalensi karies gigi pada anak prasekolah masih sangat tinggi, hasil penelitian menunjukkan bahwa prevalensinya mencapai 80% di berbagai negara berkembang dengan prosentase lima kali lebih banyak dari penyakit asma, tujuh kali lebih banyak dari alergi, serta empat belas kali lebih banyak dari bronkitis kronis (Filstrup *et al.*, 2003; Habibian *et al.*, 2002). Di Indonesia hasil penelitian Fitriani pada tahun 2007 di Semarang, menunjukkan bahwa sebesar 90,5% di perkotaan dan 95,9% di pedesaan anak usia dini menderita karies gigi, sedangkan di Surabaya pada tahun 2006 hasil penelitian yang dilakukan Indawati menunjukkan bahwa 74% anak usia dini menderita karies gigi.

Proses terjadinya karies adalah hasil dari pergeseran yang bertahap dan konsisten dalam keseimbangan demineralisasi dan remineralisasi email gigi yang secara langsung dipengaruhi oleh *S.mutans* merupakan salah satu agen etiologi yang paling penting sebagai penyebab karies gigi (Takahashi and Nyvad, 2008).

Patogenesis molekuler karies gigi adalah rentan terhadap intervensi kekebalan tubuh. Antibodi bisa memblokir reseptor diperlukan untuk kolonisasi (misalnya, adhesins) atau akumulasi (misalnya, Glucan mengikat domain dari Gbps dan GTF), atau menonaktifkan enzim GTF bertanggung jawab untuk glukan Pembentukan (MatsumotoNakano *et al.*, 2007).

Immune system tubuh berfungsi untuk mempertahankan tubuh manusia dari *foreign invaders*. Sistem kekebalan tubuh yang terganggu dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti infeksi, penuaan, alergi, gangguan berbagai organ serta penyakit

lainseperti kanker dan AIDS (Cherng *et al.*, 2008). Peran *Immune system* tubuh menjadi semakin penting dalam memahami mekanisme pencegahan penyakit (Volkman *et al.*, 2008). Fungsi efektif dari *immune system* tubuh adalah untuk segera mengeradikasi agen infeksi dari tubuh. Hal ini dilakukan dengan tindakan sistem yang saling interaktif, yaitu *innate*(sangat spesifik) cepat tetapi non-spesifik dan *adaptive immune system* (Volman *et al.*, 2008).

Kekebalan dalam rongga mulut adalah sistem yang membuat keseimbangan dengan cara mengendalikan berbagai mikroba yang terdapat dalam rongga mulut yang bersifat fluktuatif karena agresi eksternal. Mulut adalah jalan masuk dan pertukaran dengan lingkungan luar ooleh karena itu faktor homeostasis harus dievaluasi dan dikendalikan oleh sistem kekebalan tubuh (Zasloff, 2002; Wu *et al.*, 2014).

Berbagai pencegahan karies gigi telah dilakukan, misalnya dengan menggosok gigi yang benar, fluoridasi dengan topikal aplikasi, dan pembuatan vaksin yang sampai saat ini belum menunjukkan hasil yang diharapkan (Trigg, *et al.*, 2001), oleh karena itu penelitian ini bertujuan mengidentifikasi faktor resiko karies gigi berupa *immune system* baik *innate* maupun *adaptive immunity* yang salah satu fungsinya adalah membunuh patogen yang menyerang host.

Berdasarkan hal tersebut diatas timbul rumusan masalah apakah *immune system* baik *innate* maupun *adaptive immunity* berperan pada terjadinya *severe early chldhood caries*. Adapun tujuan khusus dari penelitian ini pada tahun ke-2 adalah menganalisis deteksi marker *innate immunity* melalui ekspresi CD3, CD16, CD19 pada saliva *severe early chldhood caries* dan bebas karies.

Urgensi penelitian dikarenakan prevalensi karies gigi pada anak usia prasekolah yang masih terus meningkat maka deteksi marker *innate* dan *adaptive immunity* yaitu ekspresi IL-10, IFN- γ , CD3, CD16, CD19, CD59, CD4,CD8 dapat dipakai untuk mencegah terjadinya *severe early chldhood caries* melalui pentingnya pemberian immunomodulator.



BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Karies Gigi

Karies gigi adalah salah penyakit menular yang paling umum pada manusia dan masih menjadi masalah kesehatan yang signifikan di berbagai negara, baik negara maju maupun berkembang (Mitchell, 2003). Karies gigi merupakan hasil interaksi dari mikroflora rongga mulut yang ada pada permukaan gigi, nutrisi, dan lingkungan mulut dalam kurun waktu tertentu menghasilkan lesi pada enamel gigi (Takahashi and Nyvad 2008).

Karies gigi adalah penyakit kronis yang paling umum pada anak-anak (Banas, 2004), dan merupakan penyakit multifaktorial yang melibatkan interaksi faktor risiko yang kompleks yaitu: genetik, diet, lingkungan dan perilaku (Fejerskov, 2004). Pergeseran pH dan fisiologis rongga mulut dapat menyebabkan perubahan dalam komposisi mikroba biofilm rongga mulut (Fejerskov, 2004). Kelompok *acidogenic* yaitu *S. mutans* dan *S. sobrinus* adalah salah satu mikroba kariogenik yang berada di dalam rongga mulut yang merupakan bakteri paling dominan yang berhubungan dengan karies gigi. Rongga mulut merupakan tempat berbagai *genotipe* yang berbeda dari *S. mutans*, yang sudah ditemukan sebanyak 52 *genotipe* baik dalam saliva dan plak gigi (Napimoga *et al.* 2005; Tabchoury *et al.* 2008). Beberapa *genotipe S. Mutans* memiliki kemampuan berkoloni dan mendominasi lingkungan spesifik rongga mulut (Napimoga *et al.* 2005). Individu dengan karies tinggi dibandingkan karies rendah menunjukkan perbedaan yang signifikan prevalensi strain *S mutans* (Banas, 2004).

2.1.1. Komplikasi *Early Childhood Caries*

Selain kognitif, faktor lingkungan, dan perilaku karies gigi pada *early childhood* dapat mengakibatkan perkembangan lebih lanjut berupa komplikasi yang lebih signifikan. Kerusakan akibat karies gigi pada *early childhood* dapat berdampak baik fisik maupun psikologis dan dapat menciptakan kebiasaan jelek pada masa anak menjadi dewasa.

2.1.2. Gangguan Pertumbuhan dan Bicara

Pada *early childhood* yang mengalami rasa sakit akibat infeksi karies gigi mengalami kesulitan makan sehingga menyebabkan kekurangan gizi yang sangat diperlukan untuk pertumbuhan yang optimal (Sheiham, 2007). Gangguan pertumbuhan ini disebabkan karena *early childhood* merasa kesakitan dalam mengkonsumsi makanan

sehingga anak menjadi kekurangan nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan fisik dan kognitif sehingga pada *early childhood* yang mengalami karies gigi mempunyai berat badan lebih rendah dibanding kelompok usia yang sama dan mungkin pertumbuhan dan perkembangannya menjadi terhambat (Clarke *et al.*, 2006).

Pada *early childhood* yang mengalami karies gigi juga mempengaruhi fungsi bicaranya karena giginya menjadi nekrosis yang akhirnya harus dicabut, walaupun tanpa struktur gigi yang lengkap anak-anak masih mampu berkomunikasi (AAPD, 2008). Proses bicara yang terganggu akan mempengaruhi perkembangan aspek sosial terutama anak mengalami kesulitan berpartisipasi dalam percakapan penting dengan temannya.

2.1.3. Gangguan Kognitif

Early childhood yang mengalami gangguan gigi lebih banyak tidak masuk sekolah bila dibandingkan dengan anak-anak dengan gigi yang sehat sehingga dapat menghambat perkembangan fisik anak, perkembangan sosial dan kognitif karena anak kehilangan kesempatan untuk berinteraksi dengan lingkungannya (Clarke *et al.* 2006). Pada *early childhood* yang mengalami karies gigi yang merasa kesakitan mungkin masih bisa bersekolah tetapi sulit untuk berkonsentrasi memperhatikan pelajaran di sekolah (Ramage, 2000). Rasa sakit karena karies kronis yang tidak diobati bisa menghambat perkembangan kognitif, pertumbuhan psikososial (Clarke *et al.*, 2006).

2.1.4. Gangguan Psikologis.

Early childhood dengan kelainan gigi akan terganggu sekolahnya (Dibiase and Sandler, 2001), gigi yang terlihat kuning atau hitam karena lesi karies pada gigi, ataupun adanya gigi yang hilang, serta adanya maloklusi menyebabkan anak merasa malu untuk tersenyum atau berkomunikasi daripada anak dengan gigi yang baik yang pada akhirnya menyebabkan perkembangan bicara yang buruk serta dengan kondisi gigi yang jelek oleh karena karies dapat menyebabkan anak menjadi kurang aktif dalam bergaul dengan teman sebayanya (Moore *et al.*, 2004). Maloklusi bisa menjadi akibat langsung dari gigi sulung yang hilang terlalu dini. Ketika gigi permanen berkembang dan siap untuk erupsi, akar gigitelah hilang menyebabkan gigi permanen erupsi ke arah luar. Gigi sulung yang hilang terlalu dini menyebabkan gigi permanen yang tumbuh dibawahnya tidak memiliki jalan untuk mengikuti dan mungkin erupsi pada daerah yang tidak diinginkan. Gigi yang hilang menyisakan ruang kosong sehingga secara alami gigi bergerak ke ruang yang kosong tersebut,

sedangkan gigi permanen yang di atasnya ruang yang kosong pertumbuhannya melayang sehingga menyebabkan maloklusi yang berdampak anak menjadi malu untuk tersenyum.

2.1.5. Fokus Infeksi.

Bakteri dalam karies yang tidak diobati dapat menyebabkan efek lebih parah pada tubuh, termasuk kematian (Otto, 2007). Asupan gizi buruk yang pada anak prasekolah berhubungan dengan nyeri karies gigi dapat menurunkan asupan makanan yang tepat sehingga sistem kekebalan tubuh melemah sehingga menjadi lebih rentan terhadap infeksi. Mikroba penyebab karies gigi yang masuk ke dalam aliran darah dalam hal ini *S. mutans* dapat masuk ke organ vital dalam tubuh termasuk otak, paru-paru dan jantung dan dapat menyebabkan infeksi yang mengancam jiwa dan dapat juga menyebabkan sepsis sistemik yang merupakan satu kasus menyebabkan kematian, *S. mutans* yang menginfeksi otak pada anak usia 12 tahun yang menderita *meningocephalitis* dan *empiema subdural* dari abses gigi yang tidak diobati (Otto, 2007).

Karies gigi yang tidak dirawat juga bisa menyebabkan kerusakan jaringan sekitarnya karena *S. mutans* dapat menyebar ke jaringan disekitar gigi yang dapat mengakibatkan radang gusi atau periodontitis (Califano, 2003). Abses gigi akibat adanya pembusukan gigi kronis yang tidak diobati dapat berkembang dari gingivitis ke selulitis pada mandibula yang merupakan infeksi akut yang membutuhkan pengobatan antibiotik IV yang harganya sangat mahal dan mungkin

2.2. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

Streptococcus mutans pertama kali diisolasi dari lesi karies oleh Clarke *et al.* pada awal 1924, namun tidak sampai tahun 1960 terjadi perkembangan dibidang taksonomi dimana para peneliti mencocokkan strain streptokokus rongga mulut dari lesi karies manusia dengan *S. mutans* hasil isolasi dari Clark pada tahun 1924 (Loesche 1986, Hamada and Slade 1980). Tetapi saat itu masih tetap bahwa *S. mutans* adalah nama yang diberikan kepada semua *streptokokus oral* yang diisolasi dari lesi karies yang dapat memfermentasi manitol dan sorbitol, yang menghasilkan ekstraseluler glukon dan kariogenik pada hewan model karies. Mikroba tersebut disebut *mutans* karena pada pengecatan Gram tampak adanya versi *mutan* dari *streptokokus*, dengan penampakan yang lebih kecil dan lebih lonjong (Loesche 1986).

Strain *S. mutans* terdiri berbagai serotipe yaitu serotipe a- h. Hasil analisis DNA strain *Streptococcus* dibagi menjadi beberapa spesies, yaitu : *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S.*

criceti, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macaccae*, *S. Ratti*, dan *S. hyovaginalis* (Facklam 2002). *Streptococcus mutans* adalah bakteri yang bersifat fakultatif anaerob, non-motil, kokus Gram positif dan bersifat katalase negatif yang berperan penting pada etiologi karies gigi pada anak usia dini (Tanzer *et al.* 2001). Tidak berkapsul, uji tes biokimia dengan media gula menghidrolisis manitol, sorbitol, *raffinose*, *salicin*, *esculin* menjadi asam kecuali arginin dan pada pembiakan pada media agar darah akan menghemolisis darah, membuat warna hijau pada alpha hemolisis, tetapi beberapa strain adalah beta hemolisis. Pada media selektif *Triptan Yeast Cystein (TYQ)* agar dengan sukrosa dan bacitrasin, koloni berwarna putih jernih, kenyal, permukaan halus, tepi tidak rata, melekat kuat, pada media cair *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)* berupa endapan yang berbutir, menempel pada dinding tabung, *Streptococcus mutans* merupakan mikroorganisme fakultatif anaerob yang tumbuh optimum pada suhu 25- 45°C, dengan pH 5,0- 6,5 (Balakrishnan, 2000).

Penelitian kohort selama 1-3 tahun pada dari *early childhood* usia 2- 4,5 tahun berada di Skandinavia dan di Japan (Seki *et al.* 2003) menyimpulkan bahwa bahwa keberadaan *S. mutans* dalam plak atau saliva anak prasekolah bebas karies secara signifikan meningkatkan risiko karies (Thenisch *et al.* 2006). Spesies *S. mutans* yang menyebabkan karies gigi adalah *S. Mutans* (serotipe c, e, f) (Tanzer *et al.* 2001) yang berhasil diisolasi pada 95 persen anak anak dengan tingkat karies tinggi dengan beragam etnis dan status sosial ekonomi

3.3. Immune System

Immune system tubuh berfungsi mempertahankan tubuh manusia dari *foreign invaders*. Sistem kekebalan tubuh yang terganggu dapat menyebabkan berbagai penyakit seperti infeksi, penuaan, alergi, gangguan berbagai organ serta penyakit lain seperti kanker dan AIDS (Cherng *et al.*, 2008). Peran *Immune system* tubuh menjadi semakin penting dalam memahami mekanisme pencegahan penyakit (Volkman *et al.*, 2008). *Immune system* selalu mendapat tantangan oleh invasi patogen, seperti bakteri, jamur, virus, parasit dan racun yang sangat membahayakan system kekebalan tubuh. Disfungsi kekebalan dapat berupa kurang aktifnya kekebalan tubuh, melemahnya fungsi kekebalan tubuh (*immunodeficiency*) atau fungsi yang terlalu aktif dari kekebalan tubuh (autoimunitas atau penyakit autoimun).

Sistem kekebalan tubuh yang lemah dapat menyebabkan berbagai infeksi oleh patogen dan, dalam beberapa kasus, seperti misalnya kanker. Sistem kekebalan tubuh yang terlalu aktif dapat menyebabkan reaksi alergi seperti asma dan sinusitis atau gangguan autoimun seperti lupus dan *multiple sclerosis*. Fungsi yang paling efektif dari sistem kekebalan tubuh adalah untuk segera mengeradikasi agen infeksi dari tubuh. Hal ini dilakukan dengan tindakan sistem yang saling interaktif, yaitu innate (sangat spesifik) cepat tetapi non-spesifik dan adaptive immune system seperti yang ditunjukkan pada tabel 3 (Volman *et al.*, 2008).

3.3.1 *Innate dan adaptive immunity*

Innate immune system adalah sistem pertahanan individu yang dibawa sejak lahir, termasuk hambatan epitel seperti kulit, saluran pencernaan, paru-paru dan saluran kemih, yang semuanya merupakan garis pertahanan pertama. Epitel bertindak sebagai penghalang fisik untuk masuknya mikroba dan juga memproduksi berbagai faktor antimikroba. *Innate immune response* umumnya tidak spesifik, tidak merespon dengan kuat untuk pertemuan kedua dengan mikroba tertentu oleh karena tidak menunjukkan respon memori (Pruett, 2003). Sel yang memediasi respon ini meliputi: neutrofil, eosinofil, basofil, makrofak, natural killer (NK) sel dan sistem komplemen.

Virus tidak memiliki alat untuk memperbaharui dan mereplikasi diri, maka virus perlu bagi menembus sel host yang terinfeksi untuk mendominasi replikatifnya, oleh karena itu sangat penting bagi host untuk menemukan cara untuk membunuh sel yang terinfeksi sebelum virus dapat mereproduksi. Sel NK memediasi fungsi ini dengan memfasilitasi lisisnya sel virus yang terinfeksi atau tumor (Roitt *et al.*, 2005).

Makrofak membantu dalam menghilangkan mikroba intraseluler dan agen infeksius melalui fagositosis. Mediator tertentu dari sel T dapat meningkatkan kemampuan makrofak untuk menghancurkan mikroba tersebut melalui berbagai mekanisme, yaitu pengembangan *nitric oxide*, reaktif oksigen, aktivasi enzim proteolitik dan produksi sitokin (Paul, 2003), selain itu makrofak dapat bertindak sebagai *antigen presenting cells* (APC) dan merekrut bantuan dari sitokin yang aktif untuk memproduksi sel T CD4+ dalam mengatur fungsinya. Sel-sel ini memainkan peran sentral dalam fagositosis patogen, produksi radikal bebas (*oxidative burst*), produksi sitokin dan presentasi antigen ke limfosit (Paul, 2003). Berbeda dengan imunitas yang cepat dan

kekebalan bawaan non-spesifik, respons imun adaptif mengacu pada jenis imunitas spesifik host berkembang setelah terpapar antigen yang cocok (Prescott *et al.*, 1996). Hal ini terdiri dari dua komponen; imunitas humoral dan cell mediated immunity.

Sel-sel efektor utama respon humoral adalah limfosit B yang dirangsang untuk berkembang menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi. Respon sel-sel efektor utama diperantarai sel termasuk sel T helper (Th), yang menghasilkan sitokin yang mengaktifkan makrofak untuk meningkatkan aktivitas anti mikroba, dan sel T sitotoksik (Tc), yang secara langsung membunuh mikroba *pathogen* (Pruett, 2003). Setelah leukosit dari *innate immune system* diaktifkan kemudian menghasilkan sitokin dan mempresentasikan antigen kepada limfosit T dan B, yang akhirnya mengaktifkan *adaptive immune system*. Ini merupakan interaksi antara kedua sistem *immunity* yang pada akhirnya menghasilkan respon imun (Volman *et al.*, 2008).

3.3.2. Perkembangan *thymocytes* dan sel T subsets

Selama perkembangan sel-sel T di timus, gen reseptor sel T (TCR) ditranskripsi dan diterjemahkan lalu diproduksi dan kemudian diekspresikan pada permukaan sel tetapi ekspresi gen dari masing-masing subunit TCR tidak sinkron dalam pengembangan *thymocyte*. Gen yang mengkode CD3 complex dan rantai C ditranskripsi dalam *thymocytes* paling dewasa. Hal ini diyakini bahwa ekspresi permukaan rendah TCR pada double-positif (DP) *thymocytes* yang merupakan prekursor langsung *mature single-positive* (SP) *thymocytes*, adalah karena rendahnya tingkat transkripsi gen TCR rantai. Hal ini disebabkan fakta bahwa ekspresi permukaan sel TCRs tergantung pada ekspresi dan perakitan enam protein TCR (Kosugi *et al.*, 1992).

Protein utama yang terlibat dalam pengembangan *thymocytes* adalah CD3 / TCR complex dan antigen co-reseptor (CD4 dan CD8). Sel T yang matang dalam timus, mereka kehilangan ekspresi CD4 dan CD8 co-reseptor. Ekspresi TCR-beta (pre-kompleks TCR) sangat penting untuk perkembangan sel CD4⁻CD8⁻ ke CD4⁺ CD8⁺. Ekspresi TCR-alpha-beta sangat penting untuk pengembangan lebih lanjut menjadi sel T helper CD4⁺ CD8⁻ atau sel T sitotoksik CD4⁻CD8⁺. Sel T helper CD4⁺CD8⁻ atau sel T sitotoksik CD4⁻CD8⁺ yang sudah mengalami pematangan terjadi peningkatan sel T regulasi (TCR / CD3) kompleks dan CD5 protein serta modulasi molekul CD4 dan CD8 (Reese *et al.*, 2001).

BAB 3. TUJUAN DAN MANFAAT

3.1. Tujuan:

Mengidentifikasi faktor immune respons baik innate maupun adaptive immunity yang berperan pada terjadinya *severe early childhood caries* melalui ekspresi CD3, CD16 dan CD19 pada saliva.

3.2. Manfaat

Identifikasi faktor *immune respons* baik *innate* maupun *adaptive immunity* nantinya dapat dipakai sebagai marker deteksi dini dalam mencegah terjadinya *severe early childhood caries*.

BAB 4. METODE PENELITIAN

TAHUN KE-2

4.1. ISOLASI LIMFOSIT

Sel limfosit dalam saliva diperoleh dengan mengintruksikan subjek untuk berkumur dengan 10 ml larutan NaCl steril 1,5% sambil dikumur-kumur, namun tidak ditelan selama 30 detik, kemudian diekspektorasi pada gelas steril. Prosedur ini diulang sebanyak 4 kali. Sampel selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 450g selama 15 menit, pada suhu 40C. Pelet hasil sentrifugasi selanjutnya dicampur dengan 2 ml medium RPMI, kemudian sampel divortek lalu disaring secara berurutan dengan 20 dan 11 μm nilon filter (Gasparoto *et al.*,2011). Hasil saringan berupa suspensi sel kemudian dihitung menggunakan hemositometer.

Volume yang sama dari suspensi sel dan pewarna 0,2% tripan biru dicampur dalam tabung eppendorf dan divortex. Aliquot suspensi yang sama (20 μl) ditambahkan pada ke kedua *chamber* haemositometer dan diamati di bawah mikroskop (10X objective). Campuran ditarik digrid dengan *capillary action*. Sel-sel dihitung dalam area seluas 16 kotak yang setara dengan jumlah sel $\times 10^4/\text{ml}$. Hanya sel *translucent* yang dihitung dalam kotak. Jumlah sel per ml dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

Sel/ml= rata-rata jumlah sel per *primary square* $\times 10^4 \times$ faktor pengenceran

4.2. KULTUR LIMFOSIT DAN PEMELIHARAAN

Sel limfosit (3×10^5 sel/ml) dikultur pada termos kultur jaringan (Greiner) 75 cm² dengan medium kultur lengkap (RPMI-1640, 10% fetal calf serum (FCS), dan 1% penisilin/Streptomisin) dalam 5% CO₂ dan 95% diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur diperiksa setiap hari untuk melihat perubahan warna, kekeruhan, kepadatan dan pola pertumbuhan menggunakan *inverted light microscope* (Nikon).

4.3. PRESERVASI DAN PENYIMPANAN SEL

Sel limfosit (dari kultur sel dicuci 3 kali dengan PBS (pH 7,2) dan ditangguhkan dalam 0,5 ml FCS dan didinginkan di atas es. Aliquot sama larutan didinginkan dari 20% *dimethyl sulphoxide* (DMSO) dalam media RPMI-1640 (V \ V1: 4) ditambahkan sebagai krioprotektan dalam *cryovials* (Nunc) dan didinginkan semalam pada suhu 20°C selama 24 jam. PBMC kemudian dipindahkan ke Cbio-freezer -70° dan disimpan sampai diperlukan.

6.4. REGENERASI SEL

Kultur sel limfosit diambil dari bio freezer suhu -70°C, lalu didesinfeksi dengan 70% etanol dan segera dilakukan *Thawing* pada suhu 37°C dengan *moderate shaking*. Sel-sel kemudia dipindahkan ketabung 20 ml *pre warmed complete culture medium* (CCM) di 75 cm² kultur jaringan dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada 37°C. Viabilitas sel ditentukan oleh uji *trypan blue assay*.

4.5 ANALISIS EKSPRESI CD3, CD16, CD19 DENGAN FLOW CYTOMETRY

4.5.1. PRINSIP

Analisis ekspresi CD3, CD16, CD19 ditentukan menggunakan *flow cytometry*, menurut Cherngetal (2008). *Fluorescein isothiocyanate* (FITC), *phycoerythrin* (PE), *allophycocyanin* (APC), *Peridinin chlorophyll protein* (PerCP), PerCP-Cy5.5-*conjugated monoclonal antibodies* (mAbs) dari Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). Konsentrasi optimal mAbs ditentukan untuk setiap mAb dengan titrasi. Flow cytometry secara bersamaan mengukur dan menganalisis sifat fisik partikel seperti sel-sel karena mengalir melalui aliran fluida melalui seberkas cahaya. Sifat menghamburkan cahaya sel dapat digunakan untuk menganalisis perubahan dalam ukuran, *granularity*, kompleksitas

internal dan intensitas fluoresensi relatif (Zgonc dan Gruber 1998). Analisis flow cytometry dilakukan untuk menentukan secara langsung pola immunomodulation limfosit, dengan menggunakan antibodi monoklonal terkonjugasi (mAbs).

3.2.2. PROSEDUR

Setelah kulvitasi dan perawatan PBMC seperti yang dijelaskan sebelumnya dalam uji *lymphoproliferation*, aliquot dipindahkan ke dalam tabung FACS kemudian dicuci dengan 4 ml larutan fosfat buffer saline Dulbecco (DPBS), disentrifugasi selama 5 menit pada 2000 rpm di RT dan supernatan dituang. Pelet pada DPBS dicuci lagi dan disentrifugasi pada 1800 rpm selama 8 menit. Sel diwarnai dengan *yellow viability dye* (1 ml pewarna / 1000 µl DPBS), divortex dan diinkubasi pada suhu 4 ° C selama 15 menit. Setelah itu, sel-sel dicuci dengan 4 ml DPBS dengan 1% FCS, disentrifugasi pada 1800 rpm selama 8 menit dan supernatan tertuang. Sel-sel kemudian diwarnai dengan volume yang tepat dari mAbs diperlukan, kemudian divortex dan diinkubasi dalam lemari es selama 20 menit. Setelah mencuci dengan DPBS dingin dan 1% FCS, sel disentrifugasi selama 8 menit pada 1800 rpm dan supernatan dituang. Setelah itu, sel divortex lagi dan 100 µl dari fixative (Reagent A) ditambahkan ke sampel dan didinginkan selama 10 menit. Akhirnya, 50 ul fixative (Reagent A) ditambahkan ke setiap sampel, ditutupi dengan foil dan simpan dalam lemari es sampai saat akuisisi pada LSR2 flow cytometry.

PBMC yang tercatat dianalisis menggunakan flow cytometry analyzer (LSR 11 Sorvall RT7 Plus, Becton Dickinson, USA) dengan software Sel Quest (Becton Dickinson, USA). Hasil dianalisis dengan menggunakan flow Jo 7.0 (USA) software. Ekspresi sel CD3⁺, CD16⁺, CD19⁺ yang ditentukan menggunakan prosedur FACScan standard dengan mAbs menurut protokol produsen.

Hasilnya kemudian dirata rata. Data yang terkumpul kemudian dianalisis uji normalitas untuk menguji bahwa variabel penelitian dengan skala data interval atau rasio yang diperiksa dalam penelitian ini berdistribusi normal., uji homogenitas kemudian dilakukan Uji T test 2 Sampel Bebasuntuk melihat rerata perbedaan variabel penelitian antara kelompok *severe early childhood caries* dan bebas karies. dan hasil uji dikatakan bermakna bila diperoleh harga $p < 0,05$.

BAB 5. HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Hasil

Sudah didapatkan pengumpulan dan rekapitulasi data ekspresi CD3, CD16, CD19 hasil pemeriksaan menggunakan uji flow cytometry

Tabel 1. Hasil deteksi ekspresi data ekspresi CD3, CD16, CD19 hasil pemeriksaan menggunakan uji flow cytometry dalam persen (%)

| No. | Kelompok | N | Ekspresi CD3 | Ekspresi CD16 | Ekspresi CD19 |
|-----|-------------|---|--------------|---------------|---------------|
| 1 | S-ECC | 1 | 6.29 | 2.49 | 7.99 |
| | | 2 | 5.85 | 1.94 | 6.79 |
| | | 3 | 6.29 | 2.37 | 6.30 |
| | | 4 | 6.30 | 2.13 | 7.57 |
| | | 5 | 6.63 | 2.31 | 6.89 |
| | | 6 | 6.99 | 1.99 | 7.05 |
| | | 7 | 5.80 | 2.10 | 6.57 |
| | | 8 | 6.90 | 2.31 | 7.43 |
| 2 | Free Caries | 1 | 5.30 | 0.42 | 7.47 |
| | | 2 | 5.70 | 2.17 | 6.65 |
| | | 3 | 7.82 | 1.37 | 7.74 |
| | | 4 | 7.89 | 3.54 | 5.64 |
| | | 5 | 5.92 | 2.23 | 5.96 |
| | | 6 | 6.17 | 2.11 | 7.21 |
| | | 7 | 5.56 | 1.67 | 5.98 |
| | | 8 | 4.92 | 1.34 | 7.27 |

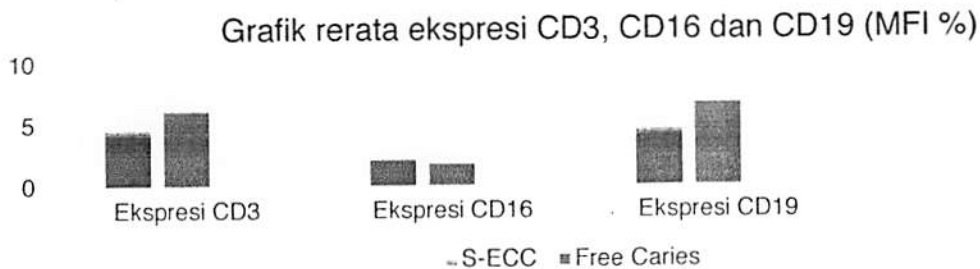
Tabel 5.2. Rerata dan standard deviasi ekspresi CD3, CD16 dan CD19 setelah diinkubasi 24 jam yang dianalisis dengan uji Flow Cytometry dan uji statistik t test

| No | Kelompok | N | Ekspresi CD3 | | Ekspresi CD16 | | Ekspresi CD19 | |
|----|-------------|---|--------------|-----------------------|---------------|-----------------------|---------------|-----------------------|
| | | | Mean (X) | Standard deviasi (SD) | Mean (X) | Standard deviasi (SD) | Mean (X) | Standard deviasi (SD) |
| 1 | S-ECC | | 6.376 | 0.440 | 2.205 | 0.686 | 7.073 | 0.197 |
| 2 | Free Caries | | 6.160 | 0.383 | 1.856 | 0.320 | 6.740 | 0.282 |

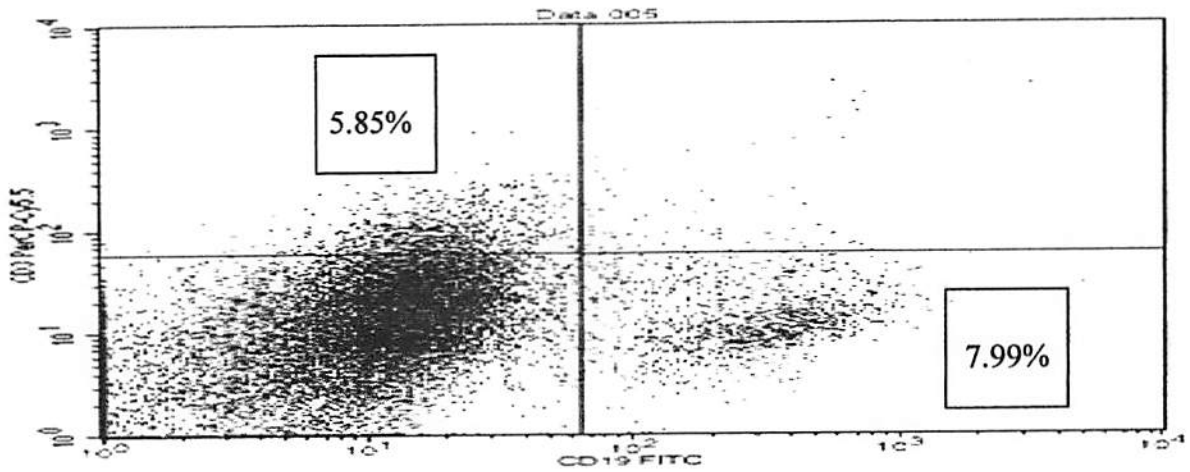
Tabel. 5.3. independent test menggunakan levene test ekspresi CD3, CD16 dan CD19 setelah diinkubasi 24 jam yang dianalisis dengan uji Flow Cytometry antara S-ECC dan Free Caries

| No | variabel | F | Sig. | Sig.(2 tailed) |
|----|---------------|-------|-------|----------------|
| 1 | Ekspresi CD3 | 4.331 | 0.56 | 0.617 |
| 2 | Ekspresi CD16 | 5.779 | 0.031 | 0.319 |
| 3 | Ekspresi CD19 | 2.435 | 0.971 | 0.348 |

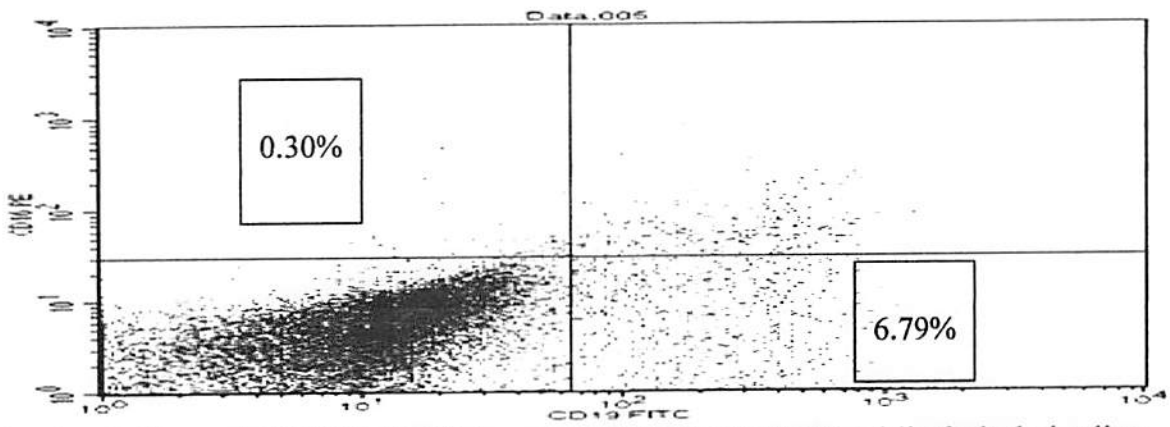
Berdasarkan hasil analisis statistic ekspresi CD3, CD16 dan CD19 menunjukkan adanya perbedaan rerata antara kelompok S-ECC dengan kelompok Free Caries (table 5.2) yang kemudian dilanjutkan dengan uji independent test tidak ada yang menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan diantara 2 kelompok dengan nilai $P > 0.05$.



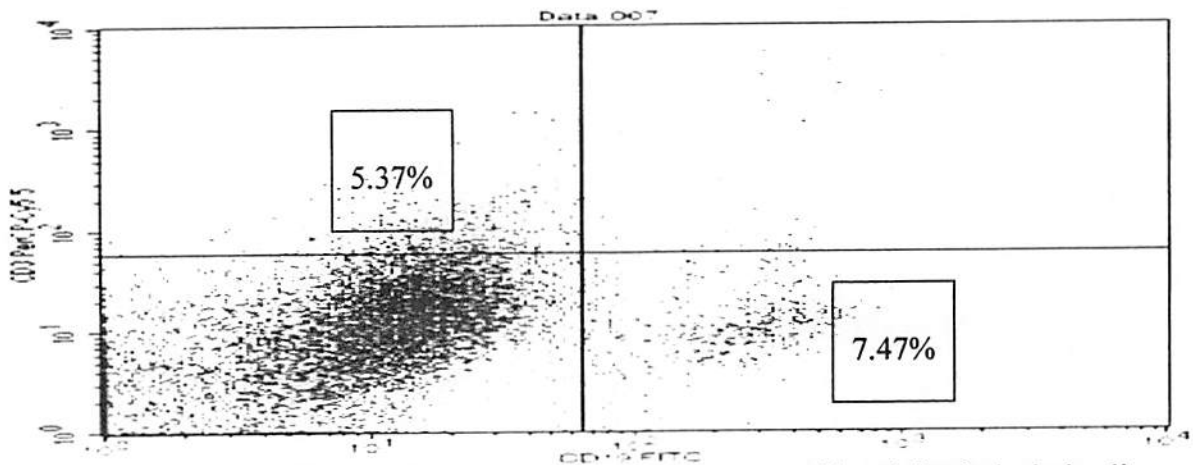
Gambar 3.1. Grafik rerata ekspresi CD3, CD16 dan CD19 pada saliva setelah setelah diinkubasi 24 jam S- ECC dan Free Caries yang dianalisis dengan uji flow cytometry dan uji statistik t test



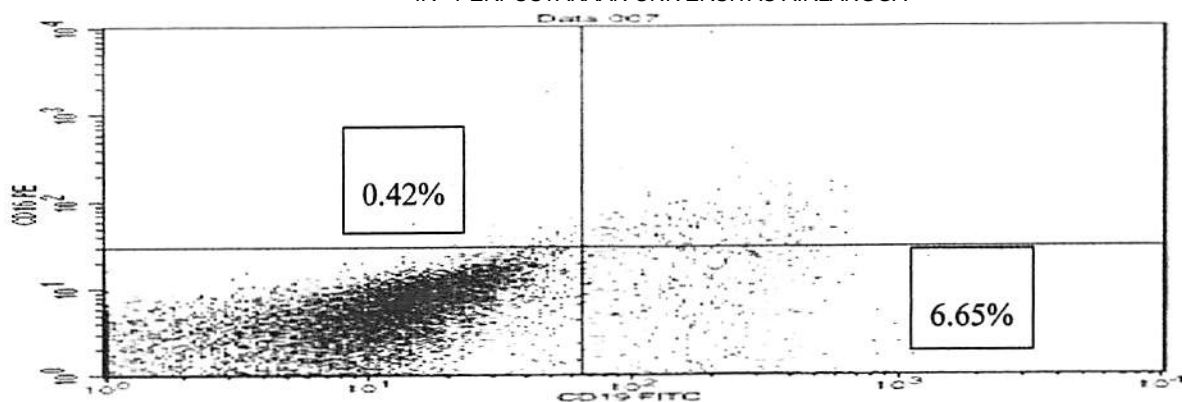
Gambar 1. Ekspresi CD3 (5.85%) dan ekspresi CD19 (7.99%) sel limfosit dari saliva severe Early Chlidhood Caries



Gambar 2. Ekspresi CD16 (0.30 %) dan ekspresi CD19 (6.79 %) sel limfosit dari saliva severe Early Chlidhood Caries



Gambar 3. Ekspresi CD3 (5.73 %) dan ekspresi CD19 (7.47 %) sel limfosit dari saliva anak Free Caries



Gambar 4. Ekspresi CD16 (0.42 %) dan ekspresi CD19 (6.65 %) sel limfosit dari saliva anak Free Caries

5.2. Luaran

Artikel ilmiah berupa draft pro publish Malaysia journal proceeding scopus Q4, Journal JIO special issue scopus Q4, accepted final Proof di Dental esearch Journal (DRJ) scopus Q2, Draft Hak cipta karya ilmiah

BAB 6. RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA

1. Analisis statistik hasil penelitian tentang ekspresi CD3, CD16, CD19
2. Analisis ekspresi. CD59, CD4 dan CD8

BAB 7. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Terjadi peningkatan ekspresi CD3, CD16 dan CD19 pada saliva S-ECC

7.2. Saran

Diperlukan penelitian lanjutan dengan menganalisis ekspresi CD59, CD4 dan CD8 untuk memperkuat dalam proses pencegahan karies gigi melalui marker deteksi dini




DAFTAR PUSTAKA

- Banas, J. A. 2004. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front Biosci*
- Cherng, J-M., Chiang, W., Chiang, L-C. 2008. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry* 106: 944–950.
- Clarke, M., Locker, D., Pencharz, P., Kenny, D., & Judd, P. 2006. Malnourishment in a population of young children with severe early childhood caries. *Pediatric Dentistry*, 28(3), 254-259.
- Fachklam R, 2002. What Happened to the Streptococci : Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *J Clin Microbiol Rev* 4 : 613-630
- Fitriani, 2007. Faktor Resiko Karies Gigi Sulung Anak (Study Kasus Anak TK Pangeran Diponegoro Semarang). Undergraduate Thesis, Diponegoro University.
- Filstrups SL, Briskie D, Fonseca M, Lawrence L, Wandera A, Inglehart MR, 2003. ECC and Quality of Life: Child and Paren perspectives. *Pediatr Dent*. 25:431-440.
- Habibian M, Beighton D, Stevenson R, Lawson M, Robert G. 2002. Relation Between Dietary Behaviours, Oral Hygiene and Mutans streptococci in Dental Plaque of a Group of Infants in Southern England. *Archives of Oral Biology*. 47: 497-498.
- Hamada, S. & Slade, H.D. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological reviews*, vol. 44, no. 2, pp. 331-384.
- Indrawati R., 2006. Aktivitas enzim dextranase dan sebaran genotype *Streptococcus mutans* penderita karies dan bebas karies. Program Pascasarjana Universitas Airlangga Surabaya.
- Kosugi, T., Saitoh, S., Tamaki, N., Shimoji, K., Kakazu, T., Saitoh, A., Ijyu, M., Agata, H. 1992. Evaluation of the sensitized condition of patients with allergic diseases in Okinawa using the MAST allergy system. *Arerugi* 41(7): 766-71.
- Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
- Mitchell SC, Ruby JD, Moser S, Momeni S, Smith A, Osgood R. 2009. Maternal Transmission of *Mutans Streptococci* in Severe-Early Childhood
- Moore, R., Brodsgaard, I., & Rosenberg, N. 2004. The contribution of embarrassment to phobic dental anxiety: a qualitative research study. *BioMed Central Psychiatry*, 4(10). *Caries. Pediatric Dentistry*. May- Jun;31(3):193-201
- Napimoga, M. H., Kamiya R. U., Rosa R. T., Rosa E. A, Hofling J. F., Mattos- Graner, R. O and. Goncalves R. B. 2004. Genotypic diversity and virulence traits of *Streptococcus mutans* in caries-free and caries- active individuals. *J Med Microbiol* 53:697-703.
- Paul, W.E. 2003. *Fundamental Immunology*. Lippincott Wilkins and Williams

- Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., Shah, A. 2009. *In vitro* cytotoxicity of *Solanum nigrum* extract against *Hela* cell line and *Vero* cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences* 1: 36-46.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 1996. Microbiology. Third Edition. W.C. Brown Publishers.
- Pruett, S.B. 2003. Stress and the immune system. *Pathophysiology* 9: 133-153.
- Roitt, I.M., Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. 2006. Roitt's essential immunology. Wiley-Blackwell. United Kingdom
- Sheiham, A. 2007. Dental caries affects body weight, growth and quality of life in pre-school children. *British Dental Journal*, 201(10), 625-626
- Tabchoury CPM, Sousa MCK, Arthur RA, Mattos-Graner RO, Del Bel Cury AA, Cury JA. 2008. Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J Appl Oral Sci*; 16: 403-407.
- Tanzer, J.M., Livingston, J. & Thompson, A.M. 2001, "The microbiology of primary dental caries in humans", *Journal of dental education*, vol. 65, no. 10, pp. 1028-1037.
- Takahashi, N. & Nyvad, B. 2008. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries research*, vol. 42, no. 6, pp. 409-418.
- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J. 2008. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and Behavior* 94: 276-284.

LAMPIRAN

1. Laik Etik Penelitian



**UNIVERSITAS AIRLANGGA FACULTY OF DENTAL MEDICINE
HEALTH RESEARCH ETHICAL CLEARANCE COMMISSION**

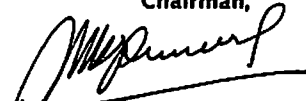
ETHICAL CLEARANCE CERTIFICATE
Number : 209/HRECC.FODM/IX/2017

Universitas Airlangga Faculty Of Dental Medicine Health Research Ethical Clearance Commission has studied the proposed research design carefully, and therefore, shall herewith certify that the research entitled :

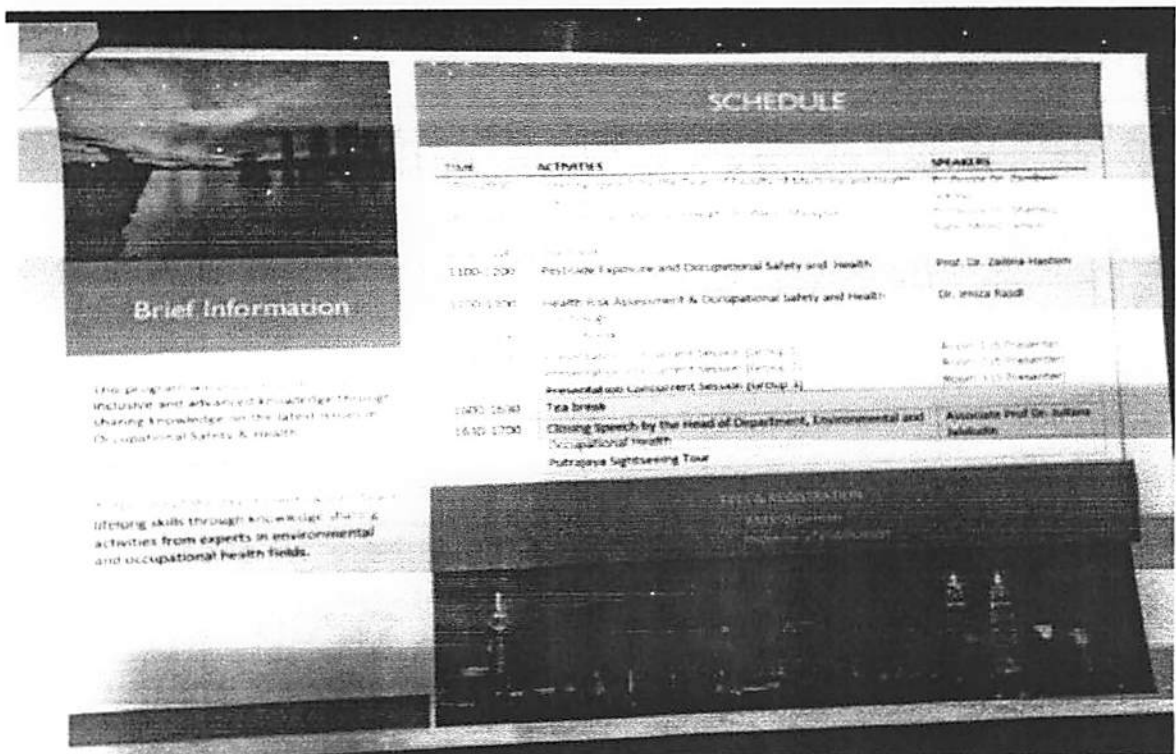
“PERAN DAN FUNGSI IMMUNE SYSTEM (Innate dan Adaptive Immunity) MELALUI PROLIFERASI SEL LIMFOSIT IL-10, IFN- γ , CD3, CD16, CD56, CD19, CD4, CD8 PADA SEVERE EARLY CHILDHOOD CARIES”

Principal Researcher : Dr. MUHAMMAD LUTHFI, drg.,M.Kes
Unit/Institution/Place of Research : - *Research Center* Fakultas Kedokteran Gigi
Universitas Airlangga Surabaya

CERTIFIED TO BE ETHICALLY CLEARED

Surabaya, September 12th, 2017
Chairman,

Prof. M. Rubianto, Dr., drg., MS., Sp.Perio(K)
Official No.195009081978021001

2. Bukti seminar internasional



3. Bukti accepted di Dental Research Journal (DRJ) Q2

[Klik di sini guna mengaktifkan](#) notifikasi desktop untuk Email Airlangga University. [Pali](#)

Email

[DRJ]:Author-side fee of your manuscript... [Klik di sini](#)

Kotak Masuk (2)
Berbintang
Email Terkirim
Draf (11)
Selengkapnya

MUHAMMAD

Dental Research Journal <editor@drjournal.net>

Ingggris Indonesia [Permalink](#)

If you cannot see this page properly, please [click here](#)

Dear Dr. Luthfi,

NOTE: This e-mail is sent to you as one of the contributing authors. If you are the author designated by your group as the corresponding author for this man

Status of the manuscript titled 'Correlation between Human Neutrophils Peptid (CD63) Expression in Severe Early Childhood Caries' submitted by Dr. Muharr mail is as;

Dear Dr. Luthfi,

We are pleased to inform that your manuscript "Correlation between Human N Azurophilic Granule (CD63) Expression in Severe Early Childhood Caries" publication of the manuscript.

The payment for author-side fee can be done online through credit card or by submission system and login into your account for the details

Once the payment is received at our end, the manuscript would be processed article in about 2-3 weeks from now for a final check and correction.

We thank you for submitting your valuable research work to Dental Research J

With warm personal regards,

Yours sincerely,
Nakisa Torablnia
Dental Research Journal

4. Artikel ilmiah submitted di jurnal Malaysia scopus Q4

Analysis of Lymphocyte Cell Proliferation and IF- γ Expression of Saliva Severe Early Childhood Caries and Free Caries in Surabaya

Muhammad Luthfi¹, Aqsa Sjuhada Oki², Retno Indrawati³, Nadia Latuamury⁴

^{1,2,3}Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Universitas Airlangga, Surabaya 60115;

⁴Undergraduate Student, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60286, Indonesia

SUMMARY

Background: Dental caries is one of the chronic, multifactorial diseases occurring due to microbiological shifts in biofilms. Shifting of biofilm flora caused by poor oral hygiene, genetic factors, and long-term immune changes leads to an increase in *Streptococcus mutans* which results in decreased pH and demineralization on tooth surfaces. Immune system of the body serves to defend the human body from foreign invaders. The impaired immune system can cause various infectious diseases, the role of the immune system becomes increasingly important in understanding the mechanisms of disease prevention. The effective function of the body's immune system is to immediately eradicate the infectious agent from the body. This is done by interactively interactive systems, ie innate (very specific) fast but non-specific and adaptive immune system. **Objective:** Analyze the expression of IF- γ and salivary cell lymphocyte proliferation in severe early childhood caries and caries-free. **Methods:** saliva taken from preschool aged children 4 to 6 years divided into two groups, ie heavy caries group with dmft > 6 and caries free with dmft = 0, for lymphocyte cell proliferation test using MTT assay and for expression test of IF- γ using flow cytometry test. **Results:** differences in lymphocyte cell proliferation and IF- γ expression in saliva severe early childhood caries and caries-free. **Conclusion:** Increase expression of IF- γ and an increase in salivary lymphocyte cell proliferation up to 6 hours incubation in severe Early childhood caries

Keywords: lymphocyte cells, IF- γ and dental caries

INTRODUCTION

The prevalence of dental caries in preschool children is still very high, the results indicate that the prevalence reaches 80% in many developing countries with a percentage of five times more than asthma, seven times more than allergies, and fourteen times more than chronic bronchitis.

In Indonesia, the prevalence of caries in children aged 3-5 years continues to increase. In 2001, caries prevalence in children aged 3-5 years in DKI Jakarta was 81.2% [1], In Surabaya, the prevalence of Early Childhood Caries (ECC) in groups of children 6 months-3 years was 30.8%; while the prevalence of Severe Early Childhood Caries (S-ECC) was 29.2% [2].

The process of caries occurrence is the result of a gradual and consistent shift in the balance of demineralization and remineralization of tooth enamel directly affected by *S.mutans* is one of the most important etiologic agents as the cause of dental caries^[3].

Immune system of the body serves to defend the human body from foreign invaders. Simply immune system can cause various diseases such as infection, aging, allergies, disorders of various organs and other diseases such as cancer and auto immune deficiency syndrome (AIDS) ^[4]. The role of the Immune system of the body becomes increasingly important in understanding the mechanisms of disease prevention. The effective function of the body immune system is to immediately eradicate the infectious agent from the body. This is done by mutually interactive system actions, ie innate (very specific) fast but non-specific and adaptive immune system ^[5]. In response to pathogenic microbes, the adaptive immune system of the body develops effector cells that function to prevent such threats, ie: CD4⁺ T cell memory that serves as a protective against bacterial infections ^[6]. CD4⁺ cells participate in response to secondary infections that are potentially anti pathogenic^[7], producing antibodies, and CD8⁺ T cell cytotoxicity^[8].

Immune in the oral cavity is a system that makes the balance by controlling various microbes contained in the oral cavity that fluctuate due to external aggression. The mouth is the entrance and exchange with the external environment o Because therefore homeostatic factors must be evaluated and controlled by the immune system. Various dental caries prevention has been done, for example by correct brushing, fluoridation with topical application, and vaccine making which has not yet shown the expected results, Fluoride can be toxic in extremely high concentrations ^[9]. therefore this research aimed to identify the risk factor of dental caries in the form of immune system both innate and adaptive immunity which one of its function is to kill pathogen attacking host.

Based on the above, the study wanted to analyze the proliferation of lymphocytes and IFN- γ expression in saliva and caries-free as early detection marker of severe early childhood caries.

MATERIALS AND METHODS

Lymphocyte Isolation

The salivary lymphocyte in saliva was obtained by instructing the subjects to gargle with 10 ml of a sterile NaCl solution of 1.5% while gargling, but not swallowed for 30 seconds, then exoriated on sterile glass. This procedure is repeated 4 times. The next sample was centrifuged at 450g for 15 minutes, at 40C. The centrifugation pellets are then mixed with 2 ml of medium RPMI, then the samples of divortek are then filtered sequentially with 20 and 11 μ m nylon filters ^[10]. The sieve results in a cell suspension and then calculated using a hemocytometer.

The same volume of cell suspension and 0.2% blue tripan dye was mixed in eppendorf and divortex tubes. The same suspension aliquot (20 μ l) was added to both chamber haemocytometers and observed under a microscope (10X objective). The mixture is drawn digrid with capillary action. The cells are counted in an area of 16 squares which is equal to the number of cells x104 / ml. Only translucent cells are counted in the box. The number of cells per ml is calculated using the following formula:

Cell / ml = average number of cells per primary square x10⁴ x dilution factor

Lymphocyte Proliferation Test

Principle

The MTT assay test is the standard used to measure cell viability. This is a colorimetric test that measures cell proliferation. This is based on the reduction of the yellow tetrazolium compound, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) by mitochondria succinic dehydrogenase. MTT enters the cell and enters the mitochondria and is reduced to a color solution (dark purple) formazan crystals. These cells were then dissolved with organic solvents and released, dissolved formazan reagents were measured using a spectrophotometer [11]. The optimum wavelength for absorbance is 570 nm, but some filters that absorb wavelengths between 550nm and 600nm can be used. Data were analyzed by plotting the number of cells against absorbance, followed by changes in quantization of cell proliferation. The tetrazolium reduction rate is proportional to the rate of cell proliferation.

$$\% \text{ Cell Proliferation} = \frac{\text{Average absorbance of treated cells}}{\text{Average absorbance of untreated cells}} \times 100$$

IFN- γ Expression Analysis With Flow Cytometry

Principle

Analysis of IFN- γ expression was determined using flow cytometry, according to ¹⁵ Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC), Peridinin chlorophyll protein (PerCP), PerCP-Cy5.5-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). The optimal concentration of mAbs is determined for each mAb by titration. Flow cytometry simultaneously measures and analyzes the physical properties of particles such as cells as they flow through the flow of fluid through a beam of light. The nature of scatter cell light can be used to analyze changes in size, granularity, internal complexity and relative fluorescence intensity. Flow cytometric analysis was performed to directly determine the immunomodulation pattern of lymphocytes, using conjugated monoclonal antibodies (mAbs).

RESULTS

Table 5.1. Mean and standard deviation of lymphocyte proliferation after incubation for 2.4 and 6 hours after 24 hours incubation analyzed with MTT test and t test statistic test

| Group | N | Incubation time after 24 hours (Hour) | Lymphocytes (%) | |
|-------------|---|---------------------------------------|-----------------|-------------------------|
| | | | Mean (X) | standard deviation (SD) |
| Caries Free | 8 | 2 | 48.2235675 | 16.28086963 |
| | | 4 | 50.3520313 | 18.39962724 |
| | | 6 | 42.6288962 | 13.95440444 |
| S-ECC | 8 | 2 | 41.3019888 | 12.99300133 |
| | | 4 | 29.9393363 | 4.09596779 |
| | | 6 | 35.1711388 | 4.74927360 |

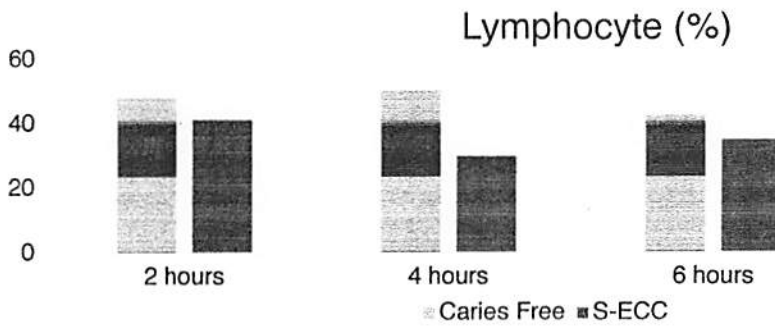


Figure 5.1. The average graph of lymphocyte proliferation after after incubation 2 hours, 4 hours and 6 hours on caries free and S-ECC analyzed by flow cytometry test and t test statistic test

The result of t test statistic analysis in caries-free group showed that there was an increase of lymphocyte cell proliferation at incubation until 4h then decrease of lymphocyte proliferation at 6 hours incubation, whereas in the S-ECC group the decrease of lymphocyte cell proliferation in 4 hours incubation increased again after 6 hours incubation as seen in table 5.1.

Table 5.2. The mean and standard deviation of IF- γ expression after 2.4 and 6 hours after 24 hours incubation were analyzed by Flow Cytometry test and t test statistic test

| Group | N | Incubation time after 24 hours (Hour) | IF- γ Expression (%) | |
|-------------|---|---------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| | | | Mean (X) | Standard deviation (SD) |
| Caries Free | 8 | 2 | 3.9875 | 2.15548 |
| | | 4 | 4.4950 | 2.05177 |
| | | 6 | 3.5475 | 1.21790 |
| S-ECC | 8 | 2 | 6.4675 | 5.88481 |
| | | 4 | 11.3013 | 12.75954 |
| | | 6 | 13.3988 | 9.71725 |

The results of t test statistic analysis in the caries-free group showed that there was an increase in IF expression in 4 hours incubation but decreased at 6 hours incubation, but in the S-ECC group increased IF-expression up to 6 hours incubation as seen in Table 5.2.

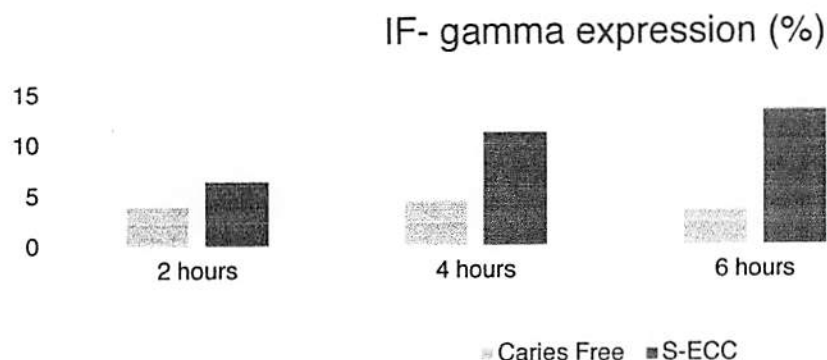


Figure 5.2. The average graph of IF- γ expression on the surface of saliva netrofil after after incubation of 2 hours, 4 hours and 6 hours in free caries and S-ECC analyzed by flow cytometry test and t test statistic test.

DISCUSSION AND CONCLUSION

IFN- γ is a proinflammatory cytokine that supports cellular immunity secreted from innate and adaptive immune cells due to the effects of cytokines such as IL-12 and IL-18. IFN- γ was first described for its antiviral activity but is currently known to protect against certain types of microbial infections [29], and mice lacking IFN- γ or IFN-resep receptors can cause infections easily caused by microbes. IFN- γ causes cytotoxic T cell responses (CD8) and up-regulation of presenting Cell antigen (APC) class II to enhance the activation of TH4-cell CD4 antigens. Furthermore, it encourages naïve CD4 + T-cells to commit to the TH1 phenotype. In addition, IFN- γ may inhibit cell growth and induce apoptosis to reduce the TH2 population [12]. It is therefore possible that the lymphocyte cell proliferation and IFN-eksp expression increase in S-ECC up to 6 hours incubation time is compared to free caries. conclusion, in s-ecc there is an increase in lymphocyte proliferation and IF- γ expression up to 6 hours incubation

REFERENCES

1. Sugito FS, Djoharnas H, Darwita RR. Breast feeding and early childhood caries (ECC) severity of children under three years old in DKI Jakarta. 2008. 12(2): 86-91.
2. Rahel Wahjuni Sutjipto, Herawati, dan Satiti Kuntari . The prevalences of early childhood caries and severe early childhood caries in preschool children at Gunung Anyar Surabaya. 2014. 47 (4): 186-89.
3. Takahashi, N. & Nyvad, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries research*, 2008. vol. 42, no. 6, pp. 409-418
4. Cherng, J-M., Chiang, W., Chiang, L-C. Immunomodulatory activities of common

- vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry* . 2008. 106: 944–950.
5. Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and Behavior* . 2008. 94: 276–284.
 6. Tubo N. J. and Jenkins M. K. “CD4+ T Cells: guardians of the phagosome,” *Clinical Microbiology Reviews*.2014. vol. 27, no. 2, pp. 200–213,
 7. Zens K.D. and Farber D. L. “Memory CD4 T cells in influenza,” in *Influenza Pathogenesis and Control—Volume II*, vol. 386 of *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2015.pp. 399–421.
 8. Strutt T. M., Mckinstry K. K., Marshall N. B., Vong A. M., Dutton R. W., and Swain S. L. “Multipronged CD4+ T-cell effector and memory responses cooperate to provide potent immunity against respiratory virus,” *Immunological Reviews*, 2013.vol. 255, no. 1, pp. 149–164.
 9. Domen Kanduti, Petra Sterbenk, and Barbara Artnik. Fluoride: A Review Of Use And Effect On Health. *Mater Sociomed*. 2016 Apr; 28(2): 133-137
 10. GasparotoTH, Vieira NA,PortoVC, Campanelli AP, Lara VS. Differences between salivary and blood neutrophils fromelderly and young denture wearers. *J. Oral Rehabil*. 2011.38(1):41-51
 11. Patel, S., Gheewala, N., Suthar, A., Shah, A. In vitro cytotoxicity of *Solanum nigrum* extract against Hela cell line and Vero cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences*. 2009. 1: 36-46.
 12. Schroder K., Hertzog PJ., Ravasi T., Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004. 75:163–89

5. Artikel ilmiah submitted di journal of Internasional Oral Health (JIOH) scopus Q4

Analysis of IL-10 Anti-Inflammatory Cytokines Expression in Saliva of Children with Severe Early Childhood Caries and Caries-Free Children

Muhammad Luthfi¹, Aqsa Sjuhada Oki², Priyawan Rachmadi³, Muhaimin Rifai⁴

1,2,Department of Oral Biology, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60115;

3Department of Dental Material, Faculty of Dental Medicine, Universitas Airlangga, Surabaya 60115;

4Departement of Physiology, Cell Culture and Animal Development, Universitas Brawijaya; 65145

Corresponding author: Muhammad Luthfi, e-mail: m.luthfi@fkg.unair.ac.id

SUMMARY

Background: Dental caries is one of the chronic, multifactorial diseases which occurs due to microbiological shifts in biofilms. Shifting of biofilm flora caused by poor oral hygiene, genetic factors, and long-term immune changes leads to an increase in *Streptococcus mutans* which results in decreased pH and demineralization on tooth surfaces. Immune system of the body serves to defend the human body from foreign invaders. The impaired immune system can cause various infectious diseases. The role of the immune system becomes increasingly important in understanding the mechanisms of disease prevention. The effective function of the body's immune system is to immediately eradicate the infectious agent from the body. This is done by interactively interactive systems, ie innate (very specific) fast but non-specific and adaptive immune system. **Objective:** This study aimed to analyze the expression of IL-10 in children with severe early childhood caries and caries-free children. **Method:** Saliva taken from preschool aged children (4 to 6 years) was divided into two groups, ie heavy caries group with dmft > 6 and caries free with dmft = 0. For expression test of IF- γ , flow cytometry test was used. **Results:** IL-10 expression in saliva of children with severe early childhood caries was 3.32 ± 0.79 . Whereas, in children with no caries was 4.04 ± 0.65 . **Conclusion:** IL-10 expression in children with severe early childhood caries was significantly lower than in caries-free children.

Keywords: lymphocyte cells, IL-10 and early childhood caries

INTRODUCTION

Caries in early childhood (ECC) is a multifactorial disease resulting from interactions of various factors, namely: cariogenic microbes, exposure to carbohydrate fermentation and various social variables. ECC is a condition of health abnormalities found in children living in socially disadvantaged communities, such as malnourished people with social and health inequalities (Feldens et al., 2010). ECC has an impact on general health, ranging from local pain, infections, abscesses, difficulty in chewing, malnutrition, indigestion, and insomnia (Finlayson et al., 2007).

The body's immune system functions to defend the human body from foreign inventors. A compromised immune system can cause various diseases, such as infection, aging, allergies, various organ disorders and other diseases, such as cancer and auto immune deficiency syndrome (AIDS) (Cheng et al., 2008). The role of the body's immune system is becoming increasingly important in understanding the mechanisms of disease prevention. The effective function of the body's immune system is to immediately eradicate the infectious agent from the body. This is done by an interactive system of actions, namely innate (very specific), fast but non-specific and adaptive immune system (Volman et al., 2008) ... which function as a pathogenic killer (Zens and Farber, 2015), produce antibodies, and CD8 + T cell cytotoxicity (Strutt et al., 2015).

Immunity in the oral cavity is a system that makes a balance by controlling various microbes in the oral cavity that are fluctuating due to external aggression. The mouth is the entrance and exchange with the outside environment. Therefore, homeostasis factors must be evaluated and controlled by the immune system.

The immune response to pathogens involves the rapid activation of the secretion of pro-inflammatory cytokine which functions to initiate host defenses against microbial invasion. However, excessive inflammatory cytokines in the tissues can cause systemic metabolic and hemodynamic disorders that are harmful to the host. As a result, the immune system has evolved to form anti-inflammatory functions to suppress the production of pro-inflammatory cytokines which function to limit tissue damage and to maintain tissue homeostasis (Mosser and Zhang, 2008). Interleukin 10 (IL-10) is an anti-inflammatory cytokine that plays an important role in preventing prolonged inflammation (Sabat et al., 2010).

Various preventions of dental caries had been carried out, for example by brushing teeth properly, fluoridating with topical applications, and making vaccines which until now have not shown the expected results (Trigg et al., 2001). Therefore, this study aimed to analyze the expression of IL-10 in saliva which functions as an anti-inflammatory.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

This was an observational analytic study using children with severe early childhood caries and caries-free children as the objects of research with a cross sectional study design. Ethical clearance test at Universitas Airlangga, Faculty of Dental Medicine was done with Health Research Ethical Clearance Commission number of 209/HRECC. FODM/IX/2017.

Samples were taken from the saliva of kindergarten children aged 4 to 6 years in the south Surabaya region which were previously divided into two groups. Group one was children with who were diagnosed with severe early childhood caries (S-ECC) marked by decay exfoliation and filling (def-t >6). Whereas, group two was kindergarten children diagnosed with free caries marked with def-t =

0. Saliva was taken from 5 of kindergarten children in groups one and two. Sampling was carried out by researchers and trained personnel using protocol standards. Subjects might not eat, drink, chew gum, or brush their teeth for 60 minutes before sampling. Furthermore, samples were frozen at -80°C for analysis (Phattaratatip, 2010).

Analysis of IL-10 Expression with Flow Cytometry

Principle

Analysis of IFN- γ expression was determined using flow cytometry, according to Cherng et al (2008). Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), allophycocyanin (APC), Peridinin chlorophyll protein (PerCP), PerCP-Cy5.5-conjugated monoclonal antibodies (mAbs) from Becton Dickinson (San Jose, CA, USA). The optimal concentration of mAbs is determined for each mAb with titration. Flow cytometry simultaneously measures and analyzes the physical properties of particles such as cells because it flows through the flow of fluid through a beam of light. The nature of scattering cell light can be used to analyze changes in size, granularity, internal complexity and relative fluorescence intensity. Flow cytometry analysis was performed to determine directly the pattern of lymphocyte immunomodulation, using conjugated monoclonal antibodies (mAbs).

RESULTS

Table 1. Mean and standard deviation of IL-10 expression in caries free and S-ECC analyzed by flow cytometry test and t test statistic test

| Groups | N | IL-10 Expression (%) | | |
|-------------|---|----------------------|--------------------|---------------------|
| | | Mean | Standard Deviation | Standard error mean |
| S-ECC | 8 | 3.321 | 0.787 | 0.278 |
| Caries-free | 8 | 4.044 | 0.648 | 0.229 |

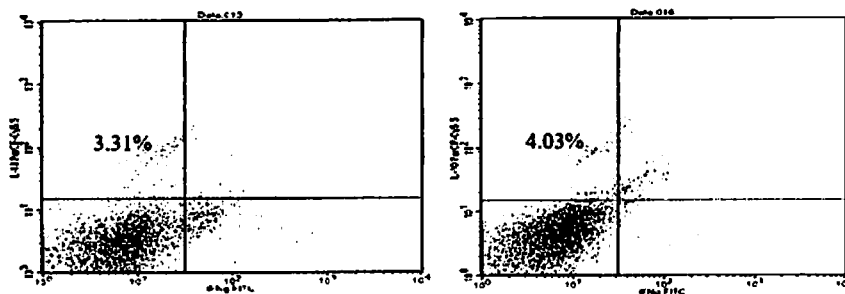


Figure 1. Expression of IL-10 from S-ECC saliva after analyzed by Flow Cytometry test.

The results of statistical analysis t test in the S-ECC group showed that IL-10 expression (3.31%) was lower than that of the caries-free group (4.03%) (Table 1). Based on Levene's test, there was significant difference in IL-10 expression between S-ECC with caries-free.

DISCUSSION AND CONCLUSION

The results of the study showed that there was expression of IL-10 decrease in children with S-ECC compared to that in caries-free children. This was probably due to the S-ECC patients responding

more antigens in the form of *S. mutans* bacteria which were relatively high in numbers compared to that in children with free caries (Luthfi et al., 2015).

An antigen structure called Pathogen Associated Molecular Pattern (PAMPs), which will be recognized by Pattern Recognition Receptors (PRRs), namely Toll-like receptors (TLRs), is very important for triggering the effector phase of the innate immune response (Kumar et al., 2011). TLR2 and TLR4 involved in the introduction of Gram-positive and Gram-negative bacteria that have been detected in odontoblast cell membranes in healthy pulp show that odontoblasts are equipped to recognize these pathogens when they diffuse through the dentinal tubules during carious infection (Veerayutthwilai et al., 2007). One of the main consequences of TLR activation is an increase in the efficacy of innate immunity, including antimicrobial agents and proinflammatory cytokines and chemokines that recruit and activate immune cells (Turner et al., 2011). One of the main consequences of TLR activation is increased efficacy of innate immunity, including antimicrobial agents and proinflammatory cytokines and chemokines that recruit and activate immune cells (Turner et al., 2014). This causes the S-ECC saliva to increase prolonged inflammatory cytokines which eventually can cause tissue damage that affects health in general, starting from local pain, infection, abscess, difficulty in chewing, malnutrition, indigestion, and sleeping difficulty (Finlayson et al., 2007).

Based on the results of this study, high expression of proinflammatory cytokines in S-ECC should be balanced by the immune host system by producing anti-inflammatory cytokines, IL-10. As a response to pathogenic microbes, the body's adaptive immune system develops effector cells that function to prevent these threats, namely CD4 + memory T cells which serve as a protective against bacterial infections (Tubo and Jenkins, 2014). CD4 + cells participate in responding to secondary infections that have the potential as anti-pathogens (Zen and Farber, 2015) producing antibodies and CD8 + T-cell cytotoxicity (Strutt et al., 2013). However, this did not occur in S-ECC so IL-10 expression in S-ECC saliva was significantly lower than that in caries-free children. This was probably due to the role of the immune system in S-ECC which was not as good as that in caries-free children.

CONCLUSION

Expression of IL-10 in S-ECC children was significantly lower (3.31%) compared to that in caries-free children.

REFERENCES

- Cherng, J-M., Chiang, W., Chiang, L-C. Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry* . 2008. 106: 944–950.
- Feldens CA, Giugliani ER, Duncan BB, Drachler Mde L, Vitolo MR. Long-term effectiveness of a nutritional program in reducing early childhood caries: a randomized trial. *Community Dent Oral Epidemiol* (2010) 38(4):324–32. doi:10.1111/j.1600-0528.2010.00540.x
- Finlayson TL, Siefert K, Ismail AI, Sohn W. Psychosocial factors and early childhood caries among low-income African-American children in Detroit. *Community Dent Oral Epidemiol* (2007) 35(6):439–48. doi:10.1111/j.1600-0528.2006.00352.x
- Kumar H., Kawai T., and Akira S., "Pathogen recognition by the innate immune system," *International Reviews of Immunology*, 2011. vol. 30, no. 1, pp. 16–34,
- Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev*. 2008 Dec;226:205–18. [PubMed: 19161426]

- Muhammad Luthfi, Retno Indrawati, Ira Arundina and Yoes Prijatna Dachlan, Korelasi Jumlah *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) dan Level Ekspresi Interleukin 8 (IL-8) pada Severe Early Childhood Caries. *Maj Ked Gi Ind.* 2015. 1(2): 142 – 148
- Sabat R, Grütz G, Warszawska K, Kirsch S, Witte E, Wolk K, Geginet J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2010 Oct; 21(5):331–44. [PubMed: 21115385]
- Strutt T. M., Mckinstry K. K., Marshall N. B, Vong A. M. , RDutton. W., and. Swain S. L, “Multipronged CD4+ T-cell effector and memory responses cooperate to provide potent immunity against respiratory virus,” *Immunological Reviews*, 2013.vol. 255, no. 1, pp. 149–164.
- Turner M. D., B. Nedjai, Hurst T., and Pennington D. J., “Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease,” *Biochimica et Biophysica Acta— Molecular Cell Research*, 2014. vol. 1843, no. 11, pp. 2563–2582,
- Turner M. D., B. Nedjai, Hurst T., and Pennington D. J., “Cytokines and chemokines: at the crossroads of cell signalling and inflammatory disease,” *Biochimica et Biophysica Acta— Molecular Cell Research*, 2014 vol. 1843, no. 11, pp. 2563–2582,
- Tubo N. J. and Jenkins M. K., “CD4+ T Cells: guardians of the phagosome,” *Clinical Microbiology Reviews.* 2014. vol. 27, no. 2, pp. 200–213,
- Trigg, T.E., et al., Use of a GnRH analogue implant to produce reversible Longterm suppression of reproductive function in male and female domestic dogs. *J Reprod Fertil Suppl.*, 2001. 57: p. 255- 61.
- Volman, J.J., Ramakers, J.D., Plat, J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiology and Behavior* . 2008. 94: 276–284.
- Veerayutthwilai O., Byers M. R., Pham T.-T. T., Darveau R. P., and Dale B. A., “Differential regulation of immune responses by odontoblasts,” *Oral Microbiology and Immunology*, 2007. vol. 22, no. 1, pp. 5–13,
- Zens K.D. and Farber D. L., “Memory CD4 T cells in influenza,” in *Influenza Pathogenesis and Control—Volume II*, vol. 386 of *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2015.pp. 399–421.

6. Draft HAKI

**PERAN INNATE IMMUNITY MUKOSA RONGGA MULUT
DALAM MENCEGAH TERJADINYA KARIES GIGI**

Muhammad Luthfi

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia yang tiada terhingga sehingga atas petunjukNya penulis dapat menyusun hasil penelitian dalam bentuk buku ini.

Shalawat dan salam semoga senantiasa tercurah Kepada Rosulullah, nabi besar Muhammad Shollallohu alaihi wasallam beserta keluarga, para sahabat dan pengikutnya.

Buku ini tercipta karena keprihatinan penulis terhadap kondisi masyarakat kita yang dalam perkembangannya ilmu pengetahuan tentang kesehatan pada umumnya dan khususnya pada kesehatan gigi justru masih didapatkan tingginya kejadian karies gigi terutama pada anak usia prasekolah.

Berbagai upaya pencegahan karies telah dilakukan mulai dari peningkatan oral hygiene, aplikasi fluoride pada permukaan gigi tetapi angka kejadian karies masih tetap tinggi.

Dari uraian diatas kami ingin mengupas bagaimana peran innate immunity mukosa rongga mulut dalam mencegah terjadinya karies gigi. Sehingga pembaca mengetahui bagaimana peran innate immunity mukosa rongga mulut dalam mencegah prevalensi karies gigi yang relative cenderung meningkat.

Besar harapan penulis buku ini dapat dipakai sebagai penambah wawasan serta landasan bagi para peneliti lainnya untuk terus mengembangkan penelitiannya tentang pencegahan karies gigi dari aspek imunologi yang merupakan salah satu faktor resiko terjadinya karies gigi.

Terima kasih

Muhammad Luthfi

BAB 1.

Fungsi kekebalan tubuh secara konseptual dibagi menjadi imunitas bawaan dan adaptif. Imunitas bawaan merupakan tanggapan yang cepat dan stereotip terhadap sejumlah besar rangsangan. Hal ini diwakili oleh hambatan fisik, kimia, dan biologi, sel khusus dan molekul terlarut, hadir pada semua individu, terlepas dari kontak sebelumnya dengan agen penyerang atau imunogen, dan tidak berubah secara kualitatif atau kuantitatif setelah kontak pertama.

Sel efektor utama imunitas bawaan adalah makrofag, neutrofil, sel dendritik, dan sel pembunuh alami (NK). Fagositosis, pelepasan mediator inflamasi, aktivasi protein sistem pelengkap, serta sintesis protein fase akut, sitokin dan kemokin adalah mekanisme utama kekebalan bawaan. Mekanisme ini diaktifkan oleh rangsangan spesifik, yang ditunjukkan oleh struktur molekuler yang ada di mana-mana dalam mikroorganisme, namun tidak pada spesies manusia. Molekul yang biasa ditemukan di permukaan mikroorganisme, seperti lipopolisakarida, mannose dan asam teichoic merupakan pathogen associated molecular pattern (PAMPs) dan mengaktifkan respons imun bawaan dengan interaksi dengan reseptor yang berbeda yang dikenal sebagai pattern recognition receptor (PRR), di antaranya adalah keluarga Toll like receptor (TLRs).² Interaksi ini adalah mirip dengan saling melengkapi antara antigen dan antibodi atau antigen dan T cell receptor (TCR), namun dalam kasus ini, tidak ada keragaman atau kemampuan adaptif untuk menghasilkan reseptor baru atau pengenalan pola molekuler baru daripada yang sudah diprogram dalam kode genetik.

Di antara berbagai PRR yang terlibat dalam opsonisasi, aktivasi komplemen, dan fagositosis, TLR dibedakan dengan peran sentralnya dalam mengikat patogen dan memulai respons inflamasi. Reseptor ini hadir terutama pada makrofag, neutrofil, dan sel dendritik (DC). Saat ini, sebelas TLR yang berbeda telah diidentifikasi, beberapa berada di membran sel, yang lain di dalam sel (Gambar 1).³ Reseptor lain yang ada dalam fagosit yang memiliki peran penting dalam respon imun adalah fraksi pelengkap, sitokin, interleukin, dan imunoglobulin. (Tipe FcγR).⁴

Fagositosis dimulai dengan adhesi reseptor permukaan fagosit ke patogen, yang kemudian diinternalisasi menjadi vesikula yang disebut fagosom. Di dalam fagosit, sekering

fagosom pada lisosom, yang isinya dilepaskan dengan pencernaan dan eliminasi patogen. Perubahan pada komponen sistem gen oksidase yang ada pada membran fagolisosom menyebabkan kecacatan pada ledakan pernapasan dan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS). Tidak adanya ROS menentukan defisiensi serius pada kapasitas destruktif fagosit, yang bertanggung jawab untuk imunodefisiensi primer yang signifikan yang disebut penyakit granulomatosa kronis.⁵

Tidak seperti respon bawaan, respon imun adaptif atau yang didapat bergantung pada pengaktifan sel khusus (the lymphocytes) dan molekul terlarut yang diproduksi oleh limfosit (Tabel 1). Fitur utama dari respon yang didapat adalah: spesifisitas dan keragaman pengakuan, memori, respon khusus, pengendalian diri, dan toleransi terhadap komponen organisme itu sendiri. Meskipun sel utama yang terlibat dalam respon imun yang didapat adalah limfosit, sel penyajian antigen (ataupun pembawa antigen) memainkan peran kunci dalam aktivasi, yang menghadirkan antigen yang terkait dengan molekul kompleks histokompatibilitas utama (MHC) terhadap limfosit T (T).⁶

SEL DENDRITIK

Sel dendritik, yang mengkhususkan diri dalam menangkap dan menyajikan antigen ke limfosit, dianggap sebagai jembatan antara kekebalan bawaan dan adaptif karena mereka tertarik dan diaktifkan oleh unsur-unsur respons bawaan dan memungkinkan penyampaian TL respons imun adaptif. Sel dendritik berada di jaringan perifer, seperti kulit, hati, dan usus, di mana mereka menangkap antigen dan menjadi aktif dan bermigrasi ke kelenjar getah bening regional, di mana mereka memproses dan menyajikan protein antigen atau lipid ke Tls. DC yang belum menghasilkan sangat efisien dalam menangkap antigen, sementara DC matang sangat efisien dalam menghadirkan antigen.⁷ Antigen yang ditangkap diproses di dalam sel dan dipresentasikan di permukaannya, terikat pada molekul MHC. Umumnya, antigen protein disajikan oleh molekul klasik MHC (kelas I dan II) yang merangsang $LT\alpha\beta$. Antigen lipid disajikan oleh MHCs molekul non-klasik sebagai CD1 dan merangsang terutama $LT\gamma\delta$ dan NK / T.

Selama masa hidup mereka, DC yang belum dewasa bermigrasi dari sumsum tulang ke dalam aliran darah, mencapai jaringan perifer sebagai kulit, di mana mereka menjadi penghuni (sel Langerhans). Aspek yang aneh adalah bahwa DC adalah sel pertama yang sampai di lokasi infeksi, bahkan mendahului neutrofil. Setelah kontak dengan antigen, DC

menjadi aktif dan bermigrasi melalui pembuluh limfatik ke organ limfoid sekunder (Gambar 3). Mereka dapat menerima sinyal dari sel NK, NK / T, dan TL yang telah matang, dan molekul proinflamasi seperti sitokin, prostaglandin, interferon, dan PAMPs.⁷ DC mempertahankan antigen dalam organ limfoid untuk waktu yang lama, yang dapat menyebabkan memori imunologis.⁸ Ini sel mengatur migrasi jenis sel kekebalan lainnya ke dalam kelenjar getah bening melalui sekresi kemokin dan mengatur diferensiasi, pematangan, dan fungsi TL dalam mode tergantung kontak dan dengan sekresi faktor yang dapat larut. Oleh karena itu, DC sangat penting untuk inisiasi dan koordinasi respons imun yang didapat.⁷ Ada dua jalur diferensiasi DC dari nenek moyang yang sama. Jalur myeloid menghasilkan myeloid DCs (mDCs), di antaranya ada sel Langerhans, DC utama di kulit, dan DC interstisial ditemukan di jaringan lain. Jalur lain diferensiasi menghasilkan plasmacytoid DCs (pDCs), yang mendominasi pada darah tepi dan mengeluarkan sejumlah besar interferon tipe I (IFN- α / β) dengan adanya infeksi virus. PDC memiliki reseptor yang mampu dari menanggapi RNA (TLRs 7 dan 8) dan DNA (TLR9), sedangkan mDC secara istimewa mengekspresikan reseptor permukaan untuk PAMPs, seperti peptidoglikan (TLR2) dan lipopolisakarida (TLR4) .⁹

DC sangat penting untuk menentukan aktivasi dan jenis kekebalan yang dimediasi oleh TLs. Secara umum, DC yang belum matang bersifat tologenik, sedangkan DC matang bersifat imunostimulan. Namun, dalam beberapa konteks, DC yang matang dapat memperluas populasi regulator TLs. Induksi toleransi atau respons imun bergantung pada himpunan sinyal yang diterima oleh DC, seperti aktivasi TLR dan sitokin yang ada di lingkungan.¹⁰ DC dapat mengkoordinasikan respon LB melalui aktivasi TL atau secara langsung oleh zat terlarut seperti INF- α .⁷

NEUTROPHILS

Neutrofil adalah leukosit yang paling banyak melimpah pada darah tepi, dengan peran penting pada tahap awal reaksi inflamasi dan sensitif terhadap agen chemotactic, seperti produk pembelahan dari pecahan komplemen (C3a dan C5a) dan zat yang dikeluarkan oleh sel mast dan basofil. Mereka termasuk di antara sel pertama yang bermigrasi dari pembuluh ke jaringan yang tertarik oleh kemokin, seperti IL-8, dan diaktifkan oleh berbagai rangsangan, seperti produk bakteri, protein pelengkap (C5a), kompleks imun (IC), kemokin, dan sitokin .

Kapasitas fagosit neutrofil dirangsang dengan mengikat reseptornya untuk opsonin, IgG-Fc, C3b, dan TLRs. Sel-sel ini juga mengalami degranulasi, melepaskan tiga kelas butiran di lingkungan ekstraselular:

Butiran primer atau azurophilic yang mengandung mediator penting, seperti myeloperoxidase, defensins, neutrofil elastase, permeabilitas-peningkatan protein, dan bakteri cathepsin G.

Butiran sekunder dengan komponen yang secara khusus disekresikan oleh neutrofil, dengan lactoferrin adalah contoh utama.

Butiran tersier dengan cathepsins dan gelatinases sebagai protein utama.

Penelitian terbaru menunjukkan bahwa neutrofil juga dapat menghasilkan apa yang disebut perangkap ekstraselular neutrofil (NET) yang dibentuk oleh zat granula dan komponen nuklir yang mampu mengeluarkan faktor virulensi dan menghancurkan bakteri ekstraselular. NET hadir dalam jumlah besar di tempat peradangan, bertindak langsung pada mikroorganisme dan juga berfungsi sebagai penghalang fisik yang mencegah penyebaran.¹¹

Dalam kondisi normal, neutrofil dibersihkan dari sirkulasi dan jaringan yang meradang oleh apoptosis. Gangguan pada apoptosis sel ini telah dikaitkan dengan beberapa kondisi autoimun, terutama SLE, seperti yang beredar

puing apoptotik yang mengandung bahan nuklir dapat menyebabkan induksi berbagai macam autoantibodi.¹¹

MACROPHAGES

Monosit terdiri dari 3-8% leukosit bersirkulasi dan, pada jaringan ikat atau parenkim organ, menimbulkan makrofag dan sel dendritik myeloid. Monosit dan makrofag adalah fagosit efisien, menelan patogen dan serpihan seluler. Tidak seperti neutrofil, makrofag dapat bertahan dalam jaringan selama berbulan-bulan sampai bertahun-tahun, bertindak sebagai sentinel sejati. Selain memiliki peran dalam imunitas bawaan, proses makrofag dan antigen hadir melalui molekul MHC, sehingga merangsang respons yang dimediasi oleh TL.4.

Baru-baru ini, keberadaan tiga subpopulasi makrofag diusulkan: diaktifkan, perbaikan jaringan, dan makrofag regulator. Yang pertama adalah makrofag klasik dengan aktivitas tumorikidal dan mikrobisida, yang mengeluarkan sejumlah besar mediator proinflamasi dan sitokin, menyajikan antigen ke TL, dan terlibat dalam respons kekebalan seluler. Tipe kedua, yang diaktifkan oleh IL-4, terutama akan terlibat dalam perbaikan jaringan dengan merangsang fibroblas dan meningkatkan deposisi matriks ekstraselular. Tipe

ketiga akan menggunakan aktivitas pengaturan melalui pelepasan IL-10, sitokin anti-inflamasi.¹³

Pada inflamasi, makrofag berperan sebagai APCs, mempotensiasi aktivasi TL dan LB dengan ekspresi molekul coestimulatory, dan melepaskan sitokin proinflamasi, seperti IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α , dan kemokin. Mereka juga memproduksi spesies oksigen reaktif (ROS), seperti anion superoksida, radikal hidroksil, hidrogen peroksida (H₂O₂), dan intermediet nitrogen reaktif yang perwakilan utamanya adalah nitric oxide (NO). NO diproduksi oleh nitrat oksida sintase yang dapat diinduksi, iNOS, tidak ada dalam makrofag yang beristirahat, namun diinduksi oleh aktivasi TLR sebagai respons terhadap PAMPs, terutama dengan adanya INF- γ .⁴ Beberapa mikroorganisme, seperti Mycobacterium tuberculosis, resisten terhadap tindakan mikrobisida dan tetap bertahan dalam fagosom makrofag yang lama. Makrofag ini menjadi besar dan multinuklear (sel raksasa) dan, bersama dengan limfosit dan fibroblas yang menumpuk di sekitar mereka, membentuk granuloma, yang merupakan upaya tubuh untuk mencegah penyebaran patogen.

NATURAL KILLER CELLS

Sel pembunuh alami (NK) berasal dari sumsum tulang dari nenek moyang yang sama dengan TL, yang merupakan 5% sampai 20% darah. sel mononuklear. Mereka adalah garis penting pertahanan nonspesifik, mengenali dan menyembuhkan sel yang terinfeksi oleh virus, bakteri dan protozoa, serta sel tumor. Selanjutnya, mereka merekrut neutrofil dan makrofag, mengaktifkan limfosit DC dan T dan B.¹⁴

Ekspansi dan aktivasi NK dirangsang oleh IL-15, diproduksi oleh makrofag, dan IL-12, inducer kuat IFN- γ dan aksi sitolitik. Setelah diaktifkan, sel NK terinfeksi dan sel-sel tumor dan mensekresikan sitokin proinflamasi (IL-1, IL-2, dan terutama IFN- γ) .¹⁴

Sitolisis yang dimediasi oleh NKs terjadi melalui tindakan perforin enzim, yang menciptakan pori-pori di membran sel target, dan granzymes, yang menembus ke dalam sel dan memicu kematian sel oleh apoptosis. Sel NK memiliki aktivasi dan penghambat reseptor, dan keseimbangan antara sinyal yang dihasilkan oleh reseptor ini menentukan aktivasi NK. Satu kelas reseptor termasuk famili imunoglobulin (KIR), sedangkan yang lainnya termasuk famili C-type lectin. Pada manusia, ada 14 KIR, delapan aktivator dan enam inhibitor.¹⁵ Reseptor penghambat mengenali molekul MHC kelas I, yang diekspresikan pada permukaan semua sel nukleasi. Secara umum, ada dominasi reseptor penghambat, yang mencegah lisis

sel normal host yang mengekspresikan kelas MHC I. Sel yang terinfeksi, terutama oleh virus, dan sel tumor sering memiliki ekspresi rendah protein MHC kelas I, menjadi rentan terhadap tindakan NK (Gambar 4) .15 Kapasitas tumorisidal NK meningkat dengan sitokin, seperti interferon dan interleukin (IL-2 dan IL-12). Tindakan efektor NK lainnya adalah penghancuran sel yang dilapisi dengan IgG, melalui reseptor Fc (Fc γ RIII atau CD16), dengan mekanisme sitotoksitas seluler yang bergantung pada antibodi (ADCC) .14

MAST CELLS

Sel mast berasal dari CD34 + nenek moyang hematopoietik di sumsum tulang dan, secara umum, tidak ditemukan dalam sirkulasi. Dari sumsum tulang, nenek moyang bermigrasi ke jaringan perifer sebagai sel yang belum matang dan berdiferensiasi secara in situ sesuai dengan ciri lingkungan mikro tertentu.^{16,17} Sel mast yang matang terdistribusi secara strategis di sepanjang pembuluh darah, saraf, dan di bawah epitel kulit dan selaput lendir. ; mereka sangat melimpah di bidang kontak lingkungan dan memainkan peran kunci dalam reaksi inflamasi akut.¹⁸ Sel mast memiliki reseptor permukaan dengan afinitas tinggi, Fc ϵ RI, terikat pada molekul IgE, dan oleh antigen multivalen oleh IgE. Stimuli seperti produk aktivasi komplemen, zat dasar, termasuk beberapa racun hewani, neuropeptida tertentu, dan Beberapa agen fisik (trauma mekanis, panas, dan dingin) dapat mengaktifkan sel mast secara independen dari pengikatan IgE. Pengikatan komponen bakteri ke TLR 1, 2, 4, dan 6, dan reseptor spesifik lainnya seperti CD48, juga mengaktifkan sel mast, yang menyebabkan pelepasan mediator.

Contoh klasik keterlibatan sel mast dalam proses inflamasi adalah reaksi di mana mereka, bersama dengan ekuivalen sirkulasinya, basofil, kontak dengan alergen memicu reaksi hipersensitivitas tipe I melalui aktivasi Fc ϵ RI. Setelah stimulus, degranulasi dan pelepasan mediator preformed terjadi, dilanjutkan dengan pelepasan mediator yang baru terbentuk. Mediator preformed meliputi amina vasoaktif, protease, heparin, IL-4, TNF- α , dan GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor). Mediator yang terbentuk setelah aktivasi termasuk platelet Pelepasan mediator ini menginduksi migrasi sel inflamasi (neutrofil dan makrofag), peningkatan permeabilitas vaskular, sekresi lendir, peningkatan

motilitas gastrointestinal, dan bronkokonstriksi, yang merupakan tanda-tanda. dan gejala alergi dan anafilaksis.¹⁹

Urtikaria Idiopatik kronis terutama disebabkan oleh degranulasi sel mast, dan pada 25% sampai 50% kasus auto-antibodi yang diarahkan terhadap reseptor FcεRIα ditemukan dan, lebih jarang, melawan IgE itu sendiri. Autoantibodi ini menyebabkan pelepasan histamin dan menandai urtikaria autoimun kronis, dengan gambaran klinis dan histologis yang serupa dengan yang ditemukan pada reaksi fase akhir.⁴

Ada bukti eksperimental keterlibatan sel mast dalam penyakit kardiovaskular, penyakit neoplastik, infeksi parasit dan bakteri, penyakit fibrotik, dan penyakit autoimun.²⁰ Beberapa penelitian histologis telah melaporkan adanya sel mast pada sinovium manusia normal dan perluasan populasi ini pada rheumatoid arthritis, asam urat, osteoarthritis, antara lain.²¹ Fungsi efektor sel mast di sinovia menunjukkan keterlibatan mereka dalam perekrutan leukosit, aktivasi fibroblast dan hiperplasia, angiogenesis, dan penghancuran tulang rawan dan tulang.²² Mereka juga berpartisipasi dalam penghancuran bersama dengan menginduksi fibroblas dan kondrosit ke mensekresi matriks metaloproteinase dan mempromosikan diferensiasi osteoklas. Sebenarnya, keterlibatan sel mast dengan aktivitas kemotaksis telah dilaporkan dalam berbagai kondisi klinis autoimun, termasuk rheumatoid arthritis, sindrom Sjögren, sklerosis sistemik, penyakit tiroid autoimun, urtikaria kronis, pemfigus, dan aterosklerosis.²³

BASOPHILS

Basofil adalah granulosit yang berasal dari nenek moyang di sumsum tulang, di mana mereka dewasa dan menghasilkan kurang dari 1% leukosit darah perifer. Meskipun tidak normal hadir dalam jaringan, mereka dapat direkrut ke tempat peradangan, bersama dengan eosinofil. Granul yang ditemukan di basofil memiliki mediator yang serupa dengan sel mast. Basofil juga mengekspresikan FcεRI, mengikat IgE, dan diaktifkan oleh kompleks antigen-IgE dan dapat menyebabkan reaksi hipersensitifitas segera.

EOSINOPHILS

Granulosit dan eosinofil adalah sel perusak infeksi yang penting, dan tindakan antiparasit mereka (cacing) adalah salah satu yang paling kuat dan efektif. Mereka juga penting dalam reaksi alergi dan asma. Eosinofil berkembang di sumsum tulang,

memproduksi dan menyimpan berbagai butiran proteolitik sekunder sebelum meninggalkan sumsum. Setelah pematangan, mereka menyebar melalui aliran darah dalam

jumlah kecil dan dapat ditemukan dalam jumlah yang lebih banyak di daerah mukosa, seperti saluran gastrointestinal, pernafasan, dan genitourinari.⁴ Eosinofil direkrut ke tempat infeksi parasit dan reaksi alergi oleh molekul adhesi dan kemokin. Mereka melawan infeksi parasit dengan sitotoksitas sel yang dimediasi oleh antibodi, dengan partisipasi reseptor FcεRI. Selama proses ini, mereka mematuhi patogen yang dilapisi dengan IgE (atau IgA) dan melepaskan kandungan granularnya setelah reseptor FcεRI mengikat IgE yang terikat pada antigen target. Setelah diaktifkan, eosinofil menginduksi peradangan melalui produksi dan pelepasan kandungan kationik eosinofilik dari butiran. Komponen utama butiran ini adalah: protein dasar utama, protein kationik eosinofil, neurotoksin turunan eosinofil, dan peroksidase eosinofil, yang memiliki potensi sitotoksitas besar pada parasit, tetapi juga dapat menyebabkan cedera jaringan. Protein kationik eosinofil dan neurotoksin adalah ribonuklease dengan sifat antiviral. Protein dasar utama menunjukkan toksitas pada parasit, menginduksi degranulasi sel mast dan basofil, dan mengaktifkan sintesis faktor remodeling oleh sel epitel. Protein kationik eosinofil menciptakan pori-pori di membran sel target, memungkinkan masuknya molekul sitotoksik lainnya; menghambat proliferasi TL; menekan produksi antibodi oleh LB; menginduksi degranulasi sel mast; dan merangsang sekresi glukosaminoglikan oleh fibroblas.

Eosinofil peroksidase membentuk ROS dan NO, meningkatkan stres oksidatif pada sel target dan menyebabkan kematian sel oleh apoptosis dan nekrosis.²⁵ Mekanisme efektor lainnya yang berkontribusi terhadap proses inflamasi meliputi produksi berbagai sitokin, seperti IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, dan TNF- α ,²⁵ dan pelepasan mediator lipid proinflamasi, seperti leukotrien (LTC₄, LTD₄, LTE₄), dan prostaglandin (PGE₂). Enzim elastase dan faktor pertumbuhan TGF- β , faktor pertumbuhan yang berasal dari platelet (PDGF), dan faktor pertumbuhan pembuluh endotel (VEGF) berkontribusi pada remodeling jaringan.

SISTEM COMPLEMENT

Sistem komplemen (CS) terdiri dari keluarga dengan lebih dari 20 glikoprotein plasma, disintesis di hati, tetapi juga oleh makrofag dan fibroblas. Setiap komponen aktif SC memperoleh aktivitas proteolitik yang mengaktifkan elemen berikutnya dalam kaskade. Terakhir, ada pembentukan kompleks serangan membran (MAC), yang mempromosikan lisis osmotik sel target, yang mendukung penghapusan agen infeksius.

Ada tiga bentuk aktivasi CS: klasik, alternatif, dan via mannose-binding lectin (MBL). Pengaktifan jalur ini berkontribusi terhadap integrasi mekanisme efektor imunitas bawaan dan adaptif (Gambar 5). Pada respon imun bawaan, patogen yang menyerang organisme menemukan zat terlarut dari respon imun bawaan, seperti protein CS, protein C-reaktif, dan lainnya. Dalam imun adaptif, CS diaktifkan dengan mengikat antibodi preformed ke patogen atau antigen (kompleks imun).²⁶ Jalur lektin dimulai dengan mengenali mannose pada permukaan mikroorganisme oleh MBL yang terikat pada protease serum MASP1 dan MASP2. Aktivasi protease ini menghasilkan pemecahan komponen CS C2 dan C4 menjadi fragmen yang lebih kecil (C4a dan C2b) dan fragmen yang lebih besar (C4b dan C2a). Kompleks C4bC2a adalah konstanta C3 dari jalur klasik, yang membelah C3 menjadi C3a dan C3b larut, yang pada gilirannya mengikat C4bC2a pada permukaan mikroorganisme. Kompleks C4bC2aC3b, yang disebut C5 convertase, membelah komponen C5, mengikuti jalur ini dan berpuncak pada pembentukan MAC. Jalur klasik menyerupai jalur lektin dan diprakarsai oleh pengikatan komponen C1q ke dua molekul IgG atau satu molekul IgM, kompleks dengan target antigen (kompleks imun). Pengikatan ini mengaktifkan protease R (C1r) dan S (C1s) yang terkait dengan C1q, membelah komponen C2 dan C4 dan mengikuti jalur, seperti yang dijelaskan. Karena jalur klasik bergantung pada produksi antibodi spesifik sebelumnya yang menempel pada permukaan patogen, hal itu terkait dengan respons imun humoral spesifik.²⁶

Jalur alternatif dimulai dengan ruptur komponen C3 spontan ke fragmen C3a dan C3b). Tioester yang mengikat fragmen C3b terkena pembelahan ini, yang memungkinkan pengikatan kovalen mereka ke permukaan mikroorganisme yang menyerang. Jika tidak ada pengikatan komponen C3b, tempat pengikatan esterium dihidrolisis dengan cepat dan fragmennya tidak aktif. Pengikatan C3b memungkinkan pengikatan pada Faktor B, yang kemudian dibelah menjadi fragmen Ba dan Bb oleh Faktor D. Kompleks C3bBb (jalur alternatif C3 convertase) membelah lebih banyak molekul C3 dan tetap berada di permukaan. Kompleks ini distabilkan oleh properdin (Factor P), sehingga memperkuat pemecahan C3. Komponen C3bBb membelah C3, menghasilkan C3bBbC3b, protease yang mampu membelah C5, langkah terakhir dari jalur alternatif.²⁶ Lectins pathways, classic and alternative, memiliki kesamaan pembentukan konverter C5, yang mendorong pembelahan komponen C5 dan menghasilkan fragmen C5a dan C5b. Pengikatan C5b ke permukaan patogen memulai pembentukan kompleks serangan membran dengan mengikat komponen

berurutan C6 dan C7 di lapisan ganda lipid membran sel. Kompleks C5b, 6,7 memungkinkan pengikatan komponen C8 dan, akhirnya, ada polimerisasi C9 yang melintasi lapisan ganda lipid dan mempromosikan lisis osmotik agen infeksius.

Fragmen yang lebih kecil yang dilepaskan selama kaskade memiliki efek biologis yang penting. C2a dan C4a berhubungan dengan perubahan permeabilitas vaskular; Bb terkait dengan aktivasi makrofag; C3a, C4a, dan C5a menginduksi aktivasi sel mast dan neutrofil; dan C5a merangsang motilitas dan adhesi neutrofil ke fokus inflamasi. Fragmen C3b dan C4b berfungsi sebagai opsonin, meningkatkan proses fagositosis dengan interaksi dengan reseptor pelengkap CR1 pada permukaan fagosit. Interaksi CR1-C3b juga mendorong pembersihan kompleks imun, yang dibawa oleh sel darah merah dan dikeluarkan oleh fagosit di hati dan limpa.

Peraturan aktivasi CS dipromosikan oleh protein terlarut yang beredar dan protein yang terikat pada membran sel. Ini Mekanisme spesifik spesies, memastikan bahwa aktivasi CS pada tingkat rendah tidak mengganggu sel organisme sendiri, dan mencegah terjadinya pengendapan kompleks yang dihasilkan pada sel autologous.

KOMPLEKS HISTOCOMPATIBILITAS UTAMA

Komplek histokompatibilitas utama manusia (MHC) terdiri dari sekumpulan gen polimorfik yang disebut human leukocyte antigen (HLA) dan terdiri dari lebih dari 120 gen fungsional, dimana sekitar 20% berhubungan dengan imunitas. Hubungan antara penyakit autoimun dan gen MHC mencerminkan peran penting molekul ini dalam mengarahkan respon imun. Untuk perannya dalam presentasi antigen, MHC menyediakan hubungan antara respon bawaan dan respons adaptif.⁸ Pada manusia, gen ini terletak pada kromosom 6 dan secara tradisional dibagi menjadi kelas I, II, dan III.²⁷ Hanya gen kelas I dan II terlibat dalam menyajikan protein antigen ke LT. Molekul kelas I hadir pada permukaan semua sel nukleasi, sedangkan kelas II ditemukan terutama pada APC (makrofag, DC, dan LB). Semua molekul MHC yang ditemukan di permukaan sel memiliki peptida terkait. Meskipun molekul kelas I dan II menunjukkan karakteristik struktural yang berbeda, keduanya dinyatakan sebagai heterotrimer di mana dua rantai berasal dari molekul MHC dan yang ketiga adalah peptida yang disajikan ke TL (Gambar 6 C) .⁸ Ada sekitar 20 gen di wilayah HLA kelas I, dan tiga di antaranya (HLA-A, B, dan C) disebut klasik (Gambar 6A). Gen yang mengkodekan molekul MHC klasik sangat polimorfik. Molekul kelas I memiliki satu rantai α yang dikodekan oleh gen HLA-A, B, atau C, dan rantai invariant kecil, mikroglobulin $\beta 2$. Karena

gen ini memiliki codominance, setiap individu mungkin memiliki tiga sampai enam jenis kelas HLA I di permukaan selnya, yang dikodekan oleh alel maternal dan paternal gen HLA-A, B, dan C.8 Molekul kelas I hadir secara endogen. peptida ke CD8 TLs, yaitu peptida yang berasal dari protein autologous dalam sitoplasma.

Molekul HLA kelas II terdiri dari dua rantai, α dan β , keduanya dikodekan oleh gen polimorfik di daerah kompleks MHC kelas II (Gambar 6 B). Rantai α dan β dari molekul kelas II dikodekan oleh gen HLA-DR, DP, dan keluarga DQ. Biasanya, rantai α dari jenis apa pun (misalnya tipe DR) dikaitkan dengan rantai β dengan tipe yang sama, namun mungkin ada pasangan heterolog; Dengan demikian, tergantung pada tingkat homozigositas atau heterozigositas, individu dapat berkembang di permukaan APC-nya 10 sampai 20 molekul kelas II yang berbeda. Dalam nomenklatur gen di kelas II, huruf pertama menunjukkan kelas (D), yang kedua menunjukkan keluarga (M, O, P, Q, R) dan kelas ketiga menunjukkan rantai A (α) atau B (β). Gen individu dari masing-masing keluarga ini dibedakan berdasarkan angka, dan nomenklatur lengkap varian alel didahului oleh tanda bintang. Sebagai contoh, HLA-DRB1 * 0101 berarti 0101 alel gen 1 yang mengkodekan rantai β molekul kelas II keluarga DR (Gambar 6 D). Molekul HLA kelas II menyajikan peptida eksogen ke TL, yaitu berasal dari proteolisis protein non-autologous dalam fagoleptosom.

PUSTAKA

1. Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-44.
2. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388:394-7.
3. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immunity recognition. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:197-216.
4. Abbas AK, Lichtman AH: *Cellular and Molecular Immunology*. 6th ed. Saunders 2003.
5. Heyworth PG, Cross AR, Curnutte JT. Chronic granulomatous disease. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:578-84.
6. Delves PJ, Roitt D. The Immune System – First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:37-50.

7. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:767-811.
8. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994; 76:287-99.
9. Shortman K, Liu YJ. Mouse and human dendritic cells subtypes. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:151-61.
10. Sallusto F, Lanzavecchia A. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J Exp Med* 1999; 189:611-4.
11. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1477-8.
12. Hanayama R, Tanaka M, Miwa Kshinohara A, Iwamatsu A, Nagata S. Identification of a factor that links apoptotic cells to phagocytes. *Nature* 2002; 417:182-7.
13. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:958-69.
14. Cerwenka A, Lanier LL. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:41-9.
15. Yokoyama WM, Kim S, French AR. The Dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22:405-29.
16. Kitamura Y, Kanakura Y, Fujita J, Nakano T. Differentiation and transdifferentiation of mast cells: a unique member of the hemopoietic cell family. *Int J Cell Cloning* 1987; 3:108-21.
17. Kitamura Y, Kanakura Y, Sonoda S, Asai H, Nakano T. Mutual phenotypic changes between connective tissue type and mucosal mast cell. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987; 82:244-8.
18. Soter NA. Mast cell in cutaneous inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 1983; 80: Suppl:22s-25s.
19. Metcalfe DD. Mast cells and mastocytosis. *Blood* 2008; 112: 946-56.
20. Kalesnikoff J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol* 2008; 9:1215-23.
21. Nigrovic PA, Lee DM. Synovial mast cells: role in acute and chronic arthritis. *Immunol Rev* 2007; 217:19-37.
22. Nigrovic PA, Lee DM. Review: mast cells in inflammatory arthritis. *Arthritis Res Ther*

2005; 7:1-11.

23. Sayed BA, Christy A, Quirion MR, Brown MA. The Master Switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annu Rev Immunol* 2008; 26:705-39.
24. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001; 357:1777-89.
25. Hogan SP, Rosenberg HF, Moqbel R, Phipps S, Foster PS, Lacy P et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:709-50.
26. Barrington R, Zhang M, Fischer M, Carroll MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. *Immunol Rev* 2001; 180:5-15.
27. Klein J, Sato A. The HLA System. First of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:702-9.

