

DISERTASI

**EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan L*)
TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA, HIGH MOTILITY GROUP BOX 1 (HMGB1) ,
INTERLEUKIN-6 DAN INTERLEUKIN-10 PADA MENCIT Balb/c DENGAN
CANDIDIASIS VULVOVAGINALIS**

**Effectiveness Of Giving Secang Wood (*Caesalpinia Sappan L*) Extract On m RNA
High Motility Group Box 1 (HMGB1) Gene Expression, Interleukin 6 And Interleukin-
10 In Balb /C With Vulvovaginalis Candidiasis**

SRI WAHYU

P0200315401



**PROGRAM STUDI S3 KEDOKTERAN
PROGRAM PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2020



DISERTASI

**EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG
(*Caesalpinia sappan L*) TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA
HIGH MOTILITY GROUP BOX 1 (HMGB1) , INTERLEUKIN-6 DAN
INTERLEUKIN-10 PADA MENCIT Balb/c DENGAN CANDIDIASIS
VULVOVAGINALIS**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

SRI WAHYU



**SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

DISERTASI

**EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG (*CAESALPINIA SAPPAN*)
TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA HIGH MOTILITY GROUP BOX 1 (HMGB 1),
INTERLEUKIN-6 DAN INTERLEUKIN-10 PADA MENCIT BALB/C DENGAN
CANDIDIASIS VULVOVAGINALIS**

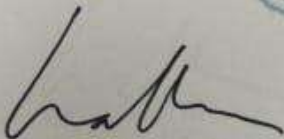
Disusun dan diajukan oleh


SRI Wahyu
P0200315401

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 12 Oktober 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,

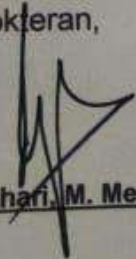

dr. Firdaus Hamid, Ph.D
Promotor

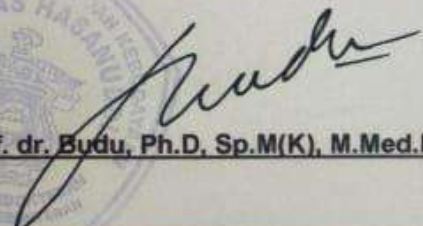

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Ko-Promotor


Dr. dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK(K)
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin


M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Kampus Tamalanrea Km. 10 Makassar 90245
Telp. (0411) 586010, 585836, 586200 Psw. 2767 Fax. (0411) 586297

SURAT PERNYATAAN NON PLAGIAT

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : **Sri Wahyu**
No Pokok : P0200315401
Program Pendidikan : Doktor (S3)
Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan secara benar, jujur dan bertanggung jawab disertasi yang berjudul : Efektifitas Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia sappan*) Terhadap Ekspresi Gen mRNA High Motility Groupv Box 1 (HMGB1), Interleukin-6 dan Interleukin-10 pada Mencit Balb/c dengan Candidiasis Vulvovaginalis." adalah **asli bukan plagiat/bebas dari plagiat**

Jika dikemudian hari ternyata disertasi ini sebagian/seluruhnya mengandung unsur plagiat maka disertasi dibatalkan dan bersedia menerima sanksi hukum dari Fakultas maupun Universitas.

Demikian Surat Pernyataan ini dibuat tanpa tekan siapapun

Makassar, 25 November 2020

Mahasiswa,

Sri Wahyu



DAFTAR TIM PENGUJI

1. dr. Firdaus Hamid, Ph.D
2. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
3. Dr. dr. Khairuddin Djawad, sp.KK(K)
4. Prof. Dr. Yusminah Hala, MS
5. Prof. Dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok
6. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK (K)
7. dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA (K),Sp.S
8. dr. Muh. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA (K)
9. Dr.dr. Burhanuddin Bahar, MS



PRAKATA

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamualaikum Warahmatullahi Wabarakatuh.

Alhamdulillah, puji syukur kita panjatkan ke hadirat Allah SWT dan shalawat kepada Rasulullah Muhammad SAW dengan selesainya disertasi ini dengan judul : **“EFEKTIFITAS PEMBERIAN EKSTRAK KAYU SECANG (*Caesalpinia sappan* L) TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA HIGH MOTILITY GROUP BOX 1 (HMGB1) , INTERLEUKIN-6 DAN INTERLEUKIN-10 PADA MENCIT Balb/c DENGAN CANDIDIASIS VULVOVAGINALIS “** sebagai salah satu persyaratan untuk mencapai gelar Doktor pada Sekolah Pascasarjana Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Keberhasilan penyusunan disertasi ini tidak lepas dari bantuan, bimbingan, nasehat dan dorongan dari berbagai pihak, untuk itu perkenankanlah saya menyampaikan ungkapan terimakasih yang sebesar-sebesarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

Bapak dr.Firdaus Hamid, Ph.D selaku Promotor yang sangat banyak memberikan masukan, memberikan ide, nasehat dan petunjuk serta membimbing tanpa lelah meluangkan waktu bahkan rela meninggalkan kesibukannya demi kelancaran dan penyelesaian disertasi ini.

Bapak Prof dr. Mochammad Hatta Ph.D, Sp.MK(K) selaku Co-Promotor Yang senantiasa memberikan banyak masukan, nasehat, arahan dan serta meluangkan waktu untuk membimbing dalam penyelesaian disertasi ini.

Bapak Dr. dr. Khairuddin Djawad, Sp.KK(K), selaku Co-Promotor yang sangat memberikan banyak masukan, memberikan ide, nasehat dan petunjuk tanpa lelah, dan waktu demi kelancaran dan penyelesaian



Optimization Software:
www.balesio.com

dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) selaku pendidik S3 Fakultas Kedokteran Unhas sekaligus penguji yang mendorong penyelesaian pendidikan saya, mengingatkan dan bahkan menegur kami bila lalai terhadap kewajiban dan tugas-tugas yang harus diselesaikan selama mengikuti pendidikan

Ibu Prof. Dr. Yusminah Hala, MS atas bantuan dan kesediaan serta arahannya selaku penguji eksternal atas arahan, bimbingan dan masukannya selama ini untuk penyelesaian disertai kami

Ibu Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok, selaku penguji dan guru kami yang telah banyak memberikan mengarahkan dan membimbing kami, dalam penyelesaian tugas disertasi ini.

Bapak dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S selaku penguji dan guru kami yang telah banyak memberikan mengarahkan dan membimbing kami, dan meluangkan waktu ditengah kesibukan beliau dalam penyelesaian tugas disertasi ini.

Bapak dr. Muh. Husni Cangara, Ph.D, Sp.PA(K) selaku penguji dan guru kami yang telah banyak memberikan mengarahkan dan membimbing kami, dan meluangkan waktu ditengah kesibukan beliau dalam penyelesaian tugas disertasi ini.

Bapak Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS atas kesediannya membimbing sekaligus sebagai tim penguji, atas saran dalam penyajian data kami sehingga dapat menyelesaikan disertasi kami,

Peneliti menghaturkan ucapan terimakasih yang tulus kepada kedua orang tua tercinta, **Ayahanda H. Sumardin Makka SKM, M.Kes dan Ibunda Hj. Nurul Kusuma Wardani**, yang telah memelihara, menjaga, membesarkan dan mendidik dengan penuh kasih sayang serta menanamkan nilai-nilai agama dalam kehidupan penulis. Suami. (**Andi Muhammad Fara Kessi, S.STP, M M**) dan ibu mertua (**Ibu Hj. Andi Bunga Billung, BA**) Saudara Kandung (**Muhammad Hasbi, S,T, M.TI,drg Ilmianti SKG, M.Kes dan Muhammad Takdir Muslihi, ST, M.T**). Kakak Ipar, (**A.Tenri Ola Kessi, SKM,M.Kes, Dr. Andi Makkulawu Kessi, SE, Msi, dan Andi Sumange Megga Kessi, S.E, M.Akt**) yang senantiasa memberikan motivasi dan dukungan. Banyak kendala yang dihadapi penulis dalam penyusunan disertasi ini, hanya berkat bantuan berbagai pihak, maka disertasi ini dapat terselesaikan. Dalam kesempatan ini penulis dengan tulus menyampaikan terima



aan, rasa hormat dan terima kasih juga penulis sampaikan
r. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA. selaku Rektor Universitas
Prof. Dr. Ir. Jamaluddin Jompa, M.Sc. selaku Dekan Sekolah
Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed selaku Dekan Fakultas
dr. Agussalim Bukhari, M.Clin., Med., Ph.D., Sp.GK(K) selaku
 Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran atas kesempatan yang diberikan kepada

penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktoral.

Ucapan penghargaan setinggi-tingginya untuk ayahanda Dekan Fakultas Kedokteran UMI Ayahanda **Prof dr. Syarifuddin Wahid, Sp.PA, Sp. F (K)** dan seluruh civitas akademika Fakultas Kedokteran UMI Makassar atas dukungannya hingga penulis dapat menyelesaikan studi.

Ucapan terima Kasih juga, penulis ucapkan untuk Kepala Bagian Fisiologi FKUMI **dr. Aryanti R Bamahry, M.Kes,Sp.GK** dan beserta staf dosen bagian Fisiologi atas dukungan dan motivasi yang diberikan selama peneliti menjalani pendidikan.

Ucapan terima kasih juga kami ucapkan untuk Staf Program Studi S3 Kedokteran UNHAS (**Pak Akmal, Pak Abdul Muin dan Pak Rachmat Mansyur**) atas bantuannya selama ini kepada peneliti.

Ucapan terima kasih juga kami ucapkan untuk teman seangkatan mahasiswa program studi S3 Kedokteran (dr. marliyanti Sp.M(K), dr. Yunita, Sp.M, (K), dr. Sriwijaya Sp. OG(K), Dr. Alfina, SKM, M.Kes terkhusus sahabat saya dr. Dian Amelia Abdi Sp.KK, atas segala dorongan, motivasi dan semangat sehingga peneliti dapat menyelesaikan disertasi ini.

Akhirnya kepada semua pihak yang telah membantu penulis yang tidak sempat dituliskan satu persatu, penulis sampaikan rasa terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya. Semoga Allah SWT selalu melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya kepada kita semua.

Makassar, 25 November 2020

Penulis,

SRIWAHYU



ABSTRAK

SRI WAHYU Efektifitas Pemberian Ekstrak Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan L*) Terhadap Ekspresi Gen MRNA High Motility Group Box 1 (Hmgb1) , Interleukin-6 Dan Interleukin-10 Pada Mencit Balb/C Dengan Candidiasis Vulvovaginalis (dibimbing oleh Firdaus Hamid, Muhammad Hatta, Khairuddin Djawad).

Pendahuluan Kandidiasis vulvovaginal (KVV) merupakan infeksi mukosa vagina dan vulva yang utamanya disebabkan oleh spesies *Candida albicans*. 75% wanita pernah mengalami satu kali episode Kandidiasis vulvovaginal (KVV) dan 40-45% lainnya mengalami dua atau lebih episode Kandidiasis vulvovaginal (KVV) sepanjang hidupnya.

Kayu secang merupakan tanaman yang mengandung beberapa kandungan seperti flavonoid, brazilin, dan tanin diduga berperan penting sebagai antibakteri dan bakteriostatik . Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh efek pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) terhadap ekspresi gen mRNA High Motility Group Box1 (HMGB1), Interleukin 6 dan interleukin10 pada mencit BALB/c dengan candidiasis vulvovaginalis

Bahan dan metode Penelitian dilakukan secara eksperimental murni yaitu percobaan laboratorium, pretest - post test control group design yang menggunakan hewan coba sebagai objek penelitian dimana penelitian dilakukan selama 18 hari dengan cara kuratif dan preventif membagi mencit menjadi 3 kelompok dengan setiap kelompok terdiri atas 5 mencit dan 1 mencit cadangan. yaitu pada H0-H10 Ketiga kelompok hanya diberikan sesuai perlakuan.kelompok 1 plasebo kelompok 2 dan 3 dengan ekstrak kayu secang. Setelah itu hari ke 11 diinfeksi dengan candida albicans, H12 diberikan lagi kelompok 1 aquades kelompok 2 obat anti jamur Flukonazole 19.5 mg/dl dan kelompok 3 diberikan ekstrak kayu secang. Setelah hari ke 7 setelah infeksi dilakukan pengambilan darah dan diuji Ekspresi gen MRNA, kadar HMGB1, Interleukin 6 dan Interleukin 10.

Hasil Penelitian : Dari hasil penelitian dengan melakukan kultur didapatkan terdapat perbedaan bermakna dengan pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) pada mencit yang mengalami kandidiasis vulvovaginalis. Hal ini dapat dilihat pada uji statistik ANOVA yang menunjukkan terdapat penurunan signifikan nilai ekspresi mRNA HMGB1, kadar HMGB1, Kadar interleukin 6 dan dan peningkatan kadar interleukin 10

Kesimpulan : Ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) pada menurunkan jumlah kandidiasis pada infeksi kandidiasis vulvovaginalis



ABSTRAK

SRI WAHYU Effectiveness of Giving Secang Wood Extract (Caesalpinia Sappan L) Against Expression of High Motility Group Box 1 (Hmgb1) mRNA Gene, Interleukin-6 and Interleukin-10 in Balb / C Mice with Vulvovaginalis Candidiasis (supervisor by Firdaus Hamid, Muhammad Hatta, Khairuddin Djawad).

Introduction Vulvovaginal candidiasis (CVV) is an infection of the vaginal and vulva mucosa that is mainly caused by the species *Candida albicans*. 75% of women have had one episode of vulvovaginal candidiasis (CVV) and another 40-45% have two or more episodes of vulvovaginal candidiasis (CVV) in their lifetime.

Secang wood is a plant that contains several ingredients such as flavonoids, brazilin, and tannins, which are thought to play an important role as antibacterial and bacteriostatic. This study aims to determine the effect of secang wood extract (Caesalpiniasappan L) on High Motility Group Box1 (HMGB1), Interleukin 6 and interleukin10 mRNA gene expression in BALB / c mice with candidiasis vulvovaginalis.

Materials and methods The research was carried out purely experimental, namely laboratory experiments, pretest - posttest control group design using experimental animals as research objects where the research was carried out for 18 days in a curative and preventive manner dividing mice into 3 groups with each group consisting of 5 mice and 1 spare mouse. . namely on H0-H10 The three groups were only given according to treatment. group 1 placebo groups 2 and 3 with secang wood extract. After that on the 11th day, they were infected with *Candida albicans*, H12 was given again group 1 aquades, group 2, the anti-fungal drug Fluconazole 19.5 mg / dl and group 3 was given secang wood extract. After 7 days after infection, blood was collected and tested for mRNA gene expression, levels of HMGB1, Interleukin 6 and Interleukin 10.**Results:** The results of the study by conducting culture, it was found that there was a significant difference with the administration of secang wood extract (Caesalpiniasappan L) in mice experiencing candidiasis vulvovaginalis. This can be seen in the ANOVA test statistical test which shows that there is a significant decrease in the expression value of mRNAHMGB1, levels of HMGB1, levels of interleukin 6 and and an increase in levels of interleukin 10

Conclusion: Extract of secang wood (Caesalpiniasappan L) on reducing the amount of *Candida albicans* in candidiasis vulvovaginalis infection



secang wood extract (Caesalpiniasappan L), HMGB1 gene expression, IL-6 and Interleukin-10 in Balb / C Mice with Vulvovaginalis Candidiasis

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Perubahan warna Ekstrak Kayu Secang Sesuai Nilai Kadar PH

Tabel 2 Fungsi Kompartemen Spesifik HMGB1

Tabel 4.1.1 Hasil pemeriksaan sampel kultur Fungi Load setelah terinfeksi (H0) setelah diberikan candida albicans dan setelah 7 hari (H8) pada kandidiasis Vulvavaginalis

Tabel 4.1.2 Hasil pemeriksaan sampel kultur Fungi Load setelah terinfeksi candida albicans dan setelah 7 hari pengobatan pada kandidiasis Vulvavaginalis menggunakan medium SDA (Sabouraud Destrose Agar)

Tabel 4.1.3 Analisis Variabel Fungi Load setelah terinfeksi candida albicans dan setelah 7 hari pengobatan pada kandidiasis Vulvavaginalis

Tabel 4.1.4 Analisis Ekspresi nilai HMGB1 setelah terinfeksi candida albicans dan setelah 7 hari pengobatan

Tabel 4.1.5 Analisis nilai kadar HMGB1 setelah terinfeksi candida albicans dan setelah 7 hari pengobatan

Tabel 4.1.6 Analisis kadar IL-6 setelah terinfeksi (H0) setelah diberikan candida albicans dan setelah 7 hari pengobatan

Tabel 4.1.7 Analisis kadar IL-10 setelah terinfeksi candida albicans dan setelah 7 hari pengobatan



DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Kayu Secang (*Caesalpinia Sappan* L)

Gambar 2 Gambar batang,Bunga dan Daun (*Caesalpinia Sappan* L)

Gambar 3 Mekanisme pelepasan HMGB1 dan Isoform HMBGB1

Gambar 4. Struktur Dinding Sel *C. albicans*



DAFTAR LAMPIRAN

1. Biodata Peneliti
2. Dokumentasi Kegiatan Penelitian
3. Data Sampel Penelitian
4. Data Kultur Penelitian
5. Hasil Kultur
6. Hasil Pemeriksaan Mouse Hmgb1 Elisa
7. Hasil Pemeriksaan Mouse Interleukin-6 Elisa
8. Hasil Pemeriksaan Mouse Interleukin-10 Elisa
9. Data Statistik



DAFTAR ISI

| | |
|---|------------------------------|
| JUDUL..... | i |
| LEMBAR PENGESAHAN | Error! Bookmark not defined. |
| PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI | Error! Bookmark not defined. |
| DAFTAR TIM PENGUJI | v |
| PRAKATA | vi |
| ABSTRAK..... | ix |
| DAFTAR TABEL | xi |
| DAFTAR GAMBAR..... | xii |
| BAB I..... | 1 |
| PENDAHULUAN..... | 1 |
| 1.1..Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2. Rumusan masalah..... | 4 |
| 1.3. Tujuan penelitian | 5 |
| 1.3.1. Tujuan umum..... | 5 |
| 1.3.2. Tujuan khusus : | 5 |
| 1.4. Manfaat penelitian..... | 5 |
| BAB II..... | 6 |
| TINJAUAN PUSTAKA..... | 6 |
| 2.1 Tinjauan umum Kayu Secang (<i>Caesalpinia sappan L</i>)..... | 6 |
| 2.1.1 Klasifikasi <i>Caesalpinia sappan L</i> | 8 |
| 2.1.2. Kandungan <i>Caesalpinia sappan L</i> | 10 |
| 2.1.3 Kayu Secang (<i>Caesalpinia sappan L</i>) sebagai anti mikroba | 13 |
| 2.2 Sistem Imun | 15 |
| 2.2.1 Respon imun non spesifik | 16 |
| 2.2.2 Respon imun Spesifik | 18 |
| 2.2.3 Respon imun seluler dan Respons Imun Humoral | 18 |



| | |
|---|----|
| E. Bahan dan Protokol Penelitian | 66 |
| 3. Pemberian Flukonazole..... | 67 |
| F. Etika Penelitian | 74 |
| G.. Analisis data..... | 74 |
| H. Alur Kegiatan Penelitian | 75 |
| BAB IV..... | 76 |
| HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN..... | 76 |
| 5.1 Hasil Penelitian | 76 |
| 5.1.1. Induksi Model Mencit Diinfeksi Candida Albicans | 76 |
| 5.2 PEMBAHASAN | 86 |
| BAB V..... | 91 |
| KESIMPULAN DAN SARAN..... | 91 |
| A. KESIMPULAN | 91 |
| B. SARAN | 91 |
| C. KETERBATASAN PENELITIAN | 92 |
| DAFTAR PUSTAKA | 93 |



BAB I

PENDAHULUAN

1.1..Latar Belakang

Kandidiasis vulvovaginal (KVV) merupakan infeksi mukosa vagina dan vulva yang utamanya disebabkan oleh spesies *Candida albicans*. Nama lain dari Kandidiasis vulvovaginal (KVV) adalah kandidiasis vulvovaginitis atau *mycotic vulvovaginitis* (Djuanda, 2003). Penelitian menunjukkan bahwa 75% wanita pernah mengalami satu kali episode infeksi Kandidiasis vulvovaginal (KVV) dan 40-45% lainnya mengalami dua atau lebih episode sepanjang hidupnya (Wolff & Johnson, 2009). Frekuensi Angka kejadian infeksi Kandidiasis vulvovaginal (KVV) di Indonesia yang cukup tinggi dilaporkan 40 persen pada tahun 1987 dan terus mengalami peningkatan setiap tahunnya. Data Dinas Kesehatan Provinsi Jawa Tengah pada tahun 2009 menunjukkan diagnosis kandidiasis vulvovaginal sebagai tiga besar penyakit yang paling sering ditemukan (Dinas Kesehatan Pemprov Jawa Tengah, 2009).

Kandidiasis vulvovaginal (KKV) umumnya dikenal dengan keputihan oleh masyarakat dan merupakan masalah yang cukup mengganggu (Sobel, 2000). Pasien sebagian besar datang berobat karena keluhan gatal, nyeri, dan panas pada area vulva dan vagina. Keluhan terkadang dirasa memberat saat berhubungan seksual. Selain itu discar berwarna keputihan juga membuat seorang wanita merasa terganggu dan mengurangi kepercayaan diri (Oakley, 2013). Kandidiasis

ng kronis juga diketahui merupakan salah satu faktor pencetus (Moyal-Barracco & Lynch, 2004). Pada kasus Kandidiasis kronis dan rekuren dapat menyebabkan kondisi disfungsi



seksual yang menurut *World Health Organization* (WHO) adalah suatu permasalahan yang sebaiknya secara rutin diinvestigasi karena menurunkan kualitas hidup wanita dan pasangannya (Orley & Kuyken, 1994).

Gejala umum adalah rasa sakit di daerah vagina, iritasi, rasa panas, dispareunia, dan sakit bila buang air kecil yang diawali keluhan pruritus akut dan keputihan (*fluor albus*). Manifestasi klinis Kandidiasis Vulvovaginalis merupakan interaksi antara patogenitas spesies *Candida* dengan mekanisme pertahanan hospes (*host*) yang berkaitan dan dipengaruhi oleh beberapa faktor predisposisi. Penyebab terbanyak Kandidiasis Vulvovaginalis adalah spesies *Candida albicans* (80-90%), diikuti spesies *Candida non albicans* seperti *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, dan *Candida glabrata* yang juga sering menimbulkan kandidiasis vulvovaginal (KVV) dan lebih banyak terjadi resistensi terhadap terapi konvensional. (Utami Rahajeng Puji 2016)

Terapi kandidiasis vulvovaginal KKV (Kandidiasis Vulvovaginalis) konvensional dengan obat sistemik dan topikal. Umumnya terapi Sistemik menggunakan flukoazol 1x150g/hari. Sedangkan topikal menggunakan Ketokenazol dengan cara dioleskan pada bagian lesi. (Ramadhan, 2017)

High mobility group atau HMG merupakan sekelompok protein yang terdapat dalam kromosom berperan dalam proses transkripsi, replikasi, rekombinasi dan perbaikan DNA. Protein High mobility group (HMG) mempunyai tiga famili berdasarkan karakteristik domain fungsional yang dimiliki, yaitu high mobility group A (HMGA) yang terdiri atas adeninthymine domain, high mobility groupB (HMGB) yang terdiri atas G-box domain dan high mobility group N (HMGN) terdiri atas wing domain. (Jian G, Jun L. 2014)



High mobility group A (HMGB) pada manusia berfungsi pada segala proses yang berhubungan dengan DNA. High mobility group A (HMGB) memiliki tiga famili, yaitu HMGB1, HMGB2 dan HMGB3. High Mobility Group Box 1 (HMGB) adalah protein HMGB yang diekskresikan hingga dewasa dan biasanya ditemukan dalam nukleus, sedangkan HMGB2 dan HMGB3 hanya diekskresikan selama embriogenesis. (Jian G, Jun L. 2014)

Interleukin 6 (IL-6) kebanyakan dianggap sebagai et al. sitokin pro-inflamasi, namun sitokin ini juga memiliki aktivitas regeneratif dan anti inflamasi. Sedangkan IL-10 merupakan sitokin yang memiliki fungsi utama pembatasan dan terminasi respon imun (anti inflamasi) (Scheller J, Chalaris.2011)

Interleukin 10 (IL-10) yang merupakan sitokin antiinflamasi, selama kondisi infeksi candida ini dapat meningkatkan fagositosis dan rekrutmen netrofil sehingga memediasi inflamasi. Sitokin menghambat aktivitas dari sel Th2, sel NK dan magrofag. Ketika pathogen mampu bertahan terhadap pemusnahan mekanisme imun yang normal. Jika terjadi infeksi IL-10 akan diproduksi untuk mengurangi inflamasi yang nantinya akan meminimalisir kondisi patologi akibat inflamasi yang berlebihan (Gao N, Chen C.2016)

Penggunaan bahan herbal sebagai obat alternatif dalam penyembuhan penyakit semakin meningkat. Hal ini disebabkan efek terapeutik dari bahan herbal bersifat konstruktif, efek samping yang ditimbulkan sangat kecil sehingga bahan herbal relatif lebih aman dari bahan kimiawi. (Salnidkk, 2013). Saat ini sudah dikenal terapi dengan *Chinese herbal medicines* yang meliputi *Syngonanthusnitens*, *F... L.*, *Centellaasiatica*, *Cymbopogoncitratus*(DC) Stapf (*Gramineae*), *L. Piper Betle L.*, *Terminaliacatappa* menunjukkan peran dalam.



Kayu secang memiliki efek anti jamur terhadap jamur *Candida Albicans* diduga karena adanya zat-zat aktif didalam kayu secang yang larut dalam etanol. Zat aktif utama yang terdapat didalam kayu secang adalah antara lain berupa senyawa polifenol yaitu tannin dan brazilin (Suriani,2015)

Ekstrak Kayu secang (*Caesalpinia sappan*) menunjukkan adanya tanin dan alkaloid.. Di antara bakteri gram positif dan gram negatif, strain bakteri gram positif lebih rentan terhadap ekstrak bila dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Hal ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa kedua kelompok ini berbeda dalam struktur komponen dinding selnya. Kemampuan senyawa tanin untuk menyebabkan koloni bakteri hancur, kemungkinan besar disebabkan oleh interferensi mereka dengan dinding sel bakteri; sehingga menghambat pertumbuhan mikroba.(Mohan,2011)

Efek Flavonoid yang terkandung dalam kayu secang juga dapat menghambat fungsi membran. Dimana akan membentuk senyawa kompleks dari protein ekstraseluler dan terlarut sehingga membran sel akan rusak dan senyawa intraseluler akan keluar (Ni Made, 2019)

Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk menguji efektifitas pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) terhadap ekspresi gen mRNA High Motility Group Box1 (HMGB1) Interleukin-6, dan interleukin-10 pada mencit Balb/c dengan kandidiasis Vulvovaginalis

1.2. Rumusan masalah

Bagaimana efek pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) terhadap ekspresi gen mRNA High Motility Group Box1 (HMGB1), Interleukin 6 dan Interleukin 10 pada mencit BALB/c dengan Kandidiasis vulvovaginalis



1.3. Tujuan penelitian

1.3.1. Tujuan umum

Untuk Menilai Ekspresi mRNA High Motility Group Box1 (HMGB1) dan ekspresi Interleukin-6 dan Interleukin 10 pada mencit Balb/c dengan kandidiasis Vulvovaginalis

1.3.2. Tujuan khusus :

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) pada mencit strain BALB/c dengan kandidiasis vulvovaginalis berdasarkan fungi load
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) terhadap ekspresi mRNA High Motility Group Box1 (HMGB1) dan kadar High Motility Group Box1 (HMGB1) pada mencit BALB/c dengan kandidiasis vulvovaginalis
3. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) terhadap ekspresi Interleukin-6 pada mencit BALB/c dengan kandidiasis Vulvovaginalis
4. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) Interleukin-10 pada mencit BALB/c dengan kandidiasis Vulvovaginalis

1.4. Manfaat penelitian

Dari aspek pengembangan ilmu memberi informasi ilmiah mengenai mekanisme biomolekuler yang timbul akibat pemberian ekstrak kayu secang sedangkan manfaat aplikasinya adalah ekstrak kayu secang dapat dikembangkan sebagai salah satu

atan antifungi terutama bagi pasien yang mengalami diagnosis ovaginalis



BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan umum Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L*)

Kayu secang (*Caesalpinia sappan L.*) termasuk suku *Caesalpinaceae* tersebar di Indonesia, nama lainnya yaitu: cang (Bali), sepang (Sasak), kayu sena (Manado), naga, sapang (Makasar), soga jawa (Jawa), kayu secang (Madura), secang (Sunda), seupeung, sopang, cacang (Sumatra), sepang (Bugis), sawala, hinianga, sinyhiaga, singiang (Halmahera Utara), sepen (Halmahera Selatan), lacang (Minangkabau), sepel (Timor), hape (Sawu), hong (Alor) (Hariana, 2006). Kayu secang sudah sejak zaman dahulu digunakan sebagai minuman yang memberikan efek rasa hangat pada tubuh. Awalnya berupa minuman keraton, dinikmati oleh keluarga keraton. Kayu secang juga memberikan warna yang menarik sehingga bisa digunakan sebagai pewarna alami. Kayu secang mengandung fenolik, flavolonoid, tannin, poliferol, kardenolin, antrakinson, sappan chalcone, caesalpin, resin, resorsin, brazilin, d-alfa phallanden, oscimenen dan minyak atsiri (Hariana,2016)

Selain itu, tanaman secang merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai pigmen alami. Bagian tanaman secang yang sering digunakan adalah kayu. Kayu secang menghasilkan pigmen berwarna merah. Pigmen merah ini disebut antosianin yang bersifat mudah larut dalam air panas. Penelitian Maharani (2003) menunjukkan bahwa pigmen alami kayu secang dapat dipengaruhi sinar Ultra Violet,

dan pH. Pigmen warna alami dipengaruhi oleh pH, pada suasana berwarna kuning sampai jingga dan pada suasana basa pigmen



berwarna merah sampai merah keunguan. Pengaruh suhu dapat menyebabkan pigmen kayu secang mengalami degradasi warna.

Kayu secang merupakan tanaman yang mengandung asam galat, brazilin (zat merah sappan) dan asam tanat (Kartasapoetra, 2004). Beberapa triterpenoid, flavonoid, dan oksigen heterosiklik ditemukan dalam isolasi komponen senyawa pada kayu secang dan brazilin ditemukan sebagai komponen utama dalam kayu secang yang diduga berperan penting pada efek farmakologis dari kayu secang. Brazilin mempunyai aktivitas farmakologis seperti anti-inflamasi, antimikroba, antioksidan, antivirus, dan anticomplementary, senyawa ini merupakan komponen utama dan senyawa penciri dari kayu secang (Batubara et al., 2010). Komponen senyawa bioaktif yang terkandung dalam kayu secang, yaitu brazilin, brazilein, 3'-O-metilbrazilin, sappanone, chalcone, sappanalcone dan komponen umum lainnya, seperti asam amino, karbohidrat dan asam palmitat yang jumlahnya relatif sangat kecil. Komponen brazilin merupakan spesifik dari kayu secang yang dapat memberikan warna merah kecoklatan jika teroksidasi atau dalam suasana basa. Selain itu, brazilin ini diduga juga dapat melindungi tubuh dari keracunan akibat radikal kimia. Kayu secang mempunyai berbagai macam khasiat antara lain: sebagai pewarna pada bahan anyaman, kue, minuman atau sebagai tinta, karena kayu secang apabila direbus akan memberikan warna merah gading muda.

Kayu secang juga berkhasiat untuk obat berbagai macam penyakit. Beberapa penyakit yang dapat diobati : diare, disentri, TBC, luka dalam, sifilis, darah kotor, berak darah, memar berdarah, malaria, tetanus, tumor dan radang selaput

Pada saat dilakukan proses perebusan kayu secang akan melarutnya senyawa yang terkandung dalam tanaman kayu secang tannin dan brasilin. Kandungan senyawa tannin dan brazilin yang



berada pada batang kayu secang ini merupakan senyawa kompleks dengan ukuran dan bentuk molekul yang memungkinkan kelarutannya dalam air. Tanin dapat bersifat sebagai antibakteri dan astingen sedangkan brazilin mempunyai aktivitas sebagai antibakteri dan bakteriostatik (Sari R,2016).



Gambaran 2.1 Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L*)

2.1.1 Klasifikasi *Caesalpinia sappan L*

Klasifikasi secang adalah (Tjitrosoepomo, 1994 dalam Fadliah, 2014) :

Regnum : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Sub divisi : Angiospermae

Class : Dicotyledoneae

Ordo : Rosales

Family : Caesalpiniaceae

Caesalpinia

Caesalpinia sappan L.



Tumbuhan secang dapat ditemukan pada daerah tropis, tumbuh pada ketinggian 500 - 1000 m dpl (Astina, 2010). Habitat berupa tumbuhan semak atau perdu, tingginya 5 - 10 m. Batang berkayu, bulat dan berwarna hijau kecokelatan. Pada batang dan percabangannya, terdapat duri-duri tempel yang bentuknya bengkok dan letaknya tersebar (Hariana, 2006), cabang memiliki lentisel (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2008). Akar tunggang berwarna cokelat, sedangkan daunnya bentuk majemuk menyirip ganda dengan panjang daun 25 - 40 cm, jumlah anak daun 10 - 20 pasang yang letaknya berhadapan (Hariana, 2006). Anak daun tidak bertangkai, bentuk lonjong, panjang 10 - 25 mm, dan lebar 3 - 11 mm (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2008). Berikut gambar batang, bunga :



Gambar 2.2 Gambar Batang,buah dan Daun Kayu secang

Bagian vegetatif tumbuhan secang dapat digunakan sebagai pewarna alami. Bagian batang, kulit batang, dan polong dapat menghasilkan warna merah cerah dan ungu muda serta akar dapat menghasilkan warna kuning. Daun secang mengandung minyak atsiri sekitar 0,20 % yang wangi dan tidak berwarna (Sari R, 2016). Warna ekstrak yang disebabkan oleh brazilin dipengaruhi oleh kadar keasaman atau nilai pH seperti yang terlihat pada tabel berikut (Rina et al., 2012):



Tabel 1. Perubahan Warna Ekstrak Kayu Secang Sesuai Nilai Kadar pH

| PH | Warna |
|-------|----------------|
| 2 - 5 | Kuning Orange |
| 6 – 7 | Merah Muda |
| > 7 | Merah Keunguan |

Kayu secang yang dijadikan serbuk atau larutan lalu disimpan pada berbagai suhu, akan mengalami perubahan kimiawi terutama senyawa-senyawa yang mempunyai aktivitas sebagai antioksidan. Sari R (2016) menyatakan semakin tinggi suhu dan semakin lama penyimpanan, ekstrak kayu secang dalam bentuk larutan atau serbuk, maka aktivitas antioksidan mengalami penurunan seiring dengan penurunan kadar fenolik, flavonoid dan vitamin C . Hal ini dapat dilihat pada seduhan ekstrak yang mengalami perubahan warna bila dipanaskan, menjadi warna yang lebih pucat (warna memudar). Perubahan warna menunjukkan zat antioksidan yang terdapat dalam ekstrak secang bersifat kurang stabil terhadap pengaruh suhu selama penyimpanan. (Sari,R 2016) mengemukakan bahwa kandungan brazilin yang terbaik dari ekstrak secang apabila direbus pada suhu 70°C selama 20 menit.

2.1.2. Kandungan *Caesalpinia sappan L*

Kayu secang merupakan tanaman yang mengandung asam galat, brazilin (zat merah sappan) dan asam tanat Beberapa triterpenoid, flavonoid, dan oksigen heterosiklik ditemukan dalam isolasi komponen senyawa pada kayu secang. Kandungan brazilin ditemukan sebagai komponen utama dalam kayu secang yang

penting pada efek farmakologis dari kayu secang. Salah satu *Caesalpinia sappan L* adalah mengandung komponen senyawa bioaktif dalam kayu secang, yaitu brazilin, brazilein, 3'-O-metilbrazilin,



sappanone, chalcone, sappanalcone dan komponen umum lainnya, seperti asam amino, karbohidrat dan asam palmitat yang jumlahnya relatif sangat kecil. Komponen brazilin merupakan spesifik dari kayu secang yang dapat memberikan warna merah kecoklatan jika teroksidasi atau dalam suasana basa. Selain itu, brazilin ini diduga juga dapat melindungi tubuh dari keracunan akibat radikal kimia. Kandungan lain C sappan adalah Tanin, dimana tannin dapat bersifat sebagai antibakteri dan astinigen.

Tingginya kandungan pada ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) sebesar 6,02% mempengaruhi adanya aktivitas antibakteri yang kuat. Ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) juga mengandung antosianin sebesar 2,43%, antosianin selain sebagai antioksidan yang baik juga dapat berperan sebagai antimikroba. Faktor yang juga mempengaruhi peningkatan diameter penghambatan karena adanya konsentrasi bahan antimikroba yang meningkat setiap konsentrasi. Selain itu kemampuan aktivitas antibakteri pada ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) ini dikarenakan kayu secang positif mengandung senyawa-senyawa metabolit sekunder lain yang berperan juga sebagai aktivitas antibakteri. Menurut Kusmiati (2014) ekstrak etanol kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) positif mengandung flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, fenolik, triterpenoid, steroid dan glikosida. Senyawa metabolit tersebut mampu berperan sebagai antibakteri baik pada bakteri gram negatif ataupun bakteri gram positif. Mekanisme kerja flavonoid sebagai senyawa antibakteri dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi

dalam Rijayanti, 2014). Dalam menghambat sintesis asam nukleat, senyawa flavonoid berperan penting dalam proses interkalisasi atau yakni dengan menumpuk basa asam nukleat sehingga



menghambat pembentukan DNA dan RNA. Hasil interaksi flavonoid juga akan menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel Cushnie and Lamb (2005). Dalam menghambat fungsi membran sel flavonoid akan membentuk senyawa kompleks dari protein ekstraseluler dan terlarut sehingga membran sel akan rusak dan senyawa intraseluler akan keluar. Sedangkan dalam menghambat metabolisme energi dengan menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri, yaitu dengan mencegah pembentukan energi pada membran sitoplasma dan menghambat motilitas bakteri yang berperan dalam aktivitas antimikroba dan protein ekstraseluler.

Antosianin merupakan golongan turunan dari flavonoid yang berfungsi sebagai antioksidan dan antimikroba. Menurut Cisowska et al., (2011) antosianin umumnya aktif terhadap mikroba yang berbeda. Mekanisme yang mendasari aktivitas antimikroba pada antosianin meliputi interaksi membran sel dan intraseluler dari senyawa ini. Pada E coli yang terpapar antosianin akan mengalami ketidakaturan pada membran luar dan kebocoran sitoplasma (Cisowska et al., 2011). Bagian antosianin yang berperan sebagai antimikroba adalah turunannya yaitu antosianidin dan cyanidin 3-glucoside. Bagian yang sangat berperan pada ketahanan suatu bakteri adalah struktur dari dinding selnya karena dinding sel berfungsi sebagai pelindung dari lingkungan yang tidak aman. Selain itu membran sel bakteri berfungsi sebagai penyeleksi untuk mengatur keluar masuknya senyawa ke dalam sel bakteri. Sehingga terganggunya permeabilitas dari membran sel yang disebabkan oleh senyawa-senyawa metabolit sekunder akan merusak fungsi dari membran sel tersebut, kemudian sel akan mengalami kebocoran. Kebocoran sel ini yang

keluarnya komponen sel. Hal ini akan mengakibatkan kerusakan tersebut dan bakteri akan menjadi lisis sehingga terjadi kematian sel



2.1.3 Kayu Secang (*Caesalpinia sappan L*) sebagai anti mikroba

Kegiatan antimikroba Minyak atsiri yang diperoleh dari kayu secang dan ekstrak etanol dan air 95% dari kayu secang menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat terhadap *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhosa* dan *Escherichia coli*. Minyak esensial menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Salmonella paratyphi*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus viridans* dan ekstrak etanol 95% terhadap *Mycobacterium smegmatis* dan *Shigella dysenteriae*. Ekstrak tanaman juga menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap jenis *Staphylococcus*, *Diplococcus*, *Corynebacterium*, *Shigella baydii* dan beberapa spesies lainnya. saponin yang diperoleh dari tanaman menunjukkan aktivitas antimikroba yang kuat terhadap *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Salmonella stanley* dan *Proteus vulgaris*. Studi-studi ini mengkonfirmasi penggunaan luas tanaman untuk tujuan anti disentri, penyembuhan luka, sakit pinggang. (Badami, 2004)

Secara umum, ekstrak metanol dari tanaman kayu secang yang diuji paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri dimana bahwa pelarut metanol polar paling berhasil dalam mengekstraksi. metabolit sekunder yang bertanggung jawab atas sifat antibakteri daripada ekstrak Air. Ekstrak *C. sappan* menunjukkan adanya tanin dan alkaloid.. Di antara bakteri gram positif dan gram negatif, strain bakteri gram positif lebih rentan terhadap ekstrak bila dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Hal ini mungkin disebabkan oleh fakta bahwa kedua kelompok ini berbeda dalam struktur komponen dinding selnya. Kemampuan senyawa tanin menghancurkan koloni bakteri hancur, kemungkinan besar disebabkan oleh interaksi mereka dengan dinding sel bakteri; sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Ekstrak *C.sappan* dalam penelitian ini menunjukkan spektrum aktivitas



yang luas terhadap bakteri dan jamur gram positif dan gram negatif. Aktivitas antibakteri spektrum luas dari ekstrak tumbuhan, mungkin karena alkaloid dan tanin yang teridentifikasi, Lebih lanjut menegaskan penggunaannya sebagai obat kesehatan dalam pengobatan tradisional. Zat bioaktif dari tanaman dapat digunakan dalam formulasi agen antimikroba untuk pengobatan berbagai infeksi bakteri dan jamur termasuk gonore, Isolasi, identifikasi dan pemurnian fitokonstituen ini dan penentuan potensi antimikroba masing-masing dan evaluasi toksikologi dengan maksud untuk merumuskan agen kemoterapi baru harus menjadi arah penyelidikan untuk masa depan. (Mohan, G., Anand, 2011).

Tanin merupakan senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul. Tanin mempunyai sifat sebagai pengelat berefek spasmolitik ini yang mengerutkan usus sehingga gerakan peristaltic usus menjadi berkurang. Efek spasmolitik ini diduga dapat mengerutkan dinding sel jamur *Candida Albicans* ,sehingga mengganggu permeabilitas sel, sehingga sel tidak dapat melakukan aktivitas hidupnya yang akhirnya menyebabkan pertumbuhan sel terhambat atau bahkan sel akan mati. (Barbara et.al,2010)

Tanin juga dapat menurunkan jumlah koloni jamur *Candida albicans* seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol kayu secang dan diperkuat dengan hasil analisa statistik, maka dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol kayu secang memiliki efek antifungal terhadap jamur *Candida albicans* secara in vitro.



2.1 Tinjauan Sistem Imun

Sistem imun merupakan sistem yang sangat kompleks dengan berbagai peran menjaga keseimbangan tubuh. Sama halnya dengan sistem endokrin, sistem imun bertugas mengatur keseimbangan, menggunakan komponennya yang beredar pada seluruh tubuh, sehingga mencapai sasaran yang jauh dari pusat. Untuk melaksanakan fungsi imunitas, didalam tubuh terdapat suatu sistem yang disebut dengan sistem limforetikuler. Sistem ini merupakan jaringan atau kumpulan sel yang letaknya tersebar diseluruh tubuh, misalnya didalam sumsum tulang, kelenjar limfe, limfa, timus, sistem saluran napas, saluran cerna dan beberapa organ lainnya. Jaringan ini terdiri atas bermacam-macam sel yang dapat menunjukkan respons terhadap suatu rangsangan sesuai dengan sifat dan fungsinya masing-masing (Roitt 1993).

Konsep imunitas dapat diartikan sebagai suatu mekanisme yang bersifat faal yang melengkapi manusia dengan suatu kemampuan untuk mengenal suatu zat sebagai asing terhadap dirinya, yang selanjutnya tubuh akan mengadakan tindakan dalam bentuk netralisasi, melenyapkan atau memasukkan dalam proses metabolisme yang dapat menguntungkan dirinya atau menimbulkan kerusakan jaringan tubuh sendiri. Konsep imunitas tersebut, bahwa yang pertama-tama menentukan ada tidaknya tindakan oleh tubuh (respons imun), adalah kemampuan sistem limforetikuler untuk mengenali bahan itu asing atau tidak (Roitt,1993).

Rangsangan terhadap sel-sel tersebut terjadi apabila kedalam tubuh terpapar

oleh sel atau jaringan tadi dianggap asing. Konfigurasi asing ini antigen atau imunogen dan proses serta fenomena yang menyertainya respons imun yang menghasilkan suatu zat yang disebut dengan



antibodi. Jadi antigen atau imunogen merupakan potensi dari zat-zat yang dapat menginduksi respons imun tubuh yang dapat diamati baik secara seluler ataupun humoral. Dalam keadaan tertentu (patologik), sistem imun tidak dapat membedakan zat asing (non-self) dari zat yang berasal dari tubuhnya sendiri (self), sehingga sel-sel dalam sistem imun membentuk zat anti terhadap jaringan tubuhnya sendiri. Kejadian ini disebut dengan Autoantibodi (Abbas dkk., 1991; Roit dkk., 1993).

Apabila sistem imun terpapar oleh zat yang dianggap asing, maka akan terjadi dua jenis respons imun, yaitu respons imun non spesifik dan respons imun spesifik. Walaupun kedua respons imun ini prosesnya berbeda, namun telah dibuktikan bahwa kedua jenis respons imun di atas saling meningkatkan efektivitasnya. Respons imun yang terjadi sebenarnya merupakan interaksi antara satu komponen dengan komponen lain yang terdapat didalam sistem imun. Interaksi tersebut berlangsung bersama-sama sedemikian rupa sehingga menghasilkan suatu aktivitas biologis yang seimbang (Grange, 1982; Goodman, 1991; Roit dkk., 1993).

2.2.1 Respon imun non spesifik

Respon imun non spesifik merupakan imunitas bawaan (innate immunity), dalam artian bahwa respons terhadap zat asing dapat terjadi walaupun tubuh sebelumnya tidak pernah terpapar oleh zat tersebut. Sebagai contoh dapat dijelaskan sebagai berikut : salah satu upaya tubuh untuk mempertahankan diri terhadap masuknya antigen seperti, bakteri, adalah dengan cara menghancurkan bakteri tersebut dengan cara nonspesifik melalui proses fagositosis. Dalam hal ini

neutrofil dan monosit memegang peranan yang sangat penting. Supaya fagositosis, sel-sel fagositosis tersebut harus berada dalam jarak yang dekat dengan partikel bakteri, atau lebih tepat lagi bahwa partikel tersebut harus



melekat pada permukaan fagosit. Untuk mencapai hal ini maka fagosit harus bergerak menuju sasaran. Hal ini dapat terjadi karena dilepaskannya zat atau mediator tertentu yang disebut dengan faktor leukotaktik atau kemotaktik yang berasal dari bakteri maupun yang dilepaskan oleh neutrofil, makrofag atau komplemen yang telah berada dilokasi bakteri (Kresno, 1991; Roitt, 1993).

Selain faktor kemotaktik yang berfungsi untuk menarik fagosit menuju antigen sasaran, untuk proses fagositosis selanjutnya, bakteri perlu mengalami opsonisasi terlebih dahulu. Ini berarti bahwa bakteri terlebih dahulu dilapisi oleh immunoglobulin atau komplemen (C3b), supaya lebih mudah ditangkap oleh fagosit. Selanjutnya partikel bakteri masuk kedalam sel dengan cara endositosis dan oleh proses pembentukan fagosom, ia terperangkap dalam kantong fagosom, seolah-olah ditelan dan kemudian dihancurkan baik dengan proses oksidasi-reduksi maupun oleh derajat keasaman yang ada dalam fagosit atau penghancuran oleh lisozim dan gangguan metabolisme bakteri (Bellanti, 1985; Subowo, 1993).

Selain fagositosis, manifestasi lain dari respons imun nonspesifik adalah reaksi inflamasi. Reaksi ini terjadi akibat dilepaskannya mediator-mediator tertentu oleh beberapa jenis sel, misalnya histamin yang dilepaskan oleh basofil dan mastosit, Vasoaktif amino yang dilepaskan oleh trombosit, serta anafilatoksin yang berasal dari komponen – komponen komplemen, sebagai reaksi umpan balik dari mastosit dan basofil. Mediatormediator ini akan merangsang Bergeraknya sel-sel polimorfonuklear (PMN) menuju lokasi masuknya antigen serta meningkatkan permeabilitas dinding vaskuler yang mengakibatkan eksudasi protein plasma dan sel-sel darah putih. Inilah yang disebut dengan respons inflamasi akut (Abbas, 1991; Kresno, 1991).



2.2.2 Respon Imun Spesifik

Merupakan respon imun yang didapat (acquired), yang timbul akibat dari stimulus antigen tertentu, sebagai akibat tubuh pernah terpapar sebelumnya. Respon imun spesifik dimulai dengan adanya aktifitas makrofag atau antigen presenting cell (APC) yang memproses antigen sedemikian rupa sehingga dapat menimbulkan interaksi dengan sel-sel imun. Dengan rangsangan antigen yang telah diproses tadi, sel-sel sistem imun berproliferasi dan berdiferensiasi sehingga menjadi sel yang memiliki kompetensi imunologik dan mampu bereaksi dengan antigen (Bellanti, 1985; Roitt, 1993; Kresno, 1991).

Walaupun antigen pada kontak pertama (respon primer) dapat dimusnahkan dan kemudian sel-sel sistem imun mengadakan involusi, namun respon imun primer tersebut sempat mengakibatkan terbentuknya klon atau kelompok sel yang disebut dengan memory cells yang dapat mengenali antigen bersangkutan. Apabila dikemudian hari antigen yang sama masuk ke dalam tubuh, maka klon tersebut akan berproliferasi dan menimbulkan respon sekunder spesifik yang berlangsung lebih cepat dan lebih intensif dibandingkan dengan respon imun primer.

2.2.3 Respon imun seluler dan Respon Imun Humoral

Mekanisme efektor dalam respon imun spesifik dapat dibedakan menjadi : Respon imun seluler dan humoral. Mikroorganisme yang hidup dan berkembang biak secara intra seluler, antara lain di dalam makrofag sehingga sulit untuk dijangkau oleh antibodi. Untuk melawan mikroorganisme intraseluler tersebut

Respon imun seluler, yang diperankan oleh limfosit T. Subpopulasi sel T dengan sel T penolong (T-helper) akan mengenali mikroorganisme bersangkutan melalui major histocompatibility complex (MHC) kelas II



yang terdapat pada permukaan sel makrofag. Sinyal ini menyulut limfosit untuk memproduksi berbagai jenis limfokin, termasuk diantaranya interferon, yang dapat membantu makrofag untuk menghancurkan mikroorganisme tersebut. Sub populasi limfosit T lain yang disebut dengan sel T-sitotoksik (T-cytotoxic), juga berfungsi untuk menghancurkan mikroorganisme intraseluler yang disajikan melalui MHC kelas I secara langsung (cell to cell). Selain menghancurkan mikroorganisme secara langsung, sel T-sitotoksik, juga menghasilkan gamma interferon yang mencegah penyebaran mikroorganisme ke dalam sel lainnya.

Respons imun humoral, diawali dengan diferensiasi limfosit B menjadi satu populasi (klon) sel plasma yang melepaskan antibodi spesifik ke dalam darah. Pada respons imun humoral juga berlaku respons imun primer yang membentuk klon sel B memory. Setiap klon limfosit diprogramkan untuk membentuk satu jenis antibodi spesifik terhadap antigen tertentu (Clonal selection). Antibodi ini akan berikatan dengan antigen membentuk kompleks antigen – antibodi yang dapat mengaktifasi komplemen dan mengakibatkan hancurnya antigen tersebut. Supaya limfosit B berdiferensiasi dan membentuk antibodi diperlukan bantuan limfosit T-penolong (T-helper), yang atas sinyal-sinyal tertentu baik melalui MHC maupun sinyal yang dilepaskan oleh makrofag, merangsang produksi antibodi. Selain oleh sel T-penolong, produksi antibodi juga diatur oleh sel T penekan (T-supresor), sehingga produksi antibodi seimbang dan sesuai dengan yang dibutuhkan.

Interaksi Antara Respons Imun Seluler dengan Humoral ini disebut dengan

antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), karena sitolisis baru terjadi dengan bantuan antibodi. Dalam hal ini antibodi berfungsi melapisi antigen sasaran, yang kemudian akan dikenali oleh sel natural killer (NK), yang mempunyai reseptor terhadap fragmen Fc



antibodi, dapat melekat erat pada sel atau antigen sasaran. Perlekatan sel NK pada kompleks antigen antibodi tersebut mengakibatkan sel NK dapat menghancurkan sel sasaran. Respons imun spesifik (adaptif) dapat dibedakan dari respons imun bawaan, karena adanya cirri-ciri umum yang dimilikinya yaitu; bersifat spesifik, heterogen dan memiliki daya ingat atau memory. Adanya sifat spesifik akan membutuhkan berbagai populasi sel atau zat yang dihasilkan (antibodi) yang berbeda satu sama lain, sehingga menimbulkan sifat heterogenitas.

2..2.4. Komponen Sistem Imun

Sistem imun dilengkapi dengan kemampuan untuk memberikan respons imun non spesifik, misalnya fagositosis, maupun kemampuan untuk memberikan respons imun spesifik yang dilakukan oleh sel-sel dan jaringan limfoid yang tergolong kedalam sistem limforetikuler (Oppenheim dkk.,1987; Abbas dkk.,1991; Roit dkk.,1993).

Sistem ini terdiri atas sejumlah organ limfoid yaitu : 1. kelenjar timus 2. kelenjar limfe 3. limfa 4. tonsil 5. berbagai jenis sel serta jaringan diluar organ limfoid, seperti : a. peyer,s patches yang terdapat pada dinding usus b. jaringan limfoid yang membatasi saluran nafas dan saluran urogenital c. jaringan limfoid dalam sumsum tulang dan dalam darah Sistem limforetikuler inilah yang merupakan sistem kendali dari semua mekanisme respons imun. Disamping sistem limforetikuler diatas, masih ada unsur-unsur lain yang berperan dalam mekanisme respons imun, dan factor-faktor humoral lain diluar antibodi yang berfungsi

anisme tersebut.

espons Imun



Sistem imun mempunyai tiga fungsi utama yaitu: pertahanan, homeostasis dan perondaan. Fungsi pertahanan menyangkut pertahanan terhadap antigen dari luar tubuh seperti invasi mikroorganisme dan parasit kedalam tubuh. Ada dua kemungkinan yang terjadi dari hasil perlawanan antara dua pihak yang berhadapan tersebut, yaitu tubuh dapat bebas dari akibat yang merugikan atau sebaliknya, apabila pihak penyerang yang lebih kuat (mendapat kemenangan), maka tubuh akan menderita sakit.

Fungsi homeostasis, memenuhi persyaratan umum dari semua organisme multiseluler yang menghendaki selalu terjadinya bentuk uniform dari setiap jenis sel tubuh. Dalam usaha memperoleh keseimbangan tersebut, terjadilah proses degradasi dan katabolisme yang bersifat normal agar unsure seluler yang telah rusak dapat dibersihkan dari tubuh. Sebagai contoh misalnya dalam proses pembersihan eritrosit dan leukosit yang telah habis masa hidupnya.

Perondaan Fungsi perondaan menyangkut perondaan diseluruh bagian tubuh terutama ditujukan untuk memantau pengenalan terhadap sel-sel yang berubah menjadi abnormal melalui proses mutasi. Perubahan sel tersebut dapat terjadi spontan atau dapat diinduksi oleh zat-zat kimia tertentu, radiasi atau infeksi virus. Fungsi perondaan (surveillance) dari sistem imun bertugas untuk selalu waspada dan mengenal adanya perubahan-perubahan dan selanjutnya secara cepat menghilangkan konfigurasi yang baru timbul pada permukaan sel yang abnormal.

2.2.6 Penyimpangan Sistem Imun



sistem lainnya dalam tubuh, sistem imun dapat mengalami
pada seluruh jaringan komunikasi baik berbentuk morfologis ataupun

gangguan fungsional. Gangguan morfologis, misalnya tidak berkembangnya secara normal kelenjar timus sehingga mengakibatkan defisiensi pada limfosit T. Sedangkan gangguan fungsional yang bermanifestasi sebagai toleransi imunologik disebabkan karena lumpuhnya mekanisme respons imun terhadap suatu antigen tertentu. Penyimpangan lain dalam mekanisme respons imun dapat berbentuk sebagai reaksi alergi, anafilaksis ataupun hipersensitifitas tipe lambat, dimana semua ini kadang-kadang menimbulkan kerugian pada jaringan tubuh. Keadaan ini disebabkan karena gangguan fungsi pertahanan sistem imun (Kresno, 1991; Abbas dkk.,1991; Roitt dkk.,1993).

Gangguan fungsi homeostatik pada sistem imun dapat menimbulkan kelainan yang dinamakan penyakit autoimun. Hal ini disebabkan oleh karena sistem imun melihat konfigurasi dari tubuh sendiri (self), sebagai benda asing, akibatnya respons imun ditujukan kepada jaringan tubuh sendiri sehingga dapat membawa kerugian. Apabila fungsi ketiga yang bertugas sebagai surveillance mengalami gangguan, akan mengakibatkan tidak bekerjanya sistem pemantauan terhadap perubahan-perubahan pada sel tubuh, sehingga akhirnya sel-sel abnormal tersebut berkembang biak diluar kendali yang menimbulkan penyakit yang bersifat pertumbuhan ganas.

2.2.7 Faktor Pengubah Mekanisme Imun

Selain faktor genetik, terdapat sejumlah faktor yang dapat mempengaruhi mekanisme imun seperti: faktor metabolik, lingkungan, gizi, anatomi, fisiologi, umur

ellanti, 1985; Subowo 1993; Roitt dkk.,1993).



1. Faktor Metabolik. Beberapa hormon dapat mempengaruhi respons imun tubuh, misalnya pada keadaan hipoadrenal dan hipotiroidisme akan mengakibatkan menurunnya daya tahan terhadap infeksi. Demikian juga pada orang-orang yang mendapat pengobatan dengan sediaan steroid sangat mudah mendapat infeksi bakteri maupun virus. Steroid akan menghambat fagositosis, produksi antibodi dan menghambat proses radang. Hormon kelamin yang termasuk kedalam golongan hormone steroid, seperti androgen, estrogen dan progesterone diduga sebagai faktor pengubah terhadap respons imun. Hal ini tercermin dari adanya perbedaan jumlah penderita antara laki-laki dan perempuan yang mengidap penyakit imun tertentu.
2. Faktor lingkungan. Kenaikan angka kesakitan penyakit infeksi, sering terjadi pada masyarakat yang taraf hidupnya kurang mampu. Kenaikan angka infeksi tersebut, mungkin disebabkan oleh karena lebih banyak menghadapi bibit penyakit atau hilangnya daya tahan tubuh yang disebabkan oleh jeleknya keadaan gizi.
3. Faktor Gizi. Keadaan gizi seseorang sangat berpengaruh terhadap status imun seseorang. Tubuh membutuhkan enam komponen dasar bahan makanan yang dimanfaatkan untuk pertumbuhan dan pemeliharaan kesehatan tubuh. Keenam komponen tersebut yaitu : protein, karbohidrat, lemak, vitamin, mineral dan air. Gizi yang cukup dan sesuai sangat penting untuk berfungsinya sistem imun secara normal. Kekurangan gizi merupakan penyebab utama timbulnya imunodefisiensi.



4. Faktor Anatomi. Garis pertahanan pertama dalam menghadapi invasi mikroba terdapat pada kulit dan selaput lender yang melapisi bagian dalam tubuh. Struktur jaringan tersebut, bertindak sebagai

imunitas alamiah dengan menyediakan suatu rintangan fisik yang efektif. Dalam hal ini kulit lebih efektif dari pada selaput lender. Adanya kerusakan pada permukaan kulit, atau pada selaput lender, akan lebih memudahkan timbulnya suatu penyakit.

5. Faktor Fisiologis. Getah lambung pada umumnya menyebabkan suatu lingkungan yang kurang menguntungkan untuk sebagian besar bakteri pathogen. Demikian pula dengan air kemih yang normal akan membilas saluran kemih sehingga menurunkan kemungkinan infeksi oleh bakteri. Pada kulit juga dihasilkan zat-zat yang bersifat bakterisida. Didalam darah terdapat sejumlah zat protektif yang bereaksi secara non spesifik. Faktor humoral lainnya adalah properdin dan interferon yang selalu siap untuk menanggulangi masuknya zat-zat asing.
6. Faktor Umur. Berhubung dengan perkembangan sistem imun sudah dimulai semasa dalam kandungan, maka efektifitasnya juga diawali dari keadaan yang lemah dan meningkat sesuai dengan bertambahnya umur. Walaupun demikian tidak berarti bahwa pada umur lanjut, sistem imun akan bekerja secara maksimal. Malah sebaliknya fungsi sistem imun pada usia lanjut akan mulai menurun dibandingkan dengan orang yang lebih muda, walaupun tidak mengalami gangguan pada sistem imunnya. Hal tersebut, selain disebabkan karena pengaruh kemunduran biologik, secara umum juga jelas berkaitan dengan menyusutnya kelenjar timus. Keadaan tersebut akan mengakibatkan perubahan-perubahan respons imun seluler dan humoral. Pada usia lanjut

dan timbulnya berbagai kelainan yang melibatkan sistem imun akan
h, misalnya resiko menderita penyakit autoimun, penyakit
n, sehingga akan mempermudah terinfeksi oleh suatu penyakit.



Faktor Mikroba Berkembangnya koloni mikroba yang tidak pathogen pada permukaan tubuh, baik diluar maupun didalam tubuh, akan mempengaruhi sistem imun. Misalnya dibutuhkan untuk membantu produksi natural antibodi. Flora normal yang tumbuh pada tubuh dapat pula membantu menghambat pertumbuhan kuman pathogen. Pengobatan dengan antibiotika tanpa prosedur yang benar, dapat mematikan pertumbuhan flora normal, dan sebaliknya dapat menyuburkan pertumbuhan bakteri pathogen.

2.2.8. Immunologi Jamur

Jamur adalah organisme eukariotik yang ditemukan dalam alam sebagai spesies yang hidup bebas dalam bahan organik mati, dalam tanah, vegetasi dan cairan tubuh. Untuk hidupnya, jamur tidak tergantung dari interaksi dengan penjamu mamalia.

Kebanyakan jamur tidak berbahaya, namun sebahagian kecil spesies jamur dapat menimbulkan penyakit pada manusia yang disebut mikosis. Penyakit tersebut bervariasi antara infeksi superfisial biasa sampai penyakit sistemik yang membahayakan terutama pada penjamu imuno defisien. Hal tersebut tergantung dari berbagai hal seperti kapsul yang sulit dicerna (kriptokok), resistensi terhadap fagositosis (histoplasma) dan destruksi sel polimorfonuklear (koksidiosis). Beberapa jamur mengaktifkan komponen melalui jamur alternative, tetapi efeknya terhadap kelangsungan hidupnya belum diketahui. Antibodi juga dapat ditemukan dan diduga mempunyai peranan dalam repon imun terhadap jamur



2.3 Tinjauan HIGH MOTILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)

High mobility group atau HMG adalah sekelompok protein yang terdapat dalam kromosom yang berperan dalam proses transkripsi, replikasi, rekombinasi dan perbaikan DNA. Protein HMG memiliki tiga famili berdasarkan karakteristik domain fungsional yang dimiliki, yaitu *high mobility group A* (HMGA) yang terdiri atas *adeninthymine domain*, *high mobility groupB* (HMGB) terdiri atas *HMG-box domain* dan *high mobility group N* (HMGN) terdiri atas *nucleosomal binding domain*.

Pada manusia yang berperan dalam segala proses yang berhubungan dengan DNA adalah HMGB. HMGB memiliki tiga famili, yaitu HMGB1, HMGB2 dan HMGB3. *High Mobility Group Box 1* merupakan protein HMGB yang diekspresikan hingga dewasa dan biasanya ditemukan dalam nukleus, sedangkan HMGB2 dan HMGB3 hanya diekspresikan selama embriogenesis. Ekspresi HMGB2 selama embriogenesis hanya terfokus pada organ limfoid dan testis, sementara HMGB3 tersebar merata pada seluruh bagian tubuh. (Damayanti wd, 2015)

High Mobility Group Box 1 pada manusia memiliki berat molekul 25 kD dan tersusun atas 215 asam amino yang berada dalam dua domain DNA yang bermuatan positif. Protein tersebut terbagi menjadi tiga bagian, dua bagian ikatan DNA bermuatan positif yang disebut kotak A dan B, serta satu bagian ekor yang bersifat asam bermuatan negatif dibentuk oleh 30 asam glutamat dan aspartat, dan sekitar 20 % sisanya adalah lisin. Struktur kotak A dan B adalah heliks, sebagian ditutupi ekor yang terlipat diatas protein. Ada dua sinyal pembawa nukleus dibagian

A dan kotak B dan dapat berikatan dengan nukleus exportin CRM1. an kotak A dan B HMGB1, diperlihatkan bahwa aktivitas 9 sitokin dapat di kotak B, aktivitas ini dapat dihambat oleh protein kotak A.



Rangkaian primer HMGB1 sangat identik pada semua mamalia, lebih dari 98,5% mirip antara manusia dan tikus. HMGB1 memiliki 3 sistein, 2 berada diposisi 23 dan 45 kotak A dan 1 di posisi 106 kotak B. Posisi sistein 106 di kotak B perannya sangat diperlukan sitokin, oksidasi atau mutasi selektif residu ini akan menghapus aktivitas sinyal HMGB1 untuk melepas sitokin. HMGB1 juga mengandung dua NLS (nuclear localization signal), satu terletak di protein kotak A aa 28-44 dan yang lain terletak di kotak B aa 179-1850 (Anderson U dkk, 2011; Li LC dkk, 2014).

Empat residu lisin berada di *nuclear localization signal* (NLS1), dan lima lainnya berada di NLS2. HMGB1 sangat rentan pada modifikasi asetilasi, menghasilkan nukleus dan pelepasan HMGB1. Di nukleus, HMGB1 menunjang struktur kromatin melalui ikatan DNA dengan rangkaian yang nonspesifik dan terlibat dalam regulasi transkripsi gen. Secara intraseluler, HMGB1 terlibat dalam autofagi dan pada *dsRNA dependent protein kinase* (PKR)/ aktivasi inflamasi. Pada permukaan sel, protein terekspresi di membran trombosit yang teraktivasi saat awal neuron, terlibat dalam pertumbuhan neurit selama perkembangan dan regenerasi sel saraf.

HMGB1 ekstraseluler telah menjadi perhatian terkait perannya yang terlibat dalam berbagai respon imun, berperan sebagai alarm sinyal prototipik karena HMGB1 memiliki fungsi spesifik. Penelitian fungsi struktural HMGB1, mengungkapkan bahwa aktivitas sitokin mengekspresikan aktivitas sitokin, sedangkan anti sitokin sendiri berperan sebagai antagonistik HMGB1 spesifik, tetapi mekanismenya masih tetap belum dimengerti. HMGB1 mengandung 3 residu sistein

45 dan 106, sensitif pada modifikasi yang bergantung pada reaksi redoks. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa redoks dan modifikasi asetil secara



langsung mengontrol sitokin dan aktifitas kemotaksis HMGB1 (Andersson dan Tracey, 2011)

Tabel 2. Fungsi kompartemen Spesifik HMGB

(Dikutip dari: Yang, H. *et al.* (2013) "The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis," *Journal of Leukocyte Biology*, 93(6), hal. 865–873

| | |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">Nukleus</p> | <p>Pengikat DNA: regulasi transkripsi Stabilisasi kromatin Kumpulan Kromosom Replikasi Sel Perbaikan DNA</p> |
| <p style="text-align: center;">Intraseluler</p> | <p>PKR/aktivasi peradangan Autofagi: C106 dibutuhkan untuk induksi autofagi Sistein-sistein, ikatan disulfida dibutuhkan untuk induksi autofagi Sebagai jalan pelepasan Formasi vesikel</p> |
| <p style="text-align: center;">Ekstraseluler</p> | <p>Ikatan membran memproduksi neurit Aktivasi trombosit Ekstraseluler: proangiogenik Antibakterial Penurunan seluruh sistein : inflamasi Menyerupai kemokin : kemotaksis Semua sistein yang teroksidasi: non inflamasi</p> |



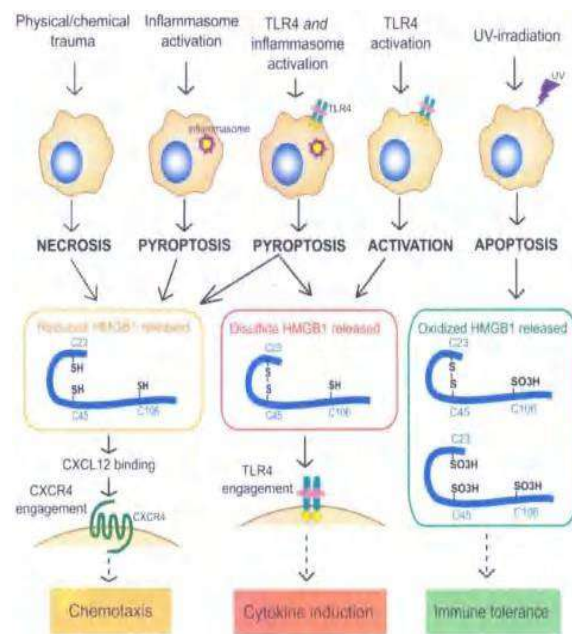
| | |
|--|---|
| | <p>Sistein dan ikatan disulfida: inflamasi, menyerupai sitokin, menginduksi sitokin</p> <p>Hiperasetilasi lisin: inflamasi, induksi sitokin</p> |
|--|---|

2.3.1. Aktivitas Sitokin HMGB 1

Aktivitas Sitokin HMGB1 adalah mediator sitokin patogenesis penyakit inflamasi. Sebagai bagian dari respon imun yang aktif, HMGB1 dapat disekresikan secara aktif dari berbagai jenis sel-sel termasuk makrofag, sejumlah sel-sel natural killer (NK), sel-sel dendrit (DCs), sel-sel endotelial, dan trombosit. HMGB1 dapat dilepaskan secara pasif dari sel-sel nekrotik, trauma, dan cedera secara signifikan ke ekstraseluler. Meskipun sel apoptosis dapat melepaskan jumlah HMGB1 lebih sedikit dibanding sel nekrotik, makrofag yang diselubungi sel apoptosis dapat menginduksi pelepasan HMGB1 secara aktif. Piroptosis, sel nekrotik yang kematiannya diprogramkan dan di induksi oleh kaspase-1, telah di demonstrasikan sebagai alur penting untuk pelepasan HMGB1 secara aktif yang dikontrol oleh dsRNA-dependent protein kinase (PKR) dan inflamosom.

Aktivasi Inflamosom pengatur kaspase-1, memediasi piroptosis dan melepaskan IL-1 β , EL-18, dan HMGB1, (Magna M dkk, 2014).





Gambar 3. Mekanisme pelepasan HMGB1 dan isoform HMGB1.

(Dikutip: dari Magna M, Pisetsky DS. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of inflammatory and Autoimmune Diseases 2014).

Seperti yang diilustrasikan gambar diatas, berbagai macam mekanisme pelepasan (nekrosis, piroptosis, aktivasi makrofag, dan apoptosis) dapat menyebabkan pelepasan HMGB1 bentuk redoks berbeda. Sel nekrosis dan piroptosis melepaskan bentuk thiol semua atau tereduksi sepenuhnya, bentuk ini dapat mengikat kemokin CXCL12 dan memberi isyarat melalui reseptor CXCR4 untuk merangsang kemotaksis. Kombinasi piroptosis dengan stimulasi ligan TLR4, menyebabkan pelepasan HMGB1 tereduksi dan HMGB1 ikatan disulfida C23 dan 14 C45 dan C106 dalam bentuk thiol. Bentuk HMGB1 ini merangsang produksi sitokin melalui sinyal TLR4. Aktivasi makrofag juga melepaskan sitokin HMGB1 bersamaan dengan aktivasi TLR4. Sel apoptosis melepaskan HMGB1 teroksidasi penuh, dengan sistein bentuk sulfonat, tidak dapat menstimulasi sitokin atau memicu kemotaksis; ekspresi sel-sel apoptosis bentuk HMGB1 teroksidasi dapat memicu

(Magnan dan M dkk, 2014).



2.3.2 Reaksi Reduksi Oksidasi dan Aktivitas Sitokin HMGB1

HMGB1 mungkin menjalani modifikasi pasca-translasi secara ekstensif, termasuk oksidasi sistein terminal yang dapat reversibel, asetilasi, metilasi, ADP ribosilasi, glikosilasi, dan fosforilasi. Beberapa modifikasi ini telah didemonstrasikan mempengaruhi pengikatan DNA dan stabilitasnya, lokalisasi selular dan regulasi transkripsi yang dimediasi oleh HMGB1. Penelitian sebelumnya berpusat pada tingkat redoks bahwa ketiga residu sistein tetap dalam regulasi HMGB1 dan kemampuan reseptor pengikatnya dan hasil biologis selanjutnya. Seperti yang di deskripsikan diatas, mekanisme redoks pasca translasi ini akan mengontrol aktivitas proinflamasi HMGB1 selama patogenesis sepsis dan HMGB1 memediasi penyakit inflamasi lainnya (Magna M dkk, 2014).

Aktivitas sitokin HMGB1 membutuhkan C23 dan C45, untuk membentuk ikatan disulfida, dan C106 bentuk reduksi (ikatan disulfida HMGB1). Reduksi thiol C106 dibutuhkan untuk aktivitas sitokin HMGB1. Sitokin yang menginduksi aktivitas HMGB1, bergantung pada tingkatan redoks C106, yang berada didalam domain pengikat DNA kotak B pada HMGB1. Posisi C106 mengekspresikan grup thiol, bersifat wajib untuk pengikatan HMGB1 pada TLR4/ MD2. Substitusi C106 HMGB1 menentukan interaksi pengikatannya dengan TLR4/ MD2 dan stimulasi pelepasan sitokin berikutnya dari makrofag. Selanjutnya, peptida 20-mer sintetik yang mengandung C106 yang memediasi pelepasan TNF di makrofag, dimana penggantian C106 dengan residu serine meniadakan kapasitas ini. Modifikasi lain pada C106 HMGB1 oleh pemaparan dengan merkuri membentuk grup merkuri pusat oksidasi menjadi sulfonat oleh H₂O₂ mengeliminasi aktifitas pada HMGB1. Hasil penelitian ini tidak memungkiri bahwa C106



dan tingkatan reduksinya dibutuhkan untuk sinyal HMGB1 dengan stimulasi pelepasan sitokin dan inflamasi TLR4 (Harris HE dkk, 2012).

Ikatan disulfida antara C23 dan C45 di kotak A juga dibutuhkan untuk aktivasi sitokin HMGB1. Hubungan fungsi struktural C23 dan C45 dalam kemampuan untuk memediasi induksi sitokin belum diketahui. Analisis LC-MS/MS mengungkapkan bahwa induksi sitokin oleh HMGB1 membutuhkan kehadiran ikatan disulfida diantara C23 dan C45, bersamaan dengan C106 yang tereksresi didalam bentuk thiol-nya. Reduksi ikatan disulfida pada C23-C45 oleh pemaparan oleh agen reduksi DTT atau oksidasi menggunakan H₂O₂ untuk menghasilkan kelompok asam sulfonat secara lengkap menentukan aktivitas sitokin HMGB1. Substitusi C23 dan C45 dengan serin atau alanin tentu saja mereduksi aktifitas sitokin itu sendiri. Laporan sebelumnya menitik beratkan pada keadaan bahwa C23 dan C46 telah membentuk ikatan disulfida yang meningkatkan stabilitas molekul HMGB1 rantai panjang. Hasil penelitian ini mendemonstrasikan dengan jelas mekanisme redoks spesifik pascatranslasi untuk mengontrol aktivitas sitokin HMGB1 sehingga tingkatan redoks pada ketiga sistein HMGB1 sangat penting dalam peran sitokin. Dalam penelitian in vivo redoks penting untuk mendukung aktivitas sitokin HMGB1 yang tepat. Relevansi fungsi in vivo HMGB1 yang termodifikasi secara redoks telah di konfirmasi dalam model eksperimental pada hewan. Komponen inflamasi APAP yang memediasi hepatotoksisitas adalah HMGB1 yang memediasi proses yang telah digunakan dalam penelitian ini. Perlakuan dengan antagonis yang ditandai dengan HMGB1 spesifik memperbaiki hepatotoksisitas yang diinduksi APAP. Pemaparan

manya menghasilkan kematian sel hepatosit secara nekrotik dalam bersamaan dengan pengeluaran nuklir HMGB1 secara sistemik dan da masa awal dari penyakit, mengekspresikan ketiga sistein dalam



bentuk tereduksi memediasi kemotaksis. Kerusakan jaringan awal diikuti dengan aktivasi rekrutmen sel inflamasi dan badai sitokin sekunder dimediasi oleh sel imun bawaan yang terkumpul yang memperburuk kerusakan hati. Aktivasi selular disebabkan oleh HMGB1 dengan ikatan disulfida yang memungkinkan sinyal TLR4/MD-2. Kadar serum HMGB1 juga meningkat selama fase resolusi pada cedera ketika molekul teroksidasi pada terminal, mengekspresikan C106 dengan gugus asam sulfad. Dampak fungsional dari jalannya perubahan redoks dari HMGB1 in vivo sejalan dengan yang telah diketahui dari penelitian in vitro (Magna M dkk, 2014).

Dinamika HMGBI

Redoks Selama Kematian Sel Dan Cidera Bentuk HMGB1 redoks intraselular dan ekstraselular dalam kematian sel dan trauma adalah dinamis. Penelitian-penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa HMGB1 intraselular sel istirahat, semua bentuknya adalah bentuk sistein tereduksi, sedangkan HMGB1 yang disekresi semua mengandung thiol dan ikatan disulfida. Penelitian juga menunjukkan bahwa ikatan disulfida HMGB1 dapat ditemukan pada serum tikus yang mengalami intoksikasi hepatic yang diinduksi dengan APAP, dan hal ini berkorelasi dengan tingkat keparahan penyakit. Kadar ROS intraseluler yang ditinggi karena H₂O₂ atau SOD1 (Cu, Zn SOD), small interfering RNA (siRNA) mempromosikan pengeluaran HMGB1 dalam beberapa tipe sel, termasuk makrofag, menunjukkan bahwa senyawa oksigen reaktif (ROS) memainkan peranan penting di dalam aksi pengeluaran HMGB1 atau sekresi aktif. **Antioksidan** alami atau menghambat kematian sel dan respon inflamasi, dan telah dibuktikan menghambat pengeluaran HMGB1 dalam beberapa model penyakit.



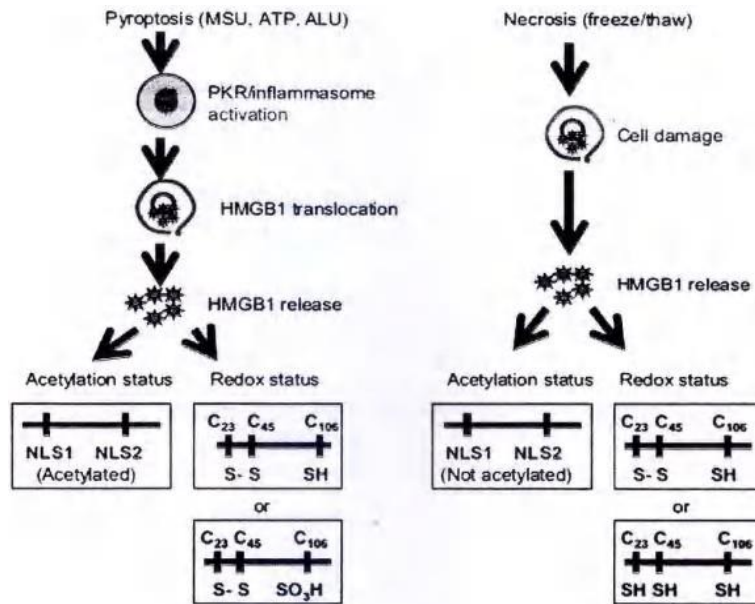
Bersamaan dengan hasil penelitian tersebut ditunjukkan bahwa status redoks HMGB1 adalah termodulasi yang dinamis di dalam lingkungan terbatas

Asetilasi dan Aktivitas Sitokin HMGB1

Hiperasetilasi Asetilasi kunci residu lisin dalam dua nuclear localization signal (NLS) dari HMGB1 menentukan mekanisme regulasi perubahan bolak-balik dari HMGB1 intrasel, menuju pengaktifan lepasnya HMGB1 dari aktivasi monosit, makrofag, dan mungkin dari jenis sel lainnya. Hiperasetilasi NLS di lisin akan mengubah keseimbangan HMGB1 dari posisi nuklear dominan menuju akumulasi sitoplasma dengan mencegah masuk kembalinya HMGB1 ke nuklir karena perpindahan terus menerus antara nukleus dan sitosol. Kadar serum asetat HMGB1 dalam induksi hepatotoksik acetaminophen pada pasien terbukti menjadi biomarker yang sensitif dan spesifik untuk memperkirakan hasil klinis. HMGB1 yang dilepas pada in vivo memberikan hasil iskemia/ reperfusi hati pada tikus yang menunjukkan terjadinya hiperasetilasi, dan pada in vitro, HMGB1 yang dilepas mengakibatkan hepatosit mengalami stress oksidatif. Efek ini diindikasikan sebagai penyebab kegagalan aktivitas deasetilasi histon untuk menghilangkan kelompok asetil dari residu lisin secara adekuat. Ketika menentukan dampak modifikasi pasca-translasi hubungan struktur fungsional HMGB1, penting untuk dicatat bahwa asetilasi residu lisin dapat mengubah potensial elektrostatik dan mempengaruhi pKa dari kelompok thiol 24 sistein. Namun, tidak ada kelompok amino lisin yang hadir dalam 8 A dari kelompok thiol di dalam struktur 3 dimensi HMGB1, oleh karena itu tidak mungkin

HMGB1 sebagai penyebab dampak dari peradangan





Gambar 2.3. Asetilasi dan Redoks Pelepasan HMGB dari Makrofag dalam Merespon Aktifasi Inflamasi. (Yang H, Antonie DJ, Andersson U, et al. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. J Leukoc Biol. 2013; 93: 865- 73).

Asetilasi dan keadaan redoks dari HMGB1 yang dikeluarkan oleh makrofag dalam merespons aktivasi inflammasom (MSU, ATP, ALU) atau dengan nekrosis (freeze/thaw). Piroptosis, diinduksi oleh MSU, ATP, atau ALU, menyebabkan PKR/25 aktivasi inflammasom dan translokasi HMGB1 dari nukleus menuju sitosol/ pengeluaran ekstraseluler. Analisis MS memperlihatkan bahwa HMGB 1 yang dilepaskan adalah ter-asetilasi pada bagian NLS1 dan -2, sedangkan HMGBI yang keluar karena diinduksi oleh nekrosis (melalui freeze/thaw berulang) bentuknya terasetilasi. Karakteristik MS bentuk redoks ke tiga sistein HMGB1 menunjukkan bahwa HMGB1 yang diinduksi piroptosis dan diinduksi nekrosis mengandung bentuk HMGB1 yang dapat menstimulasi sitokin ikatan disulfida dan tereduksi oleh nekrosis (Magna M dkk, 2014).

Piroptosis dan Hiperasetilase



sebelumnya oleh Lu B dkk, 2012 menunjukkan bahwa HMGB1 adalah sebagai biomarker untuk pyroptosis. Pada percobaan terangsang oleh prototipe pegan bahaya seperti ATP, MSU, atau

ALU. HMGB1 lepas di ekstrasel melalui aktivasi PKR dan sistem inflamasi. Analisis MS membuktikan bahwa HMGB1 yang lepas mengalami asetilasi tinggi pada NLS1 dan NLS2. Sebagai perbandingan, HMG1 yang dilepas dari makrofag melalui akibat nekrosis oleh karena pembekuan maupun pencairan tidak mengalami hiperasetilasi dalam ragam NLS. Reaksi redoks pada ketiga sistein HMGB1 menunjukkan bahwa HMGB1 yang dilepas oleh piroptosis mungkin aktif mengandung ikatan disulfida dan bentuk oksidasi terminal, sedangkan HMGB1 yang dilepas selama nekrosis dapat mengandung MD2/ ikatan TLR4 atau semua bentuk thiol. Dengan demikian, dalam beberapa penelitian mengindikasikan pelepasan HMGB1 selama proses inflamasi adalah dalam bentuk asetilasi. Inflamasom adalah multi protein kompleks yang mempromosikan sekresi sitokin proinflammatory IL-1 dan L-18. Data kami menunjukkan, HMGB1 digunakan sebagai identifikasi dan kuantifikasi piroptosis, sebuah proses fisiologis yang hingga sekarang, mengganggu biomarker. Dalam beberapa penelitian terakhir nampak bahwa pelepasan HMGB1 pada makrofag selama piroptosis tidak terlalu memberikan efek besar, sedangkan macam agonis dari permukaan sel TLR mengalami perubahan karena rilisnya HMGB1 dari bentuk kemotaksis (semua sistein thiol) ke bentuk agonis TLR4 oleh makrofag . 9.

Modifikasi Redoks HMGB1 dan Autofagi Autofagi adalah mediasi lisosom, yaitu proses memakan diri sendiri yang penting sebagai pertahanan sel selama stress. HMGB1 penting pada regulasi autofagi. Rangsangan yang menambah ROS juga mampu meningkatkan translokasi HMGB1 dari nukleus ke sitosol dan dengan demikian, menambah perubahan autofagia terus menerus. Modifikasi sistein HMGB1 dapat mengubah kegiatan autofagia. Mutasi C106 pada HMGB1, tapi tidak C45, mendukung translokasi HMGB1 ke sitosol dan autofagi. Terapi yang semuanya tereduksi namun tidak teroksidasi, HMGB1 mampu



meningkatkan autofagi pada sel kanker. Terlebih, jembatan disulfida antara C23 dan C45 dibutuhkan untuk berikatan dengan Beclin 1 untuk menopang proses 27 autofagia. Dengan demikian, HMGB1 yang diatur oleh modifikasi redoks pasca translasi, memainkan peranan penting dalam autofagi yang mendukung pertahanan sel dalam respon sel terhadap stress/ tekanan.

Metode Mendeteksi Modifikasi Post-Translasi dan Batasan HMGB1 Dengan diketahuinya analisis protein berdasar tandem mass spectrometry (MS), disertai dengan teknik molekular dan pembacaan imunologis, telah membantu menjelaskan dasar hubungan struktur-fungsi yang dihubungkan dengan modifikasi redoks dari residu sisteine atau modifikasi asetilasi pada lisin dari HMGB1. Dengan melihat redoks, determinasi pasti dari spesies kimia yang dipublikasikan telah dibuat dapat dilakukan melalui belahan enzimatik dari HMGB1 setelah diferensiasi alkalisasi dari gugus thiol (diikuti dengan reduksi dan lalu ikatan disulfida yang teralkalisasi). Campuran peptida ini lalu dipecah-pecah oleh nano-LC dan dianalisis dengan MS/MS. Pendekatan ini tidak hanya memungkinkan determinasi dari modifikasi post-translasi tertentu tetapi juga dapat menunjuk secara tepat asam amino yang dimodifikasi. Tetapi, meski dapat secara akurat dan sensitifitas dalam menentukan modifikasi post-translasi pada peptida melalui mass spectrometry, terdapat beberapa batasan. Pertama, metode yang dipublikasikan adalah low-throughput dan tidak dapat digunakan pada screening di high-throughput. Kedua, hingga saat ini, tidak ada antibodi spesifik untuk mengidentifikasi isoform fungsional yang berbeda 28 dari HMGB1, dan analisis MS/MS-based sekarang tetap menjadi

untuk identifikasi akurat. Sampai pengembangan dari assay ELISA- menawarkan accessible lebih dan opsi throughput yang lebih trade-off antara kecepatan analisa dan presisi indentifikasi dari



analyte. Ketiga, ionisasi diferensial dari peptida juga menimbulkan tantangan bagi kualifikasi absolut dan relatif bagi peptida yang berbeda (dengan modifikasi redoks atau asetil yang jelas) lintas set sampel dan mengenai HMGB1. Hal ini menunjukkan daerah yang tidak terpenuhi dan salah satu yang tidak tidak dimunculkan oleh laporan yang dipublikasikan akhir-akhir ini. Tetapi, kemajuan pada penanda isobarik untuk teknologi kuantifikasi absolut dan relatif dan penggunaan dari standar peptida yang telah diberi banyak label akan mengijinkan lebih lanjut analisis serupa pada studi selanjutnya. Karena sekarang karakterisasi kimiawi yang tepat dari perubahan yang bergantung pada redoks di HMGB1 atau modifikasi asetill dapat dihubungkan dengan fungsi biologis, pusat dari riset harus berpusat pada metode untuk kuantifikasi absolut. Saat ini, hanya beberapa laporan yang telah dipublikasikan yang menjelaskan tentang kuantifikasi akurat dari isoform HMGB1 yang telah dimodifikasi secara post-translational oleh MS. Menjadi penting untuk bekerja lebih pada riset translasional sehingga penemuan dasar dapat menghasilkan akibat klinis, sebagai contoh potensi isoform fungsional HMGB1 sebagai biomarker spesifik penyakit. HMGB1 adalah protein murni yang diekspresikan oleh sel-sel imun bawaan dalam merespon produk patogen dan sel steril yang mati, menempati peran sentral dalam patogenesis peradangan dalam sistim kekebalan. Kerusakan sel inang akan 29 mengaktifkan respon pertahanan tubuh dasar (imunitas bawaan) untuk bisa membedakan respon yang dihasilkan oleh mikroba dan patogen (Kang H dkk, 2011).

Kemajuan biologi molekuler mengungkapkan bahwa sitokin spesifik adalah mediator patogen penting dan secara selektif melemahkan tanda-tanda klinis dan

dari penyakit. Inflamasi dapat digambarkan sebagai reaksi tubuh an-kejadian yang berbahaya seperti cedera jaringan atau adanya Pelepasan mediator vasoaktif dari sel mast (histamin, leukotrin),



trombosit, dan komponen plasma (bradikinin) menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah akan mengarah pada tanda-tanda peradangan klasik kemerahan (rubor) dan panas (kalor). Edema akan menyebabkan pembengkakan (tumor), dan interaksi mediator inflamasi dengan sistem sensoris menimbulkan nyeri (dolor). Inflamasi lokal bila berlanjut terus akan menimbulkan respon sistemik yang disebut sebagai reaksi fase akut di ikuti peningkatan protein fase akut (protein C reaktif, faktor komplemen C3, fibrinogen, dan albumin serum), dan aktivasi sistem mediator (kinin, komplemen, lipid, dan sitokin). Tumor necrosis factor (TNF), IL-1, dan IL-6 telah menjadi andalan pengobatan berbasis sitokin inflamasi di klinik. Sitokin inflamasi ini telah diidentifikasi sebagai target terapi dalam patofisiologi endotoksemia, demam, sepsis, dan penyakit autoimun (Harris HE dkk, 2012).

Dinamika Translokasi HMGB1 Sewaktu Kematian Sel Secara imunologi penelitian terbaru telah memperluas kategorisasi bentuk kematian sel, seluruh mengarah kepada pelepasan HMGB1 dan mempengaruhi patogenesis dari inflamasi dan penyakit autoimun. Penanda sifat kematian sel tersebut merupakan kunci untuk memahami asal HMGB1 pada sekitar peradangan (sinovial, kelenjar air ludah, otot, lidah dll.) karena cakupan jauh melebihi apoptosis dan nekrosis yang mampu menghantarkan temuan-temuan histopatologis, seperti 32 hilangnya inti HMGB1, ekspresi sitoplasmik HMGB1 atau pelepasan ekstraseluler HMGB1 (Magna M dkk,2014)

1.1.1 Jalur Pelepasan HMGB1

Jalur pelepasan HMGB1 ke dalam sirkulasi melalui dua jalur yaitu invasi patogen beril, salah satu bersifat aktif dan lainnya pasif. Pelepasan pasif



diprakarsai oleh kerusakan integritas selular yang terjadi seketika. Sekresi aktif HMGB1 diprakarsai oleh transduksi sinyal seluler melalui interaksi reseptor membran plasma dengan produk ekstraseluler, terjadi lebih lambat. Sekresi aktif HMGB1 terjadi ketika monosit, makrofag, sel-sel natural killer, sel dendrit, sel endotel, trombosit, dan sel-sel imunologis kompeten lain terpapar dengan *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), dan secara endogen berasal dari mediator inflamasi termasuk TNF α , IL1, dan IFN- γ (Harris HE dkk, 2012). Sel-sel lain yang bisa dirangsang untuk mengeluarkan HMGB1 secara aktif termasuk neuron, astrosit, sel eritroleukemia, sel-sel neuroblastoma, dan sel-sel tumor. Kebanyakan sel, termasuk monosit dan makrofag, menyusun ekspresi protein HMGB1 dan mRNA dalam kondisi basal. Setelah makrofag diaktivasi dengan liposakarida (LPS) kadar HMGB1 mRNA meningkat selama beberapa jam dan tetap tinggi selama 24-48 jam. Sekresi aktif HMGB1 ke ekstraseluler dimulai 8- 12 jam setelah ligasi reseptor Toll-like (TLRs) dan terus meningkat selama 18-36 jam, rangkaian waktu secara signifikan lebih lambat dibandingkan dengan TNF dan IL-1, prototipe sitokin proinflamasi awal. Pelepasan HMGB1 dari kematian sel terprogram terjadi melalui dua cara (Anderson U dkk, 2011; Kim TH dkk, 2011) : a) Secara langsung dari sel apoptosis b) Melalui aktivasi monosit setelah terpapar sel apoptosis. Bukti mengungkapkan bahwa sel yang mengalami apoptosis melepas sejumlah besar HMGB1 tetapi secara imunologi tidak aktif. Artinya, secara signifikan gagal merangsang pelepasan TNF dari respon makrofag dibandingkan dengan pelepasan HMGB1 secara pasif selama nekrosis



... penting untuk dikotomi ini terletak dalam senyawa oksigen reaktif yang sel 42 apoptosis mitokondria yang menekan aktivitas inflamasi membakar sistein posisi 106, residu kritis diposisikan dalam kotak

imunostimulan domain kotak B imunostimulan dari protein rantai panjang. Mekanisme ini memberikan pemahaman mengapa apoptosis gagal mengaktifkan respon inflamasi signifikan karena secara eksperimen menghalangi langkah oksidasi HMGB1 (mencegah deaktivasi imunogenik) mengubah peristiwa apoptosis, menjadi peristiwa yang secara imunologis menstimulasi proinflamasi (Harris HE dkk, 2012; Hreggvidsdotir HS dkk, 2009). Sudah diketahui bahwa HMGB1 endogen (berasal dari sel-sel nekrotik) diperlukan untuk menstimulasi pelepasan TNF monosit dan subjek High Mobility Group Box 1 rekombinan (rHMGB1) untuk kondisi oksidasi ringan secara imunologis menjadi tidak aktif menjelaskan bahwa penting dalam mekanisme inflamasi molekuler yang dimediasi HMGB1.

Respon Inflamasi Seluler dan Reseptor HMGB1 HMGB1 dikelompokkan sebagai mediator proinflamasi klasik karena: a. Pelepasan HMGB1 dirangsang oleh cedera dan infeksi b. Mengaktifkan sel-sel imunokompeten untuk menghasilkan TNF- α , IL 1, dan respon proinflamasi lain dimana Menjadi perantara demam, anoreksia, dan sindrom penyakit in vivo .d. Aktivasi secara sinergis meningkat dengan adanya agonis TLR eksogen dan sitokin proinflamasi e. Secara khusus menjadi target terapi menguntungkan pada inflamasi steril dan sindrom penyakit infeksi yang dihubungkan peningkatan kadar HMGB1. (Harris, 2012)

Salah satu perbedaan HMGB1 dari sitokin proinflamasi konvensional (misalnya, TNF- α dan IL-1) adalah bahwa HMGB1 memunculkan respon inflamasi seluler dan biologis melalui sinyal transduksi reseptor yang sebelumnya telah berinteraksi dengan molekul asing. Tidak seperti TNF dan IL-1, or membran plasma serumpun secara jelas disebut bahwa HMGB1 dengan beberapa reseptor yang tampaknya tidak berhubungan tetapi



sebelumnya telah diidentifikasi kemampuan mereka untuk sinyal aktivasi transduksi dari eksogen (TLR2, TLR4, dan TLR9) dan ligand endogen (RAGE). Para imunologis menduga bahwa secara biokimia kebutuhan fungsional keluarga reseptor sitokin dibatasi pada persiapan terbatas sitokin serumpun yang dikejutkan dengan realitas bahwa HMGB1 khusus memodulasi respons selular melalui reseptor yang dapat diaktifkan dengan eksogen, ligand, benda asing. Hal ini mengungkapkan bahwa HMGB1 adalah protein yang sangat lestari dan evolusi tua yang mampu mengaktifkan rekaman seragam berbagai respon inflamasi terhadap kerusakan infeksi atau steril. Seperti yang dibahas secara rinci di bawah, peran sentral HMGB1 dalam menjembatani besarnya respon inflamasi terhadap sindrom klinis yang terkait dengan cedera steril dan infeksi diungkapkan dengan mengamati hilangnya aktivitas proinflamasi setelah pemberian antagonis HMGB1 dan dengan menghapus HMGB1 atau reseptor melalui teknik gugus genetik (Scaffidi P dkk, 2002). Ikatan HMGB1 pada TLR4-MD2 sebagai ukuran resonansi permukaan plasmon dan sinyal transduser yang merangsang makrofag melepas TNF. Pengikatan dan sinyal keduanya membutuhkan sistein redoks-sensitif posisi 106, dan substitusi posisi ini mencegah HMGB1 mengikat TLR4. TLR4 adalah reseptor utama HMGB1 ekstraseluler endogen dalam mediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin, dan cedera jaringan. Sinyal ini mengaktifkan IKB kinase (IKK) β dan IKK- α (endotoksin aktif hanya IKK- β) dan translokasi nuklir aktif NF- $\kappa\beta$. Ada perbedaan signifikan dalam HMGB1 dan endotoksin-dimediasi sinyal karena HMGB1 mengikat TLR4 dengan jauh lebih sedikit dibandingkan dengan afinitas LPS, dan aktivasi pola berbeda dibandingkan pola ekspresi mediasi endotoksin. HMGB1 dan endotoksin secara signifikan meningkatkan translokasi nuklir NF- $\kappa\beta$ dan fosforilasi Akt



dan p38 MAPK, tetapi LPS menyebabkan lebih tinggi aktivasi NF- κ B dan pelepasan TNF dibandingkan dengan HMGB1.

2.3.3. Respon Fisiologi dan Patofisiologi HMGB1

Keterbatasan tempat mencegah presentasi semua data ada yang berhubungan dengan biologi HMGB1 dalam peradangan steril dan infeksius. Ringkasan singkat kegiatan atau aktifitas fisiologis HMGB1 dalam sistim organ ditampilkan pada tabel 2.2, dan hasil model praklinis secara selektif menghambat aksi HMGB1 pada percobaan penyakit dirangkum dalam tabel 2.3. Di sini kita membahas modalitas terapi eksperimental dengan target melepas HMGB1, aktivitas biologis, dan sinyal reseptor transduksi, dengan fokus pada mekanisme melemahkan peradangan dan kerusakan kondisi yang berhubungan dengan peningkatan kadar HMGB1 ekstraseluler, morbiditas, dan mortalitas (Anderson U dkk, 2011).

2.4 Tinjauan Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 merupakan glikoprotein terfosforilasi dengan kandungan 185 asam amino, meliputi sitokin pleiotropic yang terlibat dalam proses peradangan, metabolisme tulang, sintesis protein C-reaktif, dan karsinogenesis. Sitokin dan reseptor ini merupakan kelas polipeptida yang memediasi proses inflamasi (Verri et al.,2006). Polipeptida ini dibagi menjadi sitokin pro dan anti-inflamasi. Proinflamasi sitokin mempromosikan inflamasi sistemik dan meliputi: interferon gamma 1 reseptor 1 (IFNGR 1), IL1R1, IL2, IL8, IL17A, factor nuclear kappa NF κ B2, dan TNF α . Sitokin anti-inflamasi menekan aktivitas sitokin



pro-inflamasi meliputi: IL1R2, IL4, IL10, dan IL13. Selain itu, IFNG1, IL1B, dan IL6 memiliki sifat pro dan antiinflamasi.

Imunitas spesifik meliputi Interleukin-6 menstimulasi pertumbuhan dan diferensiasi sel B menjadi sel mast dan juga menghasilkan antibodi (Baratawaidjaja, 2014) Interleukin-6 berfungsi juga pada imunitas nonspesifik dan spesifik, menghasilkan fagosit mononuclear, sel endotel vascular, fibroblast serta sel lainnya sebagai reaksi terhadap mikroba dan sitokin. IL-6 memiliki bermacam-macam manfaat. Dalam imunitas nonspesifik, Interleukin-6 menstimulasi hepatosit untuk menghasilkan Acute Phase Protein (APP) dan cairan serebrospina (CSF) yang menstimulasi progenitor pada sumsum tulang untuk menghasilkan neutrofil.

Gen interleukin 6 berada pada posisi chromosome ke 7 posisi 21 (7p21). Interleukin-6 merupakan sitokin multifungsi dengan peran penting dalam berbagai aktivitas biologis sel. Selain itu, interleukin 6 berperan dalam respon imun normal terhadap antigen asing. Pada beberapa kasus seperti infeksi saluran kemih maka kadar interleukin 6 dalam serum meningkat (Hedges, S., K, 1991).

2.5 Tinjauan Tentang Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin-10 dikenal juga sebagai Human Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (CSIF) merupakan protein homodimer yang terdiri atas subunit 178 asam amino (Zdanov, et al 1995). IL-10 diproduksi oleh T helper 2 dan fungsi utamanya ada dua : menghambat produksi beberapa jenis sitokin (TNF, IL-1, Kemokin dan IL-12) dan menghambat makrofag dan sel dendritik dalam membantu aktivasi sel

sifat immunosupresi. Hambatan fungsi makrofag terjadi karena IL-10 menghambat ekspresi molekul MHC kelas 2 pada makrofag (Kresno, 2013). Target kerja



IL-10 di makrofag dan sel dendritik adalah menghambat produksi interleukin12 dan ekspresi kostimulator serta menekan molekul MHC (Abbas,2011)

Pada kondisi infeksi , sitokin proinflamasi sangat candida berperan untuk meningkatkan fagositosis, rekrutmen netrofil sehingga memediasi inflamasi. (Gao N and Chen C,2015). Sitokin IL-10 merupakan sitokin anti-inflamasi. Selama infeksi, sitokin ini akan menghambat aktivitas dari sel Th2, sel NK dan makrofag. Ketika patogen masih mampu untuk bertahan terhadap pemusnahan melalui mekanisme imun yang normal, IL-10 akan diproduksi untuk mengurangi inflamasi yang nantinya akan meminimalkan kondisi patologi akibat inflamasi yang berlebihan Couper KN, Blount DG, 2008)

Sitokin memiliki peran besar selain modulator fungsi sel efektor antifungi, juga berperan sebagai pengatur pada perkembangan dan diferensiasi subset sel Thelper (CD4+) (Romani 2000). Aktivasi sel Thelper menyebabkan produksi kemokin dan sitokin pro-inflamasi seperti IL-1 α ,IL-1 β , dan TNF- α . Sedangkan sitokin anti inflamasi IL-10 berperan selama dalam pemrosesan antigen oleh Antigen Presenting Cells (APCs) yaitu sel dendritic. IL-10 berperan selama fase akhir infeksi yang mengawali eliminasi dari fungi tersebut (Seleem et al,2016). Pada fase planktonik yaitu awal infeksi *C Albicans* akan tampak peningkatan baik sitokin anti inflamasi IL-10 dan pro inflamasi IL-6, sedangkan pada awal pembentukan biofilm yang merupakan tahap virulensi candida akan terjadi pula peningkatan kadar IL-10. Kadar IL-6 dan IL-10 meningkat ketika fase inflamasi pada tahap patogenik yang akan ditunjukkan pada grafik 22.22 tentang infeksi *C Albicans* pada tikus.



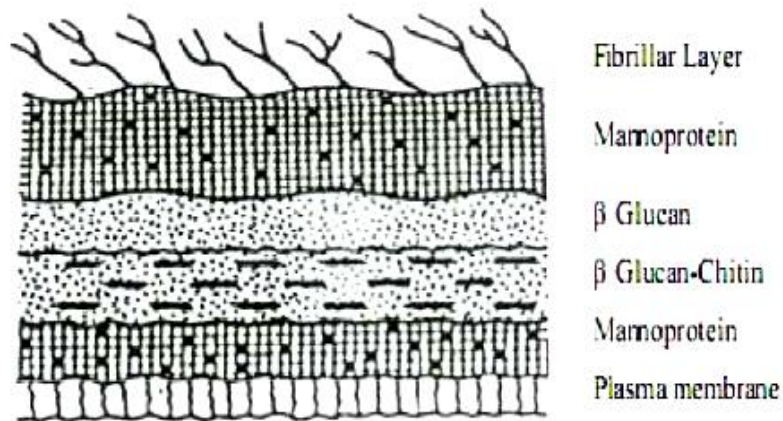
2.6. Tinjauan *Candida Albicans*

Candida albicans adalah jamur patogen yang paling sering menyebabkan infeksi terutama dapat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh. Infeksi karena mikorganisme ini membuat seseorang merasa tidak nyaman dalam beraktivitas bahkan dapat mengancam kehidupan dan sampai saat ini terapi anti jamur masih terbatas. Ada empat kelas kimia tersedia secara komersial untuk mengobati infeksi jamur seperti: poliena, azoles, echinocandine, dan analog asam nukleat. Dua yang pertama menghambat biosintesis membran sel dalam sel jamur, sedangkan echinocandine menghambat sintesis dinding sel. Di seluruh dunia, agen azole adalah agen yang paling banyak digunakan untuk mengobati kandidiasis; Namun, peningkatan jumlah azole resistant strain *C. albicans* yang menyebabkan masalah dalam pengobatan kandidiasis (Matsumoto, et al, 2014)

Candida albicans merupakan penyebab utama dari vulvovaginitis, karena kehilangan tingkat keasaman daerah genitalia wanita. Biasanya sering terjadi pada penderita diabetes melitus dan wanita hamil (Tortora, et al. 2004; Brooks, et al. 2007).

C. albicans mempunyai struktur dinding sel yang kompleks dan dinamis, tebalnya 100-400 nm. Menurut Segal & Bavin (1994) dinding sel *C. albicans* terdiri dari lima lapisan yang berbeda.





Gambar 4. Struktur Dinding Sel *C. albicans*

Komposisi primernya terdiri dari berbagai polisakarida seperti glukosa, mannan, dan khitin. Glukosa dan mannan, keduanya terutama memberi struktur sel, sedangkan yang terakhir, mannan, yang merupakan protein, turut berperan dalam membentuk antigen utama organisme. Lapisan luar dinding sel *C. albicans* terdiri dari mannoprotein yang terglykosilasi kuat, yang berasal dari permukaan sel. Lapisan ini terlibat dalam pengenalan antar sel (*cell to cell recognition events*), menentukan sifat permukaan sel dan berperan penting dalam interaksi dengan hospes. Mannoprotein ini mewakili 30—40% dari total polisakarida dinding sel dan menentukan sifat permukaan sel.

Hidrofobisitas permukaan sel berperan penting pada pathogenesis jamur oportunistik *C. albicans*. Permukaan sel hidrofobik, dibandingkan dengan sel hidrofilik, menunjukkan perlekatan yang lebih besar pada epitel, sel endotel, dan protein matriks ekstraselular. Permukaan sel hidrofobik ini akan menjadi lebih resisten terhadap sel fagosit. Sehingga semakin hidrofobik permukaan sel, maka *C. albicans* akan semakin mudah melekat pada jaringan hospes.



ulensi lainnya adalah sifat dimorfik *C. albicans*, bahkan sebagian akan sifatnya yang polimorfik. Dua bentuk utama *C. albicans* adalah bentuk pseudohifa yang juga disebut sebagai miselium. Dalam

keadaan patogen, *C. albicans* lebih banyak ditemukan dalam bentuk miselium atau filamen dibandingkan bentuk spora. Bentuk hifa mempunyai virulensi yang lebih tinggi dibandingkan bentuk spora karena ukuran yang lebih besar sehingga sulit untuk difagositosis oleh sel makrofag.

Mekanisme adhesi ke jaringan hospes merupakan kombinasi dari mekanisme spesifik dan non-spesifik. Mekanisme spesifik meliputi interaksi ligan-reseptor, sedangkan mekanisme non-spesifik meliputi agregasi, gaya elektrostatik, dan hidrofobisitas permukaan sel. Interaksi non-spesifik merupakan mekanisme utama tetapi bersifat reversibel. Sifat ini akan menjadi irreversibel jika terjadi mekanisme spesifik dalam proses adhesi yang mengakibatkan dinding sel *C. albicans* berinteraksi dengan reseptor atau ligan dari sel hospes.

Sebagian wanita penderita kandidiasis vagina simptomatik tidak menunjukkan respon yang baik terhadap terapi dan timbul keadaan infeksi kronik. Pada keadaan timbulnya kandidiasis berulang yang disebabkan oleh infeksi yang relaps dapat disimpulkan bahwa terapi pertama telah gagal. Hal ini mungkin terjadi karena adanya organisme yang tersembunyi dalam lumen atau dalam jaringan pada mukosa vagina. Diduga yang menjadi sumber infeksi kandidiasis vagina adalah tinja yang mengandung *Candida*, kulit lipatan paha dan genetalia pasangan seksual yang mengandung *Candida*, kuku dan kotoran di bawah kuku yang mengandung *Candida* dan air yang terkontaminasi *Candida* (BKKBN, 1988).

Dalam hal ini, estrogen berperan dalam menentukan kadar zat gula sebagai simpanan energi dalam (glikogen). Glikogen merupakan nutrisi dari *Lactobacillus* untuk metabolisme untuk pertumbuhannya. Sisa dari metabolisme ini melalui berbagai persenyawaan hidrat arang yang lebih rendah, akan lanjut menjadi asetaldehid, asam piruvat, dan akhirnya asam laktat.



Asam laktat ini yang menentukan suasana asam di dalam vagina dengan potensial hidrogen (pH) di kisaran 3.8-4.2.

Prosedur Identifikasi *Candida albican* menurut Wahyuningsih (2012) adalah sebagai berikut :

1. Pilih beberapa koloni yang tumbuh terpisah
2. Koloni tersebut disuspensi ke dalam 1 mL akuades dengan konsentrasi 10^5 sel/ml
3. Biakan suspensi tersebut dalam media kromogenik yaitu CHROM agar-*Candida* (CAC) dan dibungkus dengan kertas aluminium untuk menghindari pengaruh cahaya. Inkubasi pada suhu 35-37°C selama 48 jam.
4. Spesies ditentukan berdasarkan warna koloni yang tumbuh. *Candida albicans* tumbuh sebagai koloni hijau terang (HT) dengan bagian tepi memucat, *C.tropicalis* berwarna ungu tua di puncak koloni dan bagian tepi ungu pucat, sedangkan koloni *C. krusei* berwarna merah muda dengan permukaan kasar, dan *C. parapsilosis* tumbuh sebagai koloni berwarna putih pucat dan koloni *C. Glabrata* berwarna merah muda gelap dengan bagian tepi memucat (Eraso *et al.*2006)
5. Koloni *Candida albican* dilanjutkan identifikasi molekular dengan *Direct Colony*PCR (Liguori *et al.* 2010).

2.7.Tinjauan Kandidiasis Vulvovaginalis

2.7.1 Pengertian Kandidiasis Vuvovaginalis

Kandidiasis vulvovaginalis (KVV) atau kandidisis vulvovaginalis

lesi mukosa vagina dan atau vulva (epitel tidak berkeratin) yang disebabkan oleh jamur spesies *Candida*. Infeksi dapat terjadi secara akut, subakut,



dan kronis, didapat baik secara endogen maupun eksogen yang sering menimbulkan keluhan berupa duh tubuh.

Kandidiasis vaginalis merupakan jamur pada dinding vagina yang disebabkan oleh genus *Candida albicans* dan ragi (yeast) lain dari genus *Candida*. Penyebab tersering kandidiasis vaginalis adalah *Candida albicans* yaitu sekitar 85-90%. Sisanya disebabkan oleh spesies non *albicans*, yakni *Candida glabrata* (*Torulopsis Glabarata*). Penyebab kandidiasis vagina 81% oleh *Candida albicans*, 16% oleh *Torulopsis glabarata*, sedang 3% lainnya disebabkan oleh *Candida tropicalis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei* dan *Candida stellatoidea*

Infeksi pertama timbul di vagina disebut vaginitis dan dapat meluas sampai vulva (vulvitis). KVV merupakan salah satu infeksi yang paling banyak dikeluhkan wanita. Sekitar 70-75% wanita setidaknya sekali terinfeksi KVV selama masa hidupnya, paling sering terjadi pada wanita usia subur, pada sekitar 40-50% cenderung mengalami kekambuhan atau serangan infeksi kedua. Lima hingga delapan persen wanita dewasa mengalami KVV berulang, yang didefinisikan sebagai empat atau lebih episode setiap tahun yang dikenal sebagai kandidiasis vulvovaginalis rekuren (KVVR), dan lebih dari 33% spesies penyebab kandidiasis vulvovaginalis rekuren (KVVR) adalah *Candida glabrata* dan *Candida parapsilosis* yang lebih resisten terhadap pengobatan. (Saydam.G,2012; Sobel JD 2008)

2.7.2 Patogenesis Kandidiasis Vulvovaginalis.

Patogenesis kandidiasis vulvovaginitis dimulai dari adanya faktor predisposisi memudahkan pseudohifa *Candida* menempel pada sel epitel mukosa dan kolonisasi. Kemudian *Candida* akan mengeluarkan zat keratolitik yang menghidrolisis fosfolipid membran sel epitel, sehingga invasi jamur ke jaringan. Dalam jaringan *Candida* akan mengeluarkan



faktor kemotaktik neutrofil yang akan menimbulkan reaksi radang akut yang akan bermanifestasi sebagai daerah hiperemi atau eritema pada mukosa vulva dan vagina. Zat keratolitik yang dikeluarkan candida akan terus merusak epitel mukosa sehingga timbul ulkus-ulkus dangkal. Yang bertambah berat dengan garukan sehingga timbul erosi. Sisa jaringan nekrotik, sel-sel epitel dan jamur akan membentuk gumpalan berwarna putih diatas daerah yang eritema yang disebut flour albus

Faktor predisposisi terjadinya kandidiasis vulvovaginalis (KVV) meliputi faktor terkait pejamu dan kebiasaan yang mengganggu keseimbangan antara kolonisasi jamur *Candida dengan lingkungan vagina pejamu*. Faktor predisposisi terkait pejamu dalam penelitian ini antara lain diabetes melitus, kehamilan, kondisi premenstruasi, terapi hormon, konsumsi obat-obatan (antibiotik, kortikosteroid, dan antijamur). (Astari L,Ahmad Z, 2019)

2.7.3 Penyebab Kandidiasis Vulvovaginalis

Penelitian oleh Corsello dan kawan-kawan di Italia menemukan bahwa *douching vagina lebih sering* ditemukan pada pasien Kandidiasis Vulvovaginalis (KKV) dan Kandidiasis Vulvovaginalis rekuren (KVVR) daripada pada wanita sehat. Penggunaan pakaian yang ketat atau ventilasinya kurang akan menghambat sirkulasi udara di sekitar vagina sehingga menjadi sesak. Keadaan ini akan menyebabkan cairan vagina menjadi media yang cocok untuk pertumbuhan bakteri dan mikroorganisme lainnya termasuk jamur. Penelitian oleh Akpan dan kawan-kawan di Uyo Metropolis, Nigeria menunjukkan tingginya angka kejadian (76,8%)

yang secara rutin memakai celana ketat berbahan nilon atau bahan dibandingkan dengan yang secara rutin memakai bahan katun (Astari L,Ahmad Z,2016)



Data yang dikeluarkan oleh Syarifuddin dkk (1995) menyatakan tingginya frekuensi kejadian KVV seiring meningkatnya tahun, pada tahun 1987 KVV ditemukan sebanyak 40% dari seluruh infeksi saluran kemih, meningkat menjadi 60% pada tahun 1991 dan 65% pada tahun 1995. (Saydam.G,2012; Sobel JD 2008)

Gejala yang lebih sering adalah pruritus vulva. Keputihan tidak selalu ada dan sering kali hanya sedikit. Sekret vagina berwarna putih, seperti krim susu/keju atau kuning tebal tetapi dapat juga cair seperti air atau tebal homogen, bau minimal atau kadang berbau asam dan tidak mengganggu. Ekskoriasi, serviks biasanya normal, atau sedikit eritem disertai sekret putih yang menempel pada dindingnya. Pada pemeriksaan tampak mukosa vagina kemerahan dan pembengkakan labia dan vulva sering disertai pustulopapular di sekeliling lesi.

Penyakit dapat meluas ke perineum, vulva, dan daerah inguinal..Vulva tampak eritem, edema, basah dan kadang tampak papul, vesikel, pustul, erosi dan eksoriasi atau maserasi dengan hiperemi pada introitus vagina dan dapat dijumpai adanya gumpalan-gumpalan putih serta lesi satelit. Kandidiasis vulvovaginal (KVV) biasanya disertai rasa gatal yang hebat. Namun, gejala ini tidak spesifik karena pada suatu penelitian diketahui hanya 38% pasien yang mengeluhkan gatal hebat, tetapi pada penelitian lain 100% wanita yang menderita Kandidiasis vulvovaginal (KVV) mengeluhkan gatal. Gejala lain yang dirasakan adalah rasa panas dan terkadang rasa sakit terutama pada saat berkemih (disuria eksternal), saat berhubungan seksual (dispareunia), setelah pemeriksaan ginekologi atau setelah mandi atau berendam dengan air hangat. Keluhan seringkali sangat ringan (bahkan tidak dirasakan oleh sebagian pasien karena telah terbiasa) dan keluhan bisa hilang timbul.



Secara umum, gambaran klinis kandidiasis vaginalis (KKV) ditunjukkan dengan keluarnya kental berwarna putih berbau asam. Melalui pemeriksaan KOH 10 % pada secret vagina mengeluarkan pseudohifa dan blastospora pada pemeriksaan kultur ditemukan *Candida albicans*. Pemeriksaan penunjang pengecatan gram dan pemeriksaan fisik berguna untuk menunjang diagnosis. Tujuan pemeriksaan penunjang adalah mengetahui apakah ada spora pada bagian labia minora pasien yang dimana *Candida albicans* memperbanyak diri dengan membentuk blastospora (budding cell). Blastospora akan saling bersambung dan bertambah panjang sehingga membentuk pseudohifa. Bentuk pseudohifa lebih virulen dan invasif dari pada spora. Hal itu dikarenakan pseudohifa berukuran lebih besar sehingga lebih sulit difagositosis oleh makrofag. Selain itu, pseudohifa mempunyai titik-titik blastokonidia multipel pada satu filamennya sehingga jumlah elemen infeksius yang ada lebih besar.

Terapi farmakologi dengan obat topikal dan sistemik. Obat topikal yang digunakan umumnya berupa Ketokenazol 2% dioleskan pada bagian lesi di labia minora. Ketokenazol kream digunakan untuk infeksi jamur di kulit tak berambut seperti dermatofita, dengan dosis dan lamanya pengobatan tergantung dari kondisi biasanya diberikan selama 2-4 minggu dan dioleskan 1-2 kali sehari. (Kelestemur, N,2012).

Terapi sistemik yang digunakan berupa flukonazol 1x150 mg (dosis tunggal), Flukonazol ini digunakan karena secara invitro flukonazol memperlihatkan aktivitas fungistatik terhadap *Candida albicans*. Cara kerja obat ini adalah dengan menghambat enzim lanosterol sasaran (4β -sterol demetilase yang terlibat dalam konversi lanosterol ke ergosterol, komponen penting dari membran sel jamur, sehingga terjadi akumulasi produk beracun 14β -metil -3,6 diol. Akibatnya,



ergosterol konten di sel jamur membran berkurang, menyebabkan membran sel berubah struktur dan fungsi, dan akhirnya menghambat jamur pertumbuhan (Yasmin,2016)

Cara Upaya pencegahan disarankan untuk menjaga agar daerah sekitar organ reproduksi bersih dan tidak lembab dengan menggunakan pakaian dalam yang cukup menyerap keringat atau terbuat dari jenis kain katun.

Penggunaan cairan pembasuh vagina sesuai anjuran dokter dengan pertimbangan bahwa lingkungan vagina bersifat asam yang juga merupakan lingkungan normal bagi flora normal (mikroorganisme yang dalam jumlah normal tidak menyebabkan penyakit) di vagina. Adanya perubahan lingkungan normal tersebut, misalnya dengan penggunaan cairan pembilas vagina yang bersifat basa / alkali (mengandung sabun) dapat memicu pertumbuhan kuman secara abnormal yang salah satu akibatnya adalah keputihan.

Prognosis dari kelainan ini adalah baik dengan perawatan yang teliti dan rutin karena penyakit jamur termasuk penyakit yang sulit untuk disembuhkan, karena itu membutuhkan ketelatenan dan pengobatan yang relatif cukup lama yaitu sekitar sebulan untuk dapat menyembuhkan penyakit ini secara tuntas. Pengobatan-nya pun tidak boleh sembarangan, biasanya diobati dengan dua jalan, yaitu obat jamur yang diminum. (Kelestemur, N,2012)

2.8 Tinjauan tentang Mencit BALB/c

Mencit BALB/c adalah mencit albino galur tikus rumah yang secara khusus dikembangkan biakan di laboratorium untuk tujuan penelitian sebagai hewan coba.

nya dikembangkan di Rumah Sakit Halsey J. Bagg, New York. dikembangkan lebih lanjut di laboratorium *Jackson*. Mencit ini yang mencit BALB/c saat ini. (Potter, 1985) Mencit BALB/c ini berguna



dalam penelitian imunologi dan infeksi. Mencit BALB/c mudah diinfeksi, dan menimbulkan respons imun yang baik terhadap kondisi tersebut. Banyak model infeksi menggunakan model mencit BALB/c karena menghasilkan respons makrofag terhadap patogen sangat baik. (Steinman and Hemmi, 1985)

2.9. Tinjauan Ekspresi Gen

DNA sebagai bahan genetik karena DNA dapat mewariskan sifat sifat organisme induk, sudah diidentifikasi pada pertengahan abad 20. ^(1,2,5)Genom adalah sepotong DNA / segment DNA yang menyandi protein mengandung semua informasi genetik yang dimilikinya. Dengan penemuan ini ditemukan bagaimana informasi genetik diwariskan dan diekspresikan. Mekanisme molekuler dari pewarisan melibatkan proses yang dikenal sebagai replikasi, dimana rantai DNA induk berfungsi sebagai cetakan untuk sintesis salinan DNA.

Ekspresi gen di dalam sel memerlukan dua proses, transkripsi dimana DNA berfungsi sebagai “template” dan ditranskripsikan menjadi mRNA dan translasi dimana informasi pada RNA akan diterjemahkan menghasilkan protein. Pengaturan ekspresi gen pada sel eukariotik hanya memungkinkan ekspresi sebagian kecil genom dalam suatu waktu, sehingga sel dapat menjalani perkembangan dan differensiasi. Ini memerlukan suatu pengaturan melalui mekanisme yang rumit. Untuk suatu gen spesifik, pengaturan dapat terjadi secara bersamaan diberbagai tingkat dan berbagai faktor bekerja bersamaan untuk merangsang dan menghambat ekspresi suatu gen.



gen, urutan nukleotida sepanjang untaian DNA menentukan protein, dihasilkan oleh organisme disebut sebagai *ekspresi gen* . Langkah

pertama dalam ekspresi gen adalah transkripsi DNA menjadi RNA. Molekul RNA sama dengan DNA kecuali pada : Gugusan gula adalah ribosa. Basa Urasil (U) menggantikan Timin (T) dan U berpasangan dengan A. RNA biasanya tidak berantai ganda walaupun dapat melipat dirinya sendiri jika terjadi komplementaritas dan beberapa virus RNA berantai ganda.

2.10 Tinjauan Real-Time PCR

Organisme memiliki gen yang diekspresikan secara konstitutif pada seluruh/beberapa jenis sel dan gen yang diekspresikan berbeda-beda bergantung pada kondisi yang dihadapi organisme. Ekspresi gen tersebut secara molekuler dapat dideteksi pada tahap transkripsi (mRNA) maupun translasi (protein) (Storey, 2004). Reaksi rantai polimerasi (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in-vitro*. DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA merupakan suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA PCR yang memungkinkan dilakukan pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA *template* (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempel pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium merangsang aktivasi



PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu:

1. DNA cetakan,

yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10^5 – 10^6 molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.

2. Oligonukleotida primer,

yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA yang mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60 % untuk kestabilan penempelan primer.

3. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP)

terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dNTP, mengikat ion magnesium sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Komponen ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.

4. Enzim DNA Polimerase

yaitu enzim yang melakukan katalis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh *Eubacterium* yang disebut *Thermus aquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman *Yellowstone* pada tahun 1969. Enzim *polymerase Taq* tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.

lengkap yang lain adalah senyawa buffer.

PCR umumnya mengandung Tris-HCL 10-50 mM pH 8,3–8,8 (suhu 50–60°C); Mg²⁺ 1–2 mM; gelatin 0,1 % atau *Bovine Serum Albumine* (BSA); Tween 20



sebanyak 0,01 % atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1 % disamping itu perlu ditambahkan $MgCl_2$ 1,5 Mm (Yuwono T dkk, 2006).

Proses PCR menggunakan alat *thermocycler*. Sebuah mesin yang memiliki kemampuan untuk memanaskan sekaligus mendinginkan tabung reaksi dan mengatur temperatur untuk tiap tahapan reaksi. Ada 3 tahapan penting dalam proses PCR yang selalu terulang dalam 30-40 siklus dan berlangsung cepat:

1. Denaturasi

Didalam proses PCR denaturasi awal dilakukan sebelum enzim Taq polimerase ditambahkan kedalam tabung reaksi. Denaturasi DNA merupakan proses pembukaan DNA untai ganda menjadi DNA untai tunggal. Hal ini biasanya berlangsung sekitar 3 menit untuk meyakinkan bahwa molekul DNA terdenaturasi menjadi DNA untai tunggal. Denaturasi yang tidak lengkap mengakibatkan DNA mengalami renaturasi (DNA untai ganda terbentuk kembali) secara cepat dan ini menyebabkan gagalnya proses PCR. Adapun waktu denaturasi yang terlalu lama dapat mengurangi aktivitas enzim Taq polimerase. Aktivitas enzim tersebut mempunyai waktu paruh lebih dari 2 jam, 40 menit, 5 menit masing-masing pada suhu $92,5^{\circ}C$; $95^{\circ}C$ dan $97,5^{\circ}C$.

2. *Annealing* (penempelan primer)

Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18–25 basa, mengandung G + C 50-60 % untuk

penempelan primer, pada proses ini kedua primer tersebut sebaiknya tidak berpasangan dengan DNA masing-masing primer itu sebaiknya tidak saling berpasangan karena, hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder



pada primer tersebut dan akan mengurangi efisiensi PCR. Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30–45 detik. Semakin panjang ukuran primer yang diperiksa semakin tinggi temperatur yang dipakai. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36–72°C, namun suhu yang biasa dilakukan adalah antara 50–60°C.

3. *Extension* (pemanjangan primer)

Selama tahap ini Taq polimerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukleotida oleh enzim tersebut pada suhu 72°C diperkirakan 35–100 nukleotida/ detik. Hal ini bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk menghasilkan PCR dengan panjang 2000 pasang basa waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya diakhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini bisa diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan dapat membentuk DNA untai ganda. Reaksi tersebut diulangi lagi setiap 25–30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi.

Metode pemeriksaan PCR sangat sensitif, sensitifitas tersebut dapat digunakan untuk melipat gandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuens

menggunakan metode PCR dapat diperoleh pelipat gandaan suatu 10 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus 220 menit. Hal ini menunjukkan bahwa pelipat gandaan suatu

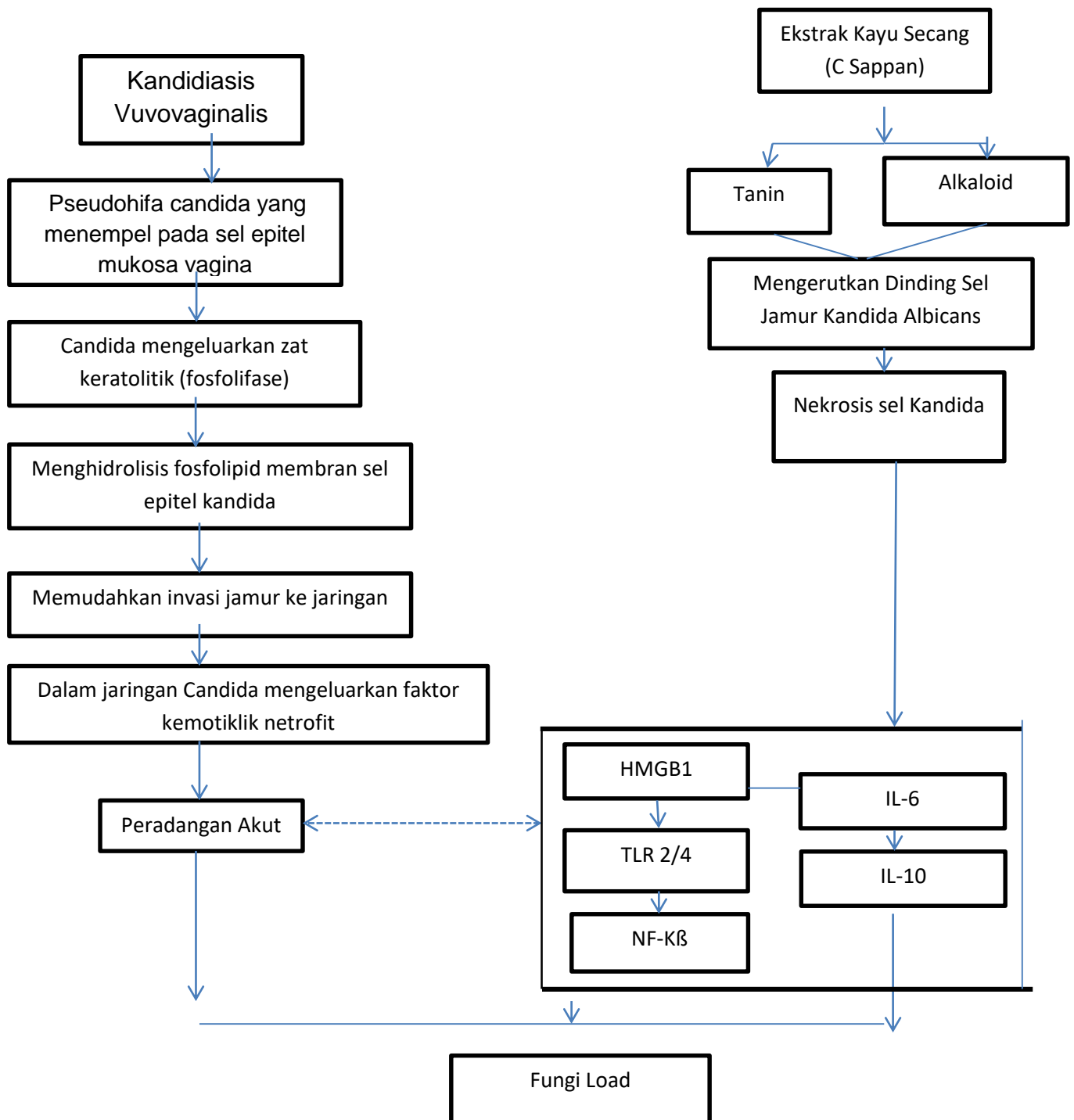


fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya cetakan DNA yang diperlukan hanya sekitar 5 µg, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50–100 µl. DNA cetakan yang digunakan juga tidak memerlukan pemurnian terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuens DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri didalam tabung PCR. (Yuwono, 2006)

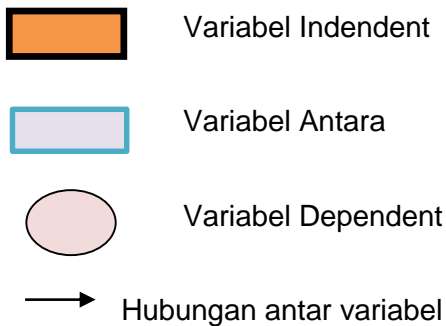
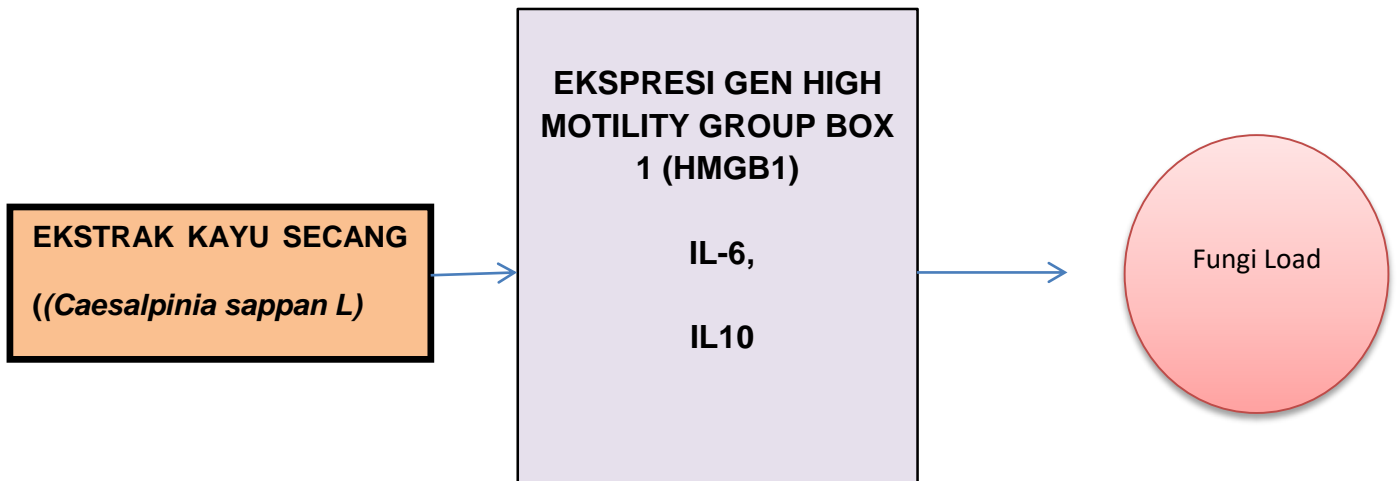
Real-time PCR atau quantitative PCR (qPCR) merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (O'Connel, 2002). Prinsip kerja qPCR adalah mendeteksi dan menguantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Arya *et al.*, 2005).



2.11. KERANGKA TEORI



2.12 KERANGKA KONSEP



Keterangan :

- a. **Variabel bebas /Independent** : Ekstrak Kayu Secang (C. Sappan)
- b. **Variabel antara** : Gen mRNA High Motility Group Box 1 (HMGB1, interleukin 6 dan Interleukin 10
- c. **Variabel Tergantung/ Dependen** : Fungi Load

2.12 Definisi Operasional



Ekstrak kayu secang (C.Sappan) adalah hasil ekstraksi kayu secang (*Caesalpinia sappan L*) dengan etanol 70% yang diberikan pada tikus.

b. **Kandidiasis Vulvovaginalis** adalah keadaan infeksi mukosa vagina dan atau vulva (epitel tidak berkeratin) yang disebabkan oleh jamur spesies *Candida*.

c. **Ekspresi mRNA High Motility Group Box 1 (HMGB1)** : mediator sitokin patogenesis pada kondisi inflamasi.

d. **Kadar interleukin** adalah jumlah interleukin yang terukur melalui pemeriksaan RT-PCR dan dinyatakan dalam satuan pg/dl. Untuk penelitian ini kadar interleukin yang diukur adalah **kadar IL-6** (kadar proinflamasi ketika terjadi inflamasi diharapkan mengalami peningkatan dan kadar **IL-10** (Kadar antiinflamasi ketika terjadi inflamasi diharapkan mengalami penurunan

2.14.Hipotesis

1. Pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) meningkatkan ekspresi gen mRNA High Motility Group Box1 (HMGB1) pada mencit BALB/c dengan candidiasis vulvovaginalis
2. Pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) dapat meningkatkan ekspresi Interleukin-6 dan menurunkan ekspresi gen Interleukin 10 pada mencit Balb/c dengan candidiasis Vulvovaginalis
3. Pemberian ekstrak kayu secang (*Caesalpiniasappan L*) dapat meningkatkan ekspresi Interleukin-6 dan menurunkan ekspresi gen Interleukin 10 pada mencit Balb/c dengan candidiasis Vulvovaginalis

