

Pengaruh Pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) Menggunakan *Self Antigen* dsDNA terhadap Jumlah Sel T *Helper* 17 (Th17) dan Kadar Interleukin 17A pada Mencit Balb/c Lupus Induksi Pristan



TESIS

Diusulkan oleh:

Toha Muhajir Albaar 156070122011003

Dosen Pembimbing:

Prof. Dr. dr. Kusworini Handono, M.Kes, Sp.PK (K)

Dr. dr. Nurdiana, M.Kes

**PROGRAM MAGISTER ILMU BIOMEDIK
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2018





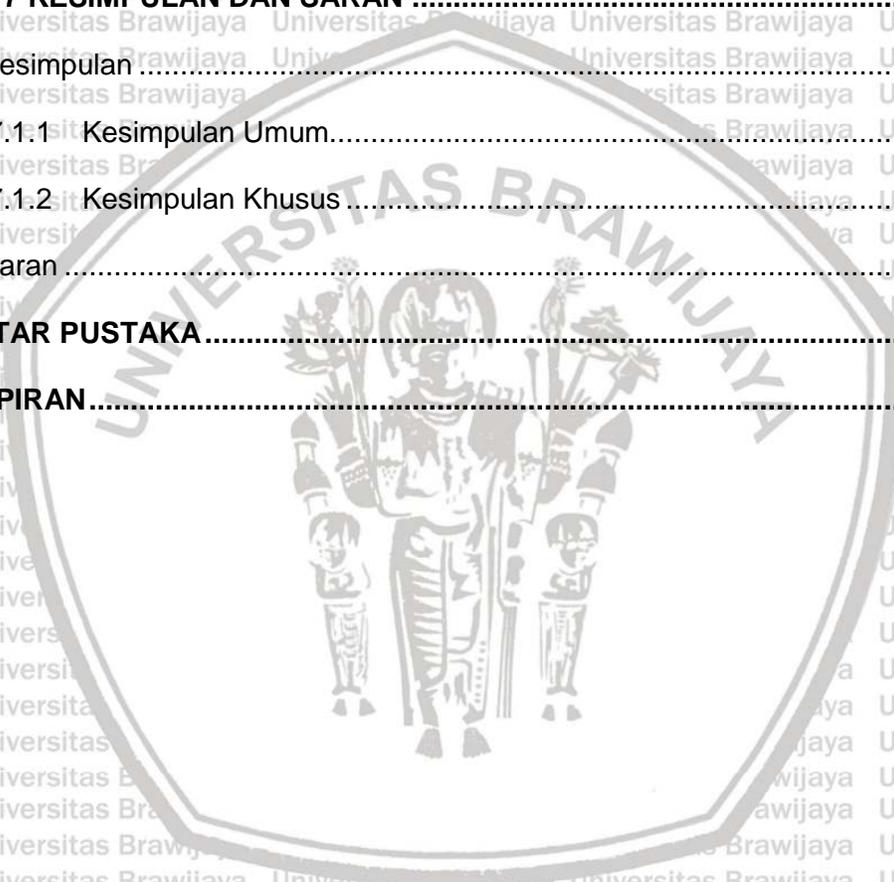
DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
IDENTITAS TIM PENGUJI TUGAS AKHIR	iv
KATA PENGANTAR	v
RINGKASAN	vii
SUMMARY	ix
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR SINGKATAN	xvii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.2.1 Rumusan Masalah Umum	3
1.2.2 Rumusan Masalah Khusus	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademik	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Lupus Eritematosus Sistemik	5

2.1.1	Definisi LES	5
2.1.2	Epidemiologi LES	5
2.1.3	Faktor Resiko LES	6
2.1.4	Patogenesis LES	7
2.1.5	Manifestasi Klinis LES	10
2.1.6	Diagnosis LES	11
2.1.7	Penatalaksanaan Penyakit LES	12
2.2	Toleransi Sistem Imun	14
2.3	dsDNA	15
2.3.1	dsDNA	15
2.3.2	dsDNA pada LES	16
2.4	<i>Escalating Dose Antigen Specific Immunotherapy (EDI)</i>	17
2.5	Peran Sel Th17 pada LES	19
2.6	Peran Sitokin IL-17A pada LES	22
2.7	Mekanisme Pristan Menginduksi Lupus	24
2.8	Kerangka Teori	25
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS		26
3.1	Kerangka Konsep	26
3.2	Hipotesis	27
3.2.1	Hipotesis Umum	27
3.2.2	Hipotesis Khusus	27
BAB 4 METODE PENELITIAN		28
4.1	Rancangan Penelitian	28
4.2	Populasi Dan Sampel	30
4.3	Kelompok Penelitian	31
4.4	Variabel Penelitian	32

4.4.1	Variabel Bebas Penelitian.....	32
4.4.2	Variabel Tergantung Penelitian.....	32
4.5	Definisi Operasional:.....	32
4.6	Bahan Dan Alat Penelitian.....	34
4.6.1	Bahan Penelitian.....	34
4.6.2	Alat.....	35
4.7	Prosedur Penelitian.....	36
4.7.1	Persiapan Hewan Coba.....	36
4.7.2	Injeksi Pristan Pada Hewan Coba.....	36
4.7.3	Isolasi Dsdna.....	37
4.7.4	Prosedur Nanodrop.....	37
4.7.5	Preparasi Dsdna.....	38
4.7.6	Pembedahan Hewan Coba.....	40
4.7.7	Pengukuran Jumlah Sel Th17.....	40
4.7.8	Pengukuran Kadar Il-17a.....	41
4.7.9	Prosedur Pengumpulan Dan Analisis Data.....	42
4.8	Skema Alur Penelitian.....	43
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....		44
5.1	Identifikasi Karakteristik Mencit Balb/C Lupus Induksi Pristan.....	44
5.1.1	Manifestasi Klinis Mencit Balb/C Lupus Induksi Pristan.....	44
5.1.2	Manifestasi Serologis Mencit Balb/C Induksi Pristan.....	47
5.2	Efek Pemberian Terapi Edi Dsdna Terhadap Jumlah Sel T Helper 17 (Th17) Pada Mencit Lupus Induksi Pristan.....	48
5.3	Efek Pemberian Terapi Edi Dsdna Terhadap Kadar Interleukin 17a (Il-17a) Pada Mencit Lupus Induksi Pristan.....	50
BAB 6 PEMBAHASAN.....		53

6.1 Manifestasi Mencit Lupus Induksi Pristan.....	53
6.2 Efek Pemberian Edi Dsdna Terhadap Jumlah Sel Th17 Pada Mencit Lupus Induksi Pristan.....	56
6.3 Efek Pemberian Edi Dsdna Terhadap Kadar Il-17a Pada Serum Mencit Lupus Induksi Pristan.....	59
BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN	62
7.1 Kesimpulan.....	62
7.1.1 Kesimpulan Umum.....	62
7.1.2 Kesimpulan Khusus.....	62
7.2 Saran.....	62
DAFTAR PUSTAKA.....	63
LAMPIRAN.....	70



RINGKASAN

Toha Muhajir Albaar, NIM. 156070122011003. Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Pengaruh Pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) Menggunakan *Self Antigen* dsDNA terhadap Jumlah Sel T *Helper* 17 (Th17) dan Kadar Interleukin 17A pada Mencit Balb/c Lupus Induksi Pristan. Komisi Pembimbing Ketua: Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK; Anggota : Dr. dr. Nurdiana, M.Kes.

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun yang ditandai dengan adanya inflamasi tersebar luas, mempengaruhi setiap organ atau sistem dalam tubuh. Penyakit ini berhubungan dengan deposisi antibodi terhadap autoantigen (*self antigen*) dan kompleks imun, sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan. LES merupakan penyakit global yang berkaitan dengan peningkatan kematian usia muda yang terjadi di berbagai belahan dunia. Pasien LES diperkirakan sekitar 5 juta orang yang terdiagnosis dan setiap tahunnya ditemukan lebih dari 100 ribu penderita baru. Penyakit ini sering diderita oleh wanita usia produktif dan tidak sedikit dari wanita penderita LES tersebut yang mengalami penurunan produktivitas dan kemampuan dalam melakukan kegiatan sehari-hari. Pada LES terjadi hiperreaktivitas sistem imun akibat kegagalan proses toleransi tubuh dalam meregulasi sistem imun sehingga menyebabkan respon imun yang berlebihan serta pembentukan antibodi terhadap *self antigen* seperti antibodi dsDNA yang dihasilkan oleh sel plasma dan menyebabkan berbagai macam manifestasi klinis LES.

Escalating Dose (Antigen-Spesifik) Immunotherapy / EDI adalah metode terapi untuk mensupresi respon imun melalui mekanisme toleransi dengan cara menginjeksikan *self-antigen* dengan dosis yang bertahap. Metode EDI telah diteliti pada penyakit autoimun *multiple sclerosis* dan terbukti mampu mengembalikan toleransi imun dengan menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif termasuk sel T dan sel B. Pada LES, sel Th17 teraktivasi dan memproduksi IL-17A yang berperan dalam memfasilitasi aktivasi sel T dan infiltrasinya menuju jaringan dengan cara meningkatkan regulasi ekspresi *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *matrix metalloproteinase* yang menyebabkan peradangan kronis dan kerusakan jaringan. Beberapa penelitian menunjukkan peningkatan Th17 berkorelasi yang positif dengan aktivitas penyakit LES.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian terapi EDI menggunakan *self-antigen* dsDNA dalam berbagai dosis pada mencit Balb/c lupus induksi pristan terhadap persentase sel Th17 dan kadar IL-17A. Metode penelitian yang dilakukan adalah desain eksperimen murni di laboratorium secara *in vivo*. Mencit betina Balb/c berusia 6-8 minggu dibagi kelompok kontrol negatif (mencit normal, n=5) dan kelompok mencit lupus induksi pristan. Kelompok mencit lupus induksi pristan diberi injeksi 0,5 cc (782 μ g/ml) pristan secara i.p. Dua belas minggu paska injeksi pristan, mencit dievaluasi manifestasi klinis dan serologis (kadar anti-dsDNA). Mencit yang menunjukkan tanda-tanda lupus atau mencit lupus induksi pristan dibagi menjadi empat kelompok diantaranya kelompok kontrol positif (n=5): mencit lupus induksi pristan tanpa terapi EDI dsDNA, kelompok terapi A (n=5): mencit lupus induksi pristan dengan terapi EDI dsDNA dosis I (0,01 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml), kelompok terapi B (n=5): mencit lupus induksi pristan dengan terapi EDI dsDNA dosis II (0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml), dan kelompok terapi C (n=5): mencit lupus induksi pristan dengan terapi EDI dsDNA dosis III (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan. Persentase sel Th17 diukur menggunakan metode flowcytometry dari limpa sedangkan kadar IL-17A diukur menggunakan metode ELISA dari serum darah mencit. Analisis data dilakukan dengan tingkat kepercayaan 95%. Uji beda dilakukan dengan uji *One Way ANOVA* jika data terdistribusi normal dan homogen dan uji *Kruskal Wallis* jika data tidak terdistribusi normal dan atau tidak homogen. Uji *post hoc* dilakukan untuk mengetahui perbedaan antar kelompok.

Hasil penelitian ini menunjukkan pemberian injeksi *pristane* secara i.p. dosis tunggal dapat menginduksi tanda-tanda lupus yaitu penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas dan peningkatan kadar anti-dsDNA secara signifikan. Hasil menunjukkan rata-rata persentase sel Th17 pada kelompok terapi A (3,62 \pm 0,37), B (3,86 % \pm 1,03), dan C (3,73 % \pm 0,49) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+) meskipun tidak signifikan. Rata-rata kadar IL-17A pada kelompok terapi A (29,28 \pm 2,99) dan C (25,60 \pm 3,91) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+). Sedangkan rata rata kadar IL-17A pada kelompok terapi B (34,50 \pm 12,85) cenderung mengalami peningkatan dibanding kelompok kontrol positif (K+).

Pada penelitian ini pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit lupus induksi pristan dapat menurunkan jumlah sel Th17 melalui peningkatan sel T-Reg dan produksi sitokin imunomodulator IL-10 dan TGF- β . Pada penelitian sebelumnya, pemberian imunoterapi dengan antigen spesifik dengan metode EDI terbukti dapat menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif. Studi lain juga menunjukkan rasio antara Treg terhadap Th17 mengalami penurunan pada pasien LES yang mengalami eksaserbasi serta rasio yang meningkat dari Treg terhadap Th17 pada kelompok kontrol.

Pemberian terapi EDI dsDNA pada kelompok perlakuan juga tidak menyebabkan perbedaan yang signifikan dibanding kelompok kontrol positif serta tidak ada perbedaan antara kelompok kontrol negatif dengan positif. Meskipun hasil ini tidak sesuai dengan banyak penelitian yang menjelaskan adanya hubungan kuat antara IL-17A dengan LES, namun terdapat beberapa studi lain yang melaporkan tidak adanya hubungan antara IL-17 dengan aktivitas penyakit. Selain itu, pada penelitian penyakit autoimun lain juga terdapat fluktuasi kadar IL-17A di berbagai waktu dari lamanya penyakit yang diderita. Hal ini menunjukkan kadar IL-17A dapat berfluktuasi bergantung pada perjalanan penyakitnya serta pemilihan waktu dalam mengamati kadar IL-17A merupakan hal yang penting dalam korelasinya dengan perjalanan serta aktivitas penyakitnya. Efek pemberian EDI dsDNA pada mencit lupus induksi pristan menunjukkan penurunan jumlah sel Th17 serta tidak terdapat penurunan kadar IL-17A.



SUMMARY

Thoha Muhajir Albaar, NIM. 156070122011003. Biomedical Science Master Degree, Medical Faculty of Universitas Brawijaya. 2018. Effect of Escalating Dose Antigen Specific Therapy with dsDNA on Th17 Cell Number and Serum Interleukine-17A Levels in Pristane Induced Lupus Balb/c Mice. Supervisor Chairman: Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK, Member: Dr. dr. Nurdiana, M.Kes.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is an autoimmune disease which marked by wide inflammatory process, affecting multiple organs and systems in the body. This disease is associated with the deposition of antibodies against self antigen and led to destructions of tissues. SLE is a global disease that is associated with an increase in young age deaths that occur in various parts of the world. LES patients are estimated to be around 5 million diagnosed and each year more than 100 thousand newly diagnosed patients are found. This disease is often suffered by women of productive age and not a few of the women with SLE who experience decreased in productivity and ability to carry out daily activities. SLE is caused by hyperreactivity due to failure of the body's tolerance process in regulating the immune system, causing excessive immune responses and the formation of antibodies to self antigens such as dsDNA antibodies produced by plasma cells and causing various types of clinical manifestations of LES.

Escalating Dose (Antigen-Specific) Immunotherapy / EDI is a therapeutic method for suppressing immune responses through a tolerance mechanism by injecting self-antigens in a gradual dose. The EDI method has been investigated in autoimmune disease multiple sclerosis and has been shown to restore immune tolerance by inducing the activation and function of Treg to produce IL-10 and TGF- β cytokines that work to suppress autoreactive immune cells including T and B cells. Th17 will activated in SLE and produced IL-17A which plays a role in facilitating T cell activation and infiltration into tissues by increasing regulation of expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and metalloproteinase matrix which causes chronic inflammation and tissue damage. Several studies have shown that an increase in Th17 has a positive correlation with LES disease activity.

This study was aim to determine the effect of EDI therapy using self-antigen dsDNA in various doses to *pristane* induced lupus (PIL) Balb/c mice towards Th17 cell percentages and IL-17A levels. This research uses true experimental study design in laboratory with post-test-only control group design. Samples were selected using simple random sampling method. Balb/c female mice 6-8 weeks old and 20-30 grams body weight separated randomly to negative control group (healthy mice) and pristane induced lupus (PIL) mice group. PIL mice groups were injected 0.5 cc (782 μ g / ml) pristane intraperitoneally. Twelve weeks after the injection of pristane, the mice were evaluated for clinical and serological manifestations (anti-dsDNA levels). Mice with lupus signs (PIL mice) were divided into four groups; positive control group: PIL mice without EDI dsDNA therapy, treatment A: PIL mice with EDI dsDNA therapy dose I (0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml), treatment B: PIL mice with EDI dsDNA therapy dose dose II (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml), and treatment C: PIL mice with EDI dsDNA therapy dose III (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) was administered once every week respectively. This study was measured some variables including percentages of Th17 cells in spleen mice using flowcytometry method and IL-17A levels measured using ELISA. The data obtained were analyzed first using the normality and homogeneity test of variance with confidence level of 95%. Comparable tests performed by One Way ANOVA test if the data were normal distributed and homogenous and Kruskal Wallis test if the data were not normally distributed and or not homogeneous. Analysis can be continued post hoc test to know the differences between groups.

The results of this study showed that a single dose of i.p. dose injection could induce signs of lupus including weight loss, hair loss, decreased activity and significantly increased anti-dsDNA levels. The results showed that the average percentage of Th17 cells in treatment group A (3,62 \pm 0,37), B (3,86 % \pm 1,03), and C (3,73 % \pm 0,49) tended to decrease compared to positive group (K+) although not significant. Mean IL17A levels in treatment A (29,28 \pm 2,99) and C (25,60 \pm 3,91) tends to decrease compared to positive group (1.60 \pm 0.51), While the average IL-17A level in the B therapy group (34.50 \pm 12.85) tended to increase compared to the positive control group (K+).

In this study, the administration of EDI dsDNA in the group of PIL mice can reduce the number of Th17 cells by increasing T-Reg cells and the production of IL-10 and TGF- β immunomodulatory cytokines. In previous studies, administration of immunotherapy with specific antigens with EDI methods was shown to induce T-Reg activation and function for IL-10 and TGF- β cytokine secretion that work suppresses

autoreactive immune cells. Another study also showed a decrease in the ratio of Th17 to Treg in LES patients who had exacerbations and an increased ratio of Treg to Th17 in the control group.

Administration of EDI dsDNA therapy in PIL mice treatment group also did not make a significant difference compared to the positive control group and there was no difference between PIL mice and negative control. Although these results are incompatible with many studies that explain the strong association between IL-17A and LES, there are several other studies that report no association between IL-17 and disease activity. In addition, in other autoimmune diseases studies there were also fluctuations in IL-17A levels at various times from the duration of the disease. This shows that IL-17A levels can fluctuate depending on the course of the disease. The timing of observing IL-17A levels is important in its correlation with the course and activity of the disease. The effect of EDI dsDNA administration on lupus induction pristan showed a decrease in the number of Th17 cells and no decrease in IL-17A levels.



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit autoimun adalah kelompok beragam kondisi peradangan kronis yang disebabkan oleh respon imun yang tidak toleran terhadap jaringan tubuh sendiri dan telah mempengaruhi jutaan orang di seluruh dunia.

Salah satu penyakit yang berhubungan dengan autoimun adalah Lupus Eritematosus Sistemik (LES). LES merupakan penyakit peradangan jaringan ikat multisistem dengan angka mortalitas dan morbiditas yang tinggi (Tsokos, 2011).

Prevalensi LES di seluruh dunia bervariasi cukup luas di berbagai negara. Pasien LES diperkirakan sekitar 5 juta orang yang terdiagnosis dan setiap tahunnya ditemukan lebih dari 100 ribu penderita baru. Secara umum, negara – negara di Eropa memiliki insiden kejadian LES yang lebih rendah dibandingkan dengan negara – negara yang berada di Asia, Australasia, dan Amerika. Di Indonesia, jumlah penderita LES diperkirakan 1.250.000 orang (Kemenkes RI, 2017). Penyakit ini lebih banyak diderita oleh wanita dibandingkan pria dengan rasio sekitar 9 banding 1 (Rees *et al.*, 2016).

Selain itu, penyakit ini sering diderita oleh wanita usia produktif dan tidak sedikit dari wanita penderita LES tersebut yang mengalami penurunan produktivitas dan kemampuan dalam melakukan kegiatan sehari-hari.

Dampak penyakit LES ini tidak hanya dirasakan bagi penderitanya saja melainkan juga dirasakan bagi keluarganya mengingat peran wanita dalam keluarga.

Patogenesis LES hingga saat ini belum diketahui dengan jelas, namun telah terbukti terjadi hiperreaktivitas sistem imun yang mengakibatkan terjadinya kerusakan berbagai organ. Terjadinya proses hiperreaktivitas

dapat diakibatkan oleh kegagalan proses toleransi tubuh diakibatkan gangguan fungsi dari sel *T regulator* (Treg) dalam meregulasi sistem imun sehingga menyebabkan respon imun yang berlebihan terutama terhadap jaringan sendiri. Hal ini ditandai dengan hiperaktivasi berbagai jalur sel T helper (Th) seperti Th1, Th2, dan Th17 serta merangsang aktivasi sel limfosit

B. Sel limfosit B yang tersensitisasi akan memproduksi antibodi terhadap *self antigen dsDNA*. Antibodi - antibodi ini akan menyatu menjadi suatu kompleks antibodi dan protein dimana kompleks ini akan menempel pada permukaan dan merusak berbagai jaringan dalam tubuh sebagai manifestasi klinis dari LES (Pathak dan Mohan, 2010).

Sel Th17 merupakan sel proinflamasi yang dapat mensekresi sitokin – sitokin seperti IL-17A, IL-17F, dan IL-22, dimana sitokin – sitokin ini bekerja pada berbagai macam sel dan berperan pada kerusakan jaringan. Th17 juga dikatakan dapat menginduksi terjadinya autoimunitas pada model hewan (Kleczynska *et al.*, 2011). IL-17A merupakan salah satu sitokin yang banyak berkaitan dengan patogenesis LES. Peningkatan kadar IL-17A ternyata berkaitan dengan derajat penyakit, keparahan pada lupus nefritis, maupun terjadinya *flare* pada pasien lupus (Wong *et al.*, 2008).

Manifestasi klinis LES sangat luas, meliputi keterlibatan kulit dan mukosa, sendi, darah, jantung, paru, ginjal, sistem saraf pusat (SSP) dan sistem imun. Terapi LES menggunakan obat-obat immunosupresan dan steroid yang merupakan pengobatan standar yang hingga saat ini ternyata masih belum menunjukkan hasil memuaskan bahkan pemberian steroid dalam jangka panjang justru semakin memperburuk kondisi pasien LES (Pathak dan Mohan, 2010).

Beberapa tahun terakhir banyak penelitian dilakukan untuk menemukan metode pengobatan lain yang dapat menangani penyakit

autoimun. Salah satunya adalah penggunaan *escalating dose (antigen-specific) immunotherapy (EDI)*. Metode ini menggunakan antigen khusus yang berperan dalam suatu patogenesis penyakit tertentu dan diberikan kepada penderita dari dosis rendah dan ditingkatkan secara bertahap dalam jangka waktu tertentu untuk memunculkan efek desensitisasi sehingga tetap dapat ditoleransi oleh tubuh dengan efek samping yang minimal. Metode ini telah berhasil dilakukan pada studi terhadap berbagai penyakit alergi (Sebatos-Peyton *et al.*, 2010).

Penelitian menggunakan metode EDI terhadap penyakit autoimun telah dilakukan oleh Burton *et al* (2014) menggunakan model mencit *autoimmune encephalomyelitis* dari *multiple sclerosis*. Studi tersebut mampu menunjukkan keberhasilan regulasi sistem imun pada model *multiple sclerosis* menggunakan self antigen dari sel *schwann* yaitu *myelin basic protein (MBP)*. Pemberian MBP dari dosis rendah terlebih dahulu dapat menunjukkan efek anergi dan supresi sel serta peningkatan kadar IL-10 (Burton *et al.*, 2014).

Berdasarkan pada keberhasilan penelitian tersebut, peneliti ingin mengetahui efek pemberian *self antigen dsDNA* dengan metode EDI sebagai imunoterapi pada penyakit autoimun LES. Penelitian mengenai metode EDI *self antigen dsDNA* pada lupus dewasa ini belum pernah dilakukan. Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi lebih lanjut mengenai penggunaan self antigen dsDNA sebagai *inducer* toleransi sistem imun sehingga menghentikan progresivitas dan mengobati penyakit LES, dan dilihat pengaruhnya terhadap jumlah sel Th17 serta kadar dari IL-17A.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) menggunakan *Self Antigen dsDNA* dapat memperbaiki regulasi sistem imun melalui penurunan persentase jumlah sel Th17 dan kadar serum IL-17A pada mencit Balb/c lupus induksi pristan?

1.3 Tujuan

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek pemberian *self-antigen dsDNA* dengan metode *Escalating Dose Antigen Specific Immunotherapy* dalam memperbaiki regulasi sistem imun pada Lupus Eritematosus Sistemik.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui Efek Pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) menggunakan *Self Antigen dsDNA* terhadap penurunan persentase jumlah sel Th17 pada mencit Balb/c lupus induksi pristan.
2. Mengetahui Efek Pemberian *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) menggunakan *Self Antigen dsDNA* terhadap penurunan kadar IL-17A pada mencit Balb/c lupus induksi pristan.

1.4 Manfaat

Manfaat Keilmuan:

Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan mengenai perkembangan terapi Lupus Eritematosus Sistemik sekaligus sebagai dasar untuk pengembangan penelitian selanjutnya dalam bidang kesehatan, khususnya tentang pengembangan metode *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) menggunakan *Self Antigen dsDNA* sebagai terapi baru perbaikan regulasi sistem imun pada mencit lupus induksi pristan.

Manfaat Aplikatif:

Dapat dijadikan sebagai pertimbangan klinisi kesehatan untuk menciptakan suatu alternatif terapi yang efektif dalam perkembangan metode *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) menggunakan *Self Antigen dsDNA* sebagai perbaikan regulasi sistem imun pada Mencit lupus induksi pristan.



BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lupus Eritematosus Sistemik

2.1.1 Definisi

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun yang ditandai dengan adanya inflamasi tersebar luas, mempengaruhi setiap organ atau sistem dalam tubuh. Penyakit ini berhubungan dengan deposisi autoantibodi dan kompleks imun, sehingga mengakibatkan kerusakan jaringan. Etiologi dan patofisiologi penyakit ini masih belum jelas. Kerusakan dapat terjadi pada berbagai bagian dari sistem imun yang menyebabkan banyaknya variasi manifestasi klinis yang terjadi pada penderita (Mok dan Lau, 2003).

2.1.2 Epidemiologi LES

LES merupakan penyakit global yang berkaitan dengan peningkatan kematian usia muda yang terjadi di berbagai belahan dunia. Variasi prevalensi dan insiden LES yang terjadi di dunia sangat beragam, dengan insiden tertinggi dilaporkan terjadi di Amerika Utara (23,2/100.000 orang per tahun) dan terendah dilaporkan di Afrika (0,3/100.000 orang per tahun) dan Ukraina (0,3/100.000 per tahun). Secara umum, negara – negara di Eropa memiliki insiden yang lebih rendah untuk terjadi LES dibandingkan negara – negara yang terletak di Asia, Australasia, dan Amerika (Rees *et al.*, 2016).

LES lebih sering terjadi pada usia dewasa bila dibandingkan dengan anak – anak. Selain itu, LES juga lebih sering terjadi pada perempuan bila dibandingkan dengan laki – laki terutama pada masa usia antara pubertas dengan menopause. Rasio perempuan dibandingkan dengan laki – laki sebanyak 3:1 pada anak – anak

berubah menjadi 9:1 pada masa pubertas hingga menopause (Kaul *et al.*, 2016)

Mortalitas pada pasien dengan LES telah membaik dalam 30 tahun terakhir namun tetap jauh lebih tinggi dibandingkan dengan orang-orang yang berasal dari wilayah geografis yang sama tanpa LES. Orang-orang Afrika, Cina dan Hispanik yang menderita LES memiliki peningkatan jumlah terjadinya komplikasi pada ginjal (lupus nefritis), dimana hal ini merupakan salah satu prediktor terkuat dari peningkatan risiko mortalitas. Akibatnya, risiko kematian karena LES aktif dan lupus nefritis tertinggi pada pasien dari etnis-etnis ini yang memiliki latar belakang sosial ekonomi rendah. (Kaul *et al.*, 2016).

2.1.3 Faktor Resiko

LES disebabkan oleh suatu reaksi autoimun dimana baik sistem *innate* maupun adaptif memberikan respon yang tidak seharusnya pada partikel seluler yang memiliki asam nukleat. Namun, penyebab yang mendasari terjadinya reaksi autoimun masih belum dapat dipastikan. Beberapa faktor yang dapat meningkatkan resiko terjadinya LES antara lain:

1. Faktor Genetik. Mutasi pada gen tertentu dapat menyebabkan peningkatan resiko terjadinya LES. Terdapat setidaknya lebih dari 100 lokus genetik yang diasosiasikan dengan LES, dimana sebagian besar dapat memberikan efek kecil terhadap resiko terjadinya LES. Namun, ketika resiko-resiko genetik berkumpul pada seseorang, orang tersebut dapat menjadi LES. Kebanyakan variasi genetik yang ada mewakili elemen regulator daripada sekuen *coding*, dan kebanyakan genetik tersebut mengkode protein yang dapat berefek dalam jalur molekuler penting yang dapat

mengganggu fungsi imun, termasuk pembentukan *self-antigen* dan aktivasi dari respon imun *innate* dan adaptif (Kaul *et al.*, 2016).

2. Faktor Lingkungan. Rangsangan dari lingkungan dapat meningkatkan kejadian LES, seperti infeksi, stress, makanan, obat – obatan, serta paparan rokok dan silika. Manifestasi klinis yang terjadi pada penderita LES seperti kelelahan, nyeri sendi, dapat mengarahkan bahwa infeksi virus terutama *Epstein Barr Virus* (EBV) dapat merangsang terjadinya penyakit LES. EBV dapat berperan pada aktivasi sistem imun *innate* dan diferensiasi sel B, serta dapat menstimulasi produksi autoantibodi yang spesifik untuk sekuen asam amino yang dibagikan oleh *self-protein* dan protein yang mengkode EBV. Sinar UV dapat menginduksi kerusakan DNA sehingga dapat merubah ekspresi genetik, membentuk fragmen asam nukleat atau menyebabkan terjadinya apoptosis atau nekrosis sel. LES yang diinduksi oleh obat-obatan diyakini memiliki mekanisme yang merubah proses metilasi DNA (Kaul *et al.*, 2016).

2.1.4 Patogenesis LES

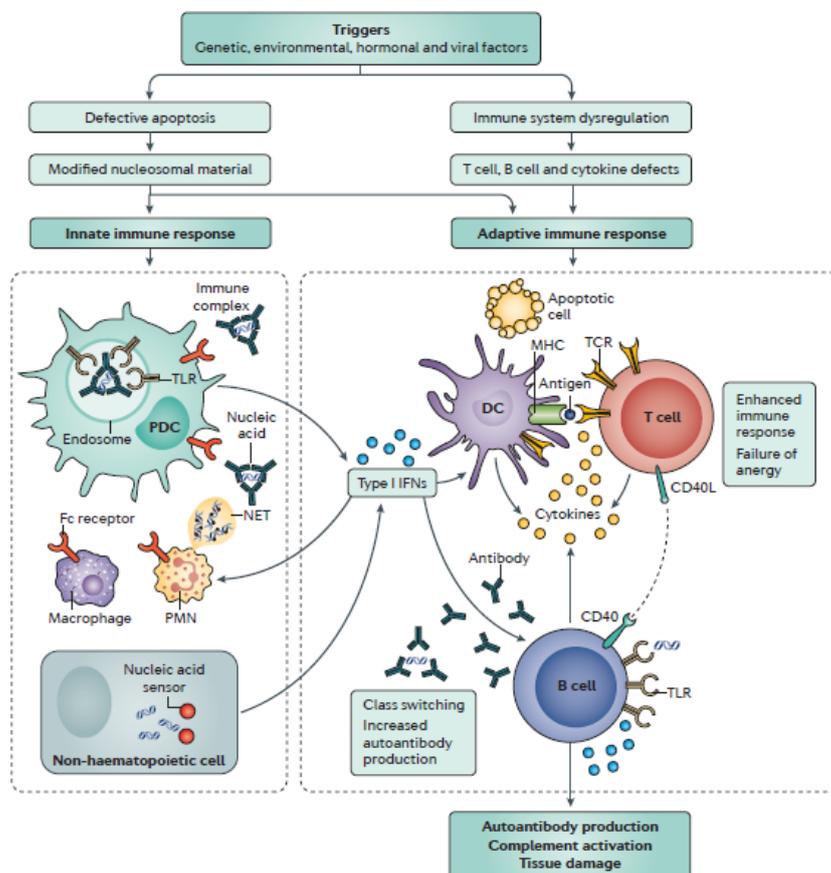
Menurut Hahn (2007), individu akan menderita LES melalui beberapa tahapan yang panjang. Gejala akan muncul dalam hitungan bulan sampai tahun. Individu dengan manifestasi klinis LES akan mengalami periode intermiten selama bertahun-tahun berupa munculnya gejala dan perbaikan (biasanya tidak sampai remisi sempurna), dan kerusakan organ serta komorbiditas terkait inflamasi kronis, terapi, dan penuaan.

Salah satu karakteristik utama dari LES adalah terdapat respon imun yang melawan *self antigen* dari inti sel. Meskipun patogenesis penyakit ini masih belum jelas namun terdapat bukti-bukti adanya

penyimpangan sistem imun yang melibatkan sel T, sel B, monosit, serta sel T regulator. Autoantigen dilepaskan oleh sel apoptosis yang terdapat pada sel dendritik untuk merangsang aktivasi sel T. Sel T yang aktif akan membantu sel B untuk memproduksi antibodi dengan cara mensekresi sitokon seperti IL10 dan IL17 dan melalui molekul permukaan sel seperti CD40L dan CTLA-4. Akibat dari penyimpangan tersebut yang merangsang aktivasi sel B dan meningkatnya jumlah sel yang menghasilkan antibodi, maka produksi autoantibodi akan ikut meningkat dan terbentuknya kompleks imun. Aktivasi sel B poliklonal tersebut akan membentuk antibodi yang tidak spesifik yang dapat bereaksi terhadap berbagai jenis antigen termasuk antigen tubuh sendiri. Gagalnya supresi terhadap sel B mungkin merupakan salah satu faktor yang menyebabkan penyakit berlangsung terus (Jianxin et al, 2009).

Sistem imunitas tubuh harus dapat menyeimbangkan antara menjadi cukup sensitif untuk melindungi terhadap infeksi, dan menjadi peka ketika akan menyerang protein tubuh sendiri (autoimunitas). Dalam suatu respon imunitas terhadap stimulus asing, seperti bakteri, virus, atau alergen, sel-sel imun yang biasanya akan dinonaktifkan karena afinitas mereka untuk jaringan sendiri dapat secara abnormal diaktifkan dengan membuat sinyal untuk *antigen presenting cells* (APC). Hal ini dapat dipicu oleh berbagai hal seperti virus, bakteri, alergen (IgE dan hipersensitivitas lainnya), serta dapat diperburuk oleh stimulan lingkungan seperti sinar ultraviolet dan reaksi obat tertentu. Rangsangan-rangsangan ini dapat memulai suatu reaksi yang mengarah pada penghancuran sel-sel lain di dalam tubuh dan paparan

dari DNA, *histone*, dan protein lainnya, khususnya bagian bagian dari inti sel (Crispin dan Tsokos, 2009).



Gambar 2.1 Disfungsi sistem imun pada LES (Kaul *et al.*, 2016)

Produk dari sel apoptosis maupun adanya gangguan klirens sel apoptosis tidak hanya berfokus pada respon imun adaptif pada asam nukleat dan protein yang terkait, tetapi juga bertindak sebagai pemicu langsung potensi aktivasi sistem imun innate. Kompleks imun yang memiliki asam nukleat, serta RNA sitoplasma dan DNA, merupakan stimulus potensial untuk aktivasi TLRs endosomal yang berespon terhadap asam nukleat dan juga sensor asam nukleat TLR-independen, yang mengarah pada terbentuknya tipe I IFN disfungsi sistem imun pada LES. (Kaul *et al.*, 2016) aktivasi IFN ini memungkinkan stimulasi sistem imun, serta dapat pula menstimulasi *neutrophil extracellular traps*

(NETs). Tipe I IFN merupakan pusat aktivasi sistem imun bawaan pada banyak pasien. Aktivasi sel dendritik oleh tipe I IFNs dapat membantu sel ini untuk mempresentasikan antigen secara efektif (termasuk self antigen) ke sel T. Pembentukan sel T efektor menghasilkan produksi sitokin dan ekspresi molekul permukaan sel yang mendukung amplifikasi respons imun terhadap self antigen serta mendukung terjadinya peradangan (Kaul *et al.*, 2016).

Sel dendritik (DC) memainkan peran penting dalam imunitas adaptif dengan mengaktifkan sel B dan T. Tetapi, peran sel dendritik yang pasti dalam proses autoimunitas, masih kurang dipahami dengan jelas. beberapa penelitian menunjukkan bahwa pada mencit dengan LES yang tidak memiliki sel dendritik mengalami kondisi klinis yang lebih ringan dibandingkan mencit yang memiliki sel dendritik. Secara khusus, perluasan sel T dan plasmablasts dengan produksi autoantibodi bergantung pada adanya sel dendritik. hal ini menunjukkan peran sel dendritik dalam mempromosikan respon humoral extrafollicular pada LES (Choi *et al.*, 2012).

2.1.5 Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis penderita LES dapat menjadi kompleks, mengingat jumlah sistem organ yang dapat dipengaruhi oleh penyakit.

Pasien mengalami flare-up dengan berbagai derajat serta periode remisi penyakit. Tanda dan gejala umum yang sering muncul pada penderita LES diantaranya demam, kelelahan, dan penurunan berat badan.

(Maidhof dan Hilar, 2012)

Bagian tubuh yang paling sering menimbulkan manifestasi klinis yaitu kulit, sistem muskuloskeletal, dan sistem pernafasan. Pasien LES yang mengeluhkan gejala pada kulit, paling sering memiliki ruam merah

berbentuk seperti kupu-kupu di hidung dan pipi setelah terpapar matahari. Gejala lain yang terkait dengan manifestasi kulit termasuk alopecia, fenomena Reynaud, dan luka di mulut atau hidung. Gejala yang terdapat pada sistem muskuloskeletal berupa artralgia, mialgia, dan artritis. Artritis dapat terjadi baik pada sendi kecil maupun sendi besar, serta biasanya muncul sebagai nyeri dan kaku sendi disertai dengan terjadinya inflamasi yang timbul baik sesekali atau pun terus-menerus. Pasien dengan gejala pada pernafasan sering mengeluhkan mengalami nyeri saat bernafas, batuk, dan sesak napas. Terkadang didapatkan efusi pleura dan hipertensi pulmonal (Rahman dan Isenberg, 2008)

LES juga dapat mempengaruhi sistem kardiovaskular, gastrointestinal, ginjal, dan hematologi, serta sistem saraf pusat (SSP). Efek pada kardiovaskular dapat berupa perikarditis, miokarditis, endokarditis, dan penyakit arteri koroner. terdapat teori yang mengatakan bahwa obat-obatan tertentu yang digunakan untuk mengobati LES (misalnya imunosupresan dan kortikosteroid) merupakan faktor risiko untuk penyakit arteri koroner pada pasien LES (Maidhof dan Hilar, 2012).

2.1.6 Diagnosis

Diagnosis LES dapat ditegakkan berdasarkan gambaran klinis dan laboratorium. The American College of Rheumatology (ACR) menerbitkan kriteria untuk diagnosis LES pada tahun 1982, yang direvisi pada tahun 1997. Kriteria terbaru yang digunakan pada LES adalah dari Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) tahun 2012. Kriteria SLICC 2012 adalah kriteria yang lebih kompleks dan dapat digunakan bila kriteria ACR tidak dapat mengklasifikasikan LES. Telah

ditentukan bahwa kriteria SLICC 2012 bersifat lebih sensitif dan dapat mengklasifikasi penderita LES pada tahapan yang lebih awal dalam perjalanan penyakit (Cunha dan Siebert, 2016) Kriteria SLICC 2012 dijelaskan lebih lanjut pada Tabel 2.2. Diagnosis LES tegak jika didapatkan lebih dari sama dengan 4 kriteria (sedikitnya 1 kriteria klinis ditambah 1 kriteria laboratorium) atau jika didapatkan biopsy ginjal lupus nefritis ditambah ANA atau anti-DNA yang positif (Petri et al., 2012).

Tabel 2.2 Kriteria SLICC 2012

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

2.1.7 Penatalaksanaan Penyakit LES

Manajemen pasien LES dimulai dengan rekomendasi dasar seperti menghindari sinar matahari dan penggunaan sunscreen SPF tinggi (> 35), dengan skrining dan konseling untuk faktor risiko kardiovaskular yang dapat dimodifikasi seperti merokok dan hipertensi yang tidak terkontrol. Diskusi keluarga berencana harus dipertimbangkan dengan pasien LES berusia reproduktif. Suplementasi kalsium dan vitamin D dianjurkan. Pendekatan umum untuk penggunaan agen farmakologi tergantung pada keterlibatan organ tertentu dan

disesuaikan dengan karakteristik dan kondisi dari pasien LES (Cunha dan Siebert, 2016).

Pada pasien dengan LES ringan sampai sedang, NSAID, agen antimalaria, dan kortikosteroid biasanya digunakan untuk mengobati tanda dan gejala. Ketika penyakit berkembang dan manifestasi klinis memburuk, kortikosteroid dosis tinggi dan agen immunosupresif digunakan untuk membantu mengendalikan progresivitas penyakit (Maidhof dan Hilar, 2012).

Obat-obatan antimalaria, seperti hydroxychloroquine, telah terbukti bermanfaat dalam mengobati manifestasi ringan lupus termasuk dermatitis, arthritis, dan gejala konstitusional. Mekanisme aksi antimalarial yang tepat tidak diketahui. Kortikosteroid dapat mengontrol aktivitas LES, dari mengendalikan penyakit kulit atau sendi, hingga komplikasi berat dan mengancam nyawa seperti vaskulitis dan nefritis. Penggunaan jangka pendek dari kortikosteroid mungkin diperlukan dan sering baik dalam mengontrol terjadinya flare, tetapi penggunaan jangka panjang dapat mengakibatkan efek samping yang signifikan (Cunha dan Siebert, 2016).

Obat immunosupresif seperti azathioprine dapat digunakan sebagai steroid sparing agent untuk mengobati berbagai manifestasi dari LES. Untuk manifestasi organ LES yang paling mengancam kehidupan seperti neuropsikiatri, Lupus Nefritis, perdarahan pulmonal dan vaskulitis sistemik, pemberian steroid dosis tinggi digunakan sebagai pengobatan awal, biasanya diikuti oleh steroid sparing agent berpotensi tinggi. Cyclophosphomide (CYC), agen alkalitasi, telah muncul sebagai obat standar emas untuk penatalaksanaan lupus nephritis setelah sebuah penelitian NIH yang menunjukkan bahwa

pasien LES dengan pemberian CYC memiliki ketahanan ginjal yang lebih baik daripada pasien LES dengan kortikosteroid saja (Cunha dan Siebert, 2016).

Terapi dengan menggunakan agen biologis seperti antibodi monoklonal dapat menetralkan atau menghambat kerja suatu molekul baik reseptor atau ligan atau sitokin-sitokin tertentu. Terapi ini menargetkan pada suatu molekul spesifik yang berperan dalam patogenesis LES. Beberapa strategi pada terapi biologis adalah dengan menargetkan sel B, menargetkan sel T, memblokir kostimulator, menghambat sitokin dan menghambat komplemen (Postal et al., 2012)

2.2 Toleransi Sistem Imun

Toleransi imunologis adalah kurangnya respon sel limfosit terhadap antigen yang disebabkan oleh terpaparnya limfosit oleh antigen ini. Ketika limfosit dengan reseptor untuk antigen tertentu menghadapi antigen ini, limfosit dapat diaktifkan untuk berproliferasi dan berdiferensiasi menjadi sel efektor dan memori. Antigen yang menimbulkan respon seperti itu disebut antigen imunogenik. Selain itu, limfosit dapat menjadi secara fungsional tidak aktif atau mati, sehingga menghasilkan toleransi; antigen yang menginduksi toleransi dikatakan tolerogenik. Biasanya, mikroba bersifat imunogenik dan self antigen atau antigen yang berasal dari tubuh sendiri bersifat tolerogenik. Pilihan antara aktivasi limfosit dan toleransi ditentukan sebagian besar oleh sifat antigen dan sinyal tambahan yang dapat muncul ketika antigen dipresentasikan ke sistem imun (Abbas et al., 2014).

Toleransi sentral mengacu pada mekanisme toleransi yang bekerja selama perkembangan limfosit di timus atau sumsum tulang. Studi eksperimental menunjukkan bahwa toleransi sentral sebagian

besar disebabkan oleh eliminasi atau inaktivasi sel T dan sel B yang mengenali *self-antigen*. Sel-sel ini dihancurkan atau menjadi tidak aktif setelah mereka mengekspresikan reseptor untuk *self antigen* dan sebelum mereka berkembang menjadi limfosit yang sepenuhnya imunokompeten. Penghapusan sel-sel *self-reaktif* pada tahap awal dalam perkembangan mereka telah disebut 'aborsi klonal' atau 'delesi klonal'. Pada awal kehidupan janin, limfosit *self-reactive* yang merupakan bagian dari sistem kekebalan berkembang akan didelesi ketika terkena *self-antigen* (Delves *et al.*, 2017)

Toleransi perifer dengan penghapusan dan inaktivasi (anergi): Toleransi perifer mengacu pada mekanisme yang bekerja pada limfosit matur setelah mereka meninggalkan organ limfoid primer. Tidak semua gen diekspresikan dalam timus sehingga sel T yang masih berkembang tidak dapat terpapar pada seluruh *self-antigen*. Oleh karena itu, mekanisme toleransi tambahan pada sel T matur yang *self-reactive* masih diperlukan. Mekanisme toleransi pada sel B perifer juga diperlukan karena setelah stimulasi dengan antigen, sel B akan memperbanyak diri dan mengalami mutasi somatik, menghasilkan populasi sel B dengan spesifitas antigen baru. Beberapa sel ini mungkin spesifik untuk *self antigen* (Delves *et al.*, 2017).

2.3 dsDNA

2.3.1 dsDNA

Sebuah molekul DNA terdiri dari dua rantai polinukleotida panjang yang terdiri dari empat jenis subunit nukleotida. Masing-masing rantai ini dikenal sebagai rantai DNA. Ikatan hidrogen pada bagian dasar nukleotida menahan kedua rantai bersama. Nukleotida terdiri dari gula lima karbon yang dilekatkan satu atau lebih gugus fosfat dan basa yang

mengandung nitrogen. Dalam kasus nukleotida dalam DNA, gula adalah deoksiribosa yang melekat pada satu gugus fosfat (karenanya disebut asam deoksiribonukleat), dan basa dapat berupa adenin (A), sitosin (C), guanin (G), atau timin. (T). Nukleotida secara kovalen terhubung bersama dalam rantai melalui gula dan fosfat, yang dengan demikian membentuk gambaran seperti tulang punggung dari rangkaian gula dan fosfat (Albert *et al.*, 2002).

2.3.2 dsDNA pada LES

Antibodi yang terbentuk terhadap dsDNA merupakan salah satu marker yang paling penting dalam diagnosis LES. Ikatan kompleks imun ini dapat menyebabkan proses inflamasi pada berbagai organ dalam tubuh. Suatu studi menunjukkan bahwa self antigen dsDNA yang menjadi penyusun kompleks imun dapat memicu aktivasi plasmacytoid sel dendritik pada pasien LES sehingga terbentuk autoantibodi dsDNA. Normalnya, self antigen dsDNA bersifat tolerogenik dan didegradasi ketika berada pada lingkungan ekstraselular. Namun, ketika self dsDNA tergabung dalam kompleks imun, self antigen dsDNA ini memiliki kemampuan untuk mengakses kompartemen intraselular dari plasmacytoid sel dendritik dan memicu aktivasi reseptor Toll-like, TLR7 dan TLR9 dan merangsang sel B membentuk autantibodi. Meskipun mekanisme ini masih belum bisa dijelaskan secara tepat. (Means 2005).

Ada beberapa mekanisme untuk menjaga self-dsDNA agar terhindar dari pengenalan terhadap sel imun. dsDNA dapat dibatasi dalam nukleus dan mitokondria dalam sel dan terdegradasi dengan cepat oleh DNase di sitoplasma dan endosom. adanya kecacatan pada mekanisme ini, misalnya, proses klirens yang tidak efisien dari debris sel apoptosis dan neutrophil extracellular traps (NET), menghasilkan

akumulasi self-dsDNA. Self-dsDNA terlibat dalam inisiasi dan patogenesis LES melalui berbagai mekanisme yang berbeda. Untuk memulai penyakit autoimun, kehadiran dsDNA di lokasi sel sel imun berada diperlukan untuk membuat terjadinya kegagalan toleransi terhadap autoantigen dan untuk menginduksi produksi autoantibodi. Sementara itu, apoptosis yang berasal dari self-dsDNA di pusat germinal centre pada pasien LES dapat dipresentasikan oleh sel dendritik folikel sebagai antigen untuk sel B autoreaktif, memberikan sinyal kelangsungan hidup untuk mencegah sel B yang dieliminasi (Bai *et al.*, 2018).

Self dDNA akan dikenali terutama oleh sel dendritik plasmacytoid (pDC) melalui berbagai sensor DNA, yang mengarah pada pembentukan tipe I interferon (IFN-I). IFN-I memiliki banyak fungsi kekebalan tubuh, mulai dari merangsang diferensiasi dan pematangan sel dendritik untuk mengaktifkan sel T dan membantu merangsang produksi antibodi oleh sel B, dimana hal tersebut penting dalam patogenesis LES (Bai *et al.*, 2018).

2.4 Escalating Dose (Antigen Specific) Immunotherapy (EDI)

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

Pemberian dosis dilakukan secara bertahap dan meningkat untuk menimbulkan efek desensitisasi dan penting dalam memodulasi sel sel imun serta menghindari efek-efek yang merugikan dari yang paling ringan seperti gatal-gatal sampai yang paling berat, syok anafilaksis. (Lee Y *et al.*, 2008)

Metode ini dilakukan dengan memberikan suatu antigen spesifik tertentu beberapa kali dengan dosis yang meningkat pada tahap awal pengobatan, sehingga dapat menyebabkan desensitisasi terhadap antigen tersebut. Saat metode ini berhasil, maka akan terjadi perbaikan toleransi sistem imun terhadap antigen spesifik tersebut. Tetapi, perubahan molecular dan imunologis yang mendetail pada saat fase administrasi eskalasi dalam memodulasi respon imun masih kurang dipahami dengan baik (Sebatos-Peyton *et al.*, 2010).

Metode Escalating Dose Antigen-Specific Immunotherapy merupakan suatu metode yang berpeluang besar sebagai terapi penyembuhan penyakit autoimun meskipun penelitian tentang ini baru sedikit. Pengobatan autoimun hanya bersifat mengontrol manifestasi klinis sehingga membuat banyak peneliti bidang imunologi yang mengembangkan metode ini. Penelitian yang dilakukan Seddon dan Mason pada penyakit autoimune thyroiditis dengan menginjeksi autoantigen thyroid ternyata mampu menginduksi T-reg. Penelitian lain yang dilakukan oleh Thorstenson menunjukkan bahwa oral dan injeksi antigen ovalbumin mampu menginduksi T-Reg. (Sakaguchi, 2000)

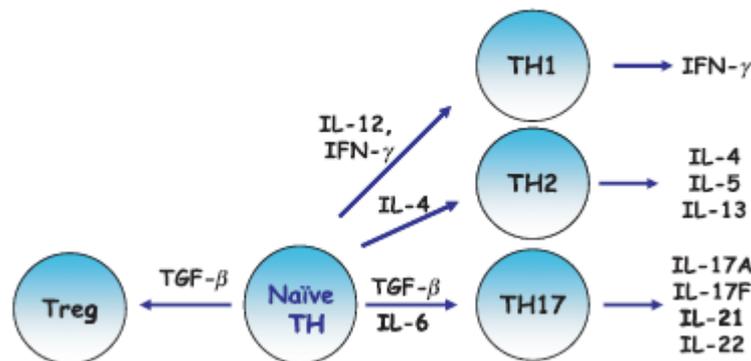
EDI Antigen-Specific Immunotherapy lain yang telah dikembangkan adalah terhadap autoimmune Multiple Sclerosis. Injeksi secara subkutan Myelin Basic Protein (MBP) mampu menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif (Burton, 2014). Dosis MBP yang diberikan bertahap dari 0.08 μ g-0.8 μ g-8 μ g-3x80 μ g dengan konsentrasi 0.01 μ g/ml-0.1 μ g/ml-1 μ g/ml-10 μ g/ml-100 μ g/ml. Penelitian ini membuktikan aktivitas sel T hiperreaktif menjadi menurun dengan pemberian imunoterapi dengan dosis rendah terlebih dahulu tetapi tetap dapat menginduksi sel menjadi anergi (Burton *et al.*, 2014).

Pemberian imunoterapi antigen spesifik dengan menggunakan metode EDI juga dibuktikan dapat memicu perubahan transkripsi. Sel T CD4 yang diberi terapi metode ini menunjukkan ekspresi molekul kostimulator negatif dan faktor-faktor transkripsi. Faktor transkripsi yang termasuk didalamnya juga yang berhubungan dengan ekspresi IL10, diantaranya Maf, Ahr dan Nfil3. Hasil penelitian ini juga menunjukkan induksi diferensiasi sel T-regulator dengan adanya fenotip sel T yang mensekresi IL-10. Korelasi paling penting yang ditunjukkan pada penelitian ini adalah pemberian imunoterapi dengan metode EDI yang efektif telah menginduksi molekul kostimulator negatif, diantaranya PD-1, LAG-3, TIM-3 and TIGIT. Beberapa dari molekul-molekul tersebut berhubungan dengan kelelahan sel T sedangkan yang lainnya dikatakan sebagai molekul marker dari sel Tr1 yang mensekresi IL10. PD-1 dan LAG-3 disebut marker sel anergi yang lebih baik dibanding lainnya. TIGIT dan TIM-3 lebih menunjukkan adanya fenotip sel yang dapat mensekresi IL-10 karena adanya imunoterapi (Burton *et al.*, 2014).

2.5 Peran Sel Th17 pada LES

Sel Th17 telah terbukti berkembang melalui jalur yang berbeda dari sel Th1 dan Th2. Dalam sistem murine, sitokin - sitokin yang mengontrol diferensiasi sel helper CD4 + T untuk menjadi sel Th17 adalah TGFb dan IL-6. Karena kehadiran TGFb dengan sendirinya mengatur pengembangan Foxp3 + regulatory T cells (Tregs), tampaknya ada hubungan timbal balik antara sel Th17 dan Tregs, dimana dalam pengaturan lingkungan proinflamasi (yaitu IL-6), TGFb akan membantu dalam pengembangan subset sel Th inflamasi (sel Th17) dibanding pada pembentukan subset immunosupresif (Tregs). Dosis TGFb menjadi penting dalam menentukan arah diferensiasi sel ini dimana dosis rendah TGFb mendukung diferensiasi dari sel Th terhadap menjadi sel Th17 sementara dosis yang lebih tinggi dari

TGF β condong untuk diferensiasi sel Th menjadi sel regulator (Treg) (Pernis, 2009).



Gambar 2.2 Diagram diferensiasi sel T helper CD4+ (Pernis, 2009)

Sel Th17 mensekresikan profil sitokin proinflamasi yang poten diantaranya IL-17A, IL-17F, IL-21 dan IL-22, yang bekerja pada berbagai sel di jaringan dan berkontribusi pada kerusakan jaringan. Studi terbaru menunjukkan bahwa sel Th17, dibandingkan dengan subset Th1, mampu menginduksi autoimunitas pada organ tertentu pada model hewan. Mendukung data ini, peningkatan fraksi sel Th17 dan peningkatan kadar IL-23 (faktor diferensiasi Th17) dan IL-17 telah ditemukan pada sejumlah gangguan autoimun (Kleczynska *et al.*, 2011).

Sel Th17 mulai terlibat dalam patogenesis LES. Peningkatan kadar IL-17 telah terdeteksi pada serum pasien LES dalam beberapa penelitian. Menariknya, penelitian terbaru menunjukkan bahwa peningkatan produksi IL-17 yang terdeteksi pada pasien LES dihasilkan dari sintesis IL-17 yang berlebihan oleh sel T CD4 $^{+}$ dan dari ekspansi CD3 $^{+}$ (Pernis, 2009).

Peran sel Th17 dalam murine lupus dibuktikan dengan keberhasilan antibodi anti-CD3 dalam perbaikan gejala yang efeknya bergantung pada penurunan produksi IL-17 dan penurunan sel-sel Th17 yang menginfiltrasi ginjal. Proses toleransi berkorelasi dengan penurunan tingkat produksi IL-6

tetapi juga berkorelasi dengan peningkatan TGF β dan sel Treg (Bedoya *et al.*, 2013). Hal ini menunjukkan sel Th17 memiliki peran yang penting dalam proses inflamasi yang terjadi pada patofisiologi LES.

2.6 Peran Sitokin IL-17A pada LES

Interleukin (IL)-17 adalah suatu protein transmembran tipe I yang berukuran 17 kDa yang awalnya diisolasi dari sel T CD4 pada tikus. IL-17A merupakan anggota pertama dari famili sitokin IL-17 dari total enam anggota (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E, dan IL-17F) dan memiliki lima reseptor (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, dan IL-17RE). Pada awalnya, sitokin ini bernama *cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 8* (Nalbandian *et al.*, 2009).

Sel Th17 teraktivasi dan memproduksi IL-17A dimana IL-17A memiliki aktivitas biologis multipel pada berbagai sel, termasuk induksi IL-6, IL-8, *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), dan *prostaglandin E2* (PGE2) pada epitel, endotel, fibroblas; peningkatan ekspresi permukaan *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) pada fibroblas, aktivasi NF- κ B dan kostimulasi proliferasi sel T, stimulasi migrasi sel, dan pembentukan tali pusat. Beberapa studi terkini pada tikus memperlihatkan bahwa sel Th17 yang teraktivasi dan memproduksi IL-17 memperantarai artritis autoimun yang secara klinis maupun imunologis mirip dengan artritis reumatoid (Harrington, *et al.*, 2005).

Berbagai macam penelitian telah membuktikan bahwa sel Th17 ternyata berperan penting dalam patogenesis LES. Banyak penelitian yang menunjukkan pasien LES memiliki kadar IL-17 yang tinggi dibandingkan dengan kontrol orang sehat. Selain itu, jumlah sel T yang memproduksi IL-17 juga meningkat pada pasien LES yang diambil darah tepinya. Produksi IL-17 juga meningkat pada penelitian *in vitro* limfosit yang distimulasi dari pasien

LES saat dibandingkan dengan limfosit normal. Kadar IL-17 juga menunjukkan adanya korelasi yang positif dengan aktivitas penyakit LES (Nalbandian *et al.*, 2009). Hasil ini juga didapatkan serupa pada pasien LES di Indonesia dimana terjadi peningkatan yang signifikan dari persentase sel Th17.

IL-17A juga memiliki kemampuan untuk meningkatkan respon imun melalui peningkatan peradangan dan kerusakan pada organ target. IL-17A memfasilitasi aktivasi sel T dan infiltrasinya menuju jaringan dengan cara meningkatkan regulasi ekspresi *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) dan *matrix metalloproteinase*. Infiltrasi pada organ target dan peradangan kronis ini merupakan salah satu penanda yang penting sebagai salah satu manifestasi klinis kerusakan organ pada pasien LES (Li *et al.*, 2015).

IL-17 bekerja sinergi dengan *B-cell activating factor* (BAFF) untuk menginduksi diferensiasi sel B dan produksi autoantibodi (Doreau, *et al.*, 2009; Crispin dan Tsokos, 2009). Penelitian lain juga menunjukkan bahwa *flare* pada pasien LES kemungkinan diakibatkan dari aktivitas sel Th17. Hal tersebut dikarenakan pemberian antibodi yang menghambat IL-17 ternyata dapat menghambat inflamasi pada vaskular secara *in vitro* (Yang, *et al.*, 2009).

2.7 Mekanisme Pristan Menginduksi Lupus

Induksi lupus pada mencit strain normal dapat dilakukan dengan berbagai metode, diantaranya seperti manipulasi genetik dari sebuah gen (baik *overexpression* atau delesi), injeksi suatu injeksi serum autoimun atau limfosit dari mencit rentan LES, vaksinasi dengan debris apoptosis sel dendritik, imunisasi dengan antigen lupus prototipikal seperti DNA dan kompleks RNA-protein atau antigen lain yang dikenal untuk menginduksi lupus, atau suntikan *pristan* (minyak hidrokarbon). Induksi lupus dengan

injeksi tunggal pristan pada mencit diketahui berhasil memunculkan penyakit dengan sebagian besar manifestasi lupus pada manusia (Rottman dan Willis, 2010).

Pristan (Tetramethylpentadecane/TMPD) merupakan alkanin isoprenoid yang terdapat pada tumbuhan dan organisme laut (alga, plankton) yang dapat menginduksi LES pada hewan bila diberikan secara intraperitoneal. Pristan dapat memicu autoantibodi dan manifestasi klinis LES (Calvani *et al.*, 2005)

Mencit Balb/c yang diberikan injeksi pristan sebanyak 0,5 ml secara intraperitoneal, menunjukkan bahwa mencit normal dapat mengalami sindrom autoimun seperti lupus. Pristan menghentikan pertumbuhan sel dan memicu kematian sel secara apoptosis melalui jalur mitokondria dengan aktivasi caspase (Calvani *et al.*, 2005). Studi lain menunjukkan adanya keterlibatan jalur Fas pada mekanisme apoptosis yang terjadi dikarenakan injeksi pristan dapat meningkatkan ekspresi dari Fas dan Fas ligan pada sel peritoneal serta adanya proteksi terjadinya lupus akibat induksi pristan pada mencit yang defisit Fas atau Fas ligan. Ada juga bukti pristin yang akan bergabung dalam membran sel dan karena itu dapat memiliki pengaruh yang merugikan pada membran integritas (Boeltz *et al.*, 2013).

Proses apoptosis sel peritoneal akibat injeksi pristin dapat menyebabkan adanya paparan autoantigen pada APC disertai peningkatan berbagai mediator inflamasi yang dapat merangsang terjadinya proses autoimunitas. Sel dendritik secara aktif akan mencoba menangkap berbagai sel apoptosis dan mempresentasikan *self-antigen* pada sel T. Hal ini dapat terjadi pada proses apoptosis seluler yang berlebihan dimana pengenalan terhadap *self-antigen* dapat terjadi. Administrasi pristin secara intraperitoneal dapat terdistribusi dengan baik pada mencit serta dapat

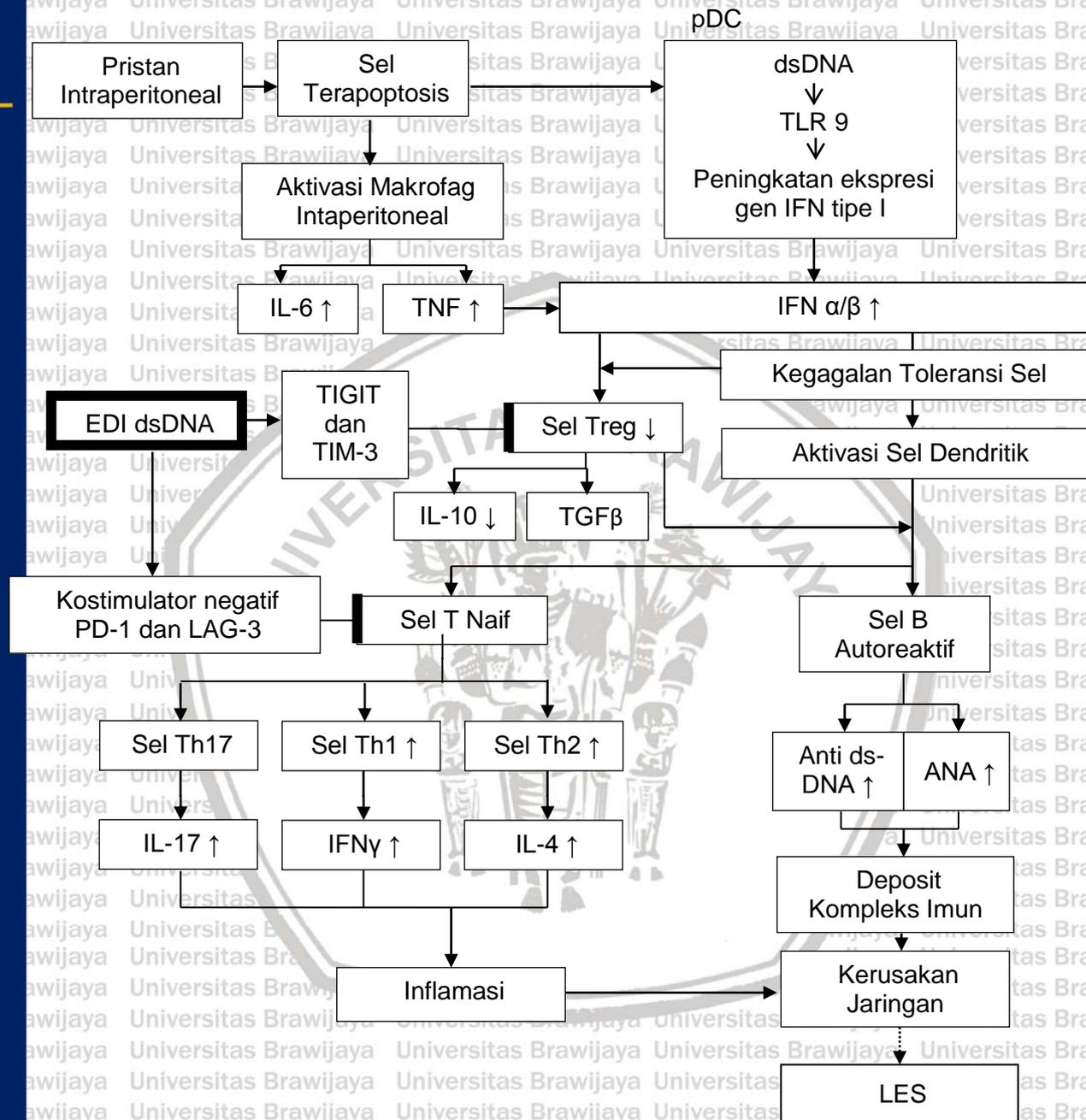
dideteksi dalam waktu yang lama di dalam kavum peritoneal dan organ lain.

Hal ini menyebabkan terjadinya proses paparan *self-antigen* secara terus menerus pada sel imun dan menyebabkan terjadinya respon autoimun (Calvani *et al.*, 2005).

Pristan juga dapat menginduksi lupus melalui disregulasi produksi IFN tipe I. Injeksi pristan secara intraperitoneal mampu meningkatkan sitokin IFN tipe I. Produksi berlebihan dari IFN tipe I sesuai dengan patogenesis penting dari terjadinya LES pada manusia (Ioannou dan Isenberg, 2000).

IFN tipe I akan berikatan dengan reseptor IFNAR dan menghasilkan sinyal untuk terbentuknya autoantibodi terhadap antigen inti sel yang berperan penting pada patogenesis lupus. Injeksi pristan intrapritoneal memicu produksi MCP-1 (CCL2), suatu kemokin yang menginduksi produksi IFN-1 dan menyebabkan keluarnya monosit imatur dengan penanda permukaan sel CD11b, Ly6Chi, Mac-3, F4/80, dan CCR2 dari sumsum tulang menuju kavum peritoneum. IFN tipe I pada mencit diproduksi sebagian besar oleh monosit imatur melalui jalur TLR7-MyD88. Sebagian besar IFN-I diproduksi oleh monosit yang belum matang, bukan PDC, dan produksinya dimediasi secara eksklusif oleh jalur TLR7-MyD88 (Reeves *et al.*, 2009).

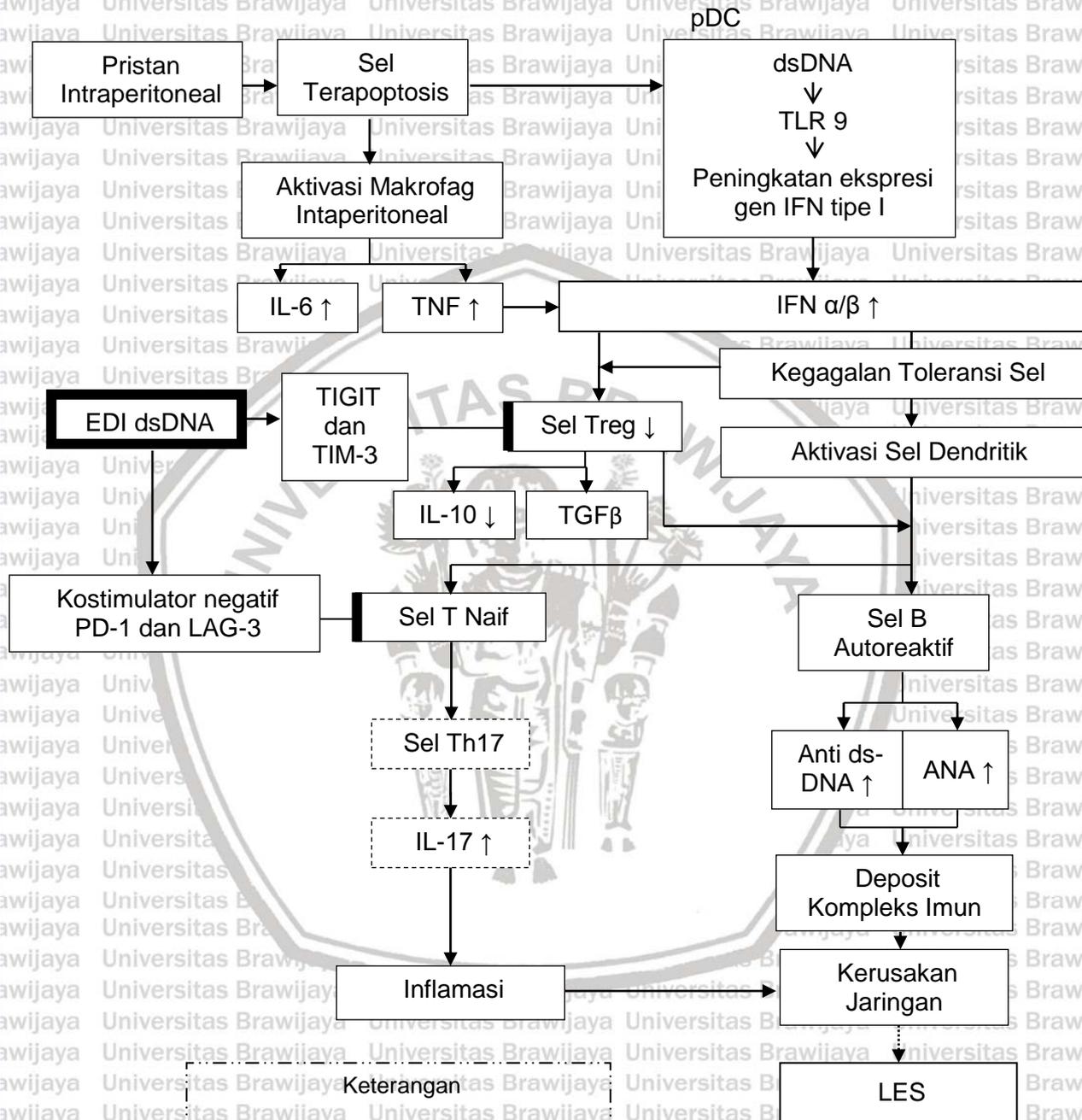
2.8 Kerangka Teori



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan

Variabel yang diukur

Variabel yang tidak diukur

Menginduksi

Menghambat



Mencit Balb/c betina yang diinduksi dengan pristan 0,5 mL secara intraperitoneal dapat menyebabkan mencit tersebut memiliki manifestasi mirip LES. Injeksi pristan menyebabkan terjadinya peningkatan apoptosis sel – sel limfoid di rongga peritoneum. Debris dari apoptosis ini salah satunya dapat berupa produk – produk seperti dsDNA. Adanya kumpulan dari self antigen yang berlebihan dapat menyebabkan adanya gangguan pada klirens sel sehingga dapat memicu respon peradangan dan menyebabkan terjadinya kegagalan toleransi respon imun. Gangguan toleransi respon imun ini akan menyebabkan limfosit menjadi lebih reaktif terhadap sel – sel yang terdapat dalam tubuh dan menyerang sel – sel tubuh itu sendiri (autoimun). Sel pengendali toleransi T-regulator mengalami penurunan fungsi dan sel limfosit lainnya seperti Th1, Th2, Th17, dan sel B akan menjadi semakin reaktif dan menyebabkan terjadinya penyerangan dan inflamasi pada jaringan tubuhnya sendiri dan menginisiasi kerusakan organ. Sel B akan menjadi autoreaktif dan memproduksi banyak autoantibodi seperti ANA dan dsDNA. Peningkatan jumlah sel B autoreaktif akan meningkatkan jumlah antibodi dan imun kompleks sebagai faktor pencetus terjadinya kerusakan jaringan pada lupus. IL-17A berperan dalam merangsang respon *pro-inflammatory* tubuh terhadap jaringannya sendiri. Proses autoimunitas inilah yang menyebabkan terjadinya LES. Pemberian *self Antigen* dsDNA dengan cara *Escalating dose Immunotherapy* atau diberikan antigen dsDNA secara terus menerus dengan dosis yang meningkat diharapkan dapat menyebabkan terjadinya desensitisasi respon imun dan mengembalikan toleransi imunitas tubuh. Kembalinya toleransi respon imun dapat menyebabkan penurunan jumlah sel Th17 serta menurunkan sitokin yang diproduksinya, yaitu IL-17A.

3.2 Hipotesis Penelitian

1. Pemberian Escalating Dose Immunotherapy (EDI) menggunakan self antigen dsDNA dapat menurunkan persentase jumlah sel Th17 pada mencit Balb/c lupus induksi pristan.
2. Pemberian Escalating Dose Immunotherapy (EDI) menggunakan self antigen dsDNA dapat menurunkan kadar IL-17A pada mencit Balb/c lupus induksi pristan.



BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan mencit Balb/c sebagai subjek penelitian yang sebelumnya diinjeksikan pristan untuk induksi LES dan kemudian diinjeksikan *self-antigen* dsDNA dalam berbagai dosis secara berurutan dan bertahap.

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh mencit Balb/c. Sedangkan sampel adalah mencit strain Balb/C betina yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi untuk dilakukan penelitian. Pemilihan mencit sebagai hewan coba dikarenakan mencit dapat menjadi model yang baik dalam penelitian imunologi, mudah ditangani, dan harga terjangkau.

Berikut adalah kriteria inklusi dan eksklusi tikus yang digunakan pada penelitian ini:

Kriteria Inklusi

1. Mencit strain Balb/C betina dengan tanda klinis lupus
2. Mencit berwarna bulu putih mengkilat, sehat, bergerak aktif, dan tingkah laku normal
3. Umur 6-8 minggu, karena pada usia tersebut mencit Balb/c sesuai usia dewasa pada manusia sehingga diharapkan kadar hormon dalam tubuhnya telah stabil (Gunawan, 2007)
4. Berat badan rata-rata 25-30 gram

Kriteria Eksklusi

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

4.2.1 Besaran Sampel

Estimasi jumlah sampel mencit yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer, 1997 sebagai berikut (supranto, 2000) :

$$(t - 1)(r - 1) \geq 15$$

r : jumlah ulangan

t : jumlah perlakuan

Penelitian ini terdapat lima perlakuan sebagaimana yang telah disebutkan sebelumnya. Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$(5 - 1)(r - 1) \geq 15$$

$$4r - 4 \geq 15$$

$$r \geq 4,75$$

Dari hasil perhitungan, diperlukan jumlah replikasi atau ulangan paling sedikit adalah 5 ekor (pembulatan dari 4,75) untuk masing-masing kelompok. Kelompok kontrol positif dan kelompok terapi adalah mencit lupus induksi pristan (mencit yang sudah menunjukkan manifestasi lupus akibat induksi pristan).

4.3 Kelompok Penelitian

Pengelompokan dan perlakuan hewan coba dilakukan secara acak dengan metode *simple random sampling* dan pembagian kelompok didasarkan atas pembagian pemberian perlakuan *self antigen dsDNA*.

Berikut ini merupakan pembagian kelompok perlakuan :

- A. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (mencit yang tanpa injeksi pristan dan dsDNA).
- B. Kelompok 2: Kelompok kontrol positif (mencit yang diinjeksi pristan, tanpa dsDNA).
- C. Kelompok 3: Mencit yang diinjeksi pristan dan dsDNA konsentrasi (0.01 µg/ml, 0.1 µg/ml, 1 µg/ml) secara berurutan per ekor.
- D. Kelompok 4: mencit yang diinjeksi pristan dan dsDNA konsentrasi II (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml) secara berurutan per ekor.
- E. Kelompok 5: mencit yang diinjeksi pristan dan dsDNA konsentrasi III (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml) secara berurutan per ekor.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas Penelitian

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian dsDNA mencit dalam berbagai macam dosis secara intraperitoneal bertahap kepada mencit Balb/c model LES.

4.4.2 Variabel Tergantung Penelitian

Variabel terikat dalam penelitian ini antara lain sebagai berikut:

1. Persentase jumlah sel Th-17 dengan mengukur presentasi sel CD4⁺ IL17A⁺ dari sampel jaringan lien
2. Kadar sitokin IL-17A pada serum darah mencit menggunakan metode ELISA

4.5 Definisi Operasional:

Definisi operasional yang digunakan adalah:

- a. Mencit Balb/c adalah salah satu strain mencit yang dikembangkan serta digunakan dalam berbagai penelitian laboratorium sebagai hewan uji coba terutama pada penelitian yang berbasis kanker dan imunologi (Festing M, 1998). Mencit ini juga memiliki onset yang cepat dan paling

menyerupai gambaran klinis LES pada manusia (Satoh *et al.*, 2000).

Mencit BALB/c pada penelitian ini didapatkan dan mendapat surat keterangan dari Universitas Islam Negeri Malang.

b. Mencit lupus induksi pristan adalah mencit galur Balb/c betina yang diberikan injeksi pristan sebanyak 0.5 ml (782 $\mu\text{g/ml}$) secara intraperitoneal kemudian ditunggu selama 12 minggu. Mencit lupus induksi pristan adalah mencit yang telah menunjukkan klinis lupus, seperti penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas, dan peningkatan autoantibodi anti-dsDNA (Rottman & Willis, 2010; Leiss *et al.*, 2013).

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

d. Aktivitas mencit diukur dari banyaknya putaran yang dihabiskan mencit untuk berpindah dari ujung kandang ke ujung kandang sisi lainnya secara manual selama kurun waktu 30 menit. Normalnya mencit sehat dapat melakukan sebanyak 150-300 putaran dalam waktu 15 menit (Suwendar *et al.*, 2004).

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

f. *Self antigen* dsDNA merupakan antigen yang digunakan untuk uji coba dengan metode *Escalating Dose Immunization* (EDI) (peningkatan dosis secara bertahap). Antigen ini didapatkan dengan prosedur isolasi DNA dari darah mencit.

g. *Polyethylenimine* (PEI) adalah adalah polimer kationik sebagai reagen *adjuvant* yang dapat mengantarkan nukleotida. Antigen dsDNA

dicampur dengan PEI dengan prosedur yang dilakukan sesuai dengan protokol in vivo jetPEI: DNA & siRNA *Delivery Protocol*, 2009. In vivo-jetPEI® didapatkan dari Polyplus-transfection Inc. New York, USA.

h. IL-17A adalah suatu sitokin *pro-inflammatory* yang berperan penting dalam proses peradangan pada LES. Pengambilan sampel berasal dari darah mencit. Kadarnya diukur dengan sampel darah menggunakan metode ELISA (eBioscience, USA) dan diukur dengan satuan pg/ml.

i. Jumlah sel Th17 adalah persentase sel T-helper 17 yang ditandai dengan marker sel CD4 (CD4-FITC biolegend *antibody*) dan IL-17A (IL-17A-PE biolegend *antibody*) dalam lien yang diukur menggunakan metode *flowcytometry*. Hasil yang diperoleh berupa persentase sel yang mengekspresikan CD4⁺ IL17A⁺ yang diukur di dalam 10.000 sel limfosit.

4.6 Bahan dan Alat Penelitian

4.6.1 Bahan Penelitian

1. Perawatan hewan coba: Hewan coba mencit Balb/c, sekam, air mineral, pakan mencit standar (PAR-S) dan tepung.
2. Pemberian Pristan: pristan, alkohol 70%, kapas.
3. Isolasi dsDNA: darah mencit, pelisis sel darah merah, NucleoSpin® Blood MACHERY-NAGEL GmbH & Co. KG Germany, etanol 70%, *deionized water*.
4. Preparasi dsDNA: larutan isolat dsDNA, *in vivo-jetPEI*, *sterile water*.
5. Pembedahan tikus dan pengambilan spesimen darah dan organ lien: kloroform 20 ml, alkohol, kertas label, dan kapas.
6. Pengukuran kadar IL-17A: serum mencit, *Anti-mouse IL-17A ELISA Kit (eBioscience, USA)*, *Biotin-conjugated*, *wash buffer*, *Streptavidin-HRP*, *TMB Substrate Solution*, *Stop Solution*

7. Pengukuran jumlah sel Th17: PBS, *cell staining buffer* (CSB) (Biolegend, USA, katalog 420201), *permeabilization wash buffer* (10x) (Biolegend, USA, katalog 421002), *fixation buffer* (Biolegend, USA, katalog 420801, FITC anti mouse CD4 (Biolegend, USA), PE antimouse IL-17A (Biolegend, USA, Katalog 506903), *phorbol myristate acetate* (PMA) (Sigma-Aldrich, katalog P-8139), *ionomycin* (BD Bioscience, katalog I-0634), *golgiplug* (BD Bioscience, katalog 555029).

4.6.2 Alat

1. Perawatan hewan coba: kandang plastik standar perawatan yang telah dilengkapi oleh botol minum dan tempat makanan, timbangan analitik, *handscoon*, dan pembersih kandang.
2. Pemberian pristan: *handscoon*, *sprit* 1cc, kain steril
3. Isolasi dsDNA: alat vortex, falcon tube, eppendorf, mikropipet dan alat sentrifugasi.
4. Preparasi dan injeksi dsDNA: alat vortex, falcon tube, eppendorf, mikropipet, *NanoDrop 2000 Spectrophotometer*, *sprit* 1 cc, *handscoon*, kain steril.
5. Pembedahan tikus dan pengambilan spesimen darah dan organ lien: papan paraffin, gunting bedah, pinset, jarum pentul, kertas label, wadah penyimpanan organ, *sprit* 5 cc, *vacotainer*
6. Pengukuran kadar IL-17A: Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, alat vortex, alat sentrifugasi, *plate*, *ELISA reader*
7. Pengukuran jumlah sel Th17: Tip biru, kuning, dan putih, pipet mikro, alat vortex, alat sentrifugasi, *flowsitometer*, tabung eppendorf, kapas, kertas penyerap, cawan, kuvet fcm

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/C yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi.

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

Sebelum dilakukan perlakuan, mencit diadaptasikan terlebih dahulu di laboratorium selama tujuh hari. Mencit diberi makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang yang berisi sekam. Selama proses aklimatisasi mencit diberikan pakan, minum, dan penggantian sekam secara rutin sesuai standar laboratorium Farmakologi FKUB. Pemberian minum mencit juga diberikan tiap hari dengan menggunakan air masak yang ditempatkan pada botol minum hewan. Air minum dilakukan penggantian setiap hari. Sekam yang terdapat dalam kandang mencit dilakukan penggantian setiap 3 hari sekali.

4.7.2 Injeksi Pristan pada hewan coba

Sebanyak lima puluh lima mencit BALB/c diberikan injeksi pristan secara intraperitoneal sebanyak 0,5 ml dengan konsentrasi 782 µg/ml.

12 minggu paska injeksi mencit dinilai tanda-tanda klinis lupus. Mencit yang menunjukkan tanda klinis lupus yang sama merupakan mencit yang digunakan pada penelitian (Leiss *et al.*, 2013). Tanda-tanda klinis lupus diantaranya penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan

aktivitas, dan peningkatan autoantibodi anti-dsDNA (Rottman & Willis, 2010; Leiss *et al.*, 2013).

4.7.3 Isolasi dsDNA

Dilakukan isolasi dsDNA dari serum darah mencit yang sehat.

Isolasi DNA dilakukan dengan menggunakan bahan dan prosedur dari NucleoSpin® *Blood* MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG Germany.

Sampel dari serum darah sebanyak 200 µl ditambahkan dengan 25 µl proteinase K dan kemudian ditambahkan larutan 200µl B3 yang digunakan untuk melisis sel darah dan diinkubasi pada suhu 70°C selama 10-15 menit. Setelah dilakukan washing ditambahkan 210µl larutan etanol 96%-100% dan kemudian dilakukan vortex. Larutan kemudian dipindahkan ke NucleoSpin® *Blood Column* yang diletakkan ke dalam *Collection Tube*. Dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g. Dipindahkan NucleoSpin® *Blood Column* kedalam *Collection tube* yang baru dan tambahkan 500 µl *Buffer BW* kemudian dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g. Ditambahkan 600 µl larutan B5 dan dilakukan sentrifugasi selama 1 menit dengan kecepatan 11.000 g sebanyak dua kali.

Pindahkan NucleoSpin® *Blood Column* keatas *microcentrifuge tube* dan tambahkan 100 µl *Buffer BE* yang telah dipanaskan sebelumnya pada suhu 70°C. Dilakukan inkubasi pada suhu ruang selama 1 menit kemudian dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 11.000 g selama 1 menit. Hasil isolasi DNA kemudian diukur konsentrasinya menggunakan nanodrop.

4.7.4 Prosedur Nanodrop

NanoDrop 2000 Spectrophotometer [Thermo Scientific] dapat digunakan untuk mengetahui nilai absorbansi larutan. Alat sangat

sensitif dan hanya membutuhkan volume sampel sebesar 2 μ l untuk tiap kali pengukuran. Beberapa tipe pengukuran sampel, antara lain: asam nukleat (DNA/RNA), microarray, protein A280, protein&labels, BCA, modified Lowry, Bradford, dan Pierce 660 nm. Lama waktu pengukuran absorbansi yang relatif singkat (kurang dari 5 detik) tiap sampel akan mempersingkat waktu dalam pengukuran.

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

Konsentrasi DNA dihitung dari persamaan berikut:

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

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

4.7.5 Preparasi dsDNA

Kadar dsDNA yang dibutuhkan agar mencit Balb/C dapat terinduksi lupus adalah sebesar 50 μ g per mencit (Qiao *et al.*, 2005).

Dengan konsep terapi desensitisasi, pengambilan dosis dibawah dosis tersebut sesuai penentuan dosis yang dianjurkan pada terapi EDI self

antigen yang dilakukan oleh burton pada penyakit autoimun multiple sclerosis (Burton *et al.*, 2014).

PEI adalah polimer kationik yang telah digunakan bertahun-tahun sebagai reagen yang dapat sebagai adjuvant untuk pengantar nukleotida. Dengan cara dsDNA dicampur dengan reagen *in vivo*-jetPEI dilarutkan dalam setengah volume injeksi pada glukosa 10%. Volume injeksi pada penelitian ini sebesar 500 μ l. dengan pelarut sterile water.

Vortex perlahan dan lakukan spin down. Ditambahkan larutan tersebut seluruhnya ke dalam larutan dsDNA. Vortex perlahan dan lakukan spin down. Dilakukan Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang hingga larutan menjadi stabil. dsDNA diinjeksikan secara intraperitoneal sesuai dosis masing-masing kelompok perlakuan diantaranya 0.01 μ g/ml (0.005 μ g dalam 500 μ l), 0.1 μ g/ml (0.05 μ g dalam 500 μ l), 1 μ g/ml (0.5 μ g dalam 500 μ l), 10 μ g/ml (5 μ g dalam 500 μ l), dan 100 μ g/ml (50 μ g dalam 500 μ l). (*in vivo* jetPEI: DNA & siRNA Delivery Protocol, 2009).

Pemilihan dosis ini didasarkan pada penelitian sebelumnya mengenai pemberian *self-antigen* MBP pada mencit model multiple sclerosis dengan peningkatan pemberian sebanyak sepuluh kali lipat dibanding dosis pemberian sebelumnya (Burton *et al.*, 2014). Pada tabel 4.2 dibawah ini dijelaskan rincian kebutuhan dsDNA, PEI, glukosa 10%, dan aquades steril untuk mencapai masing-masing konsentrasi dsDNA yang dibutuhkan. Konsentrasi glukosa diakhir volume pengenceran sebesar 5%.

Tabel 4.1 Pengenceran DNA dengan Larutan PEI

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

4.7.6 Pembedahan Hewan Coba

Setelah perawatan hewan coba selesai dilaksanakan, maka dilakukan pembedahan mencit untuk pengambilan darah mencit.

Pembedahan diawali dengan pemberian anestesi per inhalasi dengan kloroform dalam wadah tertutup. Setelah mencit tidak sadar, mencit difiksasi dengan jarum di atas papan. Pembedahan dilakukan dengan membuka dinding abdomen dan thorax. Darah diambil dengan spuit 3 ml melalui jantung dan di simpan dalam tabung vakum tutup merah (*vacutainer non additive*)

4.7.7 Pengukuran Jumlah sel Th17

Hasil homogenisasi jaringan spleen disentrifugasi untuk mendapatkan pellet cell. Pellet cell yang didapatkan disuspensikan ulang pada 1 ml Cell Staining Buffer. Sel disentrifug, lalu disuspensikan ulang dengan 0,5 ml Cell Staining Buffer yang sesuai sehingga konsentrasinya sesuai dengan yang dibutuhkan. Dilanjutkan dengan prosedur pewarnaan permukaan sel. Antibodi ditambahkan pada tabung berisi pellet cell dari prosedur sebelumnya sebagai berikut: FITC Anti-

Mouse CD4 Antibody. Diinkubasi pada temperatur ruangan selama 15-20 menit dalam gelap. Dicuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan sentrifus pada 350 X g selama 5 menit. Diulangi langkah tersebut. Sel disuspensikan ulang dalam 0,5 ml Cell Staining Buffer. Dilanjutkan segera ke proses pewarnaan intraseluler.

Pada pewarnaan intraseluler, ditambahkan 1 ml 1X Fix/Perm Solution pada tabung, di-vortex dan diinkubasi pada temperatur ruangan dalam gelap selama 20 menit, lalu disentrifus pada 350 X g selama 5 menit sampai mengendap dan supernatant dibuang. Di cuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan sentrifus pada 350 X g selama 5 menit dan supernatant dibuang. Ditambahkan 20 ul PE Anti-Mouse IL-17A Antibody dan diinkubasikan pada temperatur ruangan dalam gelap selama 30 menit. Dicuci dengan 1,5 ml Cell Staining Buffer dengan pada 350 X g selama 5 menit sampai mengendap dan supernatant dibuang. Diulangi langkah tersebut. Disuspensikan ulang dalam 0,5 ml cell Staining Buffer lalu analisis dengan flowcytometer (Kalim *et al.*, 2017).

4.7.8 Pengukuran Kadar IL-17A

Kadar IL-17A dari serum darah diukur dengan Mouse IL-17A ELISA kit yang dilakukan sesuai dengan protokol dari *eBioscience Thermo Fisher Scientific Inc.* Prosedur ELISA untuk mengukur kadar IL-17A diawali dengan membuat pengenceran larutan standar berbagai konsentrasi. 50 μ l sample diluent ditambahkan ke setiap well, kemudian ditambahkan 50 μ l sampel. Tambahkan 50 μ l biotin-conjugate yang sudah diencerkan. Inkubasi pada suhu ruang selama dua jam diatas microplate shaker dengan kecepatan 400 rpm. Lakukan washing dengan wash buffer yang telah diencerkan sebanyak tiga kali. Tambahkan substrat TMB sebanyak 100 μ l ke dalam setiap well. Inkubasi

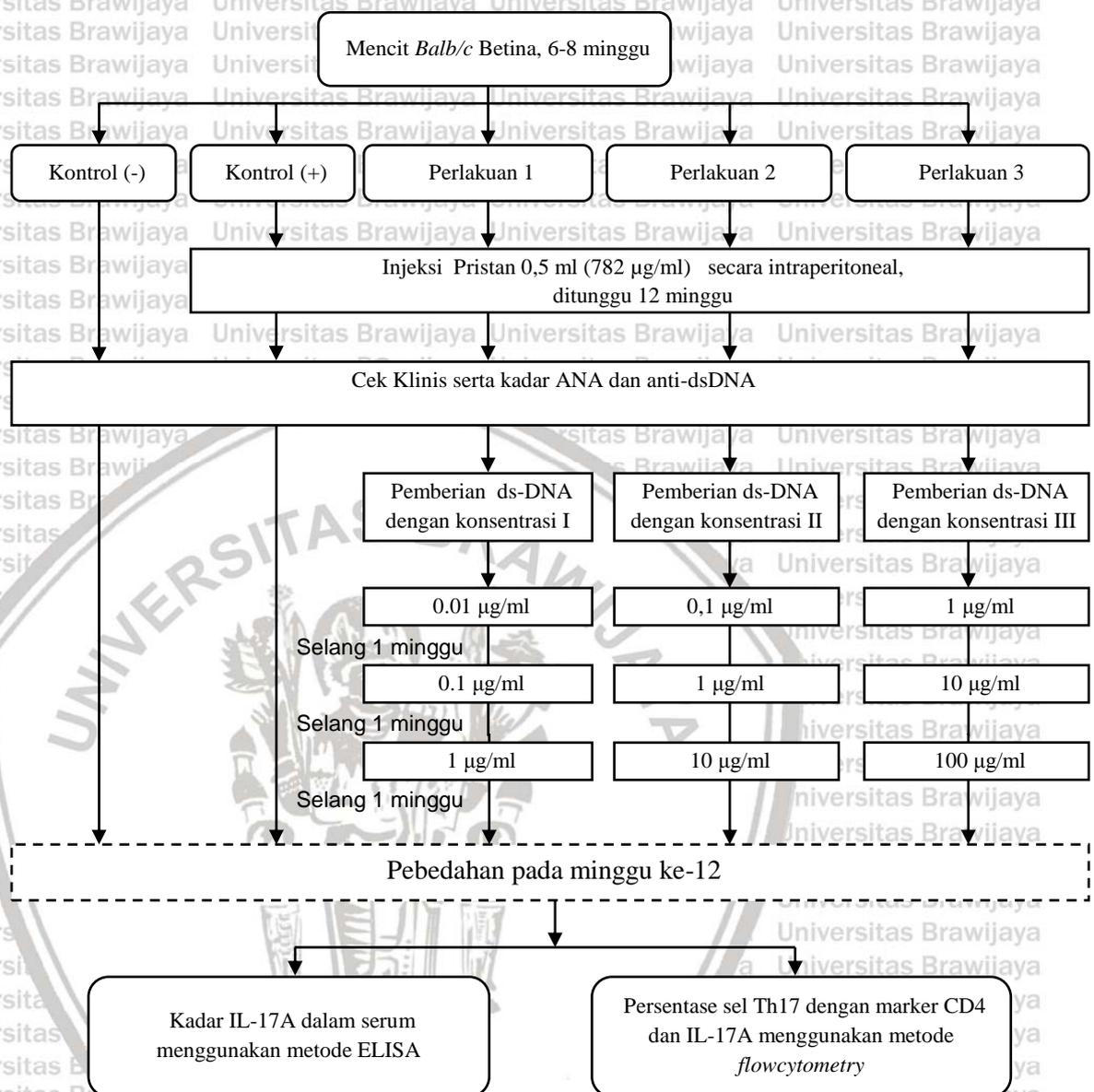
pada suhu ruang selama sepuluh menit di tempat gelap. Tambahkan stop solution ke dalam setiap well. Kadar IL-17A (pg/ml) kemudian segera dibaca pada ELISA Reader pada panjang gelombang 450 nm (Mouse IL-17A Coated ELISA Kit User Guide, 2017)

4.7.9 Prosedur Pengumpulan dan Analisis Data

Data hasil pengukuran parameter tikus kontrol dan perlakuan didapatkan setelah dilakukan pembedahan. Data tersebut dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *IBM SPSS Statistics 20* dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).

Uji normalitas dan homogenitas dilakukan terlebih dahulu untuk mengetahui apakah sebaran data normal dan homogen. Uji normalitas digunakan dengan metode statistik uji *Shapiro Wilk* dengan $\alpha=0,05$. Jika didapatkan data $p\text{ value} > 0,05$, maka data terdistribusi normal. Kemudian pada uji homogeisitas / keragaman data menggunakan uji *Test Homogeneity of Variance* bertujuan untuk memperlihatkan bahwa sebaran data memiliki varian yang sama atau *homogen*. Data disebut homogen apabila didapatkan nilai signifikansi $p > 0,05$. Jika didapat data terdistribusi normal dan *homogen* kemudian dilakukan uji parametrik lebih lanjut menggunakan *One Way ANOVA*, sebagai uji perbandingan antara kelompok kontrol dengan perlakuan berbagai dosis. Kemudian jika data terdistribusi tidak normal dan tidak *homogen* maka dilanjutkan uji non parametric menggunakan *Kruskall Wallis*.

4.8 Skema Alur Penelitian



BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *post test only controlled group design*. Sebanyak enam puluh mencit Balb/c betina usia 6-8 minggu dibagi secara acak menjadi lima kelompok besar dimana kelompok pertama adalah kelompok kontrol negatif (K-), yaitu kelompok yang tanpa injeksi pristan dan dsDNA. Kelompok kedua adalah kontrol positif (K+), yaitu kelompok mencit dengan pemberian injeksi pristan sebanyak 0,5 ml (728 μ g/ml) secara intraperitoneal, tanpa dsDNA. Kelompok A adalah mencit yang diinjeksi pristan dan terapi dsDNA dosis I (0.01 μ g/ml, 0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan. Kelompok B adalah mencit yang diinjeksi pristan dan dsDNA dosis II (0.1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan dan kelompok C adalah mencit yang diinjeksi pristan dan dsDNA dosis III (1 μ g/ml, 10 μ g/ml, 100 μ g/ml) diberikan satu kali setiap minggu secara berurutan.

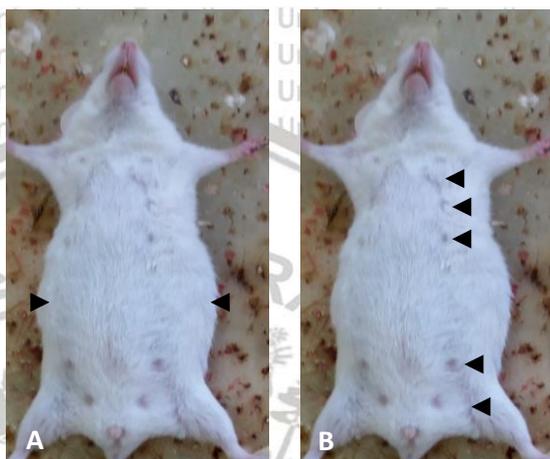
Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian terapi EDI dsDNA pada mencit lupus induksi pristan dalam mengembalikan regulasi sistem imun. Pada penelitian ini peneliti fokus pada efek pemberian EDI dsDNA pada persentase jumlah sel Th17 melalui marker CD4⁺IL17⁺ serta kadar sitokin IL-17A.

5.1 Identifikasi Karakteristik Mencit Balb/c Lupus Induksi Pristan

5.1.1 Manifestasi Klinis Mencit Balb/c Lupus Induksi Pristan

Mencit Balb/c lupus induksi pristan adalah mencit betina galur Balb/c usia 6-8 minggu dengan berat badan 20-30 gram yang diberikan injeksi pristan secara intraperitoneal kemudian ditunggu selama 12 minggu hingga muncul manifestasi

lupus. Penentuan hewan coba LES ditandai dengan adanya hasil dari manifestasi klinis dan laboratorium. Manifestasi LES yang ditemukan pada mencit lupus induksi pristan pada penelitian ini antara lain penurunan berat badan (70%), bulu rontok (60%), penurunan aktivitas (50%), asites (10%) dan peningkatan kadar anti-dsDNA. Beberapa gambaran manifestasi klinis LES pada mencit lupus induksi pristan pada penelitian ini ditunjukkan pada gambar 5.1



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

Berat badan mencit yang normal dan diinduksi pristan secara berkala diperoleh selama penelitian untuk mengetahui rata-rata berat badan mencit disetiap kelompok. Rata-rata hasil pengukuran berat badan secara berkala pada mencit normal dan mencit lupus Induksi pristan disajikan pada tabel 5.1.

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

BB (g)	Sebelum Adaptasi	4 Minggu Setelah Injeksi Pristan	12 Minggu Setelah Injeksi Pristan
Mencit Normal (n=5)	21.0 ± 2.00	26.2 ± 2.71	36.8 ± 3.37
Mencit lupus induksi pristan (n=20)	20.6 ± 1.97	25.0 ± 3.59	30.5 ± 4.16
Sig.	P=0.527*	P=0.402*	P=0.002**

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

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

Hasil uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan data berat badan mencit yang saat setelah diinduksi pristan pada minggu ke-4 dan minggu ke-12 secara berkala pada mencit normal dan mencit lupus induksi Pristan memiliki persebaran normal ($P > 0,05$). Kemudian untuk hasil uji homogenitas data berat badan (BB) menunjukkan data homogen ($P > 0,05$). Oleh karena data berat badan mencit yang normal dan diinduksi pristan pada minggu ke-4 dan minggu ke-12 secara berkala menunjukkan persebaran normal dan homogen maka uji beda berat badan (BB) dilakukan dengan uji parametrik *Independent T-test*. Hasil uji *Independent T-test* berat badan mencit pada minggu ke-4 ($P = 0,947$) tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna antara mencit normal dan mencit lupus induksi pristan. Hasil uji *Independent T-test* berat badan mencit pada minggu ke-12 ($P = 0,002$) menunjukkan perbedaan yang bermakna antara mencit normal dan mencit lupus induksi pristan yang mana BB mencit lupus induksi pristan lebih rendah dibanding kelompok mencit normal.

5.1.2 Manifestasi Serologis Mencit Balb/c Induksi Pristan

Manifestasi serologis pada mencit lupus induksi pristan diukur untuk mengetahui peningkatan kadar autoantibodi pada mencit lupus induksi pristan dibandingkan kelompok mencit normal. Rata-rata kadar anti-dsDNA diperoleh dari mencit normal dan mencit lupus induksi pristan. Pengukuran anti-dsDNA dilakukan dengan metode ELISA pada setiap kelompok. Hasil pengukuran kadar anti-dsDNA antara mencit normal dan mencit lupus induksi pristan ditunjukkan pada tabel 5.2.

Tabel 5.2 Rata-rata hasil pengukuran kadar anti-dsDNA pada mencit Normal dan mencit lupus Induksi pristan

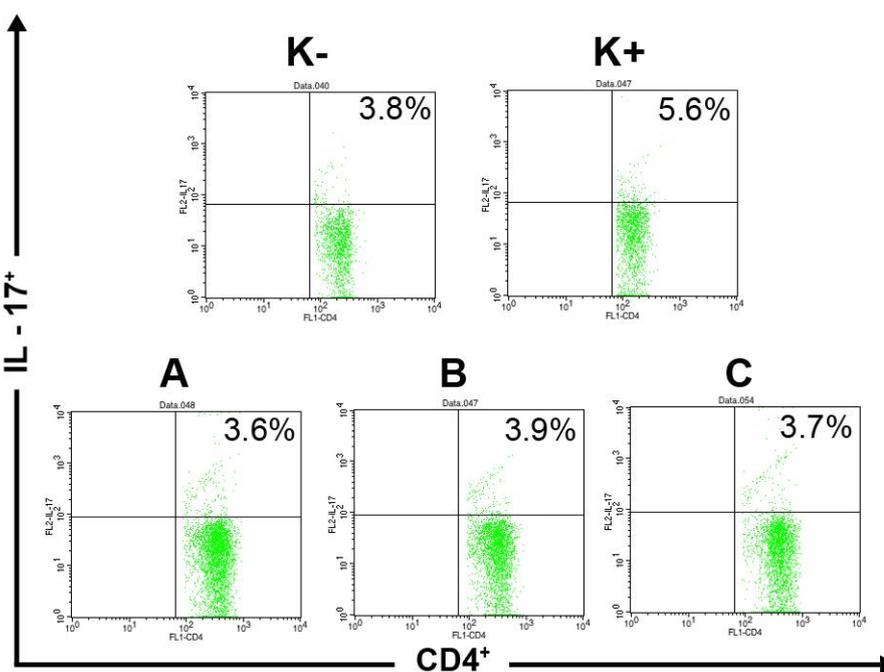
Kelompok	Kadar anti-dsDNA (ng/ml)
Mencit Normal (n=5)	7.85 ± 5.00 ^a
Mencit Lupus Induksi Pristan (n=5)	80.36 ± 47.29 ^b

Hasil uji normalitas data menggunakan *Shapiro-Wilk* menunjukkan kadar anti-dsDNA memiliki persebaran normal ($P > 0,05$). Hasil uji homogenitas data kadar ANA menunjukkan data homogen ($p = 0,998$) tetapi hasil uji kadar anti-dsDNA menunjukkan data tidak homogen ($p = 0,001$). Oleh karena data ANA yang menunjukkan persebaran normal dan homogen maka uji beda kadar ANA dilakukan dengan uji parametrik *Independent T-test*. Hasil uji *Independent T-test* kadar ANA menunjukkan peningkatan kadar ANA pada kelompok mencit lupus induksi pristan ($34,88 \pm 7,52$) dibandingkan kelompok mencit normal ($30,68 \pm 7,70$) tetapi tidak berbeda secara signifikan ($p = 0,362$). Oleh karena analisis data kadar anti-dsDNA menunjukkan data memiliki persebaran normal tetapi tidak homogen maka uji beda pada antara kadar anti-dsDNA pada kelompok mencit normal dengan mencit lupus induksi pristan dilakukan dengan uji non parametrik *Mann-whitney*. Hasil uji *Mann-whitney* kadar anti-dsDNA menunjukkan peningkatan kadar anti-dsDNA pada kelompok mencit lupus induksi pristan

(80.36 ± 47.29) dibandingkan kelompok mencit normal (7.85 ± 5.00) secara signifikan ($p=0.023$). Hal ini menandakan pemberian pristan 0.5 cc ($782\mu\text{g/ml}$) dosis tunggal secara intraperitoneal berhasil menginduksi peningkatan kadar autoantibodi pada mencit lupus induksi pristan.

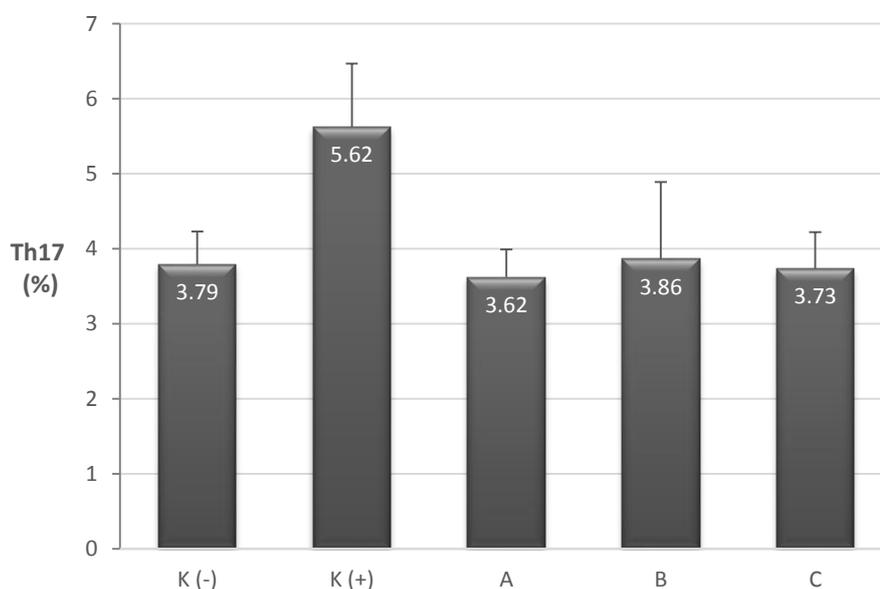
5.2 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Jumlah sel T Helper 17 (Th17) pada Mencit Lupus Induksi Pristan

Persentase jumlah sel T Helper 17 (Th17) diukur dengan menggunakan metode *flowcytometry* dari jaringan limpa mencit. Hasil pengukuran berupa persentase jumlah sel dengan marker $\text{CD4}^+\text{IL17A}^+$ dan kemudian dibandingkan rata-rata persentase jumlah sel Th17 antar kelompok. Hasil *flowcymetry* representatif dari setiap kelompok ditunjukkan pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Hasil Pemeriksaan Persentase Sel Th17 ($\text{CD4}^+\text{IL17A}^+$) dengan Metode Flowcytometry. K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat ($n=5$), K (+) = Kelompok kontrol positif, mencit lupus induksi pristan ($n=5$), A = Kelompok terapi A, mencit lupus induksi pristan dan diberi EDI dsDNA dosis I ($n=5$), B = Kelompok terapi B, mencit lupus induksi pristan dan diberi EDI dsDNA dosis II ($n=5$), C = Kelompok terapi C, mencit lupus induksi pristan dan diberi EDI dsDNA dosis III ($n=5$).

Setelah mendapatkan persentase jumlah sel Th17 dengan metode *flowcytometry* dari setiap sampel, dilakukan perhitungan rata-rata persentase sel Th17 untuk setiap kelompok. Rata-rata persentase jumlah sel T-helper 17 dari masing-masing kelompok ditunjukkan pada gambar 5.3. Rata-rata tertinggi persentase sel Th17 didapatkan pada kelompok kontrol positif (K (+) sedangkan rata-rata terendah ditunjukkan pada kelompok A. Untuk menilai perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji beda parametrik *One-way* ANOVA.



Gambar 5.3 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Persentase Sel Th17

(CD4+IL17A+). K (-) = Kelompok kontrol negatif, mencit sehat (n=5), K (+) =

Kelompok kontrol positif, mencit lupus induksi pristan (n=5), A = Kelompok

terapi A, mencit lupus induksi pristan dan diberi EDI dsDNA dosis I (n=5), B =

Kelompok terapi B, mencit lupus induksi pristan dan diberi EDI dsDNA dosis II

(n=5), C = Kelompok terapi C, mencit lupus induksi pristan dan diberi EDI

dsDNA dosis III (n=5).

Uji beda dilakukan dengan uji *One-way* ANOVA dengan tingkat

signifikansi 0,05 (α) dan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji normalitas data

menggunakan *Saphiro-Wilk* menunjukkan data memiliki persebaran normal

($P > 0,05$) sedangkan dari hasil uji homogenitas levene menunjukkan data bersifat

homogen dengan nilai $p = 0,228$ ($P > 0,05$). Dari kedua uji tersebut dapat

disimpulkan bahwa data persentase jumlah sel Th17 terdistribusi normal dan

homogeny sehingga syarat uji parametrik *One-way* Anova terpenuhi.

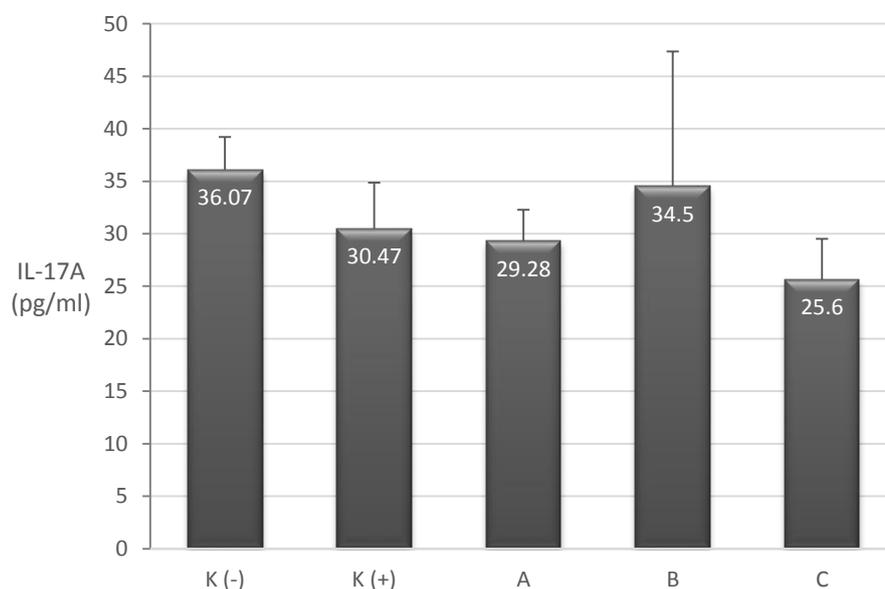
Pada tahap selanjutnya dilakukan uji *One-Way Anova* karena didapatkan persebaran data normal dan homogen. Dari hasil *One-Way Anova* didapatkan nilai *p* tidak signifikan, yaitu 0,146 yang berarti tidak terdapat setidaknya dua kelompok yang berbeda secara signifikan. Rata-rata persentase sel Th17 pada kelompok positif (K+) ($5,62 \% \pm 0,85$) mengalami kenaikan dibanding kelompok negatif (K-) ($3,79 \% \pm 0,44$) meskipun tidak signifikan. Rata-rata persentase sel Th17 pada kelompok terapi A ($3,62 \pm 0,37$), B ($3,86 \% \pm 1,03$), dan C ($3,73 \% \pm 0,49$) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+). Tidak didapatkan perbedaan yang bermakna persentase sel Th17 antara kelompok terapi A, B, maupun C.

Manifestasi serologis LES yang diukur pada penelitian ini adalah peningkatan kadar anti-dsDNA. Untuk mengetahui pengaruh pemberian EDI dsDNA terhadap manifestasi serologis mencit lupus induksi pristan, dilakukan pengukuran terhadap kadar anti-dsDNA (data tidak ditampilkan) setelah pemberian EDI dsDNA. Untuk mengetahui hubungan antara persentase sel Th17 dengan kadar anti-dsDNA, maka dilakukan uji korelasi antara persentase sel Th17 dengan kadar anti-dsDNA. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0.091 ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat korelasi yang bermakna antara persentase sel Th17 dengan kadar anti-dsDNA.

5.3 Efek Pemberian Terapi EDI dsDNA terhadap Kadar Interleukin 17A (IL-17A) pada Mencit Lupus Induksi Pristan

Interleukin-17A atau IL-17A merupakan salah satu sitokin yang diproduksi oleh sel Th17. Pada penelitian ini dilakukan pengukuran sitokin IL-17A pada serum darah hewan coba dengan metode ELISA. Rata-rata hasil pengukuran kadar sitokin IL-17A pada setiap kelompok perlakuan disajikan pada gambar 5.4. Rata-rata tertinggi kadar IL-17A didapatkan pada kelompok kontrol negatif (K (-)), sedangkan rata-rata terendah ditunjukkan pada kelompok kontrol terapi C. Untuk

menilai perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji beda parametrik *One-way ANOVA*.



Gambar 5.4 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar Interleukin-17A.

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

Uji beda dilakukan dengan uji *One-way ANOVA* dengan tingkat signifikansi 0,05 (α) dan taraf kepercayaan 95%. Hasil uji normalitas data menggunakan *Saphiro-Wilk* menunjukkan data memiliki persebaran normal ($P > 0,05$) sedangkan dari hasil uji homogenitas *Levene* menunjukkan data bersifat homogen dengan nilai $p = 0,053$ ($P > 0,05$). Dari kedua uji tersebut dapat

disimpulkan bahwa data kadar IL-17A terdistribusi normal dan homogen sehingga syarat uji parametrik One-way Anova terpenuhi.

Pada tahap selanjutnya dilakukan uji *One-Way Anova* karena didapatkan persebaran data normal dan homogen. Dari hasil *One-Way Anova* didapatkan nilai *p* tidak signifikan, yaitu 0,786 yang berarti tidak terdapat setidaknya dua kelompok yang berbeda secara signifikan. Rata-rata kadar IL-17A pada kelompok kontrol negatif (K-) ($36,07 \pm 3,13$) secara tidak signifikan mengalami sedikit kenaikan dibanding kelompok positif (K+) ($30,47 \% \pm 4,40$). Rata-rata kadar IL-17A pada kelompok terapi A ($29,28 \pm 2,99$) dan C ($25,60 \pm 3,91$) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+). Sedangkan rata-rata kadar IL-17A pada kelompok terapi B ($34,50 \pm 12,85$) cenderung mengalami peningkatan dibanding kelompok kontrol positif (K+). Tidak didapatkan perbedaan kadar IL-17A yang bermakna antara kelompok terapi A, B, maupun C. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan nilai signifikansi 0.348 ($p > 0,05$) yang berarti tidak terdapat korelasi yang bermakna antara kadar IL-17A dengan kadar anti-dsDNA.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Manifestasi Mencit Lupus Induksi Pristan

LES adalah suatu penyakit kronis yang mempengaruhi berbagai sistem organ dalam tubuh, terutama akibat adanya pembentukan dan deposisi dari autoantibodi dan kompleks imun, yang mengarah pada kerusakan jaringan dan organ. LES terjadi akibat adanya kegagalan mekanisme toleransi dalam tubuh sehingga terbentuk antibodi yang menyerang *self antigen* yang terpapar pada sel apoptosis (Maidhof *et al.*, 2012). Salah satu konsep kunci dalam patogenesis LES adalah ketidakseimbangan antara apoptosis sel dan pembersihan bahan apoptosis (Theofilopoulos *et al.*, 2011).

Studi menunjukkan injeksi pristan secara intraperitoneal pada mencit berhasil menginduksi penyakit lupus (Rottman dan Willis, 2010). Pemberian pristan memiliki efek sitotoksik dan dilaporkan dapat menginduksi kematian sel baik secara *in vitro* maupun *in vivo*. Pada mencit, pristan menginduksi apoptosis melalui jalur mitokondria dengan aktivasi *caspase* (Boeltz, 2013). Pemberian pristan dosis tunggal secara intraperitoneal dapat terdeteksi dalam jangka waktu yang lama dalam mencit sehingga menyebabkan paparan *self antigen* secara terus menerus akibat apoptosis pada sel peritoneal dan dapat memicu terjadinya respon autoimunitas. (Calvani *et al.*, 2005). Induksi lupus dengan pristan juga dapat menghasilkan mencit yang memiliki penyakit dengan manifestasi klinis paling mendekati LES pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Pada penelitian ini pemberian injeksi pristan secara intraperitoneal berhasil menginduksi manifestasi LES pada mencit Balb/c. Manifestasi yang muncul diantaranya penurunan berat badan, bulu rontok, penurunan aktivitas, dan peningkatan autoantibodi (anti-dsDNA).

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa injeksi pristan pada mencit berhubungan dengan terjadinya penurunan berat badan dan penurunan aktivitas (NRC, 1999). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini. Mencit normal (tanpa injeksi pristan) pada penelitian ini mengalami peningkatan berat badan sedangkan mencit yang diberi injeksi pristan tidak mengalami peningkatan berat badan dan bahkan mengalami penurunan berat badan. Rata-rata berat badan kelompok mencit injeksi pristan pada minggu ke-12 paska injeksi lebih rendah secara signifikan dibanding kelompok mencit normal (tanpa injeksi pristan). Hal ini menunjukkan bahwa injeksi pristan berpengaruh pada berat badan mencit pada penelitian ini. Mencit injeksi pristan pada penelitian ini juga mengalami bulu rontok yang ditandai dengan adanya daerah alopecia pada tubuh mencit. Mencit yang telah terinduksi lupus juga tampak mengalami penurunan aktivitas. Hal ini Pada mencit yang diinjeksi pristan didapatkan peningkatan kadar anti-dsDNA secara signifikan. Hal ini menunjukkan injeksi pristan berhasil memicu pembentukan autoantibodi pada mencit.

Injeksi pristan pada hewan coba juga dapat memunculkan patofisiologi yang mirip dengan patofisiologi LES pada manusia seperti keterlibatan sitokin IFN- α , disregulasi sel plasma hingga terbentuknya autoantibodi ANA dan anti-dsDNA (Rottman dan Willis, 2010). Injeksi pristan secara intraperitoneal mampu meningkatkan sitokin IFN tipe I (IFN α dan IFN β). Peningkatan IFN tipe I terjadi juga pada pasien LES dan diketahui sejak 30 tahun lalu (Reeves *et al.*, 2009). Ekspresi IFN tipe I berkontribusi pada hilangnya toleransi sistem imun. Ekspresi gen yang memproduksi IFN tipe I juga berkaitan dengan keparahan penyakit, nefritis, dan terbentuknya antibodi melawan antigen inti diantaranya dsDNA, sm, atau RNP (Reeves *et al.*, 2009).

Tanda utama LES adalah tingginya produksi autoantibodi terhadap antigen inti, seperti double-strand DNA (ds-DNA) dan kromatin, yang mengakibatkan

kerusakan organ yang diperantarai antibodi (Zhu *et al.*, 2007; Lauwerys, 2003).

Autoantibodi merupakan kelainan imunologis yang menjadi dasar patogenesis dari LES. Penumpukan autoantibodi di jaringan membutuhkan aktivasi sistem komplemen dan atau mediator inflamasi lainnya, serta kemotaksis limfosit dan polimorfonuklear, pelepasan sitokin, kemokin, enzim proteolitik, sehingga menyebabkan kerusakan organ. Penderita LES umumnya mengeluh lemah, demam, malaise, anoreksia dan berat badan menurun. Manifestasinya bisa ringan, berat, bahkan sampai dapat mengancam jiwa (Wallace, 2007; Zhu, 2007).

Pada penelitian ini, pemberian imunoterapi dengan *self antigen* dsDNA dengan metode EDI pada kelompok mencit lupus induksi pristan menunjukkan penurunan kadar anti-dsDNA. Kehadiran autoantibodi patogen dalam hal ini anti-dsDNA akan mengakibatkan kerusakan jaringan akibat deposisi kompleks imun. Studi ini menunjukkan bahwa desensitisasi dengan dsDNA yang terkait dengan Je dapat menekan respons sel B dan T di SLE dengan memodulasi T-reg. Aktivasi sel Treg dimediasi oleh sitokin TGF- β . TGF- β mengikat reseptor TGF- β pada sel T naif sehingga mengaktifkan faktor transkripsi STAT5 dan berperan langsung dalam menghambat aktivitas sel B. Penurunan autoantibodi anti-dsDNA diharapkan dapat menurunkan kerusakan jaringan akibat deposisi kompleks imun sehingga manifestasi klinis yang timbul akibat kerusakan jaringan diantaranya lemah, malaise, dan berat badan menurun mengalami perbaikan.

Manifestasi klinis pada kelompok mencit lupus induksi pristan setelah diberi terapi EDI dsDNA tidak menunjukkan perubahan sehingga tidak dapat dievaluasi.

Proses perbaikan manifestasi klinis ini mungkin membutuhkan waktu sehingga pengaruh pemberian EDI dsDNA pada mencit lupus induksi pristan belum menunjukkan perbaikan manifestasi klinis secara signifikan.

6.2 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Jumlah sel Th17 pada Mencit Lupus Induksi Pristan

Hilangnya toleransi terhadap *self antigen* dikatakan sebagai salah satu langkah awal berkembangnya LES. Hal ini diyakini dengan adanya hiperreaktivitas dari sel B dan sel T terhadap antigen tubuh. Hiperreaktivitas sel B ini didukung oleh terbentuknya autoantibodi pada pasien dengan LES, seperti anti-dsDNA, anti-Sm dan anti-RNPs. Hilangnya toleransi pada sel B dan sel T dapat terjadi pada berbagai mekanisme toleransi diantaranya seperti saat delesi dari sel autoreaktif di timus saat perkembangan sel serta kegagalan toleransi di perifer seperti mekanisme apoptosis, anergi atau inhibisi oleh sel Treg. Disfungsi dari proses anergi sel T autoreaktif dapat mengakibatkan hiperreaktivitas respon sel T yang dapat merusak keseimbangan produksi sitokin dari sel T proinflamasi dan antiinflamasi (Zharkova *et al.*, 2017)

Sel T dapat dibagi menjadi beberapa subset bergantung pada fenotip dan fungsinya. Sel Treg merupakan sel T yang berfungsi menjaga toleransi di perifer dengan cara inhibisi sel T autoreaktif. Treg dapat menjalankan fungsi tolerogenik melalui kontak antar sel atau melalui pelepasan faktor – faktor yang bersifat immunosupresif seperti *transforming growth factor β* (TGF β) and IL-10. Turunnya jumlah sel Treg dan gangguan fungsi dari sel Treg berperan dalam patogenesis LES. Sel Th17 merupakan subset lain sel T diasosiasikan dengan infeksi kronis dan penyakit autoimun termasuk LES (Rother *et al.*, 2015). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini. Injeksi pristan secara intraperitoneal pada kelompok kontrol positif menunjukkan peningkatan jumlah sel Th17 dibandingkan kelompok kontrol negatif (5,61 % \pm 0,85 vs 3,79 % \pm 0,44; $p > 0,05$) meskipun tidak signifikan.

Tujuan utama dari terapi penyakit autoimun adalah membatasi respon imun terhadap *self-antigen* tanpa menurunkan kemampuan sel imun untuk mengeleminasi antigen asing (*non-self*). Injeksi *self-antigen* dengan dosis yang

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

Penelitian dilakukan pada *autoimmune encephalomyelitis model* (EAE) dari *multiple sclerosis* dengan pemberian terapi menggunakan protein MBP (*Myelin Basic Protein*). Dosis MBP yang diberikan bertahap dari konsentrasi 0.01 $\mu\text{g/ml}$ -0.1 $\mu\text{g/ml}$ -1 $\mu\text{g/ml}$ -10 $\mu\text{g/ml}$ -100 $\mu\text{g/ml}$. Dengan menggunakan protokol EDI, pemberian antigen spesifik mampu mencapai dosis tertinggi yang dibutuhkan untuk menginduksi IL10 tanpa meningkatkan sitokin inflamasi lainnya. Fenotip sel T CD4 yang diinduksi EDI juga dibandingkan dengan sel yang diinduksi dengan dosis antigen yang sama berulang-ulang. Kedua metode tersebut sama-sama menunjukkan efek anergi sel, supresi sel, dan peningkatan ekspresi IL10. Akan tetapi, pada penelitian ini produksi IL10 pada sel yang diberikan paparan antigen dengan metode EDI menunjukkan kadar yang lebih tinggi dibanding dengan metode pemberian antigen berulang-ulang dengan dosis yang sama (Burton *et al.*, 2014).

Penelitian ini bertujuan untuk mengembalikan regulasi imun pada penyakit LES dengan memberikan imunoterapi menggunakan antigen dsDNA dengan metode EDI. Pada penelitian ini, dilakukan pemberian EDI self antigen dsDNA dengan berbagai dosis diantaranya terapi A ((0.01 $\mu\text{g/ml}$, 0.1 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$),

terapi B (0.1 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml), dan terapi C (1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml). Kelompok mencit lupus induksi pristan yang diberikan terapi EDI dsDNA mengalami kecenderungan penurunan jumlah sel Th17. Rata-rata persentase jumlah sel Th17 pada kelompok terapi A ($3,62 \pm 0,37$), B ($3,86 \% \pm 1,03$), dan C ($3,73 \% \pm 0,49$) cenderung mengalami penurunan dibanding kelompok positif (K+) meskipun tidak signifikan ($p > 0,05$). Akan tetapi, tidak didapatkan perbedaan yang bermakna antara persentase jumlah sel Th17 antara kelompok terapi A, B, maupun C. Penurunan ini menunjukkan pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit lupus induksi pristan mampu menurunkan jumlah sel Th17.

Pada penelitian sebelumnya, pemberian imunoterapi dengan antigen spesifik dengan metode EDI terbukti dapat menginduksi aktivasi dan fungsi pada Treg untuk sekresi sitokin IL-10 dan TGF- β yang bekerja menekan sel imun autoreaktif (Burton *et al.*, 2014). Dengan demikian, pada penelitian ini pemberian EDI dsDNA pada kelompok mencit lupus induksi pristan dapat menurunkan jumlah sel Th17 melalui peningkatan sel T-Reg pada produksi sitokin imunomodulator IL-10 dan TGF β . Sel T-reg memiliki fungsi penekan terhadap respons inflamasi dengan memproduksi sitokin TGF- β dan IL-10 dimana keduanya sitokin ini terbukti dapat mengurangi aktivitas sel imun lainnya. Sel Treg memiliki peran penting dalam pengembangan terapi toleransi dengan antigen spesifik. Induksi sitokin IL10 sebagai imunomodulator menunjukkan efektivitas imunoterapi baik pada tikus maupun manusia (Tarzi *et al.*, 2006; Campbell *et al.*, 2009; Fousteri *et al.*, 2010). Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan juga membuktikan bahwa sel Treg ini berperan secara langsung dalam menghambat aktivitas sel Th1, Th2, Th17, dan aktivitas dari sel B (Xu *et al.*, 2003).

Penurunan jumlah sel Treg atau adanya defisiensi pada fungsinya tampak memiliki hubungan dengan stadium aktif dari penyakit (Gerli *et al.*, 2009). Studi lain juga menunjukkan rasio antara Treg terhadap Th17 mengalami penurunan pada pasien LES yang mengalami eksaserbasi serta rasio yang meningkat dari Treg terhadap Th17 pada kelompok kontrol (Kleczynska *et al.*, 2011). Adanya ketidakseimbangan antara sel Th17 dan Treg didukung oleh studi molekuler yang menunjukkan adanya interaksi timbal balik antara kedua subpopulasi tersebut. Walaupun baik Th17 dan sebagian sel Treg membutuhkan sitokin yang sama, TGF- β , saat tahap awal dari proses diferensiasi, adanya sitokin proinflamasi lain seperti IL-6 berperan dalam diferensiasi sel T untuk mengekspresikan protein – protein seperti ROR γ t dan IL-23R yang berperan dalam pengembangan sel Th17 (Zhou *et al.*, 2008).

6.3 Efek Pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar IL-17A pada Serum Mencit

Lupus Induksi Pristan

IL-17A adalah sitokin yang terkait erat dengan epitel, dan khususnya, dengan mukosa usus. IL-17A memainkan peran kunci dalam pertahanan tubuh melawan patogen bakteri dan jamur. Selain itu, data yang ada menunjukkan bahwa IL-17A adalah sitokin proinflamasi yang kuat, memiliki kemampuan untuk memicu kaskade inflamasi, dan berkontribusi terhadap peradangan yang luas yang berakibat pada kerusakan jaringan. IL-17A dikaitkan dengan patogenesis autoimun model hewan atau penyakit autoimun pada manusia, salah satunya pada LES. (Li *et al.*, 2015). Beberapa studi menunjukkan adanya peningkatan kadar IL-17A pada pasien dengan LES (Yu *et al.*, 2011)

Pada penelitian ini, diukur kadar IL-17A untuk mengetahui efek pemberian EDI dsDNA terhadap Kadar IL-17A pada serum mencit lupus induksi pristan. Kadar IL-17A mencit lupus induksi pristan ($30,47 \pm 4,40$) tidak berbeda

signifikan dengan mencit kelompok kontrol negatif ($36,07 \pm 3,13$) dengan rata-rata IL-17A kelompok kontrol positif sedikit menurun dibanding kelompok kontrol negatif. Selain itu, kelompok mencit lupus induksi pristin yang diberikan terapi EDI dsDNA juga tidak mengalami perbedaan yang signifikan dibanding kelompok kontrol positif. Rata-rata IL-17A pada kelompok terapi A ($29,28 \pm 2,99$), B ($34,50 \pm 12,85$), dan C ($25,60 \pm 3,91$) tidak memiliki perbedaan yang signifikan antar kelompok maupun dibandingkan dengan kontrol positif ($p > 0,05$). Penelitian ini juga membandingkan korelasi jumlah sel Th17 dan kadar IL-17 dengan kadar anti-dsDNA dimana pada penelitian ini tidak menunjukkan hubungan korelasi yang signifikan.

Hal ini berbeda dengan berbagai penelitian yang menunjukkan hubungan yang kuat antara IL-17 dengan LES. Beberapa penelitian menunjukkan kadar IL-17 yang tinggi pada pasien LES dibandingkan dengan kontrol orang sehat. Selain itu, terdapat peningkatan produksi IL-17 penelitian *in vitro* limfosit yang distimulasi dari pasien LES saat dibandingkan limfosit normal, serta terdapat korelasi positif kadar IL-17 terhadap aktivitas penyakit LES (Nalbandian *et al.*, 2009). Namun, terdapat beberapa studi lain yang mendukung hasil penelitian, diantaranya studi yang melaporkan tidak adanya hubungan antara IL-17 dengan aktivitas penyakit (Cheng *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2010). Beberapa studi lain juga menunjukkan bahwa kadar IL-17A secara keseluruhan tidak lebih tinggi secara signifikan dibanding kelompok kontrol sehat yang dipasangkan sesuai dengan usia dan jenis kelamin. Selain itu, kadar IL-17A relatif stabil dari waktu ke waktu dan tidak terkait dengan aktivitas penyakit SLE (SLEDAI-2K) atau kerusakan kumulatif (SLICC-DI) (Raymond *et al.*, 2017).

Menariknya, penelitian lain pada penyakit autoimun lain seperti artritis rheumatoid (RA) menunjukkan adanya penurunan kadar IL-17 pada tahapan awal penyakit RA dibandingkan dengan kontrol negatif. Selain itu, terdapat studi lain

yang menunjukkan peningkatan persentase dari Th17 terlihat pada pasien dengan rerata durasi penyakit RA sekitar 8.9 ± 3.9 tahun (Taberkiewicz *et al.*, 2015). Pada pasien dengan autoimun *multiple sclerosis*, terdapat kadar IL-17A yang bervariasi bila dihubungkan dengan usia, pengobatan yang diberikan, serta waktu perkembangan penyakit. Terdapat fluktuasi kadar IL-17A dalam 15 tahun perkembangan penyakit, dimana puncaknya terdapat pada 5 – 10 tahun perkembangan penyakit dan menurun setelah 15 tahun perkembangan penyakit (de Jesus Guerrero-Garcia *et al.*, 2016). Hal ini menunjukkan kadar IL-17A dapat berfluktuasi bergantung pada perjalanan penyakitnya serta pemilihan waktu dalam mengamati kadar IL-17A merupakan hal yang penting dalam korelasinya dengan perjalanan serta aktivitas penyakitnya.



BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

7.1.1 Kesimpulan Umum

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

7.1.2 Kesimpulan Khusus

1. Pemberian EDI *self-antigen* dsDNA dapat menurunkan persentase sel Th17 pada mencit lupus induksi pristan meskipun tidak signifikan
2. Pemberian EDI *self-antigen* dsDNA tidak dapat menurunkan kadar IL-17A pada mencit lupus induksi pristan

7.2 Saran

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