

DISERTASI

**PENGARUH METFORMIN TERHADAP EKSPRESI mNRA
FOXP3 PADA MODEL MENCIT BALB/c BETINA
TERINDUKSI PRISTANE**



STEVENT SUMANTRI

NIM : P0200315010

**PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**PENGARUH METFORMIN TERHADAP EKSPRESI mNRA
FOXP3 PADA MODEL MENCIT BALB/c BETINA
TERINDUKSI PRISTANE**

DISERTASI

**Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Doktor
Program Studi Kedokteran**

**Disusun dan Diajukan oleh :
STEVENT SUMANTRI**

P0200315010

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR**

2020

DISERTASI

PENGARUH METFORMIN TERHADAP EKSPRESI mRNA FOXP3 PADA MODEL MENCIT BALB/C BETINA TERINDUKSI PRISTANE

Disusun dan diajukan oleh

STEVENT SUMANTRI
P0200315010

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 20 Mei 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,

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

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok

Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

dr. Agussalim Bukhari, M. Med, Ph.D, Sp.GK (K)

Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, Sp.GK

Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin

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

ABSTRAK

STEVENT SUMANTRI. *Pengaruh Metformin terhadap Ekspresi mRNA FOXP3 pada Model Mencit BALB/c Betina Terinduksi Pristane* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Rosdiana Natsir, Haerani Rasyid).

Penelitian ini bertujuan mempelajari efektivitas metformin terhadap ekspresi mRNA FOXP3 yang merupakan salah satu pemain kunci dalam patofisiologi LES.

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental terhadap hewan coba, 31 ekor mencit BALB/c betina usia 6 minggu diinduksi dengan 0,5 ml pristane intraperitoneal selama 120 hari. Pasca induksi dilakukan intervensi terhadap tiga kelompok sebagai berikut, kontrol normal salin 100 mikroliter oral, metformin 100 mg/kgBB oral dan metformin 100 mg/kgBB intraperitoneal. Pasca 60 hari mencit dikorbankan, dilakukan analisis sitokin, ekspresi mRNA dan patologi anatomi ginjal.

Hasil terapi kontrol normal salin dibanding metformin oral, menunjukkan kadar ekspresi mRNA FOXP3 6,90 vs. 7,79 *fold change* (beda rerata -0,89; IK 95% 1,68 – (-0,11); $p=0,03$). Perbandingan kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, menunjukkan kadar ekspresi mRNA FOXP3 6,90 vs. 9,02 *fold change* (beda rerata -2,12; IK 95% -2,99 - (-1,25); $p<0,001$). Perbandingan metformin oral dengan metformin intraperitoneal memberikan hasil perubahan kadar ekspresi mRNA FOXP3 -0,94 vs. -2,02 *fold change* (beda rerata 1,07; IK 95% 0,16 – 1,99; $p=0,027$).

Penelitian ini menunjukkan metformin intraperitoneal lebih efektif dibandingkan metformin oral dan kontrol normal salin dalam meningkatkan kadar ekspresi mRNA FOXP3 pada model mencit BALB/c betina terinduksi pristane.

Kata kunci: Lupus Eritematosus Sistemik, Metformin, Mencit Terinduksi Pristane, FOXP3

ABSTRACT

STEVENT SUMANTRI. The Effect of Metformin on FOXP3 mRNA Expression in Pristane Induced Female BALB/c Murine Model (guided by Mochammad Hatta, Rosdiana Natsir, Haerani Rasyid).

This study aims to evaluate the effectivity of metformin on FOXP3 mRNA expression, one of the key players in SLE pathophysiology.

This study was conducted with an animal model experimental design, 31 female BALB/c mice aged 6 weeks was induced with 0.5 ml of intraperitoneal pristane for 120 days. Post induction we proceed with intervention in three groups as follows, 100 microliter oral normal saline, 100 mg/kgBW oral metformin and 100 mg/kgBW intraperitoneal metformin. After 60 days of intervention, the mice were sacrificed and then followed with cytokines, mRNA expression and kidney pathological analysis.

The result of normal saline compared to oral metformin therapy revealed FOXP3 mRNA expression of 6.90 vs.7.79 fold change (mean -0.89; 95% CI 1.68 – (-0.11); p=0.03). Normal saline compared to intraperitoneal metformin therapy revealed FOXP3 mRNA expression of 6.90 vs 9.02 fold change (mean -2.12; 95% CI -2.99 – (-1.25); p<0.001). Comparison of oral and intraperitoneal metformin revealed FOXP3 mRNA expression delta change of -0.94 vs. -2.02 fold change (mean 1.07; 95% CI 0.16-1.99; p=0.027).

This study has shown that intraperitoneal metformin was more effective than oral metformin and normal saline control in increasing the expression of FOXP3 mRNA in a pristane induced female BALB/c murine model.

Keywords: *Systemic Lupus Erythematosus, Metformin, Pristane Induced Mice, FOXP3*

DAFTAR ISI

Sampul.....	i
Halaman Judul.....	ii
Pengesahan.....	iii
Abstrak.....	iv
Abstract.....	v
Daftar isi.....	vi
Daftar Gambar.....	ix
Daftar tabel.....	xi
Daftar istilah.....	xii
I. PENDAHULUAN.....	1
I.1. Latar Belakang Masalah.....	1
I.2. Rumusan Masalah.....	3
I.3. Tujuan Penelitian.....	3
I.4. Manfaat Penelitian.....	4
II. Tinjauan Pustaka.....	6
II.1. Epidemiologi Lupus Eritematous Sistemik.....	6
II.2. Patogenesis Biomolekular Lupus Eritomatous Sistemik.....	8
II.3. Peranan Limfosit dalam patogenesis Lupus Eritomatous Sistemik....	16
II.4. Peranan Neutrofil dalam pathogenesis Lupus Eritomatous Sistemik.....	19
II.5. Peranan sel-sel imunitas <i>innate</i> dalam patogenesis Lupus Eritomatous Sistemik.....	20
II.6. Tinjauan mediator-mediator yang berperan dalam pathogenesis Lupus Eritomatous Sistemik.....	22
II.7. Pengaruh stress oksidatif dalam pathogenesis Lupus Eritomatous Sistemik.....	36
II.8. Peranan metabolisme sel T CD4+ dalam pathogenesis lupus.....	39
II.9. Pengaruh modulasi jalur AMPK/mTOR terhadap regulasi T-reg dan T-efektor.....	41
II.10. Pengaruh metformin terhadap modulasi jalur AMPK/mTOR.....	42

II.11. Pengaruh metformin dalam model hewan Lupus Eritomatous Sistemik.....	46
II.12. Model murin untuk Lupus Eritomatous Sistemik.....	48
III. Kerangka Teori	54
III.1. Kerangka Konsep.....	55
III.2. Hipotesis Penelitian	55
III.3. Variabel Penelitian.....	56
III.4. Definisi Operasional	56
IV. Metodologi	60
IV.1. Desain studi	60
IV.2. Subyek	60
IV.3. Waktu dan lokasi penelitian	60
IV.4. Populasi dan sampel penelitian.....	60
IV.5. Cara perhitungan sampel	61
IV.6. Bahan penelitian	61
IV.7. Protokol studi.....	62
IV.8. Analisis statistik.....	71
IV.9. Alur penelitian	73
V. Hasil Pembahasan	74
V.1. Hasil.....	74
V.1.1. Induksi model mencit nefritis lupus dengan pristane	74
V.1.2. Intervensi model mencit nefritis lupus dengan metformin.....	82
V.2. Pembahasan	99
V.2.1. Model mencit nefritis lupus terinduksi pristane sebagai basis model penyakit pada manusia	99
V.2.2. Pengaruh intervensi metformin oral dan peritoneal terhadap model mencit nefritis lupus	108

VI. Kesimpulan dan Saran	134
VI.1. Kesimpulan.....	134
VI.2. Saran	135
Referensi.....	136
Lampiran	152

Daftar Gambar

Gambar 1 : Mekanisme biomolekular aktivasi sitokin pro-inflamatorik dalam patogenesis LES	11
Gambar 2 : Spiral progresivitas penyakit pada LES.....	12
Gambar 3 : Hubungan antara polimorfisme genetik, alel risiko, patogenesis LES dan kerusakan organ target.....	13
Gambar 4 : Keterkaitan berbagai faktor dalam menyebabkan kerusakan organ pada LES	15
Gambar 5 : Keseimbangan antara sel T autoreaktif dan Treg memainkan peranan penting dalam terjadinya autoimunitas pada LES	18
Gambar 6 : Peranan masing-masing mediator inflamasi mengantukan keseimbangan jalur Th1 dan Th2 dalam proses inflamasi	22
Gambar 7 : Peranan Interferon Tipe I dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik.....	26
Gambar 8 : Peranan IL 2 dalam patogenesis LES melalui disregulasi sel T-reg	29
Gambar 9 : Supresi IL-4 pada pasien LES menyebabkan keseimbangan beralih ke sel Th1	30
Gambar 10 : Peranan Th17 dalam patogenesis LES	34
Gambar 11 : Tinjauan jalur-jalur molekular stres oksidatif dan hubungannya dengan patologi LES	37
Gambar 12 : Gangguan stress oksidatif pada sel T dan fagosit, serta hubungannya dengan jaringan sinyal proinflamatorik interselular pada LES	38
Gambar 13 : Pengaruh program metabolisme terhadap pemilihan subset sel T CD4+ dan hubungannya dengan mTOR	40
Gambar 14 : Blokade mTORC1 dengan Rapamicin mengembalikan keseimbangan T regulator dan T efektor	42
Gambar 15 : Jalur regulasi metabolisme dan pertumbuhan sel melalui mTOR dan AMPK	45

Gambar 16: Pemberian metformin pada studi in vitro memberikan hasil penurunan IFN-alfa yang dipengaruhi dosis	46
Gambar 17: Terapi mencit LES selama 1 bulan dengan metformin dan 2DG berhasil mengembalikan metabolisme dan fenotip penyakit.....	47
Gambar 18: Model mencit untuk studi patogenesis dan terapi pada LES.....	52
Gambar 19: Perbandingan hasil patologi ginjal dengan pewarnaan H&E untuk BALB/c normal dan terinduksi pristane	80
Gambar 20: Rasio perbandingan IL-10/IL-2 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	87
Gambar 21: Rasio perbandingan IL-4/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	88
Gambar 22: Rasio perbandingan IL-2/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	89
Gambar 23: Rasio perbandingan IL-10/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	90
Gambar 24: Rasio perbandingan IL-2/IL-17 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	91
Gambar 25: Rasio perbandingan IL-10/IL-17 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	92
Gambar 26: Rasio perbandingan FOXP3/IL-17 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.....	94
Gambar 27: Analisis korelasi kadar IL-17 sebelum dan sesudah terapi	

metformin dikaitkan dengan perubahan ekspresi mRNA FOXP3	95
Gambar 28: Rasio perbandingan FOXP3/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal	96
Gambar 29: Analisis korelasi kadar IFN-gamma sebelum dan sesudah terapi metformin dikaitkan dengan perubahan ekspresi mRNA FOXP3	97
Gambar 30: Analisis korelasi kadar IL-2, IL-4 dan IL-10, sebelum dan sesudah terapi metformin dikaitkan dengan perubahan ekspresi mRNA FOXP3	98
Gambar 31: Hasil pemeriksaan patologi anatomi ginjal dengan pewarnaan H&E untuk BALB/c normal, terapi dengan kontrol NS, metformin oral dan metformin intraperitoneal.....	99

Daftar Tabel

Tabel 1 : Fungsi Interleukin-17	33
Tabel 2 : Perbandingan Kadar IFN-Gamma pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal.....	75
Tabel 3 : Perbandingan Kadar IL-17 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal.....	76
Tabel 4 : Perbandingan Kadar IL-2 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal.....	77
Tabel 5 : Perbandingan Kadar IL-10 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal.....	78
Tabel 6 : Perbandingan Kadar IL-4 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal.....	78
Tabel 7 : Perbandingan Besaran Ekspresi mRNA FOXP3 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal.....	79
Tabel 8 : Perbandingan Kadar IFN-gamma pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin.....	82
Tabel 9 : Perbandingan Kadar IL-17 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin.....	83
Tabel 10 : Perbandingan Kadar IL-2 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin.....	84
Tabel 11 : Perbandingan Kadar IL-10 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin.....	85
Tabel 12 : Perbandingan Kadar IL-4 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin.....	86
Tabel 13 : Perbandingan Besaran Ekspresi mRNA FOXP3 Pada Sebelum Dan Sesudah Terapi Dengan Metformin.....	93

Daftar Istilah

2-DG	: 2-DeoxyGlucose
AICD	: Activation Induced Cell Death
AMPK	: Adenosine Mono Phosphate Kinase
Anti-dsDNA	: Antibodi Anti <i>double stranded</i> Deoxyribonucleic Acid
APC	: <i>Antigen Presenting Cells</i>
BAFF	: <i>B cell Activating Factor</i>
BlySs	: <i>B-lymphocyte stimulator</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
GBM	: <i>Glomerular Basement Membrane</i>
IFN	: Interferon
IL	: Interleukin
IRF	: <i>Interferon Regulating Factor</i>
LES	: Lupus Eritematosus Sistemik
MRL/lpr	: Lupus Prone Mice / Mencit Rentan Lupus
mTOR	: <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NAC	: N-acetylcysteine
NK	: <i>Natural Killer</i>
pDC	: <i>Plasmacytoid Dendritic Cell</i>
PDH	: <i>Pyruvate Dehydrogenase</i>
PDHK	: <i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase</i>
SOR	: Senyawa Oksigen Reaktif
STAT4	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 4</i>
T-eff	: T effector
TGF	: <i>Transforming Growth Factor</i>
Th	: T-helper

TLR : *Toll Like Receptors*
TNF : Tumor Necrosis Factor
T-reg : T regulator

I. Pendahuluan

I.1. Latar Belakang

Lupus eritematosus sistemik (LES) merupakan penyakit multisistem yang kompleks, yang ditandai dengan kerusakan organ target dan komorbiditas terkait dengan produksi antibodi antinuklear dan gangguan keseimbangan sistem imunitas bawaan. Saat ini perkembangan penelitian mengenai patogenesis dari LES mengungkapkan bahwa, ada banyak sistem dan jalur yang terlibat dalam terjadinya gambaran penyakit LES. Kompleksitas patogenesis lupus ini menyulitkan tatalaksana yang komprehensif dan efektif.(Choi et al., 2012; Crispín et al., 2010; Liu and Davidson, 2012)

Saat ini tatalaksana LES bertumpu pada pemberian obat immunosupresan atau steroid, dengan harapan penekanan sistem imun akan membuat aktivitas penyakit ini akan berkurang. Strategi pengobatan ini pada banyak kasus memberikan hasil yang baik, namun demikian ada kasus-kasus yang resisten terhadap strategi pengobatan ini. Hal ini memicu para peneliti untuk melihat kembali strategi pengobatan LES dengan menggunakan prinsip penekanan imunitas tubuh. Terlebih lagi data-data klinis banyak menunjukkan efek samping dari penekanan sistem imun berlebihan, di mana infeksi dan komorbid terkait merupakan salah satu penyebab kematian utama pada pasien LES.(Lateef and Petri, 2012; Pateinakis and Pырpasopoulou, 2013)

Studi-studi patogenesis dan eksperimental terbaru terhadap hewan coba dan manusia menunjukkan bahwa, pada LES nampaknya bukan penekanan terhadap aktivitas sistem imun yang menjadi kunci penanganan yang efektif. Beberapa studi menunjukkan bahwa, gangguan keseimbangan dari sel T regulator dan T autoreaktif merupakan salah satu mekanisme utama dari timbulnya manifestasi klinis LES.(Dolff et al., 2011; Kleczynska et al., 2011; Mardani et al., 2018; Yang et al., 2011) Gangguan dari keseimbangan sel T ini kemudian menyebabkan terjadinya pembentukan antibodi antinuklear oleh sel limfosit B dan kerusakan organ target yang mengikutinya.

Studi-studi terhadap hewan coba juga menunjukkan peranan paparan lingkungan terhadap manifestasi LES, di mana stres oksidatif yang disebabkan oleh paparan terhadap senyawa oksigen reaktif (SOR) dapat menimbulkan gangguan keseimbangan dari sel Treg dan T-autoreaktif.(Lai et al., 2015; Tsai et al., 2011) Paparan terhadap SOR ini mengganggu keseimbangan potensial di mitokondria yang kemudian mengaktifkan jalur regulasi metabolisme mTOR, salah satunya dengan menghambat AMPK, dan menghasilkan peningkatan jumlah sel T-autoreaktif dibandingkan dengan Treg.(Nath et al., 2009; Yin et al., 2016, 2015)

Metformin pada beberapa studi menunjukkan kemampuan untuk regulasi jalur AMPK/mTOR dan berhasil meregulasi autoimunitas, inflamasi, karsinogenesis dan proses penuaan terkait jalur tersebut.(Chen et al., 2017; Chung et al., 2017; Duan et al., 2019; Rena et al., 2017) Studi-studi yang menggunakan metformin pada model hewan coba artritis reumatoid dan ensefalitis autoimun juga telah

menunjukkan kemampuan obat tersebut untuk menekan aktivitas autoimunitas terkait.(Kang et al., 2013; Nath et al., 2009; Son et al., 2014) Hasil ini menunjukkan kemampuan potensial metformin sebagai salah satu terapi untuk LES, namun demikian sampai saat ini belum ada studi yang secara langsung mempelajari aktivitas metformin untuk LES.

I.2. Rumusan Masalah

1. Apakah metformin mempunyai pengaruh terhadap aktivitas penyakit pada model hewan coba LES?
2. Apakah metformin mempunyai pengaruh terhadap keseimbangan sel T autoreaktif dan T regulator pada model hewan coba LES?
3. Apakah metformin mempunyai pengaruh terhadap kerusakan ginjal terkait nefritis lupus pada model hewan coba LES?

I.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Diketuinya patomekanisme biomolekular pengaruh Metformin terhadap kerusakan ginjal pada hewan model LES.

Tujuan Khusus

- Membuktikan Metformin dapat meningkatkan mRNA FOXP3 dan hubungannya dengan skor histopatologi ginjal pada hewan model LES

- Membuktikan Metformin dapat menurunkan rasio IL-2/IL-17 dan hubungannya dengan skor histopatologi ginjal pada hewan model LES
- Membuktikan Metformin dapat menurunkan rasio IL-4/IFN-gamma dan hubungannya dengan skor histopatologi ginjal pada hewan model LES
- Membuktikan Metformin dapat memperbaiki skor histopatologi ginjal pada hewan model LES
- Membuktikan Metformin parenteral mampu memberikan hasil skor histopatologi ginjal yang lebih baik dibandingkan oral pada hewan model LES

I.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari Segi Keilmuan

Metformin merupakan inhibitor jalur mTOR yang merupakan *common pathway* metabolisme selular, jalur ini mempengaruhi fungsi sel mulai dari proliferasi, transkripsi sampai apoptosis. Temuan dari studi ini dapat membantu membuktikan bahwa disregulasi metabolisme sel T dan sel B merupakan salah satu mekanisme kunci LES. Selain itu juga membuktikan apabila kita mampu memperbaiki disregulasi metabolisme tersebut maka perbaikan luaran LES akan dapat dicapai dengan lebih baik.

Manfaat dari Segi Klinis

Saat ini pengobatan LES masih berpusat pada penekanan sistem imun dengan imunosupresi dan kortikosteroid, yang banyak menghasilkan efek samping seperti infeksi dan osteoporosis. Pembuktian manfaat metformin, sebuah obat dengan riwayat panjang dan efek samping minimal, dapat membuka paradigma baru dalam pengobatan LES. Studi ini juga membandingkan efek metformin oral dan parenteral, dengan demikian apabila terbukti parenteral menghasilkan luaran klinis lebih baik dapat membuka cara baru administrasi metformin untuk kasus-kasus LES berat.

II. Tinjauan pustaka

II.1.Epidemiologi Lupus Eritematosus Sistemik

Epidemiologi lupus global

Angka prevalensi kasus LES secara internasional memiliki angka yang bervariasi dan memiliki rentang angka yaitu sekitar 1,500,000 kasus. Beberapa penelitian menuliskan angka prevalensi LES definitif sebanyak 161,000 kasus dan LES sebanyak 322,000 kasus.(Helmick et al., 2008; Lawrence et al., 2008) Angka insidensi secara internasional sulit untuk didapatkan karena sulitnya dalam diagnosis dan tanda gejala yang tidak spesifik. Geografik dan distribusi ras mempengaruhi prevalensi LES. Angka prevalensi lebih tinggi pada etnis Asia, Afro-Amerika, Afro-Karibbean, dan Hispanik-Amerika dibandingkan Amerika, dan US. Jenis kelamin perempuan lebih dominan dibandingkan laki-laki, terutama wanita usia produktif dengan ratio 7 : 1. Sebanyak 65% kasus LES memiliki onset antara usia 16 sampai 55 tahun, dan sebanyak 20% memiliki onset usia kurang dari 16 tahun, dan 15% memiliki onset usia lebih dari 55 tahun.(Danchenko et al., 2006; Pons-Estel et al., 2010, 2017b)

Angka insiden di Asia-Pasifik mencapai 0.9 sampai 3.1 setiap 100,000 kasus dengan angka insiden di Australia lebih tinggi dibandingkan Asia (45.3 banding 4.3 – 37.7). Kasus LES di Australia lebih banyak ditemukan pada suku Aborigin (angka prevalensi 19.3), dan di Asia lebih banyak ditemukan pada etnis Cina (angka insidensi 3.1) dan Jepang (angka insidensi 0.9 – 2.8 dan angka prevalensi

4.3 – 37.7). Angka insiden lebih tinggi pada wanita dibandingkan laki – laki (1.4 – 5.4 banding 0.4 – 0.8).(Jakes et al., 2012)

Menurut penelitian Jakes dkk. manifestasi klinis pada LES dewasa yang sering ditemukan adalah artritis non-erosif (angka persentase 31 – 80%), *malar rash* (angka persentase 48 – 63%), dan gangguan ginjal (angka persentase 30 – 82%). Hasil laboratorium LES dewasa yang sering ditemukan adalah *antinuclear antibody* (angka persentase 93 – 100%) , anti dsDNA (angka persentase 51 – 86%) dan kelainan pada darah (angka persentase 19 – 61%).(Jakes et al., 2012)

Hasil ini sebanding dengan beberapa negara lain, kecuali angka persentase kasus gangguan pada ginjal lebih rendah terjadi pada New Zealand (14% kasus saat didiagnosis), Australia (30% kasus selama perjalanan penyakit) dibandingkan Asia (21 – 65% kasus saat didiagnosis dan 40 – 82% kasus selama perjalanan penyakit). (Jakes et al., 2012)

Epidemiologi lupus di Indonesia

Di Indonesia belum terdapat data epidemiologi mengenai penyakit LES secara tepat. Berdasarkan data Yayasan Lupus Indonesia jumlah orang dengan lupus (Odapus) meningkat dari tahun 2004 sampai akhir tahun 2007 yaitu tercatat 8018 orang. Data tahun 2002 di RSUPN Cipto Mangunkusumo (RSCM) Jakarta didapatkan 1.4% kasus LES dari total kunjungan pasien di poliklinik Reumatologi Penyakit Dalam. Sementara di RS Hasan Sadikin Bandung terdapat 291 pasien LES atau 10.5% dari total pasien yang berobat ke poliklinik reumatologi selama tahun 2010.(Kementrian Kesehatan RI, 2016)

II.2.Patogenesis biomolekular Lupus Eritematosus Sistemik

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun sistemik yang memiliki karakteristik dimana terjadi produksi autoantibodi yang menyerang asam nukleat dan proteinnya sehingga menyebabkan hilangnya toleransi. Sistem imun bawaan memiliki peranan dalam pathogenesis LES yang menyebabkan kerusakan jaringan dan aktivasi dari autoreaktif sel T dan B yang menghasilkan autoantibodi yang patogen.(Choi et al., 2012)

Interaksi antara genetik yang berperan dan faktor lingkungan menyebabkan sistem imun yang abnormal. Respon sistem imun yang abnormal yaitu aktivasi dari sistem imun bawaan (sel dendritik) oleh CpG DNA, DNA dalam kompleks imun, dan RNA di dalam antigen. Respon yang lain adalah menurunkan batas ambang aktivasi sel imun adaptif (limfosit B dan T); ketidakseimbangan regulasi dan inhibisi dari sel T CD4+ dan CD8+; dan menurunkan pembersihan sisa sel apoptosis dan kompleks imun. Antigen, autoantibodi dan kompleks imun bertahan dalam waktu yang lama dan meningkatkan proses inflamasi. Selain sistem imun yang meningkat, terjadi peningkatan sekresi faktor – faktor inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α dan Interferon (IFN) 1 dan 2, dan *B cell – driving cytokines B lymphocyte stimulator* (BLyS) dan Interleukin (IL) 10. Tetapi, sel T dan *Natural Killer* (NK) gagal memproduksi IL – 2 dan *Transforming growth factor* (TGF) untuk regulasi sel T CD4+ dan CD8+. Hasil dari ketidakseimbangan ini yaitu produksi autoantibodi patogen dan kompleks imun yang menyerang jaringan.(Bertsias George et al, 2012; Finzel et al., 2018; Mok and Lau, 2003)

Kompleks imun yang terbentuk memiliki potensi patogenesis yang berbeda – beda, bergantung pada karakteristik dari antibodi seperti spesifisitas, afinitas, dan kemampuan untuk mengaktivasi komplemen – komplemen dan mediator inflamasi lain. Potensi lainnya seperti karakteristik antigen (ukuran dan kemampuan), kemampuan antigen bersama komplemen berikatan dengan reseptor CR1 di sel darah merah, dan fungsi hati dan limpa dalam membersihkan kompleks imun menurun.(Moulton et al., 2017; Nowling and Gilkeson, 2011)

Gangguan yang terjadi pada ginjal adalah deposisi dari kompleks imun di subendotel, mesangium, atau ruang subepitel. Kompleks imun yang terdiri dari antigen nukleus, *complement-fixing* IgG antibodi, dan antibodi DNA terdeposit di glomerulus. Deposisi kompleks imun terjadi pada *glomerular basement membrane* (GBM) dimana afinitas sangat tinggi. Setelah terdeposit di mesangial atau subendotel, kompleks imun mengaktifasi sistem komplemen dan faktor kemotaktik sehingga sel leukosit dan mononuklear datang dan menginfiltrasi. Proses deposisi kompleks imun kronik, menyebabkan inflamasi kronik, nekrosis fibrinoid, jaringan parut, dan penurunan fungsi ginjal.(Schwartz et al., 2014)

Di dalam ginjal, kompleks imun juga mengaktivasi dari *Toll-like receptors* (TLRs) dalam makrofag dan sel dendritik. Kompleks imun *nucleic acids* mengaktivasi dari endothelium glomerular, sel mesangial, dan makrofag untuk memproduksi sitokin – sitokin proinflamasi dan IFN- α dan IFN- β . Fungsi secara signifikan dari IFN masih tidak dapat dipahami secara jelas, tetapi dapat berkontribusi kerusakan ginjal dan membentuk struktur *tubuloreticular* pada

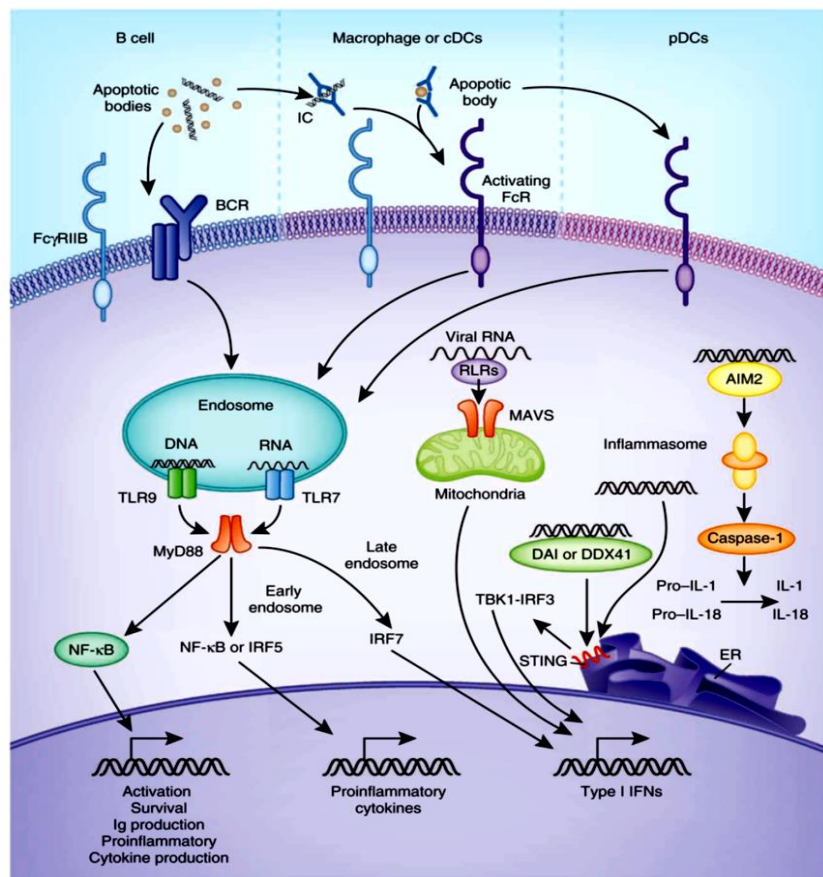
ginjal. Sel T sitotoksik, sel Th17, dan sel B menginfiltrasi pada lupus nefritis.(Lech and Anders, 2013)

Pasien dengan LES mempunyai antibodi sesuai dengan *cell-surface antigens* dengan implikasi terhadap beberapa organ seperti lupus nefritis, vaskulitis, trombositopenia, sel darah merah, sel darah putih, dan gangguan pada otak. Antibodi lain yang terbentuk adalah antibodi kompleks fosfolipid-beta-2 glikoprotein I. Beta-2-glikoprotein I memiliki efek antikoagulan, dan fungsi ini akan menurun karena pembentukan antibody. Ini menjelaskan antibodi antifosfolipid menjadi etiologi trombosis arteri dan vena.(Cervera et al., 2002; Pons-Estel et al., 2017a)

Pengenalan asam nukleat oleh sel imun bawaan merupakan salah satu pencetus pertama produksi sitokin pada LES. Asam nukleat atau partikel apoptotik dapat difagosit oleh sel B melalui BCR dan kompleks imun mengandung antigen ini dapat diambil oleh monosit, sel dendritik myeloid dan pDC melalui internalisasi dan pengenalan termediasi-FcR. Dalam endosom, DNA dan RNA berinteraksi dengan TLR9 dan TLR7. RNA viral juga dapat dihantarkan ke endosom oleh pembentukan autofagosom di pDC. Ligasi TLR menyebabkan rekrutmen protein adaptor MyD88, yang mengaktifkan kaskade sinyal NKF-KB di sel B dan menyebabkan aktivasi dan kesintasan sel B, selain berbagai fungsi efektor lainnya. Dalam pDC, rekrutmen MyD88 memicu aktivasi jalur sinyal termediasi IRF7, yang kemudian menginisiasi produksi IFN tipe I. Pada sel tipe lainnya,

rekrutmen My88 pada endosom akhir menyebabkan produksi sitokin inflamatorik.(Ban et al., 2016; Nickerson et al., 2010; Teichmann et al., 2013)

DNA dan RNA sitosolik dapat dikenali oleh sensor yang, melalui adaptor, menghasilkan produksi IFN tipe I. DNA sitosolik juga dapat dikenali oleh AIM 2, yang mengaktifasi kaspase-1, menyebabkan terjadinya pemecahan proteolitik pro-IL1 dan pro-IL18 ke dalam bentuk aktif. Kompleks imun dapat memberikan sinyal secara langsung melalui aktivasi dan inhibisi FcR yang ekspresi relatifnya dalam permukaan sel bervariasi tergantung dari status aktivasi sel (gambar 1).(Dinarello, 2007)

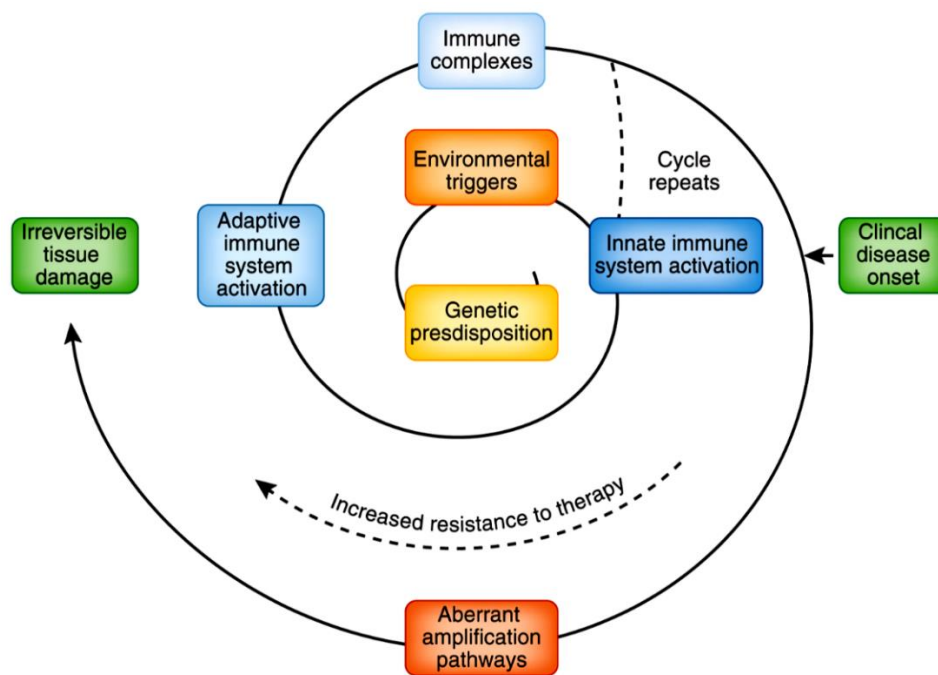


Gambar 1. Mekanisme biomolekular aktivasi sitokin pro-inflamatorik dalam patogenesis LES.

(Liu and Davidson, 2012)

Peranan Genetik dalam Patogenesis LES

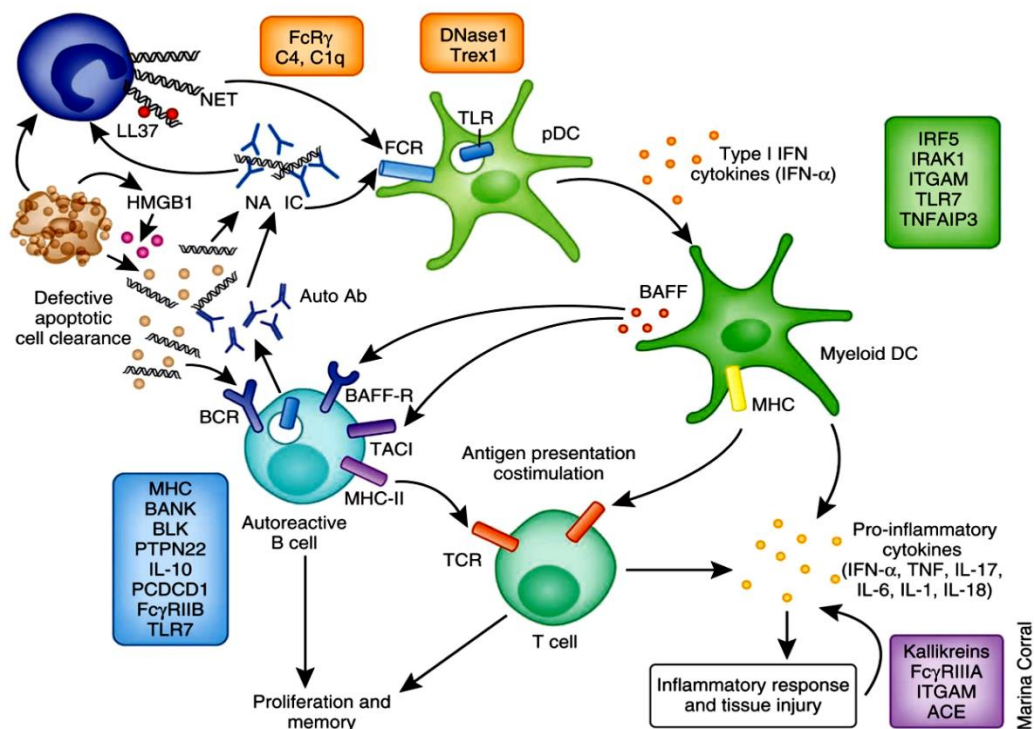
Individu dengan polimorfisme genetik tertentu telah teridentifikasi mempunyai peningkatan risiko menderita LES dibandingkan dengan populasi umum. Pemicu lingkungan juga diduga berkontribusi terhadap inisiasi dan perjalanan penyakit LES. Aktivasi sistem imun bawaan menyebabkan terjadinya peningkatan presentasi antigen ke sel T dan pelepasan sitokin-sitokin proinflamatorik seperti IFN tipe I. Perubahan-perubahan ini memfasilitasi aktivasi sistem imun adaptive dan pembentukan autoantibodi.



Gambar 2. Spiral progresivitas penyakit pada LES. (Liu and Davidson, 2012)

Autoantibodi akan berikatan asam nukleat atau debris selular untuk membentuk kompleks yang menyebabkan terjadinya stimulasi lanjutan terhadap sel-sel imun bawaan melalui TLR. Sel B autoreaktif akan bertindak sebagai sel presentasi-

antigen untuk rekrutmen sel T autoreaktif yang lebih banyak lagi. Lingkaran umpan balik positif ini melibatkan sistem imun bawaan dan adaptif akan mengamplifikasi klon limfosit autoreaktif selama masa-masa pre klinis LES. Awitan manifestasi klinis dikaitkan dengan inflamasi sistemik dan kerusakan terhadap organ target, yang selanjutnya akan menyebabkan terjadinya amplifikasi aktivasi sistem imun lagi. Lupus selanjutnya akan semakin resisten terhadap terapi modulasi imun dan berpotensi lanjut ke kerusakan jaringan ireversibel (gambar 2).



Gambar 3. Hubungan antara polimorfisme genetik, alel risiko, patogenesis LES dan kerusakan organ target. (Liu and Davidson, 2012)

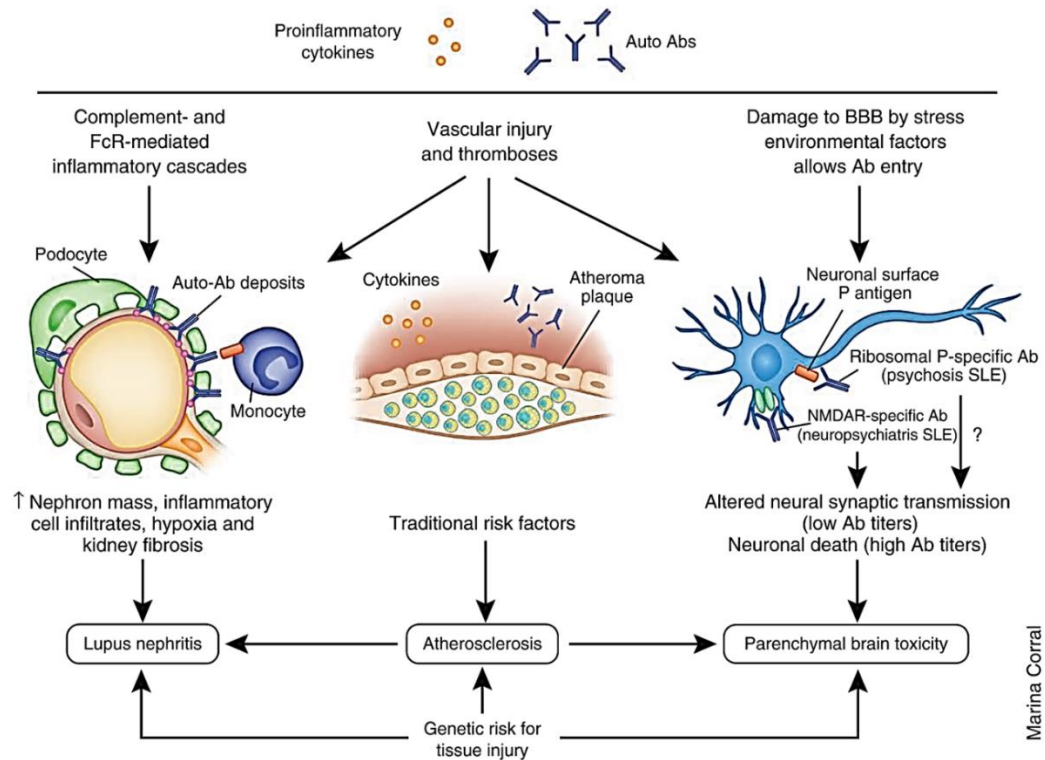
Berbagai variasi genetik telah dikaitkan dengan suseptibilitas terhadap LES. Polimorfisme pada gen yang terlibat dalam bersihan imun partikel-partikel apoptotik dan kompleks imun mengandung asam nukleat dapat menginduksi

aktivasi berlebihan sel pDC dan B autoreaktif, menyebabkan produksi IFN tipe I dan ekspansi sel-sel efektor autoreaktif. Polimorfisme gen yang terlibat dalam imunitas bawaan mengatur induksi dan juga respons dari IFN tipe I. Fungsi abnormal sel imun bawaan kemudian mengaktifasi sistem imun adaptif. Sistem imun bawaan dan adaptif keduanya memainkan kontribusi terjadinya respons inflamasi dan kerusakan jaringan.

Kelompok ketiga gen polimorfisme utama melibatkan pengenalan ligan, sinyal reseptor dan berbagai fungsi imunologis lainnya dari sel imun bawaan. Disregulasi sistem imun adaptif menyebabkan terjadinya kehilangan toleransi dan produksi autoantibodi, yang kemudian berikatan dengan antigen nuklear dan mengaktifasi sel imun bawaan, menyebabkan terjadinya lingkaran umpan balik positif yang memperberat proses patogenik LES. Alel polimorfik juga mempengaruhi derajat kerusakan organ (gambar 3). (Guerra et al., 2012; Mohan and Putterman, 2015; Moulton et al., 2017)

Mekanisme terjadinya kerusakan organ dalam LES

Kerusakan organ dalam LES disebabkan oleh aktivasi sistem imun dan inflamasi, namun demikian juga dipengaruhi oleh faktor-faktor genetik dan lingkungan non-imunologik. Autoantibodi dan mediator-mediator inflamatorik dalam sirkulasi memicu terjadinya kerusakan jaringan di organ target melalui berbagai macam mekanisme (gambar 4).



Gambar 4. Keterkaitan berbagai faktor dalam menyebabkan kerusakan organ pada LES. (Liu and Davidson, 2012)

Dalam ginjal, deposisi kompleks imun menginduksi kaskade komplemen dan inflamasi termidiasi FcR yang menyebabkan terjadinya aktivasi atau kerusakan dari sel residen ginjal, yang kemudian juga melepaskan mediator-mediator inflamasi yang merekrut lebih banyak lagi sel inflamatorik. Kerusakan ginjal jangka panjang disebabkan oleh inflamasi berkelanjutan, kerusakan vaskular disebabkan mediator lokal dan sistemik, hipoksia dan fibrosis. Nefritis terjadi pada 50% pasien dewasa dan 80% pasien pediatrik dengan LES, dan laju penyakit ginjal tahap akhir oleh karena LES nampaknya meningkat di Amerika Serikat.

Dalam sistem kardiovaskular, autoantibodi dan mediator inflamatorik solubel menyebabkan kerusakan endotel vaskular dengan menginduksi apoptosis atau

aktivasi endotel. Rekrutmen monosit ke lokasi kerusakan jaringan juga penting untuk terjadinya plak. Faktor-faktor pro-aterogenik lainnya ditambah dengan faktor risiko tradisional termasuk LDL teroksidasi, antibodi terhadap lipid teroksidasi dan HDL proinflamatorik. Risiko 10 tahun kejadian serangan jantung atau stroke meningkat 7,7-17 kali lipat pada pasien LES dibandingkan individu sehat.

Pada sistem saraf pusat, autoantibodi dapat masuk ke otak pada saat sawar darah otak mengalami gangguan oleh karena mediator inflamatorik dan faktor lingkungan, seperti asap rokok atau karena pelepasan neurotransmitter stres. Setelah terdeposisi di otak, autoantibodi dapat menginduksi apoptosis neuron atau merubah transmisi sinaptik neuronal. Kerusakan neurologis juga dapat muncul oleh karena penyebab sekunder, seperti trombosis dan infeksi. Berbagai macam perubahan patogenik ini menyebabkan banyaknya manifestasi neuropsikiatrik LES, termasuk disfungsi kognitif progresif. Manifestasi neuropsikiatrik muncul cukup awal dalam proses penyakit LES dan dapat mempengaruhi sampai 40% pasien.(Chiche et al., 2014; Gatto et al., 2013; Tsokos et al., 2016)

II.3.Peranan limfosit dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Lupus eritematosus sistemik (LES) adalah suatu penyakit autoimun yang terutama mengenai wanita dan dapat timbul dengan pelbagai manifestasi sesuai dengan keterlibatan organ. Gangguan sistem imun, sebagai akibat dari pengaruh genetik, hormonal dan faktor-faktor lingkungan saling berinteraksi dalam menyebabkan terjadinya kerusakan organ. (Liu and Davidson, 2012) Beberapa temuan-temuan

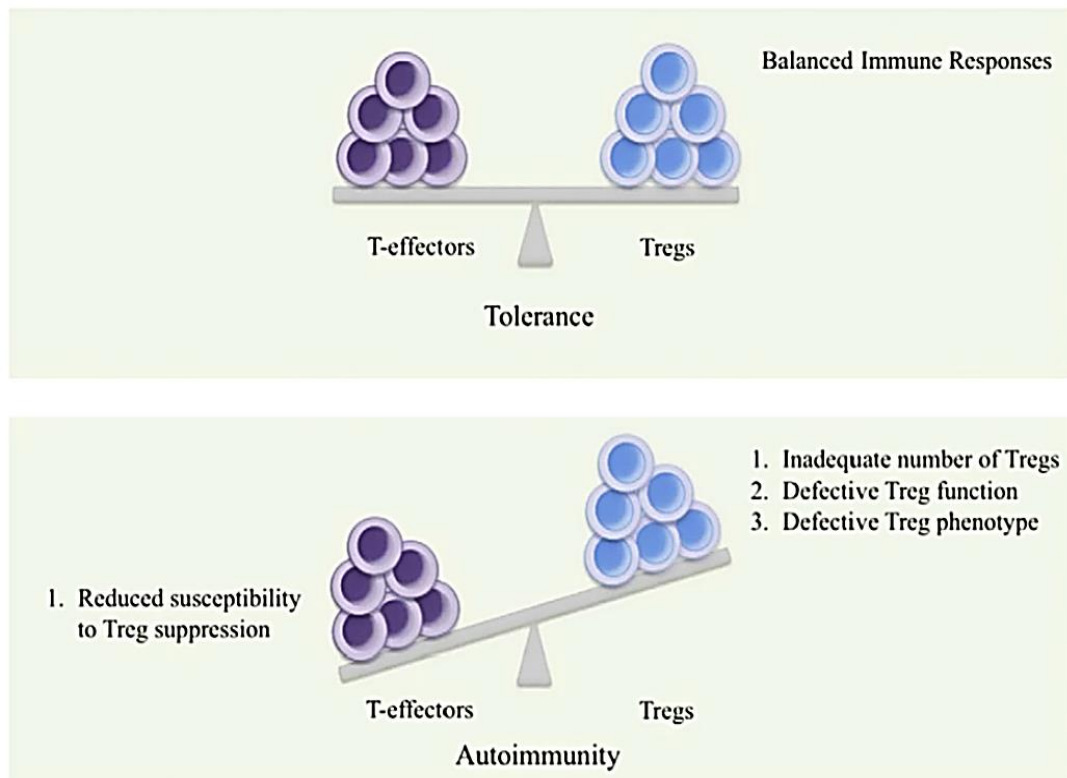
terbaru telah membantu mengembangkan pengertian kita tentang LES dan merubah model patogenik terkini.

Peranan limfosit T dalam patogenesis lupus eritematosus

Gangguan respons sistem imun bawaan memainkan peranan penting dalam patogenesis LES, berkontribusi terhadap kerusakan jaringan dan juga terhadap aktivasi sel T dan B autoreaktif. Sel T pada lupus menyebabkan gangguan melalui mekanisme terkait kontak dan juga melalui pelepasan sitokin. Salah satu sitokin penting yang dihasilkan sel Th1 adalah interferon gamma (IFN- γ), yang memainkan peranan penting dalam produksi antibodi antinuklear pada model-model lupus pada mencit. Studi pada pasien dengan LES atau penyakit terkait telah menunjukkan bahwa sel-sel Th 17 memainkan peranan dalam perkembangan penyakit pada sebagian pasien. Subset sel T regulator juga nampaknya memainkan peranan dalam modulasi toleransi sel-T pada pasien lupus. (Choi et al., 2012)

Gangguan keseimbangan homeostasis sel T memainkan peranan penting dalam perkembangan LES dan saat ini peranan penting dari sel-sel Th17 dan T regulator (Treg) tengah disoroti. Sel Th17 diidentifikasi oleh kemampuannya untuk memproduksi IL-17, dan awalnya dianggap sebagai variasi dari sel Th1, namun demikian penelitian lanjutan mengungkapkan asal yang berbeda. Interleukin-17 yang dihasilkan oleh sel ini dapat menghasilkan inflamasi pada lupus dengan mengganggu respons selular dan humoral. Sedangkan sel Treg memainkan peranan untuk menekan aktivitas limfosit autoreaktif dan mencegah terjadinya

respons imun yang terganggu terhadap sel tubuh sendiri (gambar 1). (Abou Ghanima et al., 2012, Chavele and Ehrenstein, 2011, Shin et al., 2011)



Gambar 5. Keseimbangan antara sel T autoreaktif dan Treg memainkan peranan penting dalam terjadinya autoimunitas pada LES. (Chavele and Ehrenstein, 2011), (Kaplan, 2013)

Peranan sel limfosit B dalam patogenesis lupus eritematosus

Autoantibodi merupakan pemain penting dalam terjadi kerusakan organ target pada pasien-pasien dengan LES, namun demikian sel limfosit B dapat berkontribusi terhadap patogenesis lupus melalui beberapa mekanisme lain. Sebagai contoh, mencit rentan lupus (MRL/lpr) yang dibuat untuk mengalami defisiensi sel B menghasilkan gambaran klinis penyakit yang jauh lebih ringan.

Mencit-mencit ini selain tidak memiliki autoantibodi, ternyata juga mengalami penurunan dramatis dalam aktivasi sel T. Selain itu, mencit-mencit MRL/lpr dengan ekspresi imunoglobulin mutan, meskipun tidak mampu membuat autoantibodi, tetap mengalami nefritis dan vaskulitis oleh karena adanya aktivasi sel T. Temuan-temuan di atas menunjukkan bahwa sel B dapat berkontribusi terhadap terjadinya lupus dengan cara-cara yang independen dari pembentukan autoantibodi. Peranan sel B sebagai sel pengantar antigen yang memerantarai aktivasi sel T pada lupus nampak dari studi yang menunjukkan defisiensi sel B menyebabkan menurunnya aktivasi sel T CD4+ dan CD8+.(Gatto et al., 2013; Pateinakis and Pырpasopoulou, 2013)

II.4.Peranan neutrofil dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Beberapa fungsi neutrofil menjadi abnormal pada Lupus Eritematosus Sistemik (LES). Pada LES neutrofil memiliki kapasitas fagositosis menurun, tetapi kemampuan agregasi neutrofil meningkat. Neutrofil lupus teraktivasi di intravaskuler oleh autoantibodi dan nukleosom dan cenderung untuk beragregasi. Kenaikan jumlah neutrofil yang apoptosis juga dapat ditemukan di LES. Anti dsDNA dan anti – SS/B dapat mengatur kematian dan fungsi sel neutrofil. Neutrofil pada LES juga tidak dapat dikenali oleh C1q/calreticulin/CD-91 dalam proses apoptosis.(Kaplan, 2013) Beberapa penelitian menemukan *neutrophil extracellular traps* dimana terdiri dari DNA, histon, dan protein neutrofil yang berguna untuk menangkap mikroorganisme yang diyakini menjadi patogenesis dari LES.(Kaplan, 2011)

II.5. Peranan sel-sel imunitas *innate* dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Peranan Sel Dendritik dalam patogenesis Lupus Eritematosus sistemik

Dalam keadaan fisiologis, apoptosis sel diinterpretasikan oleh sistem imun sebagai signal anti inflamasi. Sel dendritik mengambil fragmen – fragmen sel apoptosis dan menekan dari reaksi dari sel T terhadap autoantigen. Gangguan pada apoptosis sel atau pembersihan sisa–sisa sel apoptosis merupakan salah satu dari patogenesis dari LES. (Crispin et al., 2010)

Penelitian yang menggunakan tikus untuk mengetahui peran dari sel dendritik dalam pathogenesis LES. Penelitian dilakukan dengan cara memindahkan sel dendritik dari donor ke resepien tikus sehingga menyebabkan hilangnya toleransi di dalam tubuh tikus sehingga munculnya anti-DNA dan autoantibodi *anticardiolipin*. Penelitian lain oleh Chen dkk, menunjukkan bahwa tikus dengan kemampuan sel dendritik untuk apoptosis yang rendah menunjukkan akumulasi sel dendritik dan menghambat aktivasi limfosit dan aktivasi autoimunitas. (Kaplan, 2013)

Penelitian juga menunjukkan peran sel dendritik dalam LES yaitu mensekresi sitokin proinflamasi seperti IFN- α . Penelitian lebih lanjut menemukan kompleks imun pada LES dapat menstimulasi *plasmacytoid* sel dendritik (pDC). Peran TLR diaktivasi oleh pDC untuk menginduksi produksi IFN- α . IFN- α menginduksi sel B untuk memproduksi antibodi IgG. Sitokin ini juga menaikkan regulasi BAFF oleh

monosit dan sel dendritik, dimana membantu sel B berdiferensiasi menjadi *plasmablasts*. Pada akhirnya, sistem imun bawaan dan adaptif berjalan bersama yang menyebabkan autoantibodi meningkat. (Pathak and Mohan, 2011)

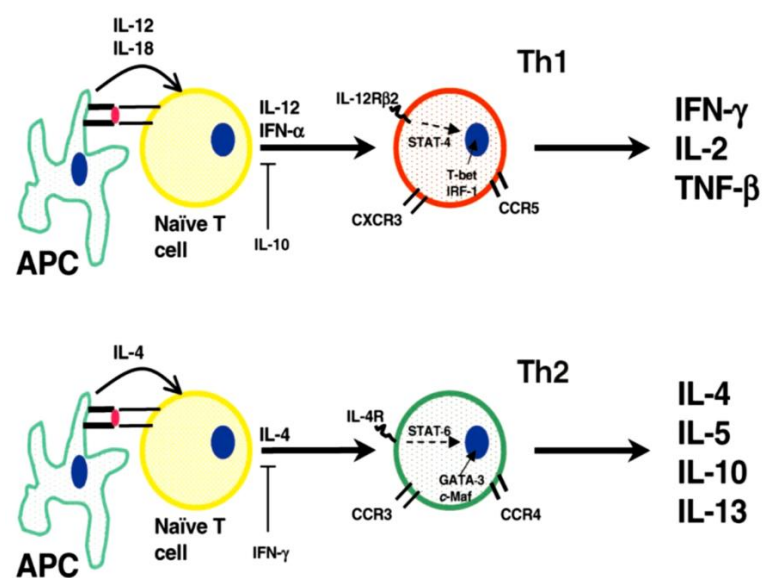
Peranan Makrofag dalam patogenesis Lupus Eritematosus sistemik

Pada pasien LES ditemukan makrofag/ monosit dimana kapasitas fagositosis material dari sel apoptosis menurun, dan jumlah makrofag di eksudat menurun. Karena kapasitas fagositosis menurun, menyebabkan proses autoimunitas meningkat. Beberapa penelitian menemukan pada tikus yaitu kurangnya *myeloid cell receptors, Tyro3, Axl, dan Mer receptor tyrosine kinase*. Dimana penelitian menemukan level *Tyro3, Axl, dan Mer* yang menurun pada tikus, sehingga menyebabkan peningkatan level autoantibodi bersamaan dengan kegagalan organ. Monosit/ makrofag dapat mengelaborasi sitokin – sitokin proinflamasi dan kemokin. Menurut penelitian Kilmon dkk menemukan bahwa makrofag meregulasi toleransi sel B dengan mensekresi faktor – faktor regulasi seperti IL-6 dan CD40L, dan ditemukan pada tikus MRL/lpr yang *lupus-prone* bahwa makrofag kurang memiliki kemampuan dalam mensekresi Ig dan faktor – faktor represif. (Kaplan, 2013)

II.6. Tinjauan mediator-mediator yang berperan dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Interferon Gamma (IFN-gamma)

Interferon Gamma (IFN-g) atau disebut interferon tipe II adalah sitokin yang terlibat pada sebagian besar di regulasi sistem imun dan inflamasi, seperti aktivasi, perkembangan dan diferensiasi dari sel T dan sel B, makrofag, sel NK, dan sel lain seperti sel endotelial dan sel fibroblas (gambar 2). IFN-g juga membantu ekspresi MHC pada *antigen-presenting cells* dan diferensiasi dari sel Th1.



Gambar 6. Peranan masing-masing mediator inflamasi mengantun keseimbangan jalur Th1 dan Th2 dalam proses inflamasi. (Theofilopoulos et al., 2001)

Mekanisme kerja dari IFN-g adalah diproduksi oleh sel Th-0, dan mengaktivasi sel Th-1 (CD4+) dan sel T sitotoksik (CD8+). Antigen dapat memicu sekresi IFN-g dan dibantu oleh IL-2 dan IL-12, serta memicu sel NK dan sel Th untuk membentuk IFN-g. Jalur IFN-g dimulai ketika IFN-g berikatan dengan reseptor

IFN-g di permukaan sel. Reseptor IFN-g dibagi menjadi dua polipeptida yaitu IFN-g-Ra dan IFN-g-Rb. Transduksi sinyal melalui Jak1, Jak2, dan STAT1a, dan transkripsi dapat dimulai. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Pada awalnya sel T CD4 (Th1), sel T sitotoksik CD8 dan sel NK yang memproduksi IFN-g. Beberapa sel seperti sel B, sel NKT, dan *professional antigen presenting cells* (APCs) mensekresi IFN-g. Produksi IFN-g oleh sel APC (monosit/makrofag, sel dendritik) bekerja secara lokal dan penting dalam mengaktifkan sel – sel inflamasi terdekat. IFN-g yang disekresi oleh sel NK bekerja sebagai mekanisme pertahanan terhadap infeksi, dan sel limfosit T sebagai sel yang memproduksi IFN-g utama dalam sistem imun adaptif. (Schroder et al., 2004)

IFN-g merupakan sitokin yang mendasari proses autoimun dengan cara memproduksi antibody IgG2a dan IgG3, dan antibodi ini mengaktifkan komplemen dan makrofag. Mekanisme yang penting IFN-g pada jalur inflamasi yaitu menghambat produksi sel Th-17. Penelitian dilakukan untuk mengetahui peran IFN-g pada LES dengan model tikus. Pada tikus jenis NZB/W F1, jika ditambahkan rekombinan IFN-g maka dapat mempercepat perkembangan penyakit. Tetapi jika diberikan antibodi monoclonal yang menghambat IFN-g maka menghasilkan fase remisi. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Peranan Interferon Gamma dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Studi-studi yang melakukan komparasi gangguan sitokin pada model-model mencit LES menemukan bahwa tingginya kadar IFN-gamma merupakan salah

satu temuan yang paling konsisten. Peningkatan kadar IFN-gamma ini tidak hanya terdokumentasi melalui metode pengukuran RNA dan protein, tetapi juga dengan ELISPOT dan mengklon sel T yang menginfiltrasi ginjal. Konsentrasi IFN-gamma juga ditemukan meningkat pada pasien lupus, terutama pada mereka yang berada dalam fase aktif. Terlebih lagi pada pasien-pasien tersebut dapat terdeteksi peningkatan rasio Th1/Th2 di dalam sel-sel mononuklear perifer dan predominansi sel-sel Th1 terutama ditemukan pada darah dan ginjal pasien dengan glomerulonefritis proliferasif difus. (Theofilopoulos et al., 2001)

Studi yang dilakukan oleh Jacob dkk menunjukkan bahwa model mencit lupus yang diberikan IFN-gamma atau pemicunya mengalami progresifitas penyakit yang lebih cepat, sedangkan mencit lupus yang menerima antibodi anti-IFN-gamma pada fase awal penyakit mengalami awitan penyakit yang signifikan lebih lama. (Jacob et al., 1987) Studi lain yang dilakukan oleh Ozmen dkk menunjukkan bahwa mencit lupus yang diterapi dengan IFN-gamma rekombinan solubel atau dengan antibodi anti-IFN-gamma pada usia 4 bulan, mengalami waktu hidup yang lebih lama dengan parameter serologis dan histologis yang lebih baik dibandingkan dengan mencit yang diberikan IFN-gamma. (Ozmen et al., 1995)

Bukti definitif bahwa IFN-gamma dibutuhkan untuk patogenesis lupus murin diperlihatkan oleh beberapa penelitian yang menggunakan mencit yang telah didelesi gen IFN-gamma atau IFN-gammaRnya. Studi ini secara bulat melaporkan penurunan signifikan karakteristik penyakit secara serologis dan histologik ditambah dengan perbaikan kesintasan mencit yang didelesi gen IFN-gammanya.

Salah satu observasi kunci adalah penurunan insidens glomerulonefritis dan kematian dini bahkan pada mencit yang mengalami delesi gen IFN-gamma secara heterozigot. Hal ini dikarenakan delesi gen heterozigot menghasilkan penurunan konsentrasi IFN-gamma sebesar 50%. Studi-studi ini menunjukkan bahwa menurunkan IFN-gamma secara selektif akan memberikan efek benefisial tanpa mengganggu respons terhadap antigen asing lainnya. (Balomenos et al., 1998; Huang et al., 2015; Peng et al., 1997)

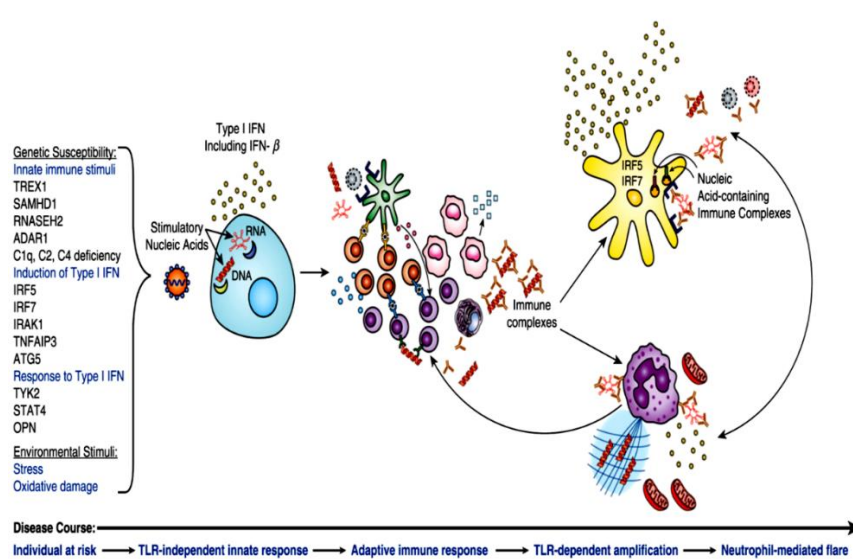
Interferon Alfa (IFN-alfa)

Interferon tipe I atau interferon-alfa adalah sitokin yang penting, dan biasanya ditemukan pada infeksi viral. RNA dan DNA virus direspon oleh TLRs dan memicu sekresi IFN oleh leukosit. Setelah sekresi IFN-alfa, IFN berikatan dengan reseptor di permukaan sel dan transduksi sinyal melalui jalur JAK/STAT. Dengan aktivasi gen, maka terjadi aktivasi respon antimikrobial dan inflamasi. Maka dapat disimpulkan efek interferon tidak hanya sistem imun bawaan tetapi juga sistem imun adaptif.

Peranan Interferon Alfa dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Pada pasien LES terdapat beberapa gejala yang merupakan efek samping dari IFN-alfa seperti demam, lemas, leukopenia. Korelasi yang sangat erat ditemukan antara IFN-alfa dengan LES, dimana pasien dengan kadar serum IFN-alfa yang tinggi memiliki prevalensi gangguan pada ginjal dan kulit. Hal ini berhubungan dengan memiliki kesamaan dengan serologi lainnya seperti anti-Ro pada kelainan

kulit LES dan anti-dsDNA pada nefritis lupus.(Niewold et al., 2010; Poole et al., 2010)



Gambar 7. Peranan Interferon Tipe I dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik. (Crow, 2014)

Pada LES didapatkan level IFN-alfa meningkat seiring dengan anti-dsDNA. Beberapa gen yang ditemukan pada pasien LES yang dapat meningkatkan produksi dari IFN-alfa yaitu *Signal Transducer and Activator of Transcription 4* (STAT4) dan *Interferon regulatory factor 5* (IRF5). STAT4 berinteraksi dengan reseptor IFN-alfa dan meningkatkan sinyal IFN. IRF5 adalah faktor transkripsi yang membantu transkripsi IFN dalam merespon sinyal TLR. Beberapa penelitian menemukan bahwa kompleks imun yang meningkat pada LES meningkatkan produksi IFN-alfa oleh sel plasma dendritik. Kompleks imun berikatan dengan *Fc gamma RIIa* yang berada di permukaan sel plasma dendritik dan aktivasi TLR9 dan TLR7 di bagian endosomal sehingga mensekresi IFN-alfa. Efek dari produksi IFN-alfa yang berlebihan adalah IFN-alfa mengirimkan sinyal balik melalui TLR7

ke sel dendritik dan monosit untuk memproduksi IFN lebih banyak. Lalu, IFN-alfa menurunkan toleransi perifer dengan mempromosikan maturasi sel dendritik.

Fungsi dari sel dendritik yang imatur adalah menurunkan reaktivitas sel T dengan *self-peptide MHC complexes*. Sel dendritik yang matur dapat meningkatkan autoreaktif dari sel B untuk memproduksi *B-cell activating factor* (BAFF). Sitokin ini termasuk *B-lymphocyte stimulator* (BLySs) dan berkontribusi dalam survival sel B. Efek dari IFN-alfa lainnya adalah menaikkan sel T CD8 dan menaikkan sel T CD4 dengan menaikkan regulasi molekul CD80 dan CD86 pada *antigen-presenting cells* (APC). (Ohl and Tenbrock, 2011)

Interleukin 2 (IL-2)

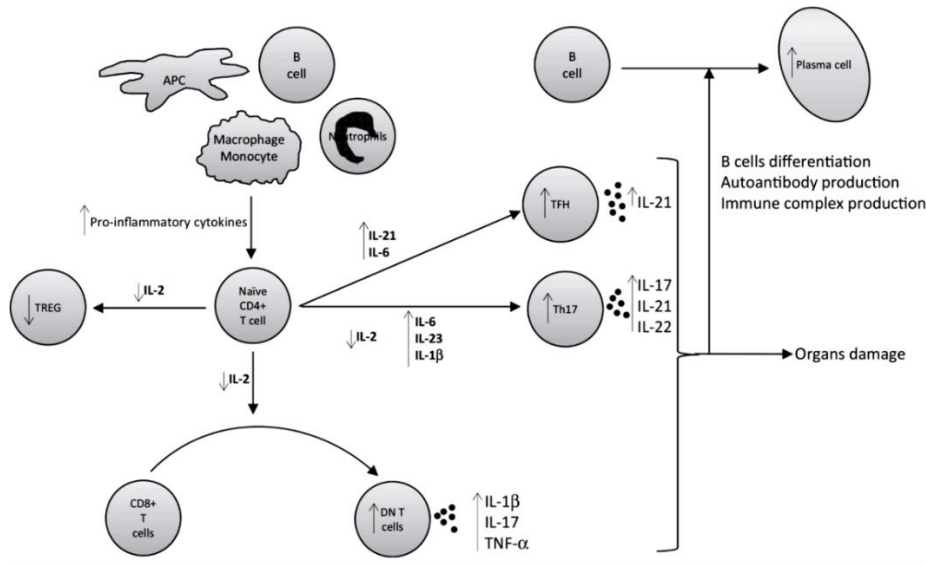
Sel T adalah sel yang memiliki fungsi untuk memproduksi interleukin-2 (IL-2). IL-2 diproduksi karena aktivasi dari *T-cell receptor* (TCR) dengan jalur parakrin dan autokrin. (Ohl and Tenbrock, 2011) Penelitian pada tikus dengan defisiensi IL-2 atau IL-2 reseptor menunjukkan gejala seperti pembesaran kelenjar getah bening perifer (limfadenopati atau splenomegali) dan gangguan pada *activation-induced cell death* (AICD) sehingga berkembang menjadi penyakit autoimun. Ditemukan hubungan penurunan IL-2 dengan penurunan toleransi sistem imun. Pada model tikus dengan defisiensi IL-2 ditemukan penurunan regulasi dengan sel T regulator (Tregs). Sehingga terjadi aktivasi sel T dan sel B yang tidak terkontrol. Selain regulasi sel T, IL-2 juga dapat mempengaruhi sel Th17. IL-2 menekan produksi dari IL-17 dan dengan level IL-2 yang menurun maka terjadi kenaikan sel Th17. Hal ini didukung dengan penelitian menemukan tikus dengan defisiensi IL-2

menunjukkan level IL-17 yang meningkat dan IL-17 ini memproduksi sel T di kelenjar getah bening perifer. Kesimpulan fungsi IL-2 selain dari *growth factor*, juga memiliki fungsi sebagai homeostasis dari sel T dan menghambat produksi IL-17. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Peranan Interleukin 2 dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Pada LES didapatkan level IL-2 yang rendah dan menyebabkan rendahnya sel T regulator. Mekanisme molekular defisiensi IL-2 adalah ekspresi yang berlebihan cAMP terhadap element modulator alpha (CREM α). CREM α adalah faktor transkripsi yang berikatan ke reseptor IL-2 dan menghambat transkripsi IL-2. Anti TCR/CD3 antibodi ditemukan di pasien LES dan memicu ekspresi dari CREM α sehingga menghambat produksi IL-2. IL-2 juga terlibat dalam activation – induced cell death (AICD). AICD mengontrol mekanisme apoptosis sel dan dikontrol oleh CD95 dan TNFR1. Proses ini terganggu dimana sel T menjadi resisten terhadap AICD yang menghasilkan persistensi autoreaktif dari sel T.(Heiler et al., 2018; Song et al., 2010)

IL-2 juga berperan dalam produksi sel T sitotoksik CD8. Sel sitotoksik T menghancurkan sel T yang terinfeksi virus dan melindungi dari infeksi. Beberapa pasien LES ditemukan defek pada sitotoksik maka terjadi peningkatan mortalitas dan morbiditas infeksi pada pasien LES. Kesimpulan dari defek IL-2 yang ditemukan pada pasien LES adalah menurunkan jumlah dan fungsi dari sel regulatori T, menurunkan AICD, menurunkan respon CTL, dan meningkatkan produksi IL-17.(Lieberman and Tsokos, 2010)



Gambar 8. Peranan IL 2 dalam patogenesis LES melalui disregulasi sel T-reg. (Comte et al., 2015)

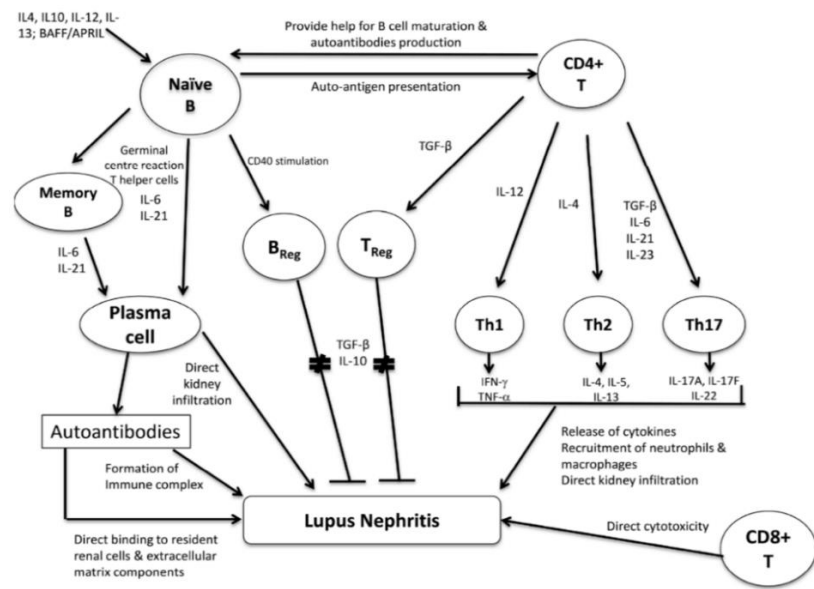
Interleukin 4 (IL-4)

Interleukin 4 (IL-4) adalah sitokin yang terlibat dalam sistem imun. IL-4 berperan dalam diferensiasi sel Th2, dan menghambat diferensiasi sel Th1. IL-4 juga dapat melindungi sel limfoid dari apoptosis, tetapi tidak dapat mempromosikan dalam proliferasi limfosit tanpa ko-stimulasi yang tersedia. IL-4 juga berperan dalam proliferasi, diferensiasi, dan apoptosis pada hematopoietik dan non-hematopoietik seperti sel myeloid, sel mas, sel dendritik, sel endothelial, sel muskular, dan sel neuronal. (Peng et al., 1997)

Peranan Interleukin 4 dalam patogenesis Lupus Erythematosus Sistemik

IL-4 memiliki peran dalam proses alergi dan autoimun. Pada proses autoimun, IL-4 berperan sebagai anti-inflamasi yang ditemukan pada model murin Reumatoid arthritis dan diabetes. (Zamorano, 2003) Penelitian Elewa dkk, menemukan kadar

IL-4 merupakan sitokin yang paling sensitif.(Elewa et al., 2014) Hal ini didukung oleh penelitian lain yang mengatakan pada pasien LES terjadi penekanan ekspresi sitokin Th2 yaitu IL-4. Pada penelitian lain, mengatakan terjadi peningkatan level IL-4 pada pasien LES. Sitokin IL-4 mempromosikan produksi antibodi sel B, jadi diharapkan pada pasien LES adalah peningkatan level IL-4. Jika IL-4 tidak meningkat dikarenakan IL-4 membantu sel B membentuk antibody tipe *noncomplement-fixing*, sedangkan pada LES memiliki autoantibodi tipe *complement-fixing*. Dan ketidakseimbangan sel Th1/Th2 pada LES menyebabkan limitasi sekresi IL-4.(Nakajima et al., 1997; Peng et al., 1997)



Gambar 9. Supresi IL-4 pada pasien LES menyebabkan keseimbangan beralih ke sel Th1. (Yap and Lai, 2015)

Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 diproduksi oleh berbagai macam sel, seperti monosit, fibroblast, endothelial, dan limfosit sel T dan sel B. IL-6 memiliki peran sebagai faktor diferensiasi sel

hematopoetik. Proses diferensiasi sel B di sel plasma, sel T dan sel makrofag, dan menginduksi produksi IgG adalah fungsi dari IL-6. Penelitian lebih lanjut menemukan fungsi IL-6 pada sumsum tulang adalah maturasi dari *stem cell*, aktivasi sel neutrofil, stimulasi produksi platelet, dan diferensiasi sel osteoklas. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Peranan Interleukin 6 dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Penelitian menggunakan tikus *murine lupus* mengindikasikan adanya keterlibatan IL-6 dalam hiperaktivitas sel B dan onset dari penyakit autoimun. Pada tikus Mrl/lpr, ditemukan kenaikan dari IL-6 dan IL-6R sesuai dengan bertambahnya usia. Tikus Mrl/lpr dengan defisiensi IL-6 memiliki onset lupus nefritis yang lebih lama. Menghambat IL-6 reseptor dapat menurunkan produksi antibodi IgG pada tikus jenis NZB/W F1 dan menyebabkan timbulnya penyakit autoimun. Dan pemberian IL-6 secara eksogen dapat mempercepat terjadinya glomerulonefritis pada tikus NZB/W F1. Fungsi lain yang ditemukan adalah sebagai sitokin yang mempengaruhi diferensiasi sel T atau disebut regulator sel T. Penelitian pada tikus menemukan bahwa dengan menghambat IL-6R maka diferensiasi sel Th17 menurun. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Sitokin IL-6 memiliki peranan dalam inflamasi lokal pada nefritis lupus. IL-6 menyebabkan proliferasi sel mesangial yang dapat ditemukan pada proliferasi nefritis lupus. Pada pasien dengan lupus nefritis ditemukan kenaikan level serum IL-6, dan meningkatnya ekspresi IL-6 pada jaringan glomerular dan tubulus ginjal. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Interleukin 17 (IL-17)

Interleukin 17 dihasilkan oleh beberapa sel T seperti sel T helper (CD4), sel T sitotoksik (CD8), sel T *double negative* (CD4⁻ CD8⁻ CD3⁺), sel T gamma-delta, sel *natural killer* (NK), dan sel neutrofil. Sel T yang secara khusus memproduksi IL-17 adalah sel Th17. Selain memproduksi IL-17a dan IL-17f, sel Th17 juga memproduksi IL-22 dan IL-21. Sel Th17 berguna untuk melawan infeksi bakteri seperti *Citrobacter*, *Klebsiella pneumonia*, dan *Borellia burgdoerferi*; dan infeksi jamur seperti *Candida albicans*. IL-17 dan sel Th17 berkontribusi dalam inflamasi jaringan dan kerusakan pada organ pada penyakit autoimun. (Ohl and Tenbrock, 2011) IL-17 memiliki beberapa efek pada beberapa sel, seperti sel T, sel B, sel monosit, sel endotel/ epitel, dan sel neutrofil (**tabel 1**).

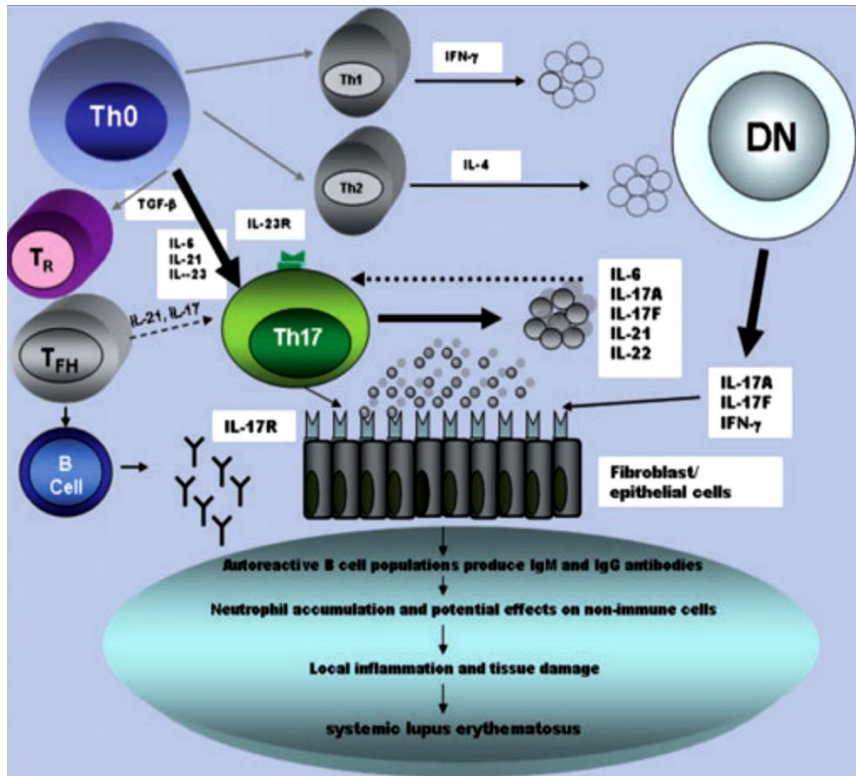
Proses sinyal IL-17 dapat meningkatkan produksi kemokin – kemokin seperti IL-8, *monocyte chemoattractant protein – 1*, *growth-related oncogene protein alpha*, dimana kemokin ini merekrut sel monosit dan sel neutrofil ke jaringan inflamasi. IL-17 juga menginduksi infiltrasi sel T dengan menaikkan regulasi dari *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1). IL-17 menginduksi sekresi beberapa protein proinflamasi seperti prostaglandin E2, *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GM-CSF), dan *granulocyte colony stimulating factor*. Produksi IL-17 mengirimkan *feedback loop* positif pada beberapa sitokin seperti IL-6, IL-1 β dan IL-21. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Tabel 1. Fungsi Interleukin-17 (Ohl and Tenbrock, 2011)

Sel T	Menginduksi produksi sitokin proinflamasi seperti IL-6, IL-1beta, dan IL-21. Menaikkan proses pembentukan sel T pada jaringan yang inflamasi.
Sel B	Membantu diferensiasi sel B menjadi sel plasma dan produksi dari autoantibodi.
Sel monosit	Meningkatkan migrasi sel ke jaringan inflamasi
Sel epitelial/ endotelial	Menginduksi produksi kemokin dan menaikkan regulasi molekul adesi
Sel neutrofil	Menaikkan proses migrasi sel ke jaringan inflamasi

Peranan Interleukin 17 dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Pada pasien LES ditemukan kenaikan serum level IL-17. IL-17 menginduksi infiltrasi sel – sel inflamasi di kulit, paru – paru, dan ginjal. Penelitian tikus Mrl/lpr ditemukan kenaikan jumlah *double-negative T cells* (DNTs), yang dapat meningkatkan produksi IL-17 dan IL-23R. Konsentrasi IL-17 ditemukan pada ginjal tikus Mrl/lpr yang menyebabkan nefritis lupus.



Gambar 10. Peranan Th17 dalam patogenesis LES. (Nalbandian et al., 2009)

Disregulasi ekspresi sitokin oleh sel T adalah patogenesis LES. Pada LES, sel T mensekresi IL-17 dan IL-21 lebih tinggi dibandingkan orang normal. IL-17 menginduksi sekresi dari kemokin dan sitokin lain yang proinflamasi yang mengakibatkan inflamasi jaringan dan kerusakan organ. IL-21 dan IL-17 dapat membantu dalam diferensiasi sel B menjadi sel plasma dan produksi antibodi IgG. Lalu, IL-21 juga membantu dalam mempertahankan sel Th17. Pada LES, sel T kurang memproduksi IL-2 sehingga menurunkan sel regulatori T dan menurunkan fungsi sel T. Karena IL-2 berperan dalam AICD, maka level IL-2 yang rendah menyebabkan autoreaktif dari sel T, yang memicu aktivasi sel B dan inflamasi jaringan.

Oksida Nitrat (NO)

Oksida Nitrat (NO) adalah agen bioregularitas yang berperan penting dalam regulasi dan pertahanan sel yang diproduksi oleh berbagai tipe sel. NO juga berperan dalam reaksi kolateral yang menyebabkan kerusakan DNA dan kematian sel. NO dapat merusak jaringan dengan menyerang pusat dari Fe-S pada beberapa protein, menghambat *ribonucleotide reductase*, dan beberapa enzim replikasi DNA. (Ohl and Tenbrock, 2011)

Pada beberapa penelitian retrospektif menemukan kenaikan level NO pada pasien LES. NO memiliki fungsi sebagai neurotransmitter, mengatur tekanan darah, dan sebagai mediator respon inflamasi. Pada penyakit autoimun seperti LES, Reumatoid arthritis (RA) ditemukan ekspresi NO yang berlebihan. (Afaq, 2010)

Peranan FOXP3 sebagai penanda aktivitas sel T autoregulator

Forkhead box P3 (FOXP3) adalah faktor transkripsi pada kromosom X, merupakan keluarga dari faktor transkripsi forkhead, dikarakteristikan dengan domain pengikat DNA forkhead terkonservasi tinggi. Serupa dengan molekul segolongannya, FOXP3 mempunyai domain leusin serupa-resleting dan motif jari seng. Domain terminus N diduga merupakan domain repressor. Molekul ini diekspresikan secara penuh dengan isoform tunggal di mencit, sedangkan dua isoform mayor dapat diidentifikasi pada manusia. FOXP2 secara umum merupakan kompleks molekular besar berukuran 600 kDa dan dapat berinteraksi

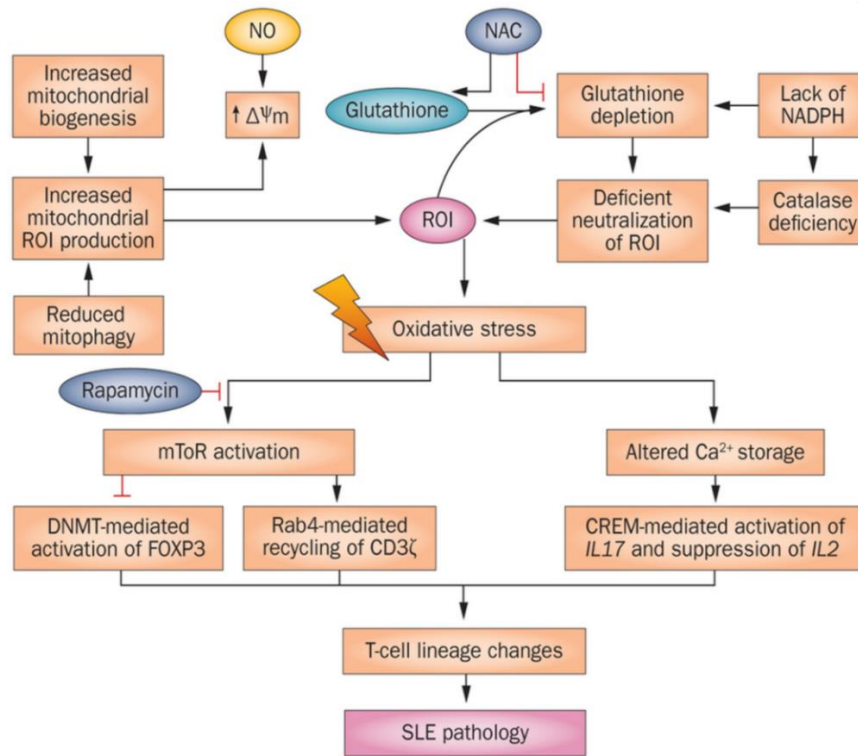
dengan faktor transkripsi lainnya seperti IRF4 dan ROR γ .(Horwitz, 2008; Kluger et al., 2017)

Penelitian dalam beberapa tahun terakhir telah menunjukkan kemajuan berarti dalam karakterisasi sel T regulator. Tidak ada penanda permukaan sel yang khusus mendefinisikan Treg, namun demikian faktor transkripsi FOXP3 merupakan gen penanda khas yang dijumpai pada galur sel ini. Beberapa data menunjukkan bahwa FOXP3 dapat berinteraksi dengan NFAT untuk meregulasi ekspresi gen, seperti penekanan gen IL-2 dan stimulasi molekul CTL-A4 dan CD25. Saat ini tidak jelas apakah semua regulasi gen dependen-FOXP3 melibatkan NFAT dan apakah NFAT memainkan peranan penting dalam pembentukan Treg. Namun demikian telah menjadi jelas, melalui analisis kombinasi dari pengikatan FOXP3 dan ekspresi gen seluruh-genom, bahwa FOXP3 merupakan gen represor dominan yang menekan gen-gen lain yang biasanya teraktivasi setelah stimulasi sel T, terutama yang dikaitkan dengan sinyal reseptor sel T.(Tone et al., 2008; Wu et al., 2006)

II.7.Pengaruh stress oksidatif dalam patogenesis Lupus Eritematosus Sistemik

Stress oksidatif diperkirakan mendasari paparan dan reaksi patologis terhadap sinyal-sinyal kematian sel yang menjadi ciri khas patogenesis LES. Aktivasi dan proses abnormal sinyal-sinyal kematian sel oleh sistem imun memicu pelepasan serpihan nuklear dari sel apoptotik dan nekrotik, yang kemudian menstimulasi produksi antibodi antinuklear (misalnya anti-Ro dan anti-DNA). Produksi

berlebihan dan gangguan bersihan senyawa oksigen reaktif (SOR) juga telah dibuktikan sebagai salah satu yang mempengaruhi perjalanan penyakit LES. (Perl, 2013; Shah et al., 2014)

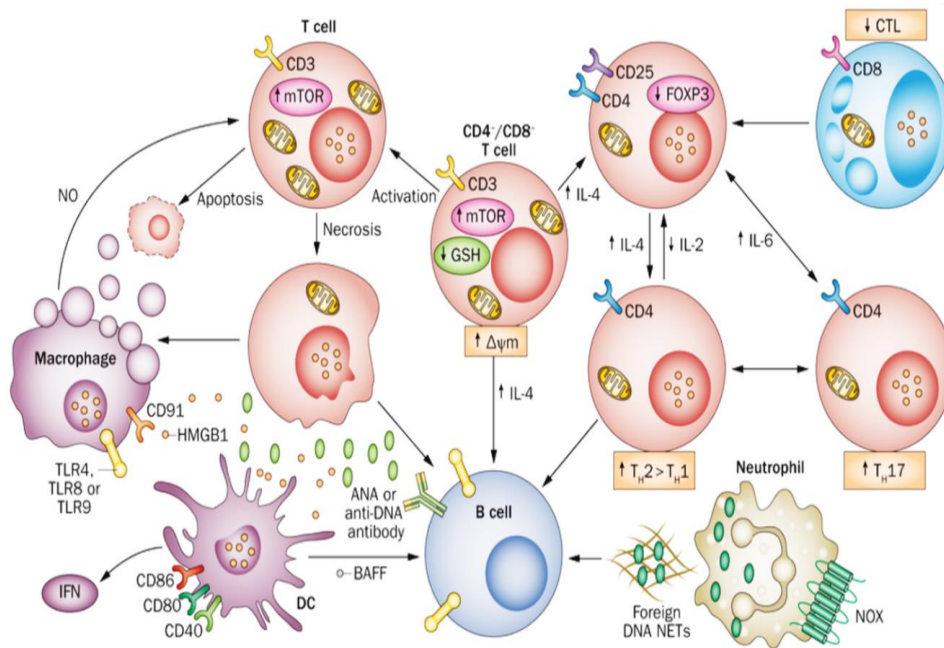


Gambar 11. Tinjauan jalur-jalur molekular stres oksidatif dan hubungannya dengan patologi LES. (Perl, 2013)

Senyawa oksigen reaktif sebagian besar berasal dari mitokondria; dan sel T dari pasien dengan LES menunjukkan disfungsi mitokondria, yang dikarakteristikan dengan hiperpolarisasi mitokondria. Faktor-faktor genetik yang mengganggu sistem pertahanan antioksidan terhadap SOR atau mengendalikan produksi SOR dengan merubah homeostasis mitokondrial telah dikaitkan dengan patologi LES. Setelah mengalami aktivasi, kerusakan oksidatif dapat dilanjutkan melalui

beberapa target molekular. Hasil dari kaskade modifikasi oksidatif ini dikaitkan dengan derajat penyakit, kerusakan organ dan komorbiditas pada LES (gambar 2).

(Shah et al., 2013, Perl, 2013, Deng and Tsao, 2010)



Gambar 12. Gangguan stress oksidatif pada sel T dan fagosit, serta hubungannya dengan jaringan sinyal proinflamatorik interselular pada LES. (Perl, 2013)

Senyawa oksigen reaktif awalnya hanya dikenal sebagai produk sampingan dari metabolisme aerobik, namun demikian saat ini dikenal sebagai modulator dari berbagai jalur transduksi sinyal, termasuk regulasi epigenetik transkripsi gen, produksi mikro-RNA regulator, kontrol translasi mRNA dan pelipatan protein. Selain itu SOR juga terlibat dalam degradasi dan daur ulang protein dan organel melalui autofagi. Sesuai dengan fungsinya yang beragam, stres oksidatif nampaknya memerantarai disfungsi sel T pada LES dalam berbagai tingkatan. Gangguan sel T semacam itu menghasilkan kerusakan respon imun dan, seiring

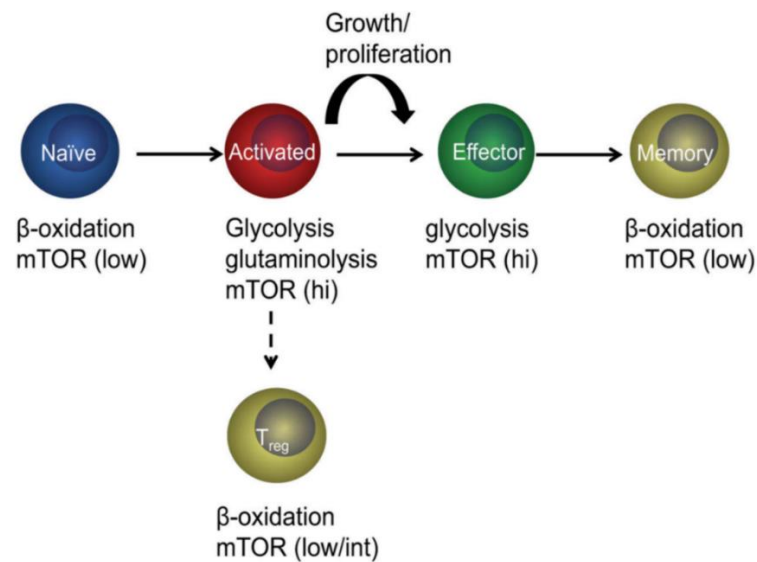
dengan senyawa hasil autoantigenesis oksidatif, dianggap menimbulkan patologi inflamasi dan komorbiditas LES (gambar 3). (Shen et al., 2012, Crispin et al., 2010, Hedrich and Tsokos, 2011, Dai and Ahmed, 2011)

II.8. Peranan metabolisme sel T CD4+ dalam patogenesis lupus

Sel T CD4+ sangat penting dalam mediasi atau menekan imunitas normal dan juga penyakit inflamatorik dan autoimun. Paparan antigen pada awalnya menyebabkan terjadinya aktivasi sel T, menginduksi pertumbuhan dan proliferasi cepat. Bergantung pada lingkungan sitokin pada saat aktivasi, sel T CD4+ dapat berdiferensiasi menjadi efektor (Th1 dan Th17) atau T regulator. Tiap subset ini mempunyai peranan unik dalam sistem imunitas adaptif, dimana T efektor mendorong imunitas dan inflamasi sedangkan T regulator memainkan peranan oposisi dengan menekan T efektor untuk membatasi respons inflamasi berlebihan. Keseimbangan antara T efektor dan T regulator memainkan peranan penting untuk memberikan perlindungan imunitas mencukupi tanpa menyebabkan terjadinya autoimunitas. (Conti et al., 2009; Talaat et al., 2015; Voo et al., 2009)

Bukti-bukti terkini menunjukkan bahwa metabolisme sel T CD4+ sangat dinamis dan memungkinkan untuk dilakukannya pemilihan atas populasi sel T tertentu. Aktivasi sel T menyebabkan terjadinya permintaan untuk prekursor biosintetik dan energi dalam jumlah mencukupi untuk fungsi efektor. Pemrograman ulang ini melibatkan penurunan oksidasi lipid dan peningkatan asupan glukosa dan glikolisis, disertai dengan transpor asam amino dan glutaminolisis. Pemrograman ulang T efektor dan T regulator ini menghasilkan program metabolisme yang

berbeda. T efektor menggunakan jumlah besar glukosa dan glikolisis untuk mendukung kebutuhan metabolismenya, sedangkan T regulator dapat mengoksidasi lipid dan mampu mengembangkan fungsinya bahkan di dalam keadaan tanpa glukosa (gambar 9).(Macintyre et al., 2014; Yin et al., 2015)



Gambar 13. Pengaruh program metabolisme terhadap pemilihan subset sel T CD4+ dan hubungannya dengan mTOR.(Zeng et al., 2016)

Sebuah studi yang dilakukan terhadap mencit LES menunjukkan bahwa piruvat dehidrogenase (PDH) merupakan persimpangan penting antara metabolisme sel T glikolitik dan oksidatif. Fungsi PDH dihambat dengan kinase PDH (PDHK). Ditemukan bahwa PDHK1 diekspresikan pada sel Th17, namun tidak pada Th1 dan sedikit ditemukan dalam T regulator, dan penekanan atau penghapusan PDHK1 memodulasi imunitas dan melindungi mencit terhadap ensefalomielitis autoimun, selain itu juga menurunkan Th17 dan meningkatkan T regulator. Data-data ini menunjukkan bahwa subset sel T CD4+ menggunakan dan membutuhkan program metabolisme berbeda yang dapat digunakan untuk mengendalikan

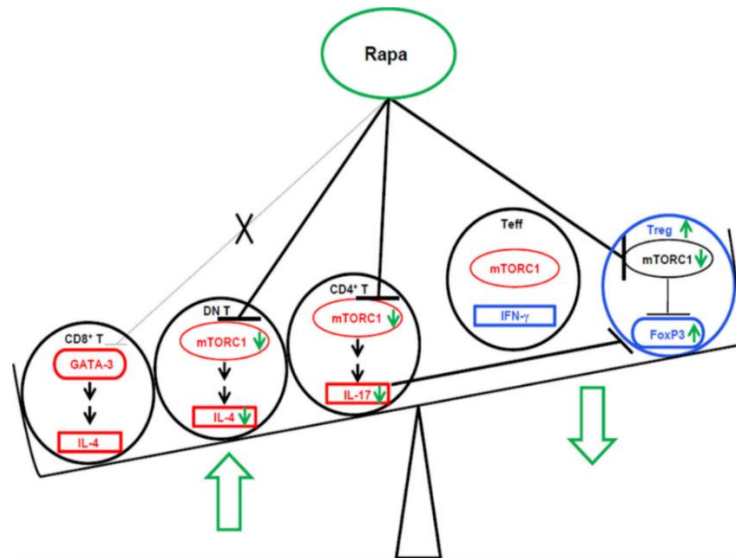
populasi sel T spesifik dalam penyakit autoimun dan inflamatorik.(Gerriets et al., 2015; Macintyre et al., 2014)

II.9.Pengaruh modulasi jalur AMPK/mTOR terhadap regulasi T-reg dan T-efektor

Sel T pada pasien LES menunjukkan adanya hiperpolarisasi mitokondrial persisten dan stres oksidatif. Jalur sinyal intraselular mTOR, sebagai sensor potensi transmembran mitokondrial($\Delta\Psi_m$), mengatur aktivitas sel T yang diimplikasikan dalam patogenesis LES. Aktivitas mTOR dapat ditekan melalui berbagai cara, diantaranya adalah dengan menggunakan rapamicin atau memberikan suplai glutathion adekuat (gambar 10). Studi-studi dengan menggunakan dua metode di atas terbukti mampu mencegah terjadinya pembentukan auto-antibodi, nefritis lupus dan memperpanjang kesintasan pada model hewan coba. Studi pada manusia juga menunjukkan bahwa suplai N-asetilsistein (NAC, sebagai donor glutathion) mampu memperbaiki keluhan pasien dan mengurangi aktivitas penyakit. Melalui penghambatan aktivasi mTOR, terapi dengan NAC juga mampu menghambat produksi antibodi anti-DNA, selain itu obat ini juga mampu membalikkan pertumbuhan sel T CD4-CD8- yang dianggap berperanan dalam produksi autoantibodi oleh sel B. (Perl, 2013)

Serupa dengan NAC, rapamicin juga mampu menghambat mTOR, meskipun aktivitasnya tidak terjadi lewat hambatan terhadap stres oksidatif (gambar 2). Studi dengan menggunakan rapamicin 2 mg per hari pada sembilan pasien LES refrakter menghasilkan perbaikan klinis signifikan. Studi fase II juga

menunjukkan bahwa terapi dengan rapamicin meningkatkan ekspansi sel Treg, yang diduga berperan terhadap mekanisme terapeutik. (Perl, 2013)



Gambar 14. Blokade mTORC1 dengan Rapamicin mengembalikan keseimbangan T regulator dan T efektor. (Kato and Perl, 2014)

II.10. Pengaruh metformin terhadap modulasi jalur AMPK/mTOR

Tinjauan senyawa dan mekanisme kerja metformin

Metformin adalah golongan biguanida, dimana metformin lebih banyak dikenal sebagai anti-hiperglikemik. Efek utama metformin adalah mengurangi produksi glukosa pada hepar melalui jalur enzim *AMP-activated protein kinase* (AMPK). Metformin memiliki waktu kerja paruh 1.5 sampai 3 jam, tidak terikat dengan protein plasma, tidak dimetabolisis, dan diekskresikan oleh ginjal. Sebagai konsekuensi cara kerja metformin yaitu menghambat glukoneogenesis pada hepar, obat ini juga mempengaruhi kerja hepar dalam metabolisme asam laktat. Pasien

dengan gangguan ginjal dapat menyebabkan akumulasi biguanida, dan meningkatkan resiko asidosis laktat yang muncul berhubungan dengan dosis.

Efek samping metformin yang sering ditemukan adalah gejala pada sistem gastrointestinal seperti anoreksia, mual, muntah, nyeri pada perut, dan diare. Absorpsi vitamin B-12 menurun pada pemakaian lama metformin, dan dibutuhkan skrining serum level vitamin B12. Tidak adanya hipoksia dan gagal ginjal atau penurunan fungsi hepar maka resiko asidosis laktat menurun. Kontraindikasi pemberian metformin adalah gagal ginjal, alkoholisme, gangguan hepar, atau keadaan yang menyebabkan jaringan hipoksia seperti kelainan paru atau jantung kronik.^{katzung}

Tinjauan pengaruh metformin terhadap jalur AMPK/mTOR

Jalur TOR pada manusia (mTOR) mengendalikan pertumbuhan dan metabolisme sel sebagai respons terhadap nutrisi (mis. Asam amino), faktor pertumbuhan (mis. Insulin, IGF-1, PDGF) dan status energi seluler (ATP). Nutrisi merupakan sinyal TOR yang paling kuat, karena kadar asam amino yang tinggi dapat mengkompensasi terhadap ketiadaan sinyal mTOR lainnya, namun tidak berlaku sebaliknya. TOR mengaktifkan pertumbuhan sel secara positif dan negatif dengan mengatur beberapa proses anabolik dan katabolik, yang secara kolektif menentukan akumulasi masa. Proses anabolik termasuk transkripsi, sintesis protein, biogenesis ribosom, transpor nutrisi dan metabolisme mitokondrial. Sebaliknya TOR menekan proses katabolik seperti degradasi mRNA, proteolisis

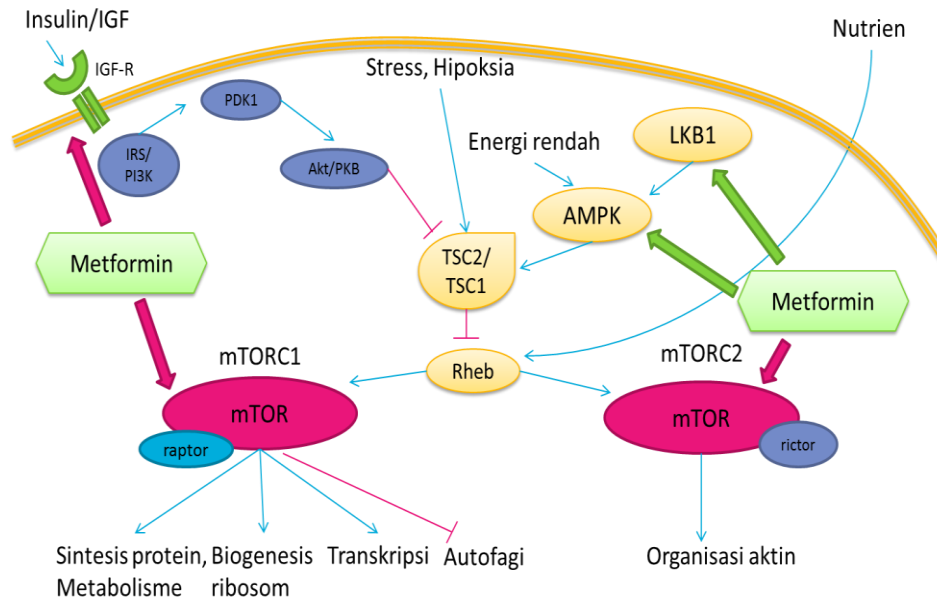
dependen ubiquitin dan autofagi (gambar 6).(Dowling et al., 2007; Kickstein et al., 2010; Sahra et al., 2011; Shi et al., 2012)

Jalur mTOR sendiri mempunyai regulator *upstream* yang disebut sebagai jalur AMPK (*activated AMP protein kinase*), yang apabila teraktivasi akan menekan jalur mTOR. Jalur AMPK sendiri saat ini banyak diteliti, oleh karena keterkaitannya dengan autoimunitas, karsinogenesis, aterosklerosis dan proses penuaan. Studi-studi baik hewan, observasional maupun intervensional pada manusia menunjukkan bahwa tindakan-tindakan yang mengaktivasi jalur AMPK dikaitkan dengan penurunan risiko autoimunitas, kanker dan peningkatan harapan hidup.(Guertin and Sabatini, 2007; Hsieh et al., 2012; Liu et al., 2015; Perl, 2015)

Metformin obat yang baru-baru ini kembali naik daun, ditemukan mempunyai mekanisme kerja yang mampu meregulasi jalur AMPK (gambar 4).Pada level selular, metformin mengaktivasi AMPK, dengan mengganggu kompleks I rantai pernapasan mitokondria, yang mengakibatkan penurunan sintesis AMP dan peningkatan rasio AMP:ATP selular. Selain itu, sebagaimana telah dijelaskan di atas, metformin melalui jalur-jalur *downstream* yang juga diatur olehnya diantaranya AMPK, TSC2, p53, ACC, HMG-CoA reductase, FAS/ACC dan EF2 mampu menekan aktivitas yang dikaitkan oleh proses autoimunitas.(Foretz et al., 2010; Sahra et al., 2011; Viollet et al., 2012; Zhou et al., 2001)

Studi menggunakan metformin pada model artritis reumatoid mencit menunjukkan bahwa, metformin (100-150mg/kg) mampu menekan skor artritis dan kerusakan tulang, menurunkan kadar sitokin pro-inflamatorik (TNF-alfa dan

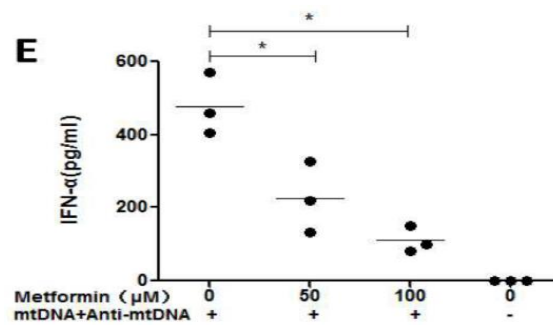
IL-1) serta menekan jumlah sel T $ROR\gamma_t+CD4+$ di kelenjar getah bening. Metformin juga menekan diferensiasi sel Th17 melalui jalur AMPK, sehingga mempunyai potensi untuk pengobatan artritis reumatoid. (Kang et al., 2013)



Gambar 15. Jalur regulasi metabolisme dan pertumbuhan sel melalui mTOR dan AMPK. (Viollet et al., 2012)

Selain itu studi terhadap model ensefalitis autoimun metformin juga menunjukkan kemampuan untuk menghambat induksi terhadap kondisi tersebut. Studi ini menunjukkan metformin menghambat ensefalitis autoimun dengan menekan ekspresi sitokin-sitokin proinflamasi (IFN-gamma, TNF-alfa, IL-6, IL-17 dan iNOS). Selain itu aktivitas AMPK dan gangguan terhadap lipid juga dipulihkan dengan terapi metformin. Aktivasi AMPK oleh metformin juga menghambat respons imun diperantari sel T, termasuk respons spesifik antigen dan produksi

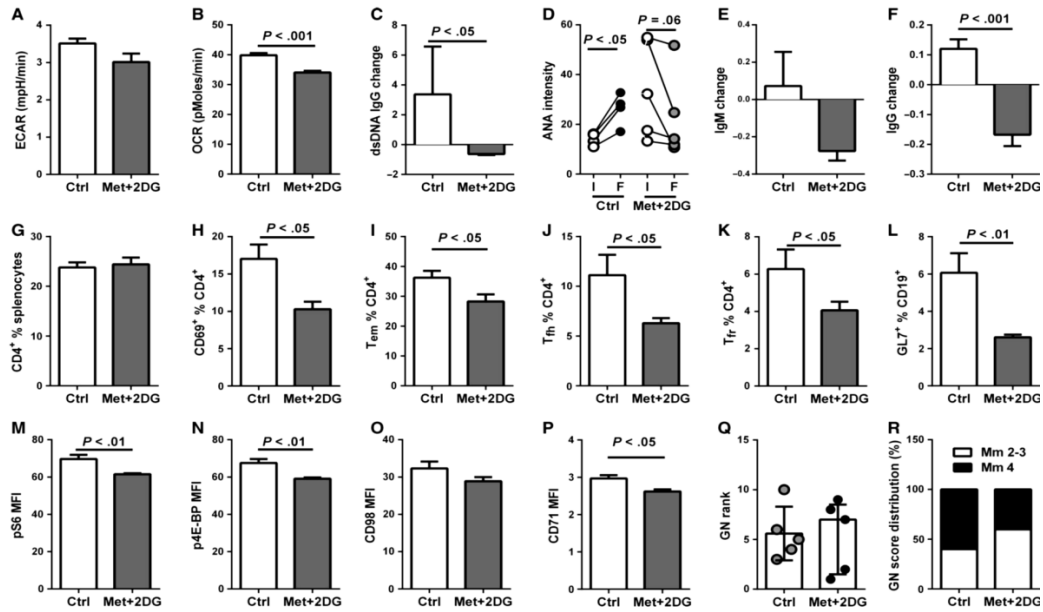
sitokin-sitokin sel Th1 atau Th17, dan sebaliknya meningkatkan produksi IL-10 pada sel-sel limpa. (Nath et al., 2009)



Gambar 16. Pemberian metformin pada studi in vitro memberikan hasil penurunan IFN-alfa yang dipengaruhi dosis. (Wang et al., 2015)

II.11. Pengaruh metformin dalam model hewan Lupus Eritematosus Sistemik

Sampai saat ini baru terdapat dua studi di dunia yang mengevaluasi penggunaan metformin pada model mencit LES. Studi pertama dilakukan oleh Wang dkk menemukan bahwa pada pasien LES ditemukan peningkatan antibodi anti-mitokondrial-DNA yang berkaitan dengan derajat keparahan nefritis lupus. Studi yang sama juga menemukan bahwa kompleks mitokondrial-DNA/anti-mitokondrial-DNA merupakan penginduksi produksi IFN-alfa sel dendritik plasma yang lebih kuat dibandingkan kompleks dsDNA/anti dsDNA. Pemberian metformin secara in vitro pada sampel darah pasien-pasien ini menghasilkan penekanan terhadap jalur aktivasi tersebut, sehingga menurunkan produksi IFN-alfa (gambar 11). (Wang et al., 2015)



Gambar 17. Terapi mencit LES selama 1 bulan dengan metformin dan 2DG berhasil mengembalikan metabolisme dan fenotip penyakit. (Yin et al., 2015)

Studi lainnya oleh Yin dkk melihat pengaruh regulasi metabolisme mitokondrial sel T CD4+ terhadap aktivitas penyakit mencit LES. Studi ini membuktikan bahwa glikolisis dan metabolisme oksidatif mitokondrial meningkat pada sel T CD4+ dari mencit LES dibandingkan dengan kontrol non-autoimun. Secara in vitro ditunjukkan bahwa penghambat metabolisme mitokondrial metformin dan penghambat metabolisme glukosa 2-deoksi-glukosa (2DG) menghasilkan penurunan produksi IFN-gamma. Secara in vivo, pengobatan mencit LES dengan kombinasi metformin dan 2DG menormalkan kembali metabolisme sel T dan memulihkan penanda biologis aktivitas penyakit. Selain itu, sel T CD4+ dari pasien LES yang menunjukkan peningkatan glikolisis dan metabolisme mitokondrial terkait aktivitas penyakitnya, juga disertai dengan produksi IFN-gamma berlebihan berhasil ditekan secara signifikan dengan metformin secara in

vitro. Hasil-hasil ini menunjukkan terapi dengan metformin merupakan salah satu modalitas yang menjanjikan untuk LES (gambar 12). (Yin et al., 2015)

II.12. Model murin untuk Lupus Eritematosus Sistemik

Tinjauan umum model murin untuk Lupus Eritematosus Sistemik

Saat ini terdapat beberapa model murin yang telah lama digunakan untuk memahami mengenai induksi LES dari perspektif selular dan genetik. Model-model klasik lupus spontan termasuk NZB/W F1 dan turunannya seperti MRL/lpr dan BXSB/Yaa, sedangkan model-model induksi termasuk model pristan dan model penyakit *graft-versus-host*. Masing-masing model ini menggambarkan penyakit serupa lupus dengan variasinya sendiri, termasuk gejala-gejala yang dijumpai pada LES manusia, seperti produksi autoantibodi, aktivasi dan hiperplasia limfoid dan nefritis lupus. (Perry et al., 2011)

Model mencit LES klasik

Mencit NZB/W F1 merupakan model lupus klasik tertua, dan dihasilkan dari persilangan F1 galur NZB dan NZW. Baik NZB maupun NZW menunjukkan autoimunitas terbatas, sedangkan persilangan F1 NZB/W mengalami fenotip serupa dengan lupus berat yang mirip dengan manusia. Fenotip serupa lupus ini termasuk limfadenopati, splenomegali, peningkatan antibodi antinuklear serum termasuk anti-ds-DNA IgG dan glomerulonefritis termediasi imun kompleks yang

muncul pada usia 5-6 bulan dan menyebabkan kematian pada 10-12 bulan.(Li et al., 2017; Richard and Gilkeson, 2018)

Persilangan antara NZB/W F1 dan NZW menghasilkan galur New Zealand Mixed (NZM), di mana NZM2328 dan NZM2410 saat ini dipakai sebagai model lupus. Galur NZM2328 dan 2410 menunjukkan spesifisitas autoantibodi yang serupa dengan mencit NZB/w F1. Homozigositas galur NZM dan potensi untuk memperkaya lokus suseptibilitas lupus telah memfasilitasi analisis genetik dan merupakan kontribusi terbesar galur ini dalam mempelajari dasar genetik lupus.

Galur MRL/lpr dikembangkan dari berbagai persilangan mencit, secara khusus sebagian besar genom MRL dihasilkan dari galur LG/J ditambah kontribusi minor dari C3H/Di, C57BL/6 dan AKR/J. Karakteristik awal subgalur MRL, dinamakan MRL/lpr, menghasilkan mencit dengan fenotipe serupa LES dengan limfadenopati dan akumulasi sel T negatif ganda (CD4- dan CD8-) serta B220+. Mencit-mencit ini menunjukkan laju mortalitas meningkat, tidak seperti mencit NZB/W F1, baik jantan maupun betina keduanya sama-sama terpengaruhi. Subgalur MRL/lpr mempunyai konsentrasi imunoglobulin sirkulasi yang amat tinggi, termasuk autoantibodi seperti ANA, anti-ssDNA, anti-dsDNA, anti-Sm dan faktor reumatoid, sehingga menghasilkan kompleks imun dalam jumlah besar.(Li et al., 2017; Richard and Gilkeson, 2018)

Tinjauan model murin LES dengan induksi pristane

Model induksi pristane saat ini banyak digunakan untuk studi mengenai autoimunitas, hal ini dikarenakan kemampuannya untuk menghasilkan gambaran LES serupa dengan model modifikasi genetik dengan biaya yang lebih terjangkau. Injeksi pristan (2,6,10,14 tetrametilpentadekan, TMPD) secara intraperitoneal merupakan metode standar yang dilakukan untuk mendapatkan antibodi monoklonal. Namun demikian, injeksi pristan pada mencit BALB/c ternyata juga menginduksi autoantibodi yang serupa dengan lupus, seperti antibodi antiribonukleoprotein (RNP) seperti anti-SU, anti-SM dan anti-U1RNP, serta anti-DNA dan anti-histon dalam jumlah yang serupa dengan mencit MRL/lpr. (Sato and Reeves, 1994) Selain itu mencit yang diinduksi dengan pristan juga mengalami deposisi kompleks imun di ginjal yang menyebabkan proteinuria berat dan nefritis lupus. (Bossaller et al., 2013)

Sitokin-sitokin pro-inflamatorik mempunyai peranan penting dalam lupus terinduksi pristan. Dengan menggunakan mencit BALB/c IL6 -/- ditemukan bahwa anti ssDNA, dsDNA dan antibodi kromatin sangat bergantung pada IL-6, sedangkan anti-RNP/Sm dan anti-Su tidak mempunyai keterkaitan jelas dengan kadar IL-6. Anti-dsDNA pada model ini muncul setelah terjadinya penyakit ginjal, yang mengindikasikan bahwa autoantibodi ini tidak berperan dalam terjadinya nefritis di model pristane. Pada saat pristane diinjeksikan di galur NZB/W F1, zat ini mengakselerasi terjadinya penyakit dan menghasilkan sejumlah besar produksi autoantibodi IL-12, anti-Sm, anti-Su dan anti-RNP,

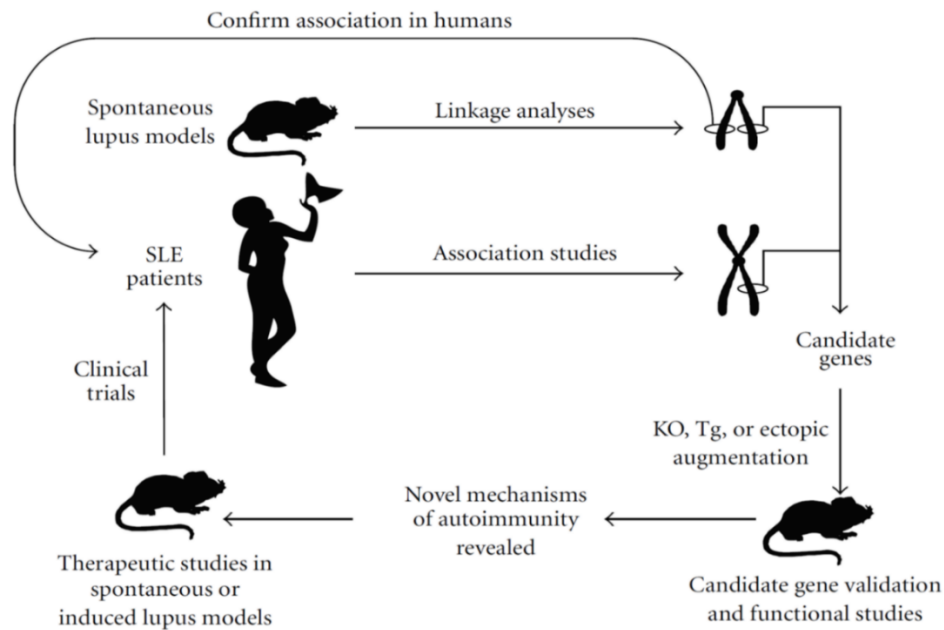
menunjukkan adanya keterkaitan erat antara IL-12 dengan autoantibodi-autoantibodi tersebut.

Overekspresi IFN-I dan gen-terstimulasi-IFN (penanda IFN) telah dikaitkan dengan produksi ANA dan keparahan penyakit di LES. Lupus terinduksi pristan merupakan satu-satunya model hewan yang menunjukkan penanda IFN. Studi-studi dengan model lupus terinduksi pristan menunjukkan bahwa defisiensi reseptor IFN menghapus penanda IFN secara sempurna, menghilangkan anti-RNP, anti-Sm dan anti-dsDNA, menurunkan anti-ssDNA dan IgG anti-histon dan memperbaiki glomerulonefritis. IFN-I dapat berkontribusi terhadap produksi autoantibodi dengan mengatur ekspresi TLR7/9 dan aktivasi sel B.(Reeves et al., 2009)

Selain terjadinya nefritis, kapilaritis pulmoner hemorrhagik dan artritis juga telah teridentifikasi dapat dihasilkan oleh model lupus terinduksi pristane. Empat belas hari setelah injeksi pristane dosis tunggal, cairan lavase bronkoalveolar menjadi hemorhagik disertai dengan peningkatan jumlah neutrofil dan kadar IL6 dan IL10. Infiltrat perivaskular terdiri dari sel imun dan kerusakan endotel juga ditemukan pada paru mencit yang diberikan pristane. Beberapa pasien LES juga mengalami kapilaritis pulmoner, namun demikian kapilatiritis hemorrhagik pada mencit masih harus dibuktikan apakah dapat mewakili hal yang sama pada manusia.

Gejala artritis pada mencit ini termasuk hiperplasia sinovial, periostitis dan erosi marginal progresif. Artritis terinduksi lupus dimediasi oleh TNF-alfa, oleh karena terapi dengan antibodi penetralisir TNF-alfa mengontrol gejala artritis dengan

sempurna. Luasnya target organ yang terkena dan juga peranan penting yang dimainkan oleh IFN I membuat lupus terinfeksi pristane salah satu model pilihan untuk studi lupus (gambar 18).(Amarilyo et al., 2014; Richards et al., 2001)



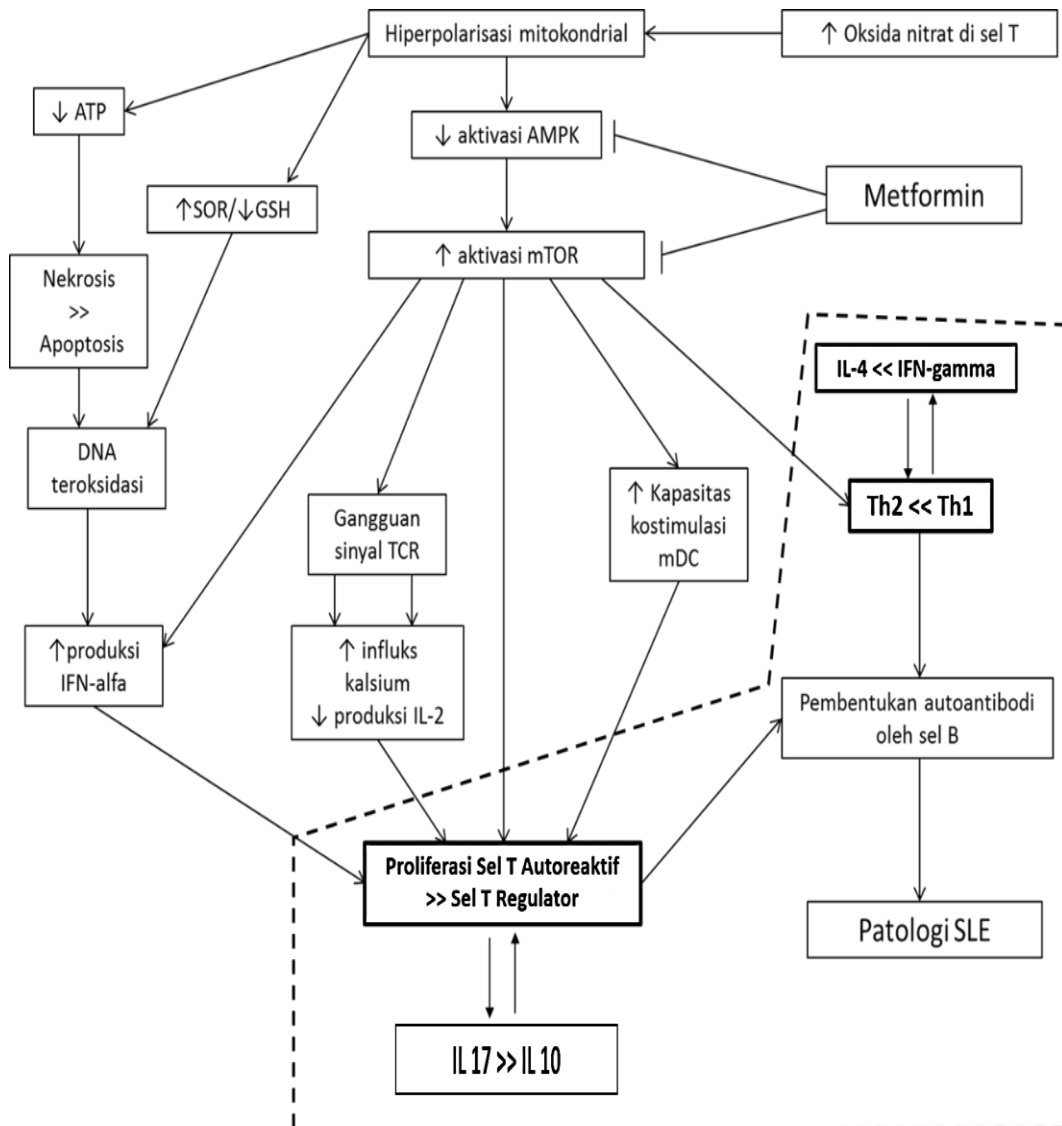
Gambar 18. Model mencit untuk studi patogenesis dan terapi pada LES.

Skoring klinis dan histopatologi pada model murin dengan LES

Ginjal: ginjal difiksasi dengan paraformaldheyde, dilekatkan di paraffin, dan diwarnai dengan H&E. setelah pewarnaan, sistem skoring untuk menilai inflamasi glomerular dan interstitial. Nilai rata-rata glomerular dihitung dari tingkatan kerusakan pada 50 sel glomerular pada tiap tikus. Skoring glomerular adalah 0 = normal, 1 = *mesangial expansion*, 2 = proliferasi endokapiler, 3 = kapilaritis atau perubahan nekrosis, 4 = *crescents*. Untuk skoring interstitial dihitung dari

mikroskop *50-high power fields* yaitu 0 = tidak ada, 1 = <25 % interstitial, 2 = 25 – 50 % interstitial, 3 = >50% interstitial. (Bossaller et al., 2013)

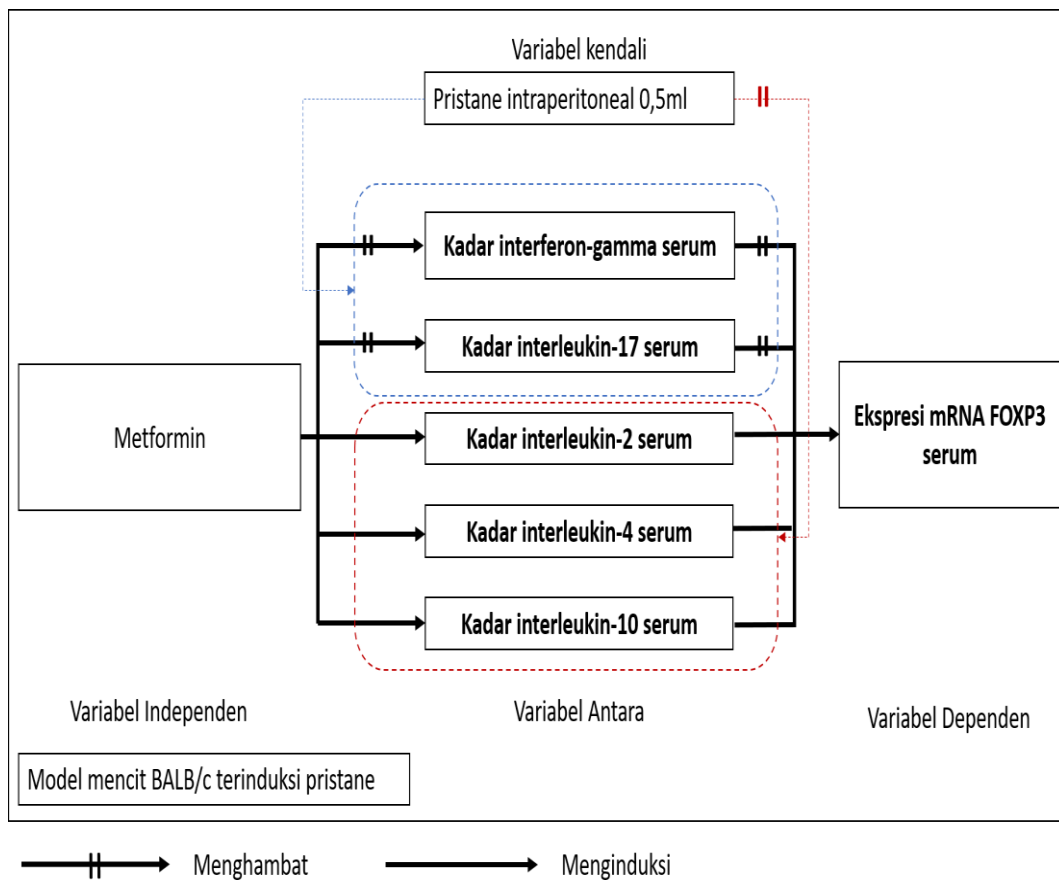
III. Kerangka teori



SOR: Senyawa Oksigen Reaktif; **GSH:** Glutation

-----: Yang diteliti

III.1. Kerangka konsep



III.2. Hipotesis Penelitian

1. Metformin mampu memperbaiki aktivitas penyakit LES pada model hewan coba.
2. Metformin mampu mencegah terjadinya kerusakan ginjal terkait nefritis lupus pada model hewan coba LES.
3. Metformin bekerja mempengaruhi aktivitas penyakit LES pada model hewan coba dengan mempengaruhi keseimbangan dari sel T regulator dan sel T autoreaktif.

III.3. Variabel penelitian

Variabel independen :

- Metformin

Variabel dependen :

- Skor histopatologi ginjal
- Kadar mRNA FOXP3
- Kadar IL-10 (Treg)
- Kadar IL-17 (T-autoreaktif)
- Kadar IL-4 (Th2)
- Kadar IFN-gamma (Th1)

III.4. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Cara pengukuran	Skala
Metformin	Senyawa kimia dengan nama lengkap metformin hydrochloride (N, N-dimethylimidodicarbonimidic diamide hydrochloride), yang digunakan sebagai terapi oral diabetes mellitus tipe 2.	Metformin diberikan secara oral dan intraperitoneal, dengan dosis 100 mg/kg bb. Pada saat analisa metformin dikoding sebagai berikut: <ul style="list-style-type: none">• 0: Kelompok Kontrol• 1: Kelompok Metformin Oral• 2: Kelompok Metformin Intraperitoneal	Nominal

<p>Skor Histopatologi Ginjal</p>	<p>Sistem skoring menggunakan hasil patologi dari ginjal mencit, bertujuan untuk menentukan derajat keberatan penyakit yang melibatkan organ tersebut.</p>	<p>Ginjal difiksasi dengan paraformaldehid, dilekatkan di paraffin, dan diwarnai dengan H&E. setelah pewarnaan, sistem skoring untuk menilai inflamasi glomerular dan interstitial. Nilai rata-rata glomerular dihitung dari tingkatan kerusakan pada 50 sel glomerular pada tiap tikus. Skoring glomerular adalah 0 = normal, 1 = mesangial expansion, 2 = proliferasi endokapiler, 3 = kapilaritis atau perubahan nekrosis, 4 = crescents. Untuk skoring interstitial dihitung dari mikroskop 50-high power fields yaitu 0 = tidak ada, 1 = <25 % interstitial, 2 = 25 – 50 % interstitial, 3 = >50% interstitial. (Bossaller et al., 2013)</p>	<p>Numerik</p>
<p>Kadar mRNA FOXP3</p>	<p>Forkhead box P3 (FOXP3) adalah faktor transkripsi pada kromosom X, merupakan keluarga dari faktor transkripsi forkhead, dikarakteristikan dengan domain pengikat DNA forkhead terkonservasi tinggi.</p>	<p>Primer FoxP3 forward: 5'-TCATCCGCTGGGCCATCCTG-3' and FoxP3 reverse: 5'-GTGGAAACCTCACTTCTTGGTC-3', dilakukan amplifikasi RNA melalui metode RT-PCR. Kemudian</p>	<p>Numerik</p>

		kadar sampel dibandingkan melalui rumus yang dijelaskan di tinjauan pustaka.	
Kadar IL-10 (Treg)	Sel Treg adalah sel yang memiliki fungsi untuk memproduksi interleukin-10 (IL-10). Sitokin IL-10 diproduksi sebagai bagian dari fungsi Treg untuk menekan reaksi inflamasi dan autoimunitas.	Dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml.	Numerik
Kadar IL-17 (T-autoreaktif)	Interleukin 17 dihasilkan oleh beberapa sel T seperti sel T helper (CD4), sel T sitotoksik (CD8), sel T double negative (CD4- CD8- CD3+), sel T gamma-delta, sel natural killer (NK), dan sel neutrofil. Sel T yang secara khusus memproduksi IL-17 adalah sel Th17. IL-17 dan sel Th17 berkontribusi dalam inflamasi jaringan dan kerusakan pada organ pada penyakit autoimun. ²⁸ IL-17 memiliki beberapa efek pada beberapa sel, seperti sel T, sel B, sel monosit, sel endotel/	Dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml.	Numerik

	epitel, dan sel neutrofil.		
Kadar IL-4 (Th2)	Interleukin 4 (IL-4) adalah sitokin yang terlibat dalam sistem imun. IL-4 berperan dalam diferensiasi sel Th2, dan menghambat diferensiasi sel Th1.	Dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml.	Numerik
Kadar IFN-gamma (Th1)	Interferon Gamma (IFN-g) atau disebut interferon tipe II adalah sitokin yang terlibat pada sebagian besar di regulasi sistem imun dan inflamasi, seperti aktivasi, perkembangan dan diferensiasi dari sel T dan sel B, makrofag, sel NK, dan sel lain seperti sel endotelial dan sel fibroblas.	Dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml.	Numerik

IV. Metodologi

IV.1. Desain studi

Desain studi akan dilaksanakan secara eksperimental dengan menggunakan hewan coba mencit BALB/c.

IV.2. Subyek

Subyek penelitian menggunakan model mencit LES yang dihasilkan sesuai dengan metode yang dijelaskan pada protokol studi. Model mencit LES akan dibagi menjadi tiga kelompok (eksperimen dan kontrol) dengan jumlah masing-masing kelompok 10 mencit (total 30 mencit).

IV.3. Waktu dan lokasi penelitian

Penelitian akan dilakukan mulai Januari-Desember 2018 bertempat di laboratorium penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar.

IV.4. Populasi dan sampel penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit balb/c betina, dengan berat 25 g berusia 6 minggu yang dibeli dari Universitas Hasanuddin Makassar. Mencit dipelihara di laboratorium biologi molekular Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar pada Januari 2018.

IV.5. Cara perhitungan sampel

Besar sampel menurut rumus Federer yaitu: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dengan (t) adalah kelompok perlakuan dan (n) adalah jumlah sampel per kelompok perlakuan.

$$(3-1)(n-1) \geq 15$$

$$N = 8,5$$

Berdasarkan perhitungan di atas jumlah sampel per kelompok adalah 9 ekor, ditambahkan 20% dari jumlah total, sehingga per kelompok dibutuhkan 10 ekor (total 30 mencit balb/c).

IV.6. Bahan penelitian

- 30 Mencit BALB-C
- Perawatan Mencit BALB-C (estimasi, biaya housing dan pakan)
- Pristane (Sigma Aldrich)
- Pemeriksaan mRNA FOXP3 kit
- Pemeriksaan IL-10 ELISA kit (Abcam)
- Pemeriksaan IL-17 ELISA kit (Abcam)
- Pemeriksaan IL-4 ELISA kit (Abcam)
- Pemeriksaan IFN-gamma ELISA Kit (Abcam)
- Pemeriksaan histopatologi ginjal
- Metformin HCl 500mg PHR1084 (Sigma Aldrich)

IV.7. Protokol studi

1. Sebelum protokol penelitian dimulai 5 mencit betina galur balb/c berusia 6 minggu dengan berat 25 g, diperoleh dari Universitas Hasanuddin dipilih sebagai model *proof of concept*. Mencit tersebut pada hari 0 dilakukan pengambilan darah vena untuk diperiksa IL-17, IFN-gamma, IL-4 dan IL-10, setelah itu disuntikkan 0,5 ml senyawa pristane (2, 6, 10, 14 tetramethylpentadecane, TMPD) di daerah peritoneum untuk menginduksi lupus. Pada hari ke 120 akan diambil sampel darah vena mencit untuk mengukur kadar IL-17, IFN-gamma, IL-4 dan IL-10, kemudian mencit dimatikan dengan menggunakan teknik asfiksia CO₂ untuk dilakukan analisis histologik dari jaringan ginjal melihat apakah induksi dengan pristane berhasil membuat model nefritis lupus yang sesuai.
2. Model mencit LES dibuat dengan menggunakan mencit betina galur balb/c berusia 6 minggu dengan berat 25 g yang diperoleh dari Universitas Hasanuddin dan ditempatkan dalam pemeliharaan hewan konvensional, disuntikkan 0,5 ml senyawa pristane (2, 6, 10, 14 tetramethylpentadecane, TMPD) secara subkutan di daerah peritoneum pada hari 0. (Vingsbo et al., 1996, Bossaller et al., 2013)
3. Pada hari 120 mencit percobaan dilakukan pengambilan sampel untuk menentukan kadar sitokin awal sebelum pengobatan dengan metformin. Sampel untuk penentuan kadar sitokin diambil dari vena sinus atau ekor mencit, untuk kemudian diukur kadar IL-10, IL-17, IL-4 dan IFN-gamma.

4. Pada hari 120 mencit percobaan dibagi menjadi dua kelompok percobaan sebagai berikut:
 - a. Kelompok metformin oral = 100 mg/kg berat badan per oral dalam larutan normal salin 100 mcl, diberikan sekali sehari.
 - b. Kelompok metformin intraperitoneal = 100 mg/kg berat badan dalam larutan normal salin 100 mcl, diberikan secara injeksi intraperitoneal sekali sehari.
 - c. Kelompok kontrol = larutan normal salin 100 mcl, diberikan dalam dosis terbagi 3 kali sehari.
5. Pada hari 180 akan dilakukan pengukuran ulangan kadar sitokin tersebut di atas dari vena sinus atau ekor mencit untuk dibandingkan dengan kadar awal.
6. Pada hari 180 mencit akan dimatikan dengan menggunakan teknik asfiksia CO₂ dan kemudian dilakukan pemeriksaan ekspresi mRNA FOXP3 dan analisis histologik dari jaringan ginjal untuk melihat derajat keparahan dari nefritis yang terjadi.

**Cara Pengukuran Aktivitas Interferon Gamma dan Interleukin (2, 4, 10, 17)
dalam model mencit**

Sample serum/plasma penderita disiapkan bersama dengan IFN-Gamma dan Interleukin kit (Abcam) dalam suhu kamar sebelum digunakan. Setiap sampel dilakukan secara triplicate untuk menjamin kebenaran/validitas hasil ELISA.

Kemudian diisi paknya semua reagen, dilusi standard dan sampel serum penderita. Buka mikroplate strip dan buat layout dari sampel sesuai dengan jumlah sampel yang akan dimasukkan kedalam well/sumur. Tahap pertama dilakukan penambahan 100 μ L Assay Diluent yang berisi buffer protein kedalam setiap sumur. Selanjutnya ditambahkan 100 μ L cairan Standard yang berisi recombinant human gen target dari KIT yang telah ditentukan atau dilusi sampel dari serum penderita kedalam setiap well/sumur. Lalu dilakukan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar.

Isap cairan disetiap well/sumur dan dicuci dengan PBS steril. Proses pencucian ini dilakukan 4 kali secara berturut turut. Kemudian ditambahkan 200 μ L cairan Conjugate yang berisi streptavidin HRP kedalam setiap well/sumur dan tutup dengan penutup plastik dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Cairan diisap dan selanjutnya dilakukan pencucian ulang sebanyak 4 kali dengan menggunakan PBS steril. Proses berikutnya ditambahkan 200 μ L Substrate Solution yang berisi TMB kedalam setiap well/sumur. Dan Inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar dimana mikroplate disimpan pada keadaan gelap untuk menghindari cahaya.

Setelah selesai diinkubasi reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μ L cairan Stop Solution yang berisi H₂SO₄ kedalam setiap well/sumur dan dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml.

Cara pengukuran mRNA FOXP3

- **Ekstraksi nucleic acid RNA dan DNA**

Volume sampel sekitar 100 µg/ul jaringan/darah dimasukkan ke dalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocianate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat no. 50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M Ethylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100. Selanjutnya diputar dengan kecepatan 12.000 rpm.

Sedimen ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang terdiri dari 50ml H₂O dan 500 µl dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi diatom ini dapat mengikat 10 µg RNA/DNA jaringan/darah, kemudian dilakukan "vortex" dan disentrifuse di dalam tabung eppendorf 1.5 ml dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit. Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120 g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml larutan "L2". Selanjutnya divortex dan disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton.

Hasilnya kemudian dipanaskan dalam waterbath pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM EDTA dalam 10 mM Tris HCL pH 8.0, kemudian dilakukan vortex dan dilanjutkan sentrifuse dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, kemudian diinkubasi dalam oven selama 10 menit pada suhu 56oC. Kemudian dilakukan vortex dan sentrifuse ulang selama 30 detik pada kecepatan 12.000 rpm dan diambil supernatannya. Supernatan dari proses ini akan diperoleh hasil ekstraksi nukleotida dan disimpan pada suhu -80oC sebelum dilakukan analisis PCR. {Hatta, 2007 #72} {Boom, 1990 #73}

- **Amplifikasi DNA dengan metode PCR**

Proses ini dilakukan pada sampel DNA yang telah diisolasi. Terlebih dahulu dibuat PCR-mix dengan primer yang spesifik dari FOXP3 yang akan diamplifikasi sebanyak 22,5 µl yaitu 2,5 µl buffer PCR 10X, 0,5 µl Taq polimerase, 2 µl MgCl₂, 2 µl dNTPs, 13,5 µl aquadest, kemudian ditambahkan primer FoxP3 forward: 5'-TCATCCGCTGGGCCATCCTG-3' and FoxP3 reverse: 5'-GTGGAAACCTCACTTCTTGGTC-3' masing masing 1 µl. Selanjutnya sebanyak 2,5 µl ekstrak DNA ditambahkan ke dalam 22,5 µl campuran PCR primer F/R dan dilakukan amplifikasi dengan tahap pertama 94oC selama 2 menit dan dilanjutkan dengan 40 siklus masing 60 detik pada 94oC; 45 detik pada 57oC; dan 60 detik pada 72oC. Proses ini dilanjutkan dengan 72oC selama 2 menit dengan menggunakan mesin PCR (Thermal cycler Applied Biosystem 2720) .

Setelah itu hasil amplifikasi dari campuran PCR primer F/R diambil masing-masing 2,5 µl dan dimasukkan ke dalam campuran loading buffer untuk dielektroforesis.

- **Analisa produk PCR dengan elektroforesis**

Masing-masing 10 µl produk amplifikasi dicampur dengan 5 µl larutan loading. Setelah tercampur dengan baik masing-masing dimasukkan ke dalam sumur gel agarosa 2% yang terendam dalam tangki yang berisi buffer TBE. Selanjutnya, elektroforesis dijalankan selama 1 jam dengan tegangan konstan 75 volt. Setelah 1 jam, elektroforesis dihentikan dengan gel diangkat untuk diamati di bawah sinar UV. Hasil positif jika terdapat pita DNA dan negatif jika tidak terdapat pita DNA pada gel.

- **Cara kerja Realtime PCR untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen target**

Proses gen spesifik oligonukleotida primer untuk GAPDH sebagai housekeeping gene (internal control). Mendeteksi gen mRNA FOXP3 dengan menggunakan primer spesifik forward dan reverse. Protokol PCR: dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94oC selama 3 menit, Siklus diulang 38 kali dengan 54oC (30 detik). Mendeteksi gen GAPDH dengan menggunakan Forward/sense primer: AGAGGGAAATCGTGCGTGAC ; Protokol PCR: 94oC(10 menit); 32 siklus 54oC (30 detik). Dan reverse/antisense primer: CAATAGTGATGACCTGGCC GT sesuai dengan protocol Tomomi Yajima.

QRT-PCR menggunakan Green QRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrumen Mx4000. Protokol disesuaikan menggunakan instrumen dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrumen pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR.

Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam reaksi, diencerkan 1 :500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya. Mengencerkan 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es. Mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 4oC dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang.

Reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Menyiapkan campuran reagen untuk reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah ini. Campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 µl (termasuk RNA percobaan)

12,5 µl dari 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix ditambah x µl dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease – bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan pewarna referens dari tahap 1 (opsional) serta 1,0 µl dari RT/Rnase campuran enzim blok dengan 50 µl total volume reaksi juga dapat digunakan. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), kemudian distribusikan campuran ke tabung

reaksi percobaan dengan menambahkan x μ l RNA percobaan pada setiap tabung reaksi. Reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi). Reaksi disentrifuse dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin Realtime PCR (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA){Yajima, 1998 #74}

- **Perhitungan Kurva kalibrasi dengan Ct (cycle threshold)**

Untuk kuantifikasi relatif ekspresi gen hTR maka dibuat kalibrasi kurva dimana RNA GAPDH, sebagai housekeeping enzim, digunakan sebagai kontrol endogen. Kurva kalibrasi sebagai xy (scatter) dan plot mewakili log dari jumlah input (log ng mRNA total awal) sebagai sumbu x dan Ct sebagai sumbu y. Persamaan yang berasal dari garis kurva kalibrasi.

Dua rumus untuk log ng hTR dan GAPDH adalah sebagai berikut:

- KOSENTRASI ekspresi mRNA gen = - slope X log (ng mRNA sampel awal) + Ct (r= 0.998).
- Contoh :
 - Kosentrasi ekspresi mRNA gen target = $-3.26x + 28.63$ (r=0,999)
 - Kosentrasi ekspresi mRNA gen GAPDH = $-3.19x + 26.46$ (r= 0.997).
- Biasanya berat sampel awal sekitar 50 ng mRNA (= log50 = 1.698)

- Bila nilai Ct sampel adalah dimasukkan kedalam rumus untuk gen target atau GAPDH maka konsentrasi hTR atau GAPDH dapat dihitung.
- Untuk menormalkan perbedaan dalam jumlah total RNA ditambahkan ke setiap reaksi, GAPDH adalah terpilih sebagai kontrol RNA endogen.
- **Untuk membandingkan 2 sampel gen**

Setelah RT-PCR maka dilakukan kuantisasi amplifikasi gen dengan menentukan ambang siklus (Ct). Kuantisasi relatif ekspresi gen hTR dievaluasi menggunakan metode perbandingan Ct. Nilai ΔCt ditentukan dengan cara mengurangkan target Ct masing-masing sampel dengan nilai Ct dari β -actinnya. Perhitungan $\Delta\Delta Ct$ ialah nilai rata-rata ΔCt sampel ASC sebagai kalibrator dikurangi nilai rata-rata ΔCt sampel kelompok normal. Kelipatan perubahan dari ekspresi dari gen target yang setara dengan $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

- RUMUS : Perbedaan kelipatan dalam membandingkan ekspresi gen 1 dengan ekspresi gen 2 = $[2^{-\Delta\Delta Ct}]$ dan diketahui :
- $\Delta\Delta Ct = \{ \text{rata-rata (triplicate) Ct } (\Delta Ct_1) \text{ sampel 1} \} - \{ \text{rata-rata (triplicate) Ct } (\Delta Ct_2) \text{ sampel 2} \}$

Cara persiapan, pemeriksaan dan skoring histopatologi ginjal mencit

Pada hari ke 120 (mencit model LES) dan hari ke 180 (mencit kelompok terapi) akan dilakukan pemeriksaan dan skoring histopatologi ginjal mencit dengan langkah sebagai berikut:

1. Mencit ditimbang dan dicatat berat badannya.
2. Mencit dikorbankan dengan menggunakan metode asfiksia CO₂.
3. Ginjal mencit dikeluarkan dari rongga tubuh dan kemudian ditimbang untuk setiap ginjal kanan dan kiri.
4. Ginjal kiri kemudian dipotong dua secara longitudinal dan ginjal kanan secara vertikal, kemudian ginjal masing-masing mencit difiksasi dengan Normal Buffer Formaldehyde 10% di dalam wadah terpisah yang telah diberi label sebelumnya.
5. Jaringan ginjal mencit setelah fiksasi dipersiapkan dalam blok parafin, dipotong 5 sediaan menggunakan somatom dan diwarnai dengan H&E.
6. Nilai rata-rata glomerular dihitung dari tingkatan kerusakan pada 50 sel glomerular pada tiap tikus. Skoring glomerular adalah 0 = normal, 1 = *mesangial expansion*, 2 = proliferasi endokapiler, 3 = kapilaritis atau perubahan nekrosis, 4 = *crests*. Untuk skoring interstitial dihitung dari mikroskop *50-high power fields* yaitu 0 = tidak ada, 1 = <25 % interstitial, 2 = 25 – 50 % interstitial, 3 = >50% interstitial. (Bossaller et al., 2013)

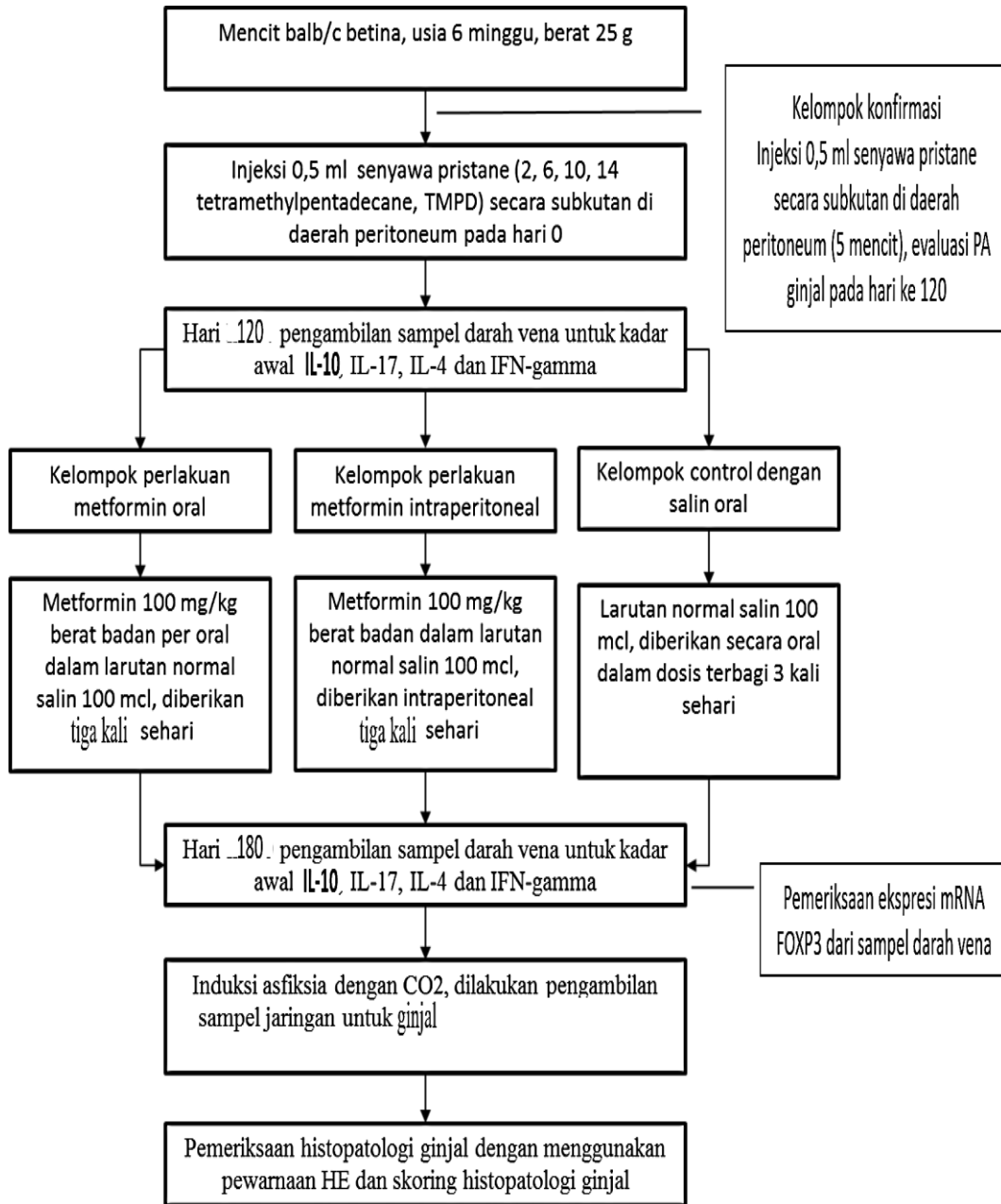
IV.8. Analisis statistik

Analisa statistik akan dilakukan dengan menggunakan uji beda dua rerata (t test) untuk melihat perbedaan rerata skor histopatologi ginjal dan kadar mRNA FOXP3, IFN-gamma, IL-2, IL-4, IL-10 dan IL-17 antar ketiga kelompok. Analisa statistik digunakan dengan program pengolahan data SPSS versi 15.

Tabel *Dummy* Analisa Statistik

	Normal Salin	Metformin Oral	Metformin Intraperitoneal
Rerata Skor Histopatologi Ginjal			
Beda Rerata Kadar mRNA FOXP3			
Beda Rerata Rasio IFN-gamma/IL-4			
Beda Rerata Rasio IL-17/IL-10			
Beda Rerata Kadar Interferon Gamma			
Beda Rerata Kadar Interleukin 10			
Beda Rerata Kadar Interleukin 4			
Beda Rerata Kadar Interleukin 17			

IV.9. Alur penelitian



V. Hasil dan Pembahasan

V.1. Hasil

V.1.1. Induksi model mencit nefritis lupus dengan pristane

Telah dilakukan studi terhadap kelompok mencit sesuai rencana studi, dari 31 mencit balb/c yang dipersiapkan terjadi kematian pada 2 ekor pada masa penyesuaian. Kelompok mencit balb/c normal dan balb/c terinduksi pristane masing-masing 5 ekor dikorbankan pada hari ke 120 masa studi untuk dilakukan uji kesesuaian model. Tiga kelompok lainnya, setelah dilakukan induksi dengan pristane, mulai hari ke 121 sampai hari 180 diberikan metformin sesuai dengan protokol studi. Selama masa studi hari ke 0-180 tidak terjadi kematian yang tidak direncanakan, dan ketiga kelompok intervensi (masing-masing 5 ekor) dikorbankan pada hari ke 180 untuk dilakukan analisis sitokin, ekspresi mRNA dan patologi anatomi ginjal. Empat ekor mencit yang tidak masuk dalam analisis studi, dikorbankan dan didisposisi sesuai dengan prosedur yang berlaku.

Pengaruh induksi pristane terhadap aktivitas sitokin-sitokin terkait patomekanisme nefritis lupus

Aktivitas sitokin-sitokin yang diketahui mengalami peningkatan pada LES diwakili oleh IFN-gamma dan IL-17, sedangkan sitokin-sitokin yang diketahui mengalami penurunan diwakili oleh IL-2, IL-10 dan IL-4. Tabel 2, 3 dan 4 di bawah ini menggambarkan kadar sitokin-sitokin tersebut pada saat sebelum dan

sesudah dilakukan induksi nefritis lupus dengan menggunakan pristane intraperitoneal.

Tabel 2. Perbandingan Kadar IFN-Gamma pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal

	IFN-gamma Awal (pg/ml)	IFN-gamma Pasca Induksi (pg/ml)	Beda rerata	Nilai p
Mencit Balb/c kontrol normal	269,60 (254,08-285,12)	269,82 (250,27-289,37)	-0,24 (-24,13-23,68)	0,98
Mencit Balb/c model LES	281,12 (249,85-312,39)	322,42 (305,70-339,15)	-41,29 (-83,26-6,66)	0,052
Mencit LES + Kontrol NS	271,18 (253,70-288,67)	321,54 (303,11-339,97)	-50,35 (-79,33-(-21,37))	0,008
Mencit LES + Metformin Oral	270,30 (252,10-288,51)	326,18 (310,57-341,78)	-55,87 (-79,81-(-31,93))	0,003
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	270,05 (254,18-285,91)	329,61 (318,07-341,14)	-59,55 (-72,68-(-46,43))	<0,001

Kadar sitokin IFN-gamma awal pada kelompok mencit Balb/c kontrol normal, yang tidak diinduksi menjadi nefritis lupus dengan pristane, setara dengan kelompok model nefritis lupus (269,60 vs. 281,12 pg/mL; beda rerata 11,52 pg/mL; IK 95% -17,47 – 40,52 pg/mL; p=0,386). Pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IFN-gamma antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (269,82 vs. 322,42 pg/mL; beda rerata 52,59 pg/mL; IK 95% 31,23 – 73,96 pg/mL; p<0,001).

Tabel 3. Perbandingan Kadar IL-17 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal

	IL-17 Awal (pg/ml)	IL-17 Pasca Induksi (pg/ml)	Beda rerata	Nilai p
Mencit Balb/c kontrol normal	53,567 (49,85-57,27)	52,3 (50,09-64,65)	1,23 (-0,71-3,17)	0,153
Mencit Balb/c model LES	55,33 (52,87-57,78)	64,20 (61,54-66,87)	-8,87 (-13,04-(-4,71))	0,004
Mencit LES + Kontrol NS	57,47 (54,67-60,29)	64,95 (61,80-68,10)	-7,46 (-13,05-(-1,88))	0,021
Mencit LES + Metformin Oral	55,74 (52,58-58,90)	65,20 (61,78-68,62)	-9,87 (-14,48-(-5,26))	<0,001
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	52,74 (50,10-55,38)	62,61 (60,49-64,73)	1,23 (-0,71-3,17)	0,004

Kadar sitokin IL-17 awal pada kelompok mencit Balb/c kontrol normal, yang tidak diinduksi menjadi nefritis lupus dengan pristane, setara dengan kelompok model nefritis lupus (53,56 vs. 55,30 pg/mL; beda rerata 1,76 pg/mL; IK 95% - 1,92 – 5,45 pg/mL; p=0,303). Pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IL-17 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (52,33 vs. 64,20 pg/mL; beda rerata 11,87 pg/mL; IK 95% 8,93 – 14,81 pg/mL; p<0,001).

Kadar sitokin IL-2 awal pada kelompok mencit Balb/c kontrol normal, yang tidak diinduksi menjadi nefritis lupus dengan pristane, setara dengan kelompok model nefritis lupus (136,59 vs. 150,56 pg/mL; beda rerata 6,55 pg/mL; IK 95% -1,14 – 2,90 pg/mL; p=0,066). Pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IL-2 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model

nefritis lupus (131,21 vs. 101,89 pg/mL; beda rerata -29,31 pg/mL; IK 95% - 44,90 – (-13,73) pg/mL; $p < 0,001$).

Tabel 4. Perbandingan Kadar IL-2 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal

	IL-2 Awal (pg/ml)	IL-2 Pasca Induksi (pg/ml)	Beda rerata (pg/ml)	Nilai p
Mencit Balb/c kontrol normal	136,59 (122,72-150,47)	131,21 (119,23-143,19)	5,38 (-18,97-29,74)	0,573
Mencit Balb/c model LES	150,56 (138,78-162,35)	101,89 (87,45-116,34)	48,67 (33,40-63,94)	0,001
Mencit LES + Kontrol NS	139,86 (125,20-154,51)	104,00 (90,37-117,63)	35,85 (13,21-58,49)	0,012
Mencit LES + Metformin Oral	145,45 (130,49-160,42)	101,57 (87,38-115,76)	43,88 (16,28-71,48)	0,012
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	136,20 (123,84-148,56)	89,50 (80,02-98,98)	46,69 (31,12-62,26)	0,001

Kadar sitokin IL-10 awal pada kelompok mencit Balb/c kontrol normal, yang tidak diinduksi menjadi nefritis lupus dengan pristane, setara dengan kelompok model nefritis lupus (29,16 vs. 30,28 pg/mL; beda rerata 1,11 pg/mL; IK 95% - 5,78 – 8,01 pg/mL; $p = 0,719$). Pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IL-10 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (27,25 vs. 11,90 pg/mL; beda rerata -15,35 pg/mL; IK 95% - 21,38 – (-9,32) pg/mL; $p < 0,001$).

Tabel 5. Perbandingan Kadar IL-10 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal

	IL-10 Awal (pg/ml)	IL-10 Pasca Induksi (pg/ml)	Beda rerata (pg/ml)	Nilai p
Mencit Balb/c kontrol normal	29,16 (22,40-35,92)	27,25 (22,27-32,24)	1,97 (-6,10-9,91)	0,545
Mencit Balb/c model LES	30,28 (25,44-35,11)	11,90 (6,62-17,18)	18,37 (9,75-27,00)	0,004
Mencit LES + Kontrol NS	29,14 (21,83-36,45)	12,09 (5,25-18,93)	17,05 (6,01-28,08)	0,013
Mencit LES + Metformin Oral	29,71 (22,07-37,35)	8,68 (3,12-13,24)	21,03 (11,59-30,46)	0,003
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	29,26 (22,49-36,02)	12,09 (7,73-16,45)	17,16 (6,89-27,43)	0,010

Tabel 6. Perbandingan Kadar IL-4 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal

	IL-4 Awal (pg/ml)	IL-4 Pasca Induksi (pg/ml)	Beda rerata (pg/ml)	Nilai p
Mencit Balb/c kontrol normal	72,14 (58,45-85,83)	78,90 (59,74-98,06)	-6,75 (8,14-(-29,36)	0,453
Mencit Balb/c model LES	70,67 (53,27-88,06)	22,18 (3,87-40,49)	48,48 (33,52-63,45)	0,001
Mencit LES + Kontrol NS	72,45 (55,41-89,50)	27,74 (12,15-43,34)	44,71 (32,78-56,64)	<0,001
Mencit LES + Metformin Oral	72,85 (52,46-93,24)	24,36 (14,00-34,72)	48,48 (25,28-71,69)	0,004
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	71,95 (56,02-87,88)	20,41 (7,82-33,01)	51,53 (32,59-70,48)	0,002

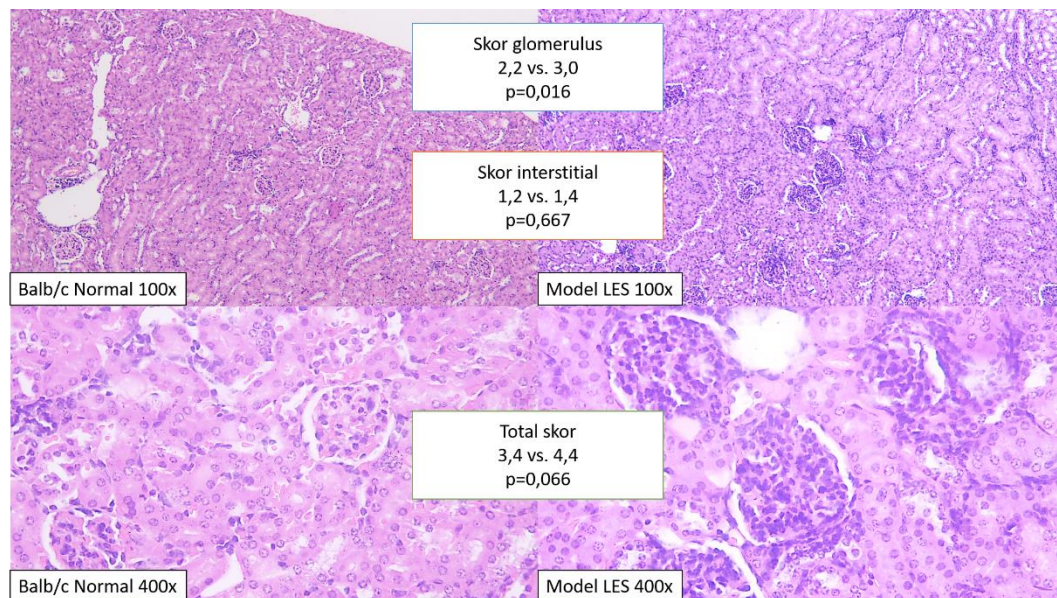
Kadar sitokin IL-4 awal pada kelompok mencit Balb/c kontrol normal, yang tidak diinduksi menjadi nefritis lupus dengan pristane, setara dengan kelompok model nefritis lupus (72,14 vs. 70,67 pg/mL; beda rerata -1,47 pg/mL; IK 95% -19,86 – 16,90 pg/mL; p=0,858). Pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IL-4 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (78,90 vs. 22,18 pg/mL; beda rerata -56,72 pg/mL; IK 95% -78,72 – (-34,71) pg/mL; p<0,001).

Tabel 7. Perbandingan Besaran Ekspresi mRNA FOXP3 pada Sebelum dan Sesudah Induksi dengan Pristane Intraperitoneal

	Ekspresi mRNA FOXP3 Awal (fold change)	Ekspresi mRNA FOXP3 Pasca Induksi (fold change)	Beda rerata (fold change)	Nilai p
Mencit Balb/c kontrol normal	8,87 (8,43-9,31)	8,80 (8,26-9,34)	0,07 (-0,51-0,65)	0,753
Mencit Balb/c model LES	8,86 (8,04-9,69)	7,17 (6,81-7,53)	1,69 (0,63-2,75)	0,011
Mencit LES + Kontrol NS	9,05 (8,39-9,70)	7,56 (6,96-8,17)	1,48 (0,50-2,47)	0,014
Mencit LES + Metformin Oral	9,05 (8,22-9,87)	6,85 (6,37-7,32)	2,19 (1,10-3,29)	0,005
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	8,94 (8,46-9,41)	6,99 (6,34-7,65)	1,94 (1,30-2,57)	0,001

Pengaruh induksi pristane terhadap ekspresi mRNA FOXP3

Ekspresi mRNA FOXP3 mewakili aktivitas dari sel T-Regulator, tabel 5 di bawah ini memberikan gambaran sebelum dan sesudah induksi pristane pada masing-masing kelompok mencit. Besaran ekspresi mRNA FOXP3 awal pada kelompok mencit Balb/c kontrol normal, yang tidak diinduksi menjadi nefritis lupus dengan pristane, setara dengan kelompok model nefritis lupus (8,87 vs. 8,86 *fold change*; beda rerata -0,00 *fold change*; IK 95% -0,78 – 0,77 pg/mL; p=0,983). Pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan ekspresi mRNA FOXP3 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (8,80 vs.7,17 *fold change*; beda rerata -1,63 pg/mL; IK 95% -2,17 – (1,09) pg/mL; p<0,001).



Gambar 19. Perbandingan hasil patologi ginjal dengan pewarnaan H&E untuk BALB/c normal dan terinduksi pristane.

Evaluasi hasil patologi ginjal mencit terinduksi pristane dan kontrol normal

Secara umum pada kelompok mencit Balb/c normal yang tidak dilakukan induksi dengan pristane, terjadi perubahan patologi ringan berupa tubulonefritis ginjal ringan. Hanya terjadi sedikit perubahan di glomerulus kesemua anggota kelompok, berupa ekspansi mesangial, proliferasi endokapiler dan kapilaritis minimal. Infiltrasi interstitial signifikan (25-50% lapangan pandang) hanya terjadi pada pada satu anggota kelompok mencit Balb/c normal.

Pada kelompok mencit model SLE, yang diinduksi dengan pristane dan dikorbankan pada hari ke 120 bersama dengan kelompok normal, didapatkan perubahan di glomerulus yang cukup signifikan. Perubahan pada glomerulus terutama berupa proliferasi endokapiler dominan, disertai dengan sedikit ekspansi mesangial dan kapilaritis. Gangguan berupa tubulo-nefritis interstitial signifikan juga didapatkan pada 2 anggota kelompok mencit model SLE, sehingga ahli patologi menyatakan perubahan patologi ginjal signifikan bermakna pada kelompok model SLE dibandingkan normal (lampiran 1. Hasil patologi ginjal).

Hasil skoring glomerulus, sesuai metode yang digambarkan pada bab tinjauan pustaka, memberikan nilai 2,2 vs. 3,0 ($p=0,016$) untuk BALB/c normal dibandingkan dengan terinduksi pristane. Sedangkan skoring interstitial memberikan nilai 1,2 vs. 1,4 ($p=0,667$), sehingga total skor skoring nefritis menjadi 3,4 vs. 4,4 ($p=0,066$).

V.1.2. Intervensi model mencit nefritis lupus dengan metformin

Tabel 8. Perbandingan Kadar IFN-gamma pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin

	Kadar IFN-gamma sebelum terapi (pg/mL)	Kadar IFN-gamma sesudah terapi (pg/mL)	Beda rerata (pg/mL)	Nilai p
Mencit LES + Kontrol NS	321,54 (303,11-339,97)	309,39 (297,23-321,55)	12,14 (-17,3-41,61)	0,316
Mencit LES + Metformin Oral	326,18 (310,57-341,78)	292,83 (278,18-307,48)	33,34 (10,74-55,94)	0,015
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	329,61 (318,07-341,14)	266,90 (256,58-277,22)	62,70 (47,28-78,12)	<0,001

Efek metformin oral dan intraperitoneal terhadap kadar sitokin-sitokin terkait patomekanisme LES

Metformin pada studi ini diberikan secara oral dan intraperitoneal, dibandingkan dengan kelompok kontrol yang diberikan normal salin per oral sesuai protokol. Hasil analisis terhadap kadar IFN-gamma sebelum dan sesudah pemberian terapi dengan metformin dapat dilihat pada tabel 8. Bila dibandingkan hasil terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IFN-gamma didapatkan 309,39 vs.292,83 pg/ml (beda rerata 16,56 pg/ml; IK 95% 0,74-32,37; p=0,042). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IFN-gamma didapatkan 309,39 vs.266,90 pg/ml (beda rerata 42,49 pg/ml; IK 95% 29,24-55,73; p<0,001). Perbandingan perubahan kadar IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan

metformin intraperitoneal memberikan hasil 33,34 vs. 62,70 pg/ml (beda rerata - 29,35 pg/ml; IK 95% -52,08-(-6,63)); p=0,018).

Tabel 9. Perbandingan Kadar IL-17 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin

	Kadar IL-17 sebelum terapi (pg/ml)	Kadar IL-17 sesudah terapi (pg/ml)	Beda rerata (pg/ml)	Nilai p
Mencit LES + Kontrol NS	64,95 (61,80-68,10)	64,62 (62,54-66,70)	0,33 (-2,91-3,57)	0,791
Mencit LES + Metformin Oral	65,20 (61,78-68,62)	60,30 (56,67-63,94)	4,85 (2,98-6,80)	0,002
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	62,61 (60,49-64,73)	55,04 (48,88-61,13)	7,56 (0,34-14,79)	0,044

Hasil analisis terhadap kadar IL-17 sebelum dan sesudah pemberian terapi dengan metformin dapat dilihat pada tabel 9. Bila dibandingkan hasil terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IL-17 didapatkan 64,62 vs. 60,30 pg/ml (beda rerata 4,31 pg/ml; IK 95% 0,83-7,79; p=0,021). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-17 didapatkan 64,62 vs. 55,04 pg/ml (beda rerata 9,57 pg/ml; IK 95% 4,17-14,97; p=0,004). Perbandingan perubahan kadar IL-17 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -4,89 vs. -7,56 pg/ml (beda rerata -2,67 pg/ml; IK 95% -9,80 – 4,45; p=0,371).

Tabel 10. Perbandingan Kadar IL-2 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin

	Kadar IL-2 sebelum terapi (pg/mL)	Kadar IL-2 sesudah terapi (pg/mL)	Beda rerata (pg/mL)	Nilai p
Mencit LES + Kontrol NS	104,00 (90,37-117,63)	104,89 (92,96-116,82)	-0,89 (-22,52-20,73)	0,914
Mencit LES + Metformin Oral	101,57 (87,38-115,76)	119,41 (106,65-132,18)	-17,84 (-38,03-2,34)	0,070
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	89,50 (80,02-98,98)	137,62 (125,31-149,93)	-48,11 (-65,26-(-30,96))	0,001

Hasil analisis terhadap kadar IL-2 sebelum dan sesudah pemberian terapi dengan metformin dapat dilihat pada tabel 10. Bila dibandingkan hasil terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IL-2 didapatkan 104,89 vs.119,41 pg/ml (beda rerata -14,52 pg/ml; IK 95% -29,03 – (-0,008); p=0,05). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-2 didapatkan 104,89 vs.137,62 pg/ml (beda rerata -32,72 pg/ml; IK 95% -46,96-(-18,48); p=0,001). Perbandingan perubahan kadar IL-2 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -17,84 vs. -48,11 pg/ml (beda rerata 30,27 pg/ml; IK 95% 8,26-52,27); p=0,013).

Hasil analisis terhadap kadar IL-10 sebelum dan sesudah pemberian terapi dengan metformin dapat dilihat pada tabel 11. Bila dibandingkan hasil terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IL-10 didapatkan 10,38 vs.21,75 pg/ml (beda rerata -11,36 pg/ml; IK 95% -19,59 – (-3,14); p=0,013). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin

dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-10 didapatkan 10,38 vs.31,16 pg/ml (beda rerata -20,78 pg/ml; IK 95% -27,80 – (-13,76); p<0,001). Perbandingan perubahan kadar IL-10 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -13,07 vs. (-19,07) pg/ml (beda rerata 6,00 pg/ml; IK 95% -2,39 – 14,39; p=0,138).

Tabel 11. Perbandingan Kadar IL-10 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin

	Kadar IL-10 sebelum terapi (pg/ml)	Kadar IL-10 sesudah terapi (pg/ml)	Beda rerata (pg/ml)	Nilai p
Mencit LES + Kontrol NS	12,09 (5,25-18,93)	10,38 (3,33-17,44)	1,70 (-7,16-10,57)	0,622
Mencit LES + Metformin Oral	8,68 (3,12-13,24)	21,75 (14,8-28,70)	-13,07 (-18,90-(-7,24))	0,003
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	12,09 (7,73-16,45)	31,16 (26,51-35,81)	-19,07 (-27,33-(-10,81))	0,003

Hasil analisis terhadap kadar IL-4 sebelum dan sesudah pemberian terapi dengan metformin dapat dilihat pada tabel 12. Bila dibandingkan hasil terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IL-4 didapatkan 20,98 vs.48,21 pg/ml (beda rerata -27,22 pg/ml; IK 95% -38,67 – (-15,77); p=0,001). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-4 didapatkan 20,98 vs. 63,26 pg/ml (beda rerata -42,27 pg/ml; IK 95% -60,12 – (-24,43); p=0,001). Perbandingan perubahan kadar IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -23,84 vs. (-42,85) pg/ml (beda rerata 19,00 pg/ml; IK 95% 1,53 – 36,48; p=0,018).

Tabel 12. Perbandingan Kadar IL-4 pada Model Mencit LES Sebelum dan Sesudah Terapi Metformin

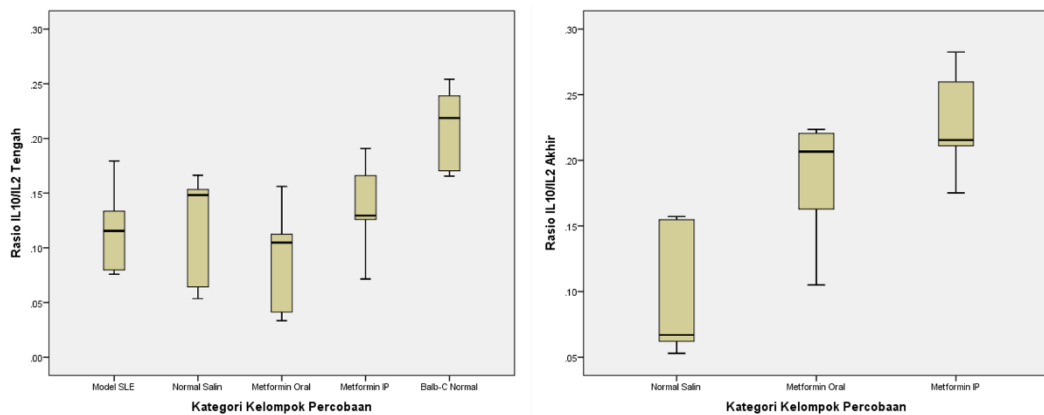
	Kadar IL-4 sebelum terapi (pg/ml)	Kadar IL-4 sesudah terapi (pg/ml)	Beda rerata (pg/ml)	Nilai P
Mencit LES + Kontrol NS	27,74 (12,15-43,34)	20,98 (11,73-30,24)	6,75 (-5,37-18,88)	0,197
Mencit LES + Metformin Oral	24,36 (14,00-34,72)	48,21 (38,00-58,42)	-23,84 (-36,63-(-11,05))	<0,001
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	20,41 (7,82-33,01)	63,26 (43,88-82,65)	-42,85 (-59,55-(-26,14))	0,004

Efek metformin oral dan intraperitoneal terhadap keseimbangan sitokin terkait jalur T-helper 1 dan T-helper 2

Rasio kadar IL-10 dan IL-2 (gambar 19) menunjukkan keseimbangan sitokin anti-inflamatorik jalur Th2 dibandingkan Th1, pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 0,11 vs. 0,20 (beda rerata -0,09; IK 95% -0,15 – (-0,03); p=0,08). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi 0,567 (p=0,003) terhadap nilai IL-10 dan IL-2 pasca induksi dengan pristane.

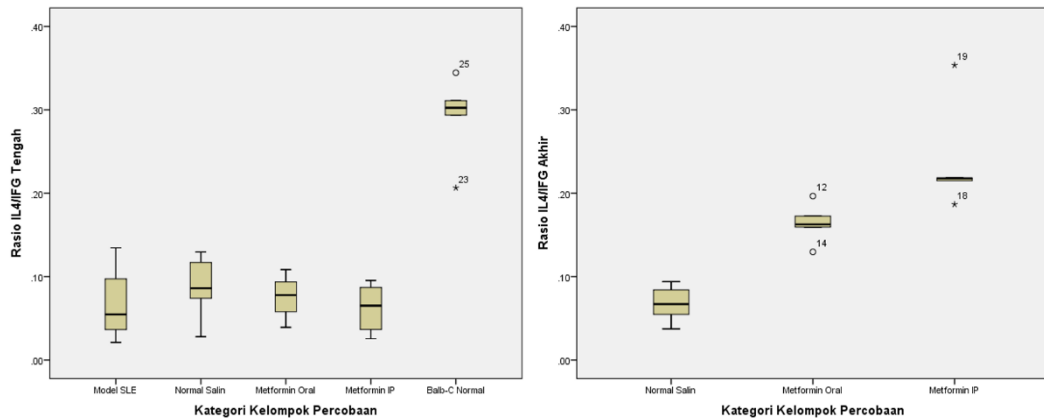
Pasca intervensi dengan metformin, rasio IL-10/IL-2 pada kelompok normal saline dibandingkan metformin oral memberikan hasil 0,09 vs. 0,18 (beda rerata -0,08; IK 95% -0,15 – (-0,01); p=0,031). Sedangkan rasio IL-10/IL-2 pada kelompok normal saline dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,09 vs 0,22 (beda rerata -0,12; IK 95% -0,19 – (-0,06); p=0,03). Perbandingan rasio IL-

10/IL-2 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,18 vs. 0,22 (beda rerata -0,04; IK 95% -0,11 – 0,02; $p=0,164$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi 0,685 ($p=0,005$) terhadap nilai IL-10 dan IL-2 pasca terapi dengan metformin.



Gambar 20. Rasio perbandingan IL-10/IL-2 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Rasio kadar IL-4 dan IFN-gamma (gambar 20) menunjukkan keseimbangan sitokin terkait aktivasi jalur Th2 dibandingkan Th1, pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 0,06 vs. 0,29 (beda rerata -0,22; IK 95% -0,29 – (-0,15); $p<0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,785 ($p>0,001$) terhadap nilai IL-4 dan IFN-gamma pasca induksi dengan pristane.



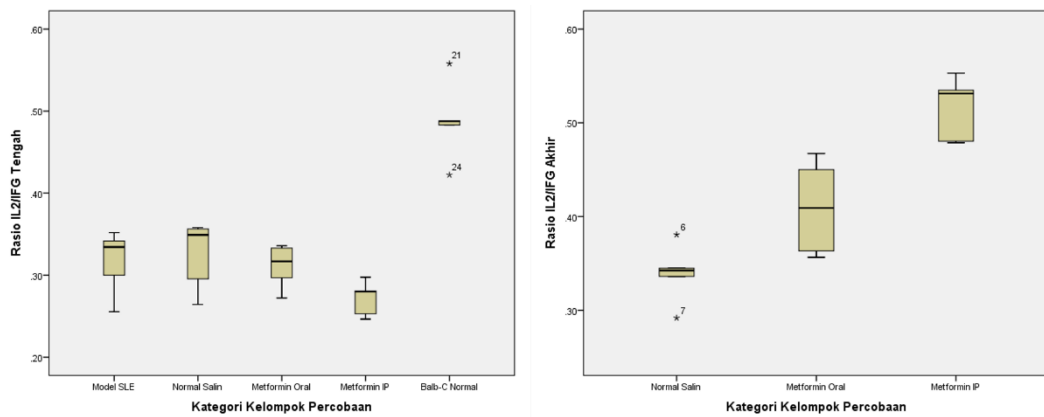
Gambar 21. Rasio perbandingan IL-4/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Pasca intervensi dengan metformin, rasio IL-4/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral memberikan hasil 0,06 vs. 0,16 (beda rerata -0,09; IK 95% -0,13 – (-0,06); $p < 0,001$). Sedangkan rasio IL-4/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,06 vs 0,23 (beda rerata -0,17; IK 95% -0,24 – (-0,09); $p = 0,001$). Perbandingan rasio IL-4/IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,16 vs. 0,23 (beda rerata -0,07; IK 95% -0,14 – 0,001; $p = 0,046$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,724 ($p = 0,002$) terhadap nilai IL-4 dan IFN-gamma pasca terapi dengan metformin.

Efek metformin oral dan intraperitoneal terhadap keseimbangan sitokin pro-inflamatorik dan anti-inflamatorik

Rasio kadar IL-2 dan IFN-gamma (gambar 21) menunjukkan keseimbangan sitokin terkait anti-inflamatorik dibandingkan pro-inflamatorik pada jalur Th1,

pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 0,31 vs. 0,48 (beda rerata - 0,17; IK 95% -0,23 – (-0,10); $p < 0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,696 ($p < 0,001$) terhadap nilai IL-2 dan IFN-gamma pasca induksi dengan pristane.

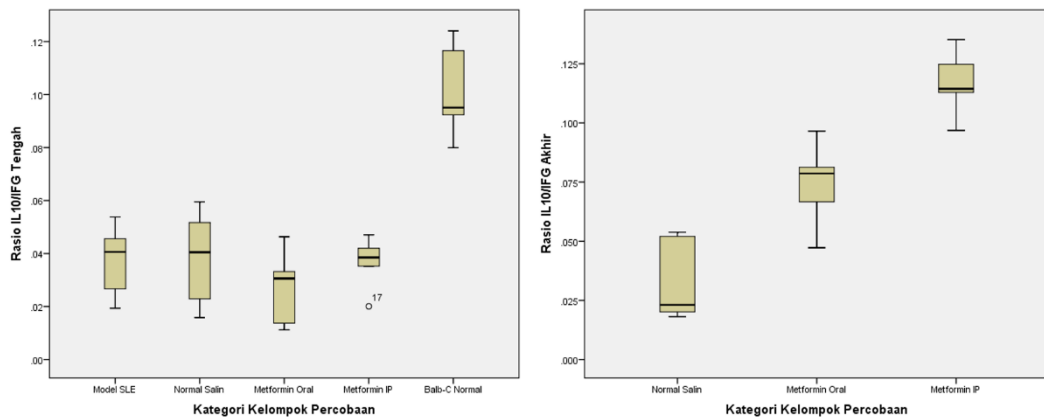


Gambar 22. Rasio perbandingan IL-2/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Pasca intervensi dengan metformin, rasio IL-2/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral memberikan hasil 0,33 vs. 0,40 (beda rerata -0,07; IK 95% -0,13 – (-0,009); $p = 0,029$). Sedangkan rasio IL-2/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,33 vs 0,51 (beda rerata -0,17; IK 95% -0,22 – (-0,12); $p < 0,001$). Perbandingan rasio IL-2/IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,40 vs. 0,51 (beda rerata -0,10; IK 95% -0,16 – 0,04; $p = 0,004$). Analisis korelasi dengan

menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi $-0,787$ ($p < 0,001$) terhadap nilai IL-2 dan IFN-gamma pasca terapi dengan metformin.

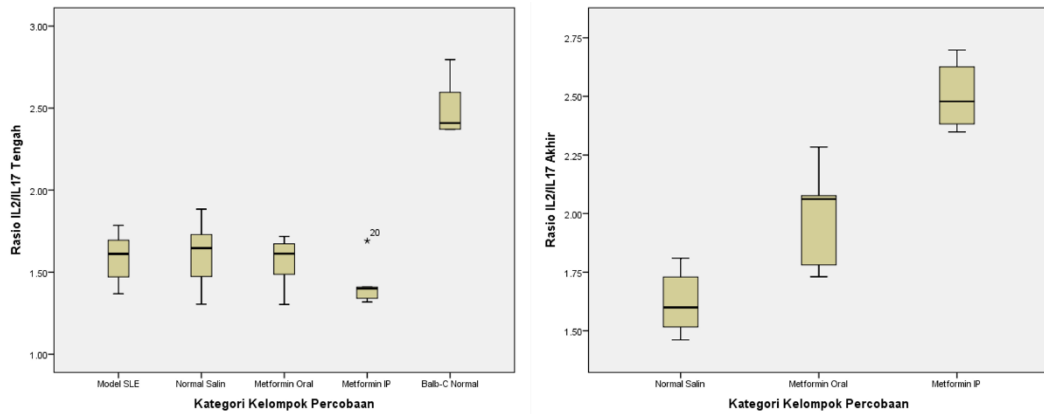
Rasio kadar IL-10 dan IFN-gamma (gambar 22) menunjukkan keseimbangan sitokin terkait anti-inflamatorik dibandingkan pro-inflamatorik, pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil $0,03$ vs. $0,10$ (beda rerata $-0,06$; IK 95% $-0,03 - 0,03$; $p < 0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi $-0,855$ ($p < 0,001$) terhadap nilai IL-10 dan IFN-gamma pasca induksi dengan pristane.



Gambar 23. Rasio perbandingan IL-10/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Pasca intervensi dengan metformin, rasio IL-10/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral memberikan hasil $0,03$ vs. $0,07$ (beda rerata $-0,04$; IK 95% $-0,06 - (-0,01)$; $p = 0,008$). Sedangkan rasio IL-10/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil $0,03$ vs $0,11$ (beda rerata $-0,08$; IK 95% $-0,10 - (-0,05)$;

$p < 0,001$). Perbandingan rasio IL-10/IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,07 vs. 0,11 (beda rerata -0,04; IK 95% -0,06 – (-0,01); $p = 0,003$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,690 ($p = 0,004$) terhadap nilai IL-10 dan IFN-gamma pasca terapi dengan metformin.

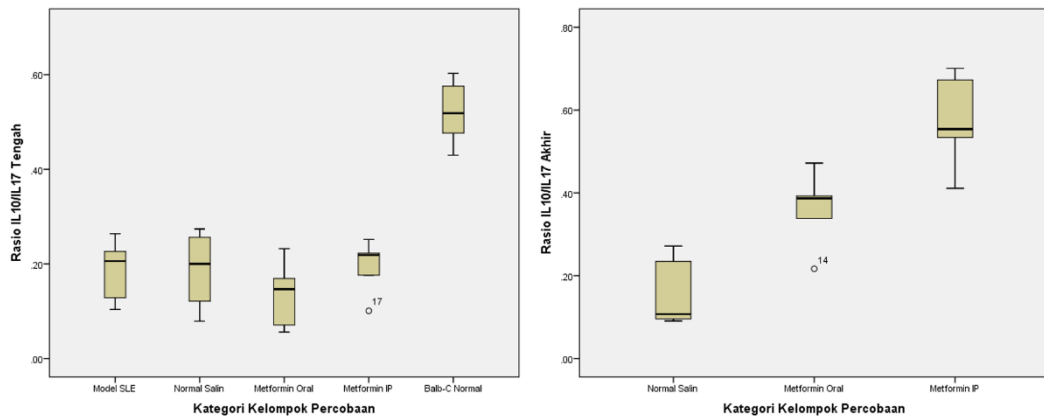


Gambar 24. Rasio perbandingan IL-2/IL-17 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Rasio kadar IL-2 dan IL-17 (gambar 23) menunjukkan keseimbangan sitokin terkait anti-inflamatorik dibandingkan pro-inflamatorik, pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 1,58 vs. 2,50 (beda rerata -0,92; IK 95% -1,18 – (-0,66); $p < 0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,666 ($p < 0,001$) terhadap nilai IL-2 dan IL-17 pasca induksi dengan pristane.

Pasca intervensi dengan metformin, rasio IL-2/IL-17 pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral memberikan hasil 1,62 vs. 1,98 (beda rerata -0,36;

IK 95% -0,64– (-0,08); $p=0,017$). Sedangkan rasio IL-2/IL-17 pada kelompok normal salin dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 1,62 vs 2,50 (beda rerata -0,88; IK 95% -1,09 – (-0,66); $p<0,001$). Perbandingan rasio IL-2/IL-17 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 1,98 vs. 2,50 (beda rerata -0,51; IK 95% -0,80 – (-0,23); $p=0,003$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,562 ($p=0,029$) terhadap nilai IL-2 dan IL-17 pasca terapi metformin.



Gambar 25. Rasio perbandingan IL-10/IL-17 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Rasio kadar IL-10 dan IL-17 (gambar 24) menunjukkan keseimbangan sitokin terkait aktivitas anti-inflamatorik (T-Reg) dibandingkan pro-inflamatorik (Th-17), pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 0,18 vs. 0,52 (beda rerata -0,33; IK 95% -0,43 – (-0,23); $p<0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,808 ($p<0,001$) terhadap nilai IL-10 dan IL-17 pasca induksi dengan pristane.

Tabel 13. Perbandingan Besaran Ekspresi mRNA FOXP3 pada Sebelum dan Sesudah Terapi dengan Metformin

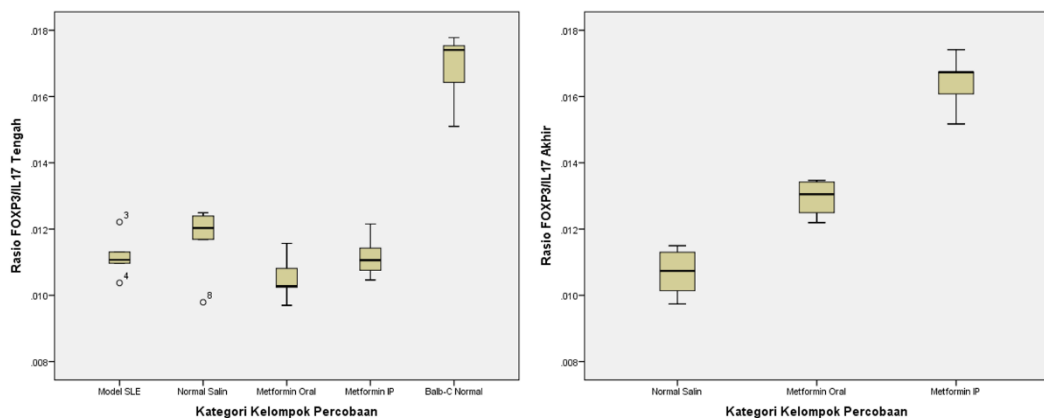
	Ekspresi mRNA FOXP3 sebelum terapi (fold change)	Ekspresi mRNA FOXP3 sesudah terapi (fold change)	Beda rerata (fold change)	Nilai p
Mencit LES + Kontrol NS	7,56 (6,96-8,17)	6,90 (6,28-7,51)	0,66 (0,09-1,22)	0,031
Mencit LES + Metformin Oral	6,85 (6,37-7,32)	7,79 (7,08-8,51)	-0,94 (-1,53-(-0,35))	0,011
Mencit LES + Metformin Intraperitoneal	6,99 (6,34-7,65)	9,02 (8,17-9,87)	-2,02 (-2,95-(-1,09))	0,04

Pasca intervensi dengan metformin, rasio IL-10/IL-17 pada kelompok normal saline dibandingkan metformin oral memberikan hasil 0,16 vs. 0,36 (beda rerata -0,20; IK 95% -0,33 – (-0,06); p=0,008). Sedangkan rasio IL-10/IL-17 pada kelompok normal saline dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,16 vs 0,57 (beda rerata -0,41; IK 95% -0,56 – (-0,26); p<0,001). Perbandingan rasio IL-10/IL-17 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,36 vs. 0,57 (beda rerata -0,21; IK 95% -0,36 – (-0,05); p= 0,013). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,761 (p<0,001) terhadap nilai IL-10 dan IL-17 pasca terapi metformin.

Efek metformin oral dan intraperitoneal terhadap ekspresi mRNA FOXP3

Hasil analisis terhadap kadar ekspresi mRNA FOXP3 yang mewakili aktivitas sel T-Regulator, sebelum dan sesudah pemberian terapi dengan metformin, dapat dilihat pada tabel 13. Bila dibandingkan hasil terapi pada kelompok kontrol

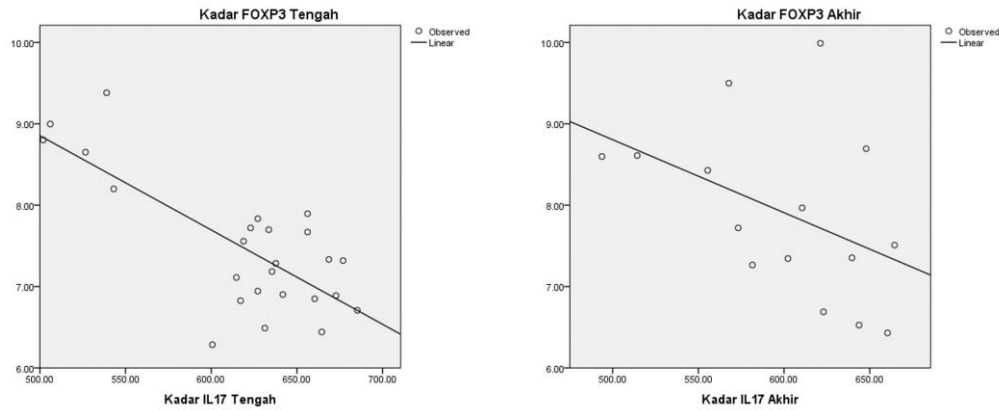
normal salin dengan metformin oral, hasil kadar ekspresi mRNA FOXP3 didapatkan 6,90 vs.7,79 *fold change* (beda rerata -0,89 *fold change*; IK 95% -1,68 – (-0,11); p=0,03). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar ekspresi mRNA FOXP3 didapatkan 6,90 vs.9,02 *fold change* (beda rerata -2,12 *fold change*; IK 95% -2,99 - (-1,25); p<0,001). Perbandingan perubahan kadar ekspresi mRNA FOXP3 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -0,94 vs. -2,02 *fold change* (beda rerata 1,07 *fold change*; IK 95% 0,16 – 1,99; p=0,027).



Gambar 26. Rasio perbandingan FOXP3/IL-17 pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Rasio kadar ekspresi mRNA FOXP3 dan IL-17 (gambar 25) menunjukkan keseimbangan aktivitas T-Reg dibandingkan Th-17, pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 0,011 vs. 0,016 (beda rerata -0,005; IK 95% -0,006 – 0,04; p<0,001). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson

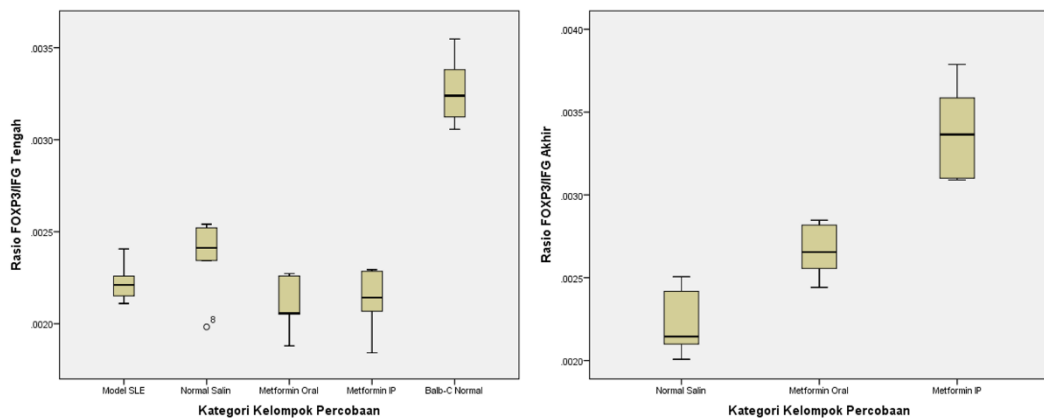
menunjukkan hasil koefisien korelasi $-0,756$ ($p < 0,001$) dan R^2 $0,572$ ($p < 0,001$) terhadap nilai ekspresi mRNA FOXP3 dan IL-17 pasca induksi dengan pristane.



Gambar 27. Analisis korelasi kadar IL-17 sebelum dan sesudah terapi metformin dikaitkan dengan perubahan ekspresi mRNA FOXP3.

Pasca intervensi dengan metformin, rasio FOXP3/IL-17 pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral memberikan hasil $0,010$ vs. $0,012$ (beda rerata $-0,02$; IK 95% $-0,003 - (-0,001)$; $p=0,001$). Sedangkan rasio FOXP3/IL-17 pada kelompok normal salin dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil $0,010$ vs $0,016$ (beda rerata $-0,05$; IK 95% $-0,006 - (-0,004)$; $p < 0,001$). Perbandingan rasio FOXP3/IL-17 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil $0,012$ vs. $0,016$ (beda rerata $-0,03$; IK 95% $-0,004 - (-0,002)$; $p > 0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi $-0,440$ ($p < 0,001$) dan R^2 $0,193$ ($p=0,101$) terhadap nilai ekspresi mRNA FOXP3 dan IL-17 pasca terapi metformin.

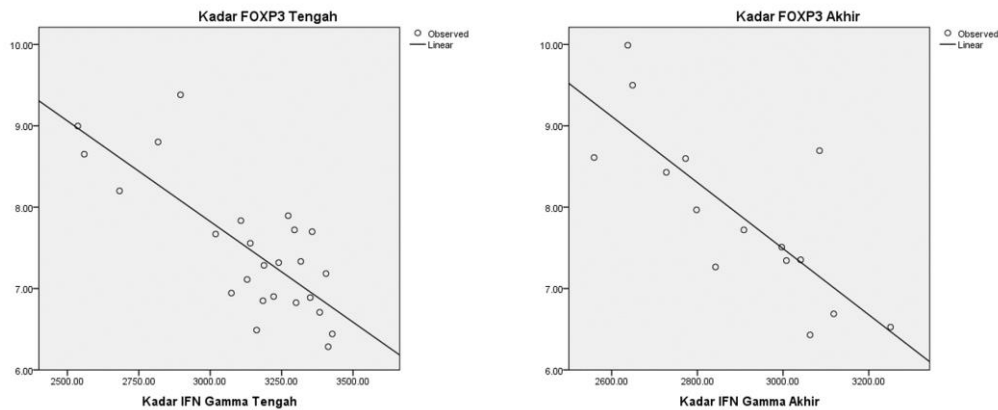
Rasio kadar ekspresi mRNA FOXP3 dan IFN-gamma (gambar 26) menunjukkan keseimbangan aktivitas T-Reg dibandingkan jalur Th1 pro-inflamatorik, pemeriksaan rasio tersebut pada mencit model SLE pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal menunjukkan hasil 0,002 vs. 0,003 (beda rerata -0,001; IK 95% -0,001 – 0,0008; $p < 0,001$). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,776 ($p < 0,001$) dan R^2 0,602 ($p < 0,001$) terhadap nilai ekspresi mRNA FOXP3 dan IFN-gamma pasca induksi dengan pristane.



Gambar 28. Rasio perbandingan FOXP3/IFN-gamma pada masing-masing kelompok model SLE, kontrol normal salin, metformin oral, metformin intraperitoneal (IP) dan Balb/c normal.

Pasca intervensi dengan metformin, rasio FOXP3/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral memberikan hasil 0,0022 vs. 0,0027 (beda rerata -0,0004; IK 95% -0,0007 – (-0,0001); $p = 0,008$). Sedangkan rasio FOXP3/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,0022 vs 0,0034 (beda rerata -0,001; IK 95% -0,0015 – (-0,0007); $p < 0,001$). Perbandingan rasio FOXP3/IFN-gamma pada

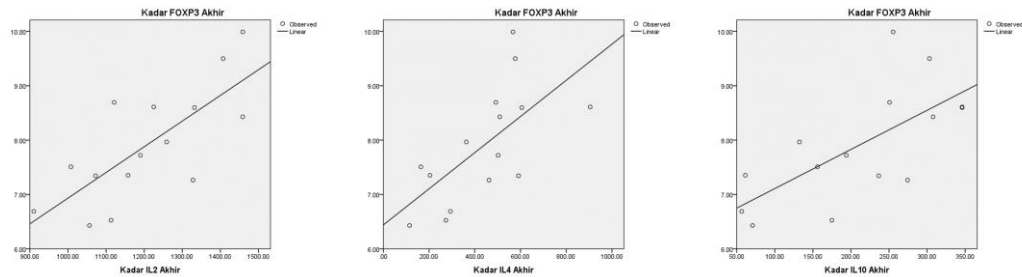
kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 0,0027 vs. 0,0034 (beda rerata -0,0007; IK 95% --0,0011 – (-0,0003); p= 0,002). Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi -0,785 (p=0,001) dan R^2 0,616 (p=0,001) terhadap nilai ekspresi mRNA FOXP3 dan IFN-gamma pasca terapi metformin.



Gambar 29. Analisis korelasi kadar IFN-gamma sebelum dan sesudah terapi metformin dikaitkan dengan perubahan ekspresi mRNA FOXP3.

Analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi 0,703 (p<0,001) dan R^2 0,494 (p<0,001) untuk ekspresi mRNA FOXP3 dan kadar IL-2; koefisien korelasi 0,678 (p<0,001) dan R^2 0,460 (p<0,001) untuk ekspresi mRNA FOXP3 dan kadar IL-10; koefisien korelasi 0,812 (p<0,001) dan R^2 0,660 (p<0,001) untuk ekspresi mRNA FOXP3 dan kadar IL-4 pasca induksi pristane. Pasca terapi metformin analisis korelasi dengan menggunakan metode Pearson menunjukkan hasil koefisien korelasi 0,746 (p=0,001) dan R^2 0,556 (p=0,001) untuk ekspresi mRNA FOXP3 dan kadar IL-2; koefisien korelasi 0,681 (p=0,005) dan R^2 0,464 (p=0,005) untuk ekspresi mRNA

FOXP3 dan kadar IL-10; koefisien korelasi 0,656 ($p=0,008$) dan R^2 0,431 ($p=0,008$) untuk ekspresi mRNA FOXP3 dan kadar IL-4.



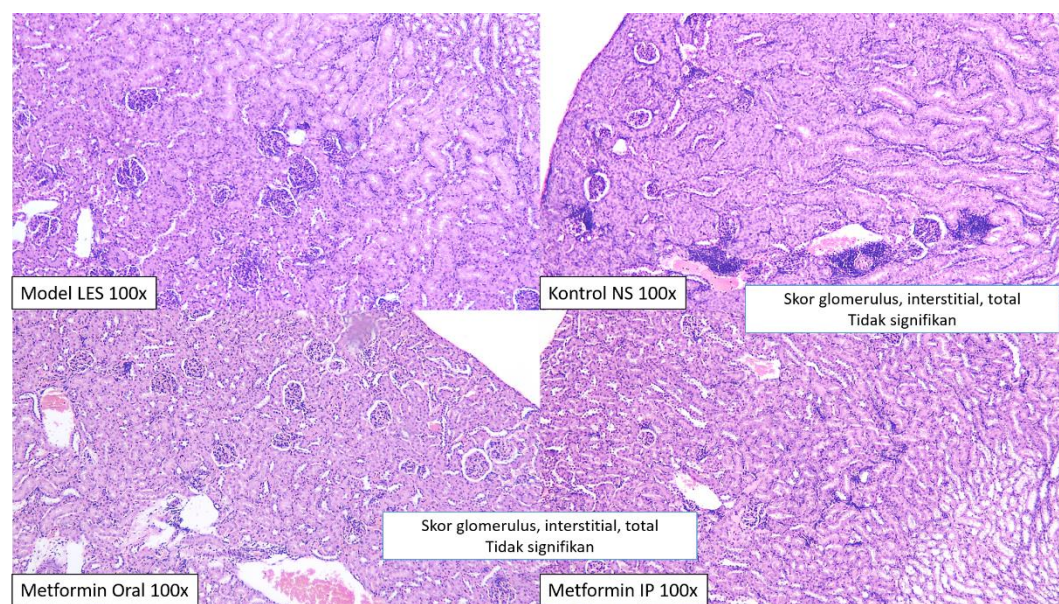
Gambar 30. Analisis korelasi kadar IL-2, IL-4 dan IL-10, sebelum dan sesudah terapi metformin dikaitkan dengan perubahan ekspresi mRNA FOXP3.

Efek metformin oral dan intraperitoneal terhadap patologi ginjal model mencit nefritis lupus

Secara umum pada kelompok mencit kontrol normal salin, metformin oral dan metformin intraperitoneal, yang diinduksi dengan pristane dan dikorbankan pada hari ke 180 pasca intervensi, didapatkan perubahan di glomerulus dan interstitial yang signifikan. Perubahan pada glomerulus terutama berupa proliferasi endokapiler, disertai dengan sedikit ekspansi mesangial dan kapilaritis, namun tidak signifikan pada kelompok model SLE sebelumnya. Sebagai catatan vasculitis glomerulus yang cukup signifikan terjadi pada 1 anggota dari kelompok kontrol normal salin.

Gangguan berupa tubulo-nefritis interstitial lebih signifikan terjadi dibandingkan glomerulonefritis, namun infiltrasi interstitial signifikan (25-50% keterlibatan) hanya terjadi pada kelompok kontrol normal salin, terutama pada 2 anggota

kelompoknya. Secara kualitatif, ahli patologi yang menilai secara tersamar, menemukan bahwa perubahan patologi (infiltrasi interstitial dan glomerulonefritis) paling berat terjadi pada kelompok kontrol normal saline dan paling ringan pada kelompok metformin intraperitoneal. Analisis statistik untuk skoring glomerulus, interstitial dan total pada masing-masing kelompok tidak menunjukkan hasil yang bermakna secara statistik.



Gambar 31. Hasil pemeriksaan patologi anatomi ginjal dengan pewarnaan H&E untuk BALB/c normal, terapi dengan kontrol NS, metformin oral dan metformin intraperitoneal.

V.2. Pembahasan

V.2.1. Model mencit nefritis lupus terinduksi pristane sebagai basis model penyakit pada manusia

Lupus eritematosus sistemik (LES) merupakan kondisi autoimun inflamatorik multifaktorial, dengan manifestasi klinis melibatkan berbagai organ dan jaringan.

Etiologi kondisi ini dikaitkan dengan respons limfosit B dan T disfungsi terhadap stimulus lingkungan pada individu rentan secara genetik, yang menentukan respons imun terhadap autoantigen berbeda dan pada akhirnya merusak jaringan. Penggunaan pristane, sebuah senyawa hidrokarbon aromatik, mempunyai keunggulan dibandingkan dengan mencit modifikasi genetik, karena model ini menyerupai kondisi LES di manusia yang biasanya disebabkan oleh karena pencetus lingkungan pada individu rentan secara genetik. Model mencit pristane juga memungkinkan peneliti mengevaluasi perubahan-perubahan awal apa yang terjadi, sehingga menyebabkan terjadinya gangguan toleransi tanpa adanya defek genetik mayor, sehingga memberikan gambaran mekanisme selular yang terlibat dalam perkembangan dan progresivitas LES. (Arbuckle et al., 2003; Richards et al., 2001; Satoh et al., 1995; Satoh and Reeves, 1994)

IFN-gamma dan induksi nefritis lupus pada mencit Balb/c dengan pristane

Pada penelitian ini sebelum dan sesudah dilakukan induksi dengan pristane, didapatkan perubahan kadar IFN-gamma yang signifikan antara grup kontrol normal dibandingkan dengan grup intervensi pristane (269,82 vs. 322,42 pg/mL; beda rerata 52,59 pg/mL; IK 95% 31,23 – 73,96 pg/mL; $p < 0,001$). Studi oleh Richards dkk. memperlihatkan IFN-gamma merupakan komponen penting terjadinya lupus nefritis pada model terinduksi pristane. Pada mencit defisien IFN-gamma secara genetik (IFN- γ -/-), induksi dengan pristan intraperitoneal tidak mencetuskan terjadinya perubahan patologi ginjal yang sesuai dengan nefritis lupus. Selain itu pada mencit defisien IFN-gamma ini, pasca induksi juga tidak

terbentuk antibodi yang biasanya terbentuk apabila mencit Balb/c diinduksi dengan pristane (IgG anti-ssDNA dan antibodi antikromatin).(Peng et al., 1997; Richards et al., 2001)

Saat ini perhatian besar diberikan kepada peranan interferon tipe 1 (IFN tipe 1) dan peranannya terhadap patogenesis lupus, dimana overekspresi dari gen yang terstimulasi interferon pada pasien-pasien dengan LES menunjukkan keterkaitan yang erat dengan kriteria diagnosis dan aktivitas penyakit. Namun demikian beberapa penelitian mutakhir, diantaranya dilakukan oleh Chiche dkk. menunjukkan aktivitas dari jalur terkait interferon gamma juga memainkan peranan dalam pembentukan antibodi anti-dsDNA dan penurunan jumlah limfosit pada pasien LES.(Chiche et al., 2014) Selain itu studi patogenesis terhadap mencit MRL-lpr oleh Balomenos dkk. juga menunjukkan bahwa, hiperproduksi IFN-gamma diperlukan untuk perkembangan lupus, diduga melalui mekanisme peningkatan ekspresi MHC dan presentasi antigen kepada sel T-autoreaktif.(Balomenos et al., 1998)

IL-17 dan induksi nefritis lupus pada mencit Balb/c dengan pristane

Pada penelitian ini sebelum dan sesudah induksi pristane, pada kelompok kontrol normal dibandingkan model nefritis lupus, didapatkan perbedaan kadar IL-17 yang signifikan (52,33 vs. 64,20 pg/mL; beda rerata 11,87 pg/mL; IK 95% 8,93 – 14,81 pg/mL; $p < 0,001$). Hal ini serupa dengan penelitian Amarilyo dkk. yang menunjukkan pada mencit defisien IL-17 (IL17 -/-), induksi dengan pristane tidak menghasilkan autoantibodi lupus dan gambaran glomerulonefritis seperti pada

mencit IL-17 sufisien. Amariyo dkk. juga menunjukkan proteksi mencit defisien IL-17 juga disebabkan oleh penurunan frekuensi sel T $CD3^+CD4^-CD8^-$ negatif ganda dan ekspansi sel T regulator $CD4^+$.(Amariyo et al., 2014)

Keterlibatan IL-17 dalam patogenesis lupus pada model mencit juga ditunjukkan oleh studi-studi pada mencit $MRL^{lpr/lpr}$ dan $B6^{lpr/lpr}$, di mana pada mencit-mencit tersebut ditemukan kadar IL-17 yang lebih tinggi.(Yang et al., 2009) Selain itu studi-studi dengan model mencit yang tidak mempunyai reseptor IL-17 (IL-17R) mengalami penurunan dalam respons humoral(Hsu et al., 2008) dan juga sebagaimana disebutkan di atas, mencit defisien IL-17 tidak mengalami glomerulonefritis(Pisitkun et al., 2012). Hal ini menunjukkan selain IL-17 merupakan sitokin proinflamatorik yang penting, temuan-temuan di atas mendukung IL-17 secara langsung mendukung kondisi propatogenik yang menghasilkan produksi autoantibodi dan inflamasi ginjal pada LES.

IL-2 dan induksi nefritis lupus pada mencit Balb/c dengan pristane

Pada penelitian ini sebelum dan sesudah induksi pristane, didapatkan perbedaan kadar IL-2 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (131,21 vs. 101,89 pg/mL; beda rerata -29,31 pg/mL; IK 95% -44,90 – (-13,73) pg/mL; $p < 0,001$). Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Wei dkk. terhadap mencit Balb/c yang diinduksi pristane selama 24 minggu, di mana pasca induksi didapatkan perubahan pada kadar IL-2, IL-6 dan IL-13, ditambah dengan peningkatan level IgM anti ssDNA dan autoantibodi antihiston.(Wei et al., 2010)

Interleukin-2 merupakan salah satu sitokin yang berpengaruh terhadap patogenesis terjadinya LES, diketahui penurunan produksi IL-2 menyebabkan terjadinya berbagai defek fungsi sel T, termasuk kehilangan toleransi yang dipertahankan oleh sel T regulator dengan ekspresi FOXP3.(Burchill et al., 2007; Horwitz, 2008) Sekresi IL-2 oleh sel T dibutuhkan untuk menginduksi ekspansi T-Reg dan mempertahankan homeostasis imun melalui jalur STAT-5 yang juga mensupresi diferensiasi Th17.(Wei et al., 2008) Pada LES telah diamati bahwa penurunan produksi IL-2 juga diikuti dengan gangguan fungsi T-Reg, yang menghasilkan glomerulonefritis sebagai akibat dari dibentuknya autoantibodi.(Putterman, 2004)

IL-10 dan induksi nefritis lupus pada mencit Balb/c dengan pristane

Pada penelitian ini pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IL-10 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (27,25 vs. 11,90 pg/mL; beda rerata -15,35 pg/mL; IK 95% -21,38 – (-9,32) pg/mL; $p < 0,001$). Hasil ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Mardani dkk. terhadap mencit Balb/c terinduksi pristane, di mana pasca induksi juga didapatkan penurunan dari kadar IL-10 disertai dengan peningkatan IL-17 dan IFN-gamma dari splenosit dibandingkan dengan mencit kontrol.(Mardani et al., 2018) Namun demikian studi yang dilakukan oleh Chae dkk. menunjukkan hasil yang berbeda, dengan metode induksi yang sama pada mencit Balb/c didapatkan peningkatan signifikan kadar IL-10 bersamaan dengan IL-6 dan IFN-gamma.(Chae et al., 2008) Perbedaan antara studi Mardani dkk. dan Chae dkk.

terletak pada kultur sel yang digunakan, Mardani dkk. menggunakan kultur splenosit, sedangkan Chae dkk. menggunakan kultur makrofag dari limpa, timus dan peritoneal.(Chae et al., 2008; Mardani et al., 2018)

Perbedaan hasil di atas menunjukkan sifat pleiotropik yang dimiliki oleh IL-10 dalam meregulasi sistem imun dalam kaitan dengan inflamasi dan autoimunitas. Interleukin-10 merupakan sitokin anti-inflamatorik yang kuat, dengan kemampuan untuk mempertahankan toleransi imunitas, melalui interaksinya dengan sel TR1 dan Treg. Sekresi sitokin ini oleh sel TR1 dan Treg mampu menghambat induksi aktivitas Th17 dan Th1 oleh makrofag, sebagaimana ditunjukkan oleh studi Mardani dkk.(Mardani et al., 2018) Sedangkan studi Chae dkk. meskipun sepiantas terlihat berlawanan, memperlihatkan bahwa sekresi yang dominan tinggi pada kultur makrofag, mengarahkan pada peningkatan ekskresi IL-10 untuk mensupresi aktivitas makrofag, Th17 dan Th1 secara lokal.(Chae et al., 2008) Sebagai catatan, beberapa model mencit lain, seperti NZB, NZB/W F1, NZM2410 dan B6.TC, di mana gangguan utama adalah pada sel B-autoreaktif, kadar IL-10 yang tinggi dikaitkan dengan patogenesis lupus.

Pada model-model mencit lupus ini, diketahui sekresi IL-10 yang meningkat dikaitkan dengan peningkatan proliferasi dan aktivitas sel B-autoreaktif, diikuti dengan peningkatan produksi autoantibodi dan derajat keberatan nefritis lupus.(Peng et al., 2013) Sehingga diduga peranan IL-10 terhadap patogenesis lupus pada mencit sangat bergantung kepada model mencit yang digunakan dan gangguan sistem imun yang terjadi pada model tersebut, apakah lupus disebabkan

oleh karena peningkatan inflamasi (misal model induksi pristane) atau gangguan fungsi sel limfosit B (misal galur NZB dan variasinya).

IL-4 dan induksi nefritis lupus pada mencit Balb/c dengan pristane

Pada penelitian ini pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan kadar IL-4 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (78,90 vs. 22,18 pg/mL; beda rerata -56,72 pg/mL; IK 95% -78,72 – (-34,71) pg/mL; $p < 0,001$). Sampai saat ini belum ada studi yang mempelajari pengaruh IL-4 terhadap patogenesis lupus di mencit terinduksi pristane, namun demikian beberapa studi model mencit menunjukkan peranan IL-4 yang kompleks.

Pada satu sisi, studi pada mencit NZW X C57BL/6.Yaa menunjukkan IL-4 mencegah terjadinya penyakit autoimun serupa lupus, melalui modulasi respons imunitas Th1 versus Th2. Proses ini dicapai melalui penekanan terhadap pembentukan autoantibodi IgG terkait Th1, seperti autoantibodi IgG3 yang telah ditunjukkan sifat nefritogeniknya.(Santiago et al., 1997) Namun demikian pada model mencit Balb/c terinduksi DWEYSVWLSN, model mencit NZB/W (B/W) F1 dan model mencit MRL/Mp-*lpr/lpr* IL-4 *-/-* menunjukkan peranan IL-4 dalam produksi autoantibodi dan penetrasinya ke dalam sel, sehingga memberikan kontribusi dalam patogenesis lupus.(Deocharan et al., 2003; Nakajima et al., 1997; Peng et al., 1997) Nampaknya pengaruh IL-4 dalam autoimunitas humoral pada lupus menunjukkan interaksi yang kompleks, tergantung dari latar belakang genetik, pemicu antigenik dan stadium lupus yang terjadi.

Ekspresi mRNA FOXP3 dan induksi nefritis lupus pada mencit Balb/c dengan pristane

Pada penelitian ini pasca induksi dengan pristane intraperitoneal didapatkan perbedaan ekspresi mRNA FOXP3 antara kelompok Balb/c kontrol normal dengan model nefritis lupus (8,80 vs.7,17 fold change; beda rerata -1,63 pg/mL; IK 95% -2,17 – (1,09) pg/mL; $p < 0,001$). Kadar ekspresi mRNA FOXP3 pada mencit merupakan gambaran dari aktivitas sel T-regulator, pada studi model mencit Balb/c terinduksi pristane oleh Peixoto dkk. juga didapatkan pada hari ke 90 dan 120 pasca induksi ditemukan penurunan jumlah sel T CD4+CD25+FOXP3+ (T-regulator) pada sel monosit darah perifer ($p < 0,005$ dan $p < 0,012$). (Peixoto et al., 2019) Penurunan jumlah T-regulator ini dikaitkan dengan peningkatan kadar IFN-gamma ($p = 0,017$), TNF-alfa ($p = 0,043$) dan TGF-beta1 ($p = 0,038$). Selain itu studi oleh Kluger dkk. menunjukkan gangguan pada fungsi sel T-regulator (FOXP3+), selain permasalahan pada jumlah, juga berkontribusi terhadap munculnya glomerulonefritis akut pada model mencit terinduksi pristane. Gangguan fungsional pada T-reg, dengan mengambil sifat menyerupai Th17 (bi-T-reg, ROR γ t+ FOXP3+), juga menyebabkan terjadinya supresi terhadap jalur Th2 anti-inflamatorik melalui mekanisme terkait ROR γ t. (Kluger et al., 2017)

Beberapa mekanisme telah ditemukan berkontribusi terhadap peranan supresi T-reg FOXP3+ terhadap terjadinya lupus pada model mencit. Studi yang dilakukan oleh Liu dkk. terhadap mencit (NZBxNZW) F1 menunjukkan bahwa aktivitas dari

T-reg FOXP3+ dibutuhkan untuk mensupresi aktivitas sel B autoreaktif dalam memproduksi auto-antibodi.(Liu et al., 2014) Selain itu, aktivitas T-reg FOXP3+ melalui mekanisme STAT3 dibutuhkan untuk meregulasi aktivitas Th17 dalam memproduksi IL-17, yang merupakan sitokin pro-inflamatorik penting. Pasca induksi pristane, gangguan mekanisme T-reg terhadap Th17 pada mencit defisien STAT3, menyebabkan terjadinya peningkatan inflamasi peritoneal, nefritis lupus, vaskulitis pulmonar dan kematian.(Kluger et al., 2016)

Perubahan patologi ginjal pada mencit lupus terinduksi pristane

Pada penelitian ini di mencit Balb/c SLE, yang diinduksi dengan pristane dan dikorbakan pada hari ke 120, didapatkan perubahan di glomerulus yang cukup signifikan. Perubahan pada glomerulus terutama berupa proliferasi endokapiler dominan, disertai dengan sedikit ekspansi mesangial dan kapilaritis. Pada studi mencit Balb/c terinduksi pristane yang dilakukan oleh Satoh dkk. didapatkan perubahan lesi glomerular proliferaatif segmental atau difus, yang setara dengan WHO kelas III, IV atau V. Terjadi juga hipertrofi sel epitelial dan endotel serta hipertrofi dari loop kapiler. Selain itu juga ditemukan adanya infiltrasi monosit pada kapiler glomerulus.(Satoh et al., 1995) Perubahan patologi ginjal mencit pada penelitian ini serupa dengan model mencit terinduksi pristane yang diajukan oleh Satoh dkk., di mana ditemukan pada model ini patologi glomerulonefritis terkait dengan terbentuknya antibodi anti-Su, anti-U1RNP dan anti-Sm dalam waktu 2-4 bulan pasca induksi.(Satoh and Reeves, 1994)

V.2.2. Pengaruh intervensi metformin oral dan peritoneal terhadap model mencit nefritis lupus

Pengaruh metformin terhadap kadar IFN-gamma terkait patogenesis lupus pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan hasil terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IFN-gamma didapatkan 309,39 vs.292,83 pg/ml (beda rerata 16,56 pg/ml; IK 95% 0,74-32,37; p=0,042). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IFN-gamma didapatkan 309,39 vs.266,90 pg/ml (beda rerata 42,49 pg/ml; IK 95% 29,24-55,73; p<0,001). Perbandingan perubahan kadar IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil 33,34 vs. 62,70 pg/ml (beda rerata - 29,35 pg/ml; IK 95% -52,08-(-6,63)); p=0,018).

Interferon gamma merupakan salah satu sitokin esensial untuk patogenesis nefritis lupus pada model mencit terinduksi pristane, sebagaimana ditunjukkan oleh Richards dkk. model mencit defisien IFN-gamma (IFN-gamma -/-) tidak mengalami nefritis lupus pada saat diinduksi dengan pristane.(Richards et al., 2001) Studi yang mempelajari intervensi menurunkan kadar IFN-gamma pada model mencit terinduksi pristane belum banyak, namun studi oleh Mardani dkk. dengan menggunakan probiotik *Lactobacillus* menunjukkan penurunan kadar IFN-gamma dan IL-17 diikuti dengan penurunan kadar autoantibodi seperti ANA, anti-dsDNA dan anti-RNP.(Mardani et al., 2018)

Salah satu mekanisme mengapa penurunan IFN-gamma dapat memperbaiki luaran nefritis lupus dijelaskan oleh studi Li Huang dkk. yang menunjukkan inaktivasi jalur sinyal B7/CD28 menghasilkan penurunan kadar autoantibodi ANA, IL-4 dan IFN-gamma. Studi ini juga menunjukkan penghambatan jalur B7/CD28 yang menyebabkan terjadinya anergi, tolerans dan apoptosis pada sel T, menghasilkan penurunan konsentrasi protein urin dan deposisi imun kompleks di ginjal mencit C57BL/6J yang terinduksi pristane.(Huang et al., 2015)

Pada studi ini metformin, baik secara oral maupun intraperitoneal, berhasil memberikan efek supresi IFN-gamma yang signifikan dibandingkan plasebo normal salin. Hal ini serupa dengan penelitian yang dilakukan oleh Yin dkk. terhadap mencit B6.Sle1Sle2.Sle3, dimana intervensi dengan metformin atau penghambat metabolisme glukosa (2-deoksi-d-glukosa, 2DG) menyebabkan terjadinya penurunan kadar IFN-gamma dan meningkatkan kadar IL-2 melalui normalisasi jalur metabolisme sel T CD4+. Yin dkk. juga menunjukkan bahwa, sel T CD4+ pada pasien lupus memberikan karakteristik peningkatan metabolisme mitokondrial dan glikolisis, dimana hal ini terkait dengan aktivitas sel T tersebut dan pemberian metformin dapat menekannya.(Yin et al., 2016, 2015)

Pada studi ini pemberian metformin intraperitoneal memberikan efek supresi kadar IFN-gamma yang lebih baik dibandingkan metformin oral, sepanjang pengamatan peneliti ini merupakan studi pertama yang mengkaitkan efektivitas superior metformin intraperitoneal terhadap metformin oral pada dosis yang serupa (100mg/kgBB). Studi sebelumnya yang membandingkan metformin oral

dan intraperitoneal pada model mencit sklerosis multipel oleh Nath dkk. menunjukkan efektivitas yang serupa dengan pemberian tiga kali sehari dosis 100 mg/kgBB.(Nath et al., 2009)

Studi oleh Dowling dkk pada mencit NOD/SCID menunjukkan kadar metformin plasma yang lebih tinggi pada metformin intraperitoneal dibandingkan oral setelah 30 menit pemberian (145 uM vs. 77 uM; rentang 65,8-214,7 uM vs. 41,6-99,0 uM).(Dowling et al., 2016) Sehingga disimpulkan pemberian metformin intraperitoneal dapat memberikan supresi yang lebih tinggi terhadap kadar IFN-gamma dibandingkan oral, disebabkan oleh karena kadar plasma yang lebih tinggi pasca pemberian.

Pengaruh metformin terhadap kadar IL-17 terkait patogenesis lupus pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini perbandingan terapi pada kelompok kontrol normal saline dengan metformin oral, hasil kadar IL-17 didapatkan 60,30 vs. 0,69 pg/ml (beda rerata 43,14 pg/ml; IK 95% 0,83-7,79; p=0,021). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal saline dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-17 didapatkan 64,62 vs. 55,04 pg/ml (beda rerata 9,57 pg/ml; IK 95% 4,17-14,97; p=0,004). Perbandingan perubahan kadar IL-17 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -4,56 vs. -2,30 pg/ml (beda rerata -2,67 pg/ml; IK 95% -9,80 – 4,45); p=0,371).

Sebagaimana dikemukakan sebelumnya, IL-17 yang diproduksi oleh Th17 merupakan salah satu sitokin penting dalam patogenesis lupus. Studi oleh

Amarilyo dkk. menunjukkan tanpa adanya IL-17, maka induksi lupus oleh pristane tidak terjadi.(Amarilyo et al., 2014) Studi yang mempelajari intervensi menurunkan kadar IL-17 pada model mencit terinduksi pristane belum banyak, namun studi oleh Mardani dkk. dengan menggunakan probiotik *Lactobacillus* menunjukkan penurunan kadar IFN-gamma dan IL-17 diikuti dengan penurunan kadar autoantibodi seperti ANA, anti-dsDNA dan anti-RNP.(Mardani et al., 2018)

Salah satu mekanisme yang bisa menjelaskan mengapa penurunan kadar IL-17 dapat menghambat terjadinya lupus nefritis pada model mencit terinduksi pristane gambarkan oleh Maeda dkk. Penelitian mereka menunjukkan peranan basigin dalam mensupresi aktivitas sel Th17 dan peranan peningkatan aktivitas jalur IL-6/STAT-3 terkait terbentuknya autoantibodi dan kerusakan ginjal akibat nefritis lupus.(Maeda et al., 2015) Supresi dengan pemberian sel punca jaringan adiposa pada model mencit B6.MRL/lpr juga menunjukkan supresi terhadap ekspresi mRNA IL-17 diikuti dengan peningkatan ekspresi mRNA FOXP3+, ROR- γ t dan miR-23b yang menurunkan tingkat inflamasi renal.(X. He et al., 2016)

Pada studi ini pemberian metformin baik oral maupun intraperitoneal memberikan hasil supresi terhadap kadar IL-17 signifikan dibandingkan kontrol plasebo, hal ini serupa dengan studi yang dilakukan oleh Yin dkk. Dimana intervensi dengan metformin atau 2DG pada mencit B6.Sle1Sle2.Sle3 menghasilkan supresi terhadap kadar IL-17 dan INF-gamma signifikan melalui blokade terhadap oksidasi glukosa. Blokade terhadap oksidasi glukosa ini pada akhirnya

menghambat aktivasi sel T CD4+ dan mengembalikan keseimbangan sitokin pro/anti-inflamasi pada model mencit tersebut.(Yin et al., 2016, 2015)

Pada studi ini pemberian metformin intraperitoneal memberikan efek supresi kadar IL-17 yang lebih baik dibandingkan metformin oral, sepanjang pengamatan peneliti ini merupakan studi pertama yang mengkaitkan efektivitas superior metformin intraperitoneal terhadap metformin oral pada dosis yang serupa (100mg/kgBB). Pembahasan mengenai mekanisme terjadinya observasi ini dapat dibaca pada bagian sebelumnya.

Pengaruh metformin terhadap kadar IL-2 terkait patogenesis lupus pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini terapi pada kelompok kontrol normal saline dengan metformin oral, hasil kadar IL-2 didapatkan 104,89 vs.119,41 pg/ml (beda rerata -14,52 pg/ml; IK 95% -29,03 – (-0,008); p=0,05). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal saline dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-2 didapatkan 104,89 vs.137,62 pg/ml (beda rerata -32,72 pg/ml; IK 95% -46,96-(-18,48); p=0,001). Perbandingan perubahan kadar IL-2 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -17,84 vs. -48,11 pg/ml (beda rerata 30,27 pg/ml; IK 95% 8,26-52,27); p=0,013).

Studi ini menunjukkan peningkatan signifikan kadar IL-2 pasca pemberian metformin dibandingkan dengan kontrol plasebo. Interleukin-2 merupakan salah satu komponen penting dalam patogenesis lupus nefritis terinduksi pristane, sebagaimana ditunjukkan oleh Drappa dkk. pada model mencit C57BL/6. Drappa

dkk. menunjukkan mencit C57BL/6 defisien protein adapter spesifik sel T (TSAd) mengalami hipergammaglobulinemia, aktivasi sel T dan B, produksi autoantibodi beragam dan menderita glomerulonefritis akibat gangguan sekresi dari IL-2.(Drappa et al., 2003)

Intervensi untuk menormalkan kadar dari IL-2 terus mendapatkan perhatian dari banyak peneliti di seluruh dunia. Ji dkk. menunjukkan pemberian terapi kompleks IL-2 (IL-2/antibodi monoklonal anti-IL-2) dapat memperbaiki nefritis lupus pada mencit NZB/WF1 melalui ekspansi sel T-Reg (CD4+CD25+FOXP3+). Mencit yang diberikan terapi kompleks IL-2 juga mengalami penurunan proteinuria, perbaikan lesi patologis ginjal, diikuti dengan perbaikan fungsi ginjal dan kesintasan.(Yan et al., 2017) Studi oleh Horwitz dkk. yang memberikan partikel nano IL-2 dan TGF-beta dilapisi antibodi anti-CD2/CD4 pada mencit (C57BL/6 × DBA/2)F1 (BDF1) juga memperbaiki jumlah sel T-Reg CD4+ CD8+, mensupresi pembentukan antibodi anti-DNA serta menurunkan kerusakan ginjal.

Pada studi ini pemberian metformin baik oral maupun intraperitoneal memberikan hasil peningkatan kadar IL-2 signifikan dibandingkan kontrol plasebo, hal ini serupa dengan studi yang dilakukan oleh Yin dkk. Dimana intervensi dengan metformin atau 2DG pada mencit B6.Sle1Sle2.Sle3 menghasilkan restorasi kadar IL-2 signifikan melalui blokade terhadap oksidasi glukosa. Blokade terhadap oksidasi glukosa, perbaikan metabolisme mitokondrial dan glikolisis ini pada akhirnya menghambat aktivasi sel T CD4+ dan mengembalikan sekresi IL-2 yang sebelumnya defektif..(Yin et al., 2016, 2015) Selain itu studi Yin dkk. juga

menunjukkan normalisasi metabolisme sel pada pasien dengan LES yang diberikan metformin, hal ini memberikan potensi terapi baru untuk LES, karena studi dari Spee-Mayer dkk. menunjukkan dosis rendah IL-2 dapat mengembalikan defek T-Reg pada pasien LES.(Von Spee-Mayer et al., 2016)

Pada studi ini pemberian metformin intraperitoneal memberikan efek peningkatan kadar IL-2 yang lebih baik dibandingkan metformin oral, sepanjang pengamatan peneliti ini merupakan studi pertama yang mengkaitkan efektivitas superior metformin intraperitoneal terhadap metformin oral pada dosis yang serupa (100mg/kgBB). Pembahasan mengenai mekanisme terjadinya observasi ini dapat dibaca pada bagian sebelumnya.

Pengaruh metformin terhadap kadar IL-10 terkait patogenesis lupus pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini perbandingan terapi pada kelompok kontrol normal saline dengan metformin oral, hasil kadar IL-10 didapatkan 10,38 vs.21,75 pg/ml (beda rerata -11,36 pg/ml; IK 95% -19,59 – (-3,14); p=0,013). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal saline dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-10 didapatkan 10,38 vs.31,16 pg/ml (beda rerata -20,78 pg/ml; IK 95% -27,80 – (-13,76); p<0,001). Perbandingan perubahan kadar IL-10 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -13,07 vs. (-19,07) pg/ml (beda rerata 6,00 pg/ml; IK 95% -2,39 – 14,39; p=0,138).

Interleukin 10 sebagaimana penjabaran di atas mempunyai efek yang beragam pada studi-studi terkait LES, namun demikian diketahui bahwa IL-10 terutama

berkaitan dengan fungsi dari sel T-Regulator dan mempunyai efek anti-inflamatorik yang kuat. Sampai saat ini belum ditemukan ada studi yang berhasil menurunkan kadar IL-10 darah perifer pada mencit Balb/c terinduksi pristane. Namun demikian studi terhadap mencit NZB/W F1 dengan Bortezomib berhasil menurunkan kadar IFN-gamma, IL-4 dan IL-10 di dalam serum yang menghasilkan pencegahan infiltrasi sel inflamasi dan deposisi imunoglobulin G di glomerulus.(Matsuki-Muramoto et al., 2017)

Efek proteksi dari peningkatan kadar IL-10 terhadap penekanan sel inflamasi diprediksi akibat dari pengaruhnya terhadap regulasi sel B. Studi Zhuang dkk. menunjukkan pada mencit defisien IL-10 terjadi peningkatan mortalitas dan induksi dengan pristane menekan ekspresi reseptor IL-10 di monosit dan fosforilasi STAT-3 di makrofag paru.(Zhuang et al., 2017) Studi oleh Blenman dkk. juga menekankan efek pleiotropik dari IL-10 di mana ekspresi berlebihan IL-10 secara signifikan menunda terbentuknya auto-antibodi dan menurunkan nefritis klinis. Hasil ini didapatkan terutama melalui penurunan aktivasi sel T, sementara fenotip sel B secara umum tidak berubah.(Blenman et al., 2006)

Studi ini menunjukkan efektivitas metformin baik oral maupun peritoneal terhadap peningkatan kadar IL-10 dalam darah perifer, sepanjang pengamatan peneliti ini adalah studi pertama yang menunjukkan hasil demikian pada model mencit SLE. Namun demikian, terkait peranan penting IL-10 dan fungsi sel T-Reg untuk menginduksi toleransi di saluran cerna, studi oleh Xue dkk. menunjukkan terapi metformin mampu memperbaiki diferensiasi sel sekretorik, menekan

inflamasi dan fungsi pelindung epitelial pada mencit IL-10KO.(Xue et al., 2016)
Pada model mencit C57/B16 yang diinduksi mengalami inflamasi dengan lipopolisakarida (LPS), terapi dengan metformin menekan produksi IL-1beta dan meningkatkan kadar IL-10. Terapi metformin pada penelitian ini juga menekan produksi spesies oksigen reaktif, yang banyak dikaitkan dengan patogenesis lupus akibat toksin lingkungan.(Kelly et al., 2015)

Pada studi ini pemberian metformin intraperitoneal memberikan efek peningkatan kadar IL-10 yang lebih baik dibandingkan metformin oral, meskipun tidak signifikan secara statistik, sepanjang pengamatan peneliti ini merupakan studi pertama yang mengkaitkan efektivitas superior metformin intraperitoneal terhadap metformin oral pada dosis yang serupa (100mg/kgBB). Pembahasan mengenai mekanisme terjadinya observasi ini dapat dibaca pada bagian sebelumnya.

Pengaruh metformin terhadap kadar IL-4 terkait patogenesis lupus pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan perbandingan terapi pada kelompok kontrol normal salin dengan metformin oral, hasil kadar IL-4 didapatkan 20,98 vs.48,21 pg/ml (beda rerata -27,22 pg/ml; IK 95% -38,67 – (-15,77); p=0,001). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal salin dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar IL-4 didapatkan 20,98 vs. 63,26 pg/ml (beda rerata -42,27 pg/ml; IK 95% -60,12 – (-24,43); p=0,001). Perbandingan perubahan kadar IFN-gamma pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin

intraperitoneal memberikan hasil -23,84 vs. (-42,85) pg/ml (beda rerata 19,00 pg/ml; IK 95% 1,53 – 36,48; p=0,018).

Sebagaimana telah dijelaskan pada bagian terdahulu, IL-4 merupakan sitokin esensial yang mewakili aktivitas dari jalur Th2, dimana keseimbangannya memainkan peranan dalam patogenesis lupus. Studi pada mencit NZB X NZW (B/W) F1 menunjukkan pemberian DNA plasmid IL-4 (IL-4pDNA) secara signifikan menunda terjadinya glomerulonefritis, dan deposisi IgG2a dan C3, sehingga menurunkan ekskresi protein urin dan meningkatkan kesintasan.(Hayashi et al., 2007) Namun disisi lain pada model lupus nefritis terinduksi pristane menggunakan mencit C57BL/6J penghambatan jalur sinyal B7/CD28 menghasilkan penurunan kadar IL-4 dan IFN-gamma, disertai dengan penurunan kadar ANA dan proteinuria.(Huang et al., 2015) Hal ini kembali menekankan kompleksitas dari mekanisme kerja IL-4 dalam peranannya terhadap patogenesis lupus.

Sepengetahuan peneliti, sampai saat ini belum didapatkan penelitian serupa yang melihat efek pemberian terapi metformin terhadap kadar IL-4 di dalam plasma. Namun demikian, penelitian yang melihat aktivitas jalur *Adenosine 5'-monophosphate-activated Protein Kinase* (AMPK) menunjukkan kemampuan IL-4 dalam menstimulasi jalur tersebut dan menekan terjadinya inflamasi.(Sag et al., 2008; Zhu et al., 2015) Aktivasi jalur AMPK oleh fenformin (senyawa pendahulu metformin) juga memodulasi efek IL-4, dimana terjadi penghambatan aktivasi STAT3 namun tetap mempertahankan aktivasi gen terkait respons STAT6 dan IL-

4 secara utuh. Perubahan yang dihasilkan oleh terapi fenformin membuat keseimbangan di makrofag lebih ke arah aktivitas anti-inflamasi pada saat distimulasi dengan IL-4. Hasil ini menunjukkan potensi metformin, bukan hanya untuk meningkatkan kadar IL-4 tapi juga memodulasi efeknya lebih ke arah anti-inflamasi dan bukan pro-inflamasi. (Namgaladze et al., 2015)

Pada studi ini pemberian metformin intraperitoneal memberikan efek peningkatan kadar IL-4 yang lebih baik dibandingkan metformin oral, sepanjang pengamatan peneliti ini merupakan studi pertama yang mengkaitkan efektivitas superior metformin intraperitoneal terhadap metformin oral pada dosis yang serupa (100mg/kgBB). Pembahasan mengenai mekanisme terjadinya observasi ini dapat dibaca pada bagian sebelumnya.

Pengaruh metformin terhadap ekspresi mRNA FOXP3 pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan perbandingan terapi pada kelompok kontrol normal saline dengan metformin oral, hasil kadar ekspresi mRNA FOXP3 didapatkan 6,90 vs.7,79 fold change (beda rerata -0,89 fold change; IK 95% -1,68 – (-0,11); p=0,03). Sedangkan perbandingan antara kelompok kontrol normal saline dengan metformin intraperitoneal, hasil kadar ekspresi mRNA FOXP3 didapatkan 6,90 vs.9,02 fold change (beda rerata -2,12 fold change; IK 95% -2,99 - (-1,25); p<0,001). Perbandingan perubahan kadar ekspresi mRNA FOXP3 pada kelompok metformin oral dibandingkan metformin intraperitoneal memberikan hasil -0,94

vs. -2,02 fold change (beda rerata 1,07 fold change; IK 95% 0,16 – 1,99); p=0,027).

Penelitian ini juga menunjukkan terjadinya hubungan antara perubahan kadar ekspresi mRNA FOXP3 pasca terapi metformin dengan sitokin terkait aktivitas Th1 dan Th17. Pasca terapi metformin didapatkan adanya hubungan liner terbalik antara ekspresi mRNA FOXP3 dengan kadar sitokin inflamatorik terkait Th1 yakni IFN-gamma ($R=-0,785$; $p=0,001$ dan $R^2 0,616$; $p=0,001$) dan terkait Th17 yakni IL-17 ($R=-0,440$; $p<0,001$ dan $R^2=0,193$; $p=0,101$). Terlihat bahwa kekuatan korelasi antara FOXP3/IFN-gamma pasca terapi metformin lebih kuat dibandingkan dengan FOXP3/IL-17, sehingga diduga pada penelitian ini pengaruh metformin lebih kuat dalam memodulasi aktivitas Th1 dibandingkan Th17.

Sel T regulator CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (FOXP3⁺) merupakan pemain penting dalam mempertahankan toleransi dan mencegah autoimunitas. Pada model mencit balb/c terinduksi pristane, penekanan kadar sel T FOXP3⁺ dan peningkatan kadar sel T CD4⁺CD69⁺ dijumpai bersamaan dengan peningkatan kadar IFN-gamma di cairan intraperitoneal dan kadar TNF-alfa serta TGF-beta1 di darah perifer.(Peixoto et al., 2019) Terapi dengan *Vasoactive Intestinal Peptide* (VIP) diketahui mampu memperbaiki proteinuria, gangguan fungsi ginjal dan menekan produksi autoantibodi melalui perbaikan keseimbangan Th17/Treg. Pemberian VIP juga diketahui menekan ekspresi dan protein terkait IL-17 dan IL-6, di sisi lain meningkatkan ekspresi FOXP3 dan IL-10.(Fu et al., 2019)

Pada model mencit lupus (NZB X NZW) F1 diketahui bahwa, injeksi sel Treg CD4+FOXP3+ dapat menginduksi terjadinya remisi lupus nefritis lebih lama dibandingkan dengan terapi kortikosteroid saja.(Weigert et al., 2013) Salah satu mekanisme adalah dengan modulasi sel dendritik menjadi bersifat tolerogenik dengan bantuan sekresi IL-10 dan TGF-beta.(Lan et al., 2012) Selain itu subset Treg yang diinduksi TGF-beta (iTreg) ternyata juga mampu mensupresi aktivasi dan proliferasi sel B melalui mekanisme non-sitotoksik. Sel iTreg juga mampu menekan produksi antibodi oleh sel limfosit B lupus, dan transfer adoptif sel ini mempunyai efek lebih kuat dibandingkan sel Treg dari timus (nTreg).(Xu et al., 2016)

Sepanjang pengamatan peneliti, ini adalah studi pertama yang mempelajari efek metformin terhadap ekspresi FOXP3 pada lupus, pencarian pada database pubmed dengan kata kunci terkait tidak menunjukkan hasil. Namun demikian, diketahui metformin mempunyai kemampuan menginduksi aktivitas jalur AMPK dan menekan sinyal mTOR.(Chung et al., 2017; Howell et al., 2017) Metformin diketahui mampu menurunkan indeks aktivitas penyakit dan memperbaiki skor histologis serta mediator-mediator inflamasi pada model *Inflammatory Bowel Disease* (IBD), melalui penekanan ekspresi IL-17, p-STAT3 dan p-mTOR. Sebaliknya pada studi ini metformin meningkatkan ekspresi p-AMPK dan FOXP3.(Lee et al., 2015) Modulasi jalur AMPK dan mTOR dengan metformin juga mampu menekan terjadinya insulinitis autoimun melalui penekanan sel T IFN-gamma+ dan IL-17+, disertai peningkatan IL-10+ dan FOXP3+.(Duan et al., 2019)

Pada studi ini pemberian metformin intraperitoneal memberikan efek peningkatan ekspresi mRNA FOXP3 yang lebih baik dibandingkan metformin oral, sepanjang pengamatan peneliti ini merupakan studi pertama yang mengkaitkan efektivitas superior metformin intraperitoneal terhadap metformin oral pada dosis yang serupa (100mg/kgBB). Pembahasan mengenai mekanisme terjadinya observasi ini dapat dibaca pada bagian sebelumnya, namun demikian pemberian metformin secara intraperitoneal telah ditunjukkan pada studi model skleroderma. Pada studi ini, mencit C57BL yang diinduksi menjadi skleroderma dengan injeksi bleomisin menunjukkan bahwa, pemberian metformin secara intraperitoneal efektif mengembalikan keseimbangan Treg/Teff, menurunkan kadar IL-17A dan ROR γ t serta meningkatkan ekspresi FOXP3 secara *dose dependent*.(Wang et al., 2019)

Pengaruh metformin terhadap patologi nefritis lupus pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan hasil berupa tubulo-nefritis interstitial lebih signifikan terjadi dibandingkan glomerulonefritis, namun infiltrasi interstitial signifikan (25-50% keterlibatan) hanya terjadi pada kelompok kontrol normal salin, terutama pada 2 anggota kelompoknya. Secara kualitatif, ahli patologi yang menilai secara tersamar, menemukan bahwa perubahan patologi (infiltrasi interstitial dan glomerulonefritis) paling berat terjadi pada kelompok kontrol normal salin dan paling ringan pada kelompok metformin intraperitoneal.

Studi ini merupakan studi pertama yang membandingkan antara metformin oral, metformin intraperitoneal dan normal salin, terhadap hasil patologi nefritis lupus.

Namun demikian, satu-satunya studi lain yang melihat pemberian metformin oral dibandingkan dengan kontrol normal salin pada mencit *Roquin^{san/san}* menunjukkan bahwa, metformin oral mampu menurunkan skor nefritis secara signifikan dibandingkan kontrol normal salin ($p < 0,001$). Hal ini diduga disebabkan oleh kemampuan metformin meningkatkan ekspresi AMPK dan menekan sinyal mTOR-STAT3, dengan akibat penekanan pada aktivitas sel B dan sel T patologis serta peningkatan aktivitas sel Treg. (Lee et al., 2017)

Pada studi ini, melalui penilaian kualitatif sistematis tersamar oleh dua orang ahli patologi anatomi, menunjukkan bahwa intervensi dengan metformin intraperitoneal memberikan hasil patologi ginjal yang lebih baik dibandingkan metformin oral. Aktivitas metformin melalui jalur PI3K/Akt/mTOR diketahui serupa dengan kerja dari rapamycin dan obat turunannya sirolimus/tacrolimus. Supresi jalur PI3K/Akt/mTOR diketahui mampu meningkatkan kesintasan, mempertahankan fungsi ginjal, menormalkan proteinuria, menurunkan titer anti-dsDNA dan memperbaiki lesi histologis pada nefritis lupus. (Ge et al., 2017; Stylianou et al., 2011) Diharapkan studi lebih lanjut dengan metode penilaian histopatologi ginjal yang lebih canggih mampu memberikan jawaban lebih baik dibandingkan studi ini, sehingga mampu memberikan jawaban definitif apakah metformin intraperitoneal secara signifikan lebih poten dibandingkan oral dalam memperbaiki patologi ginjal.

Pengaruh metformin terhadap keseimbangan sitokin terkait jalur T-helper 1 dan T-helper 2 pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan rasio sitokin anti-inflamatorik jalur Th2 (IL-10) dan jalur Th1 (IL-2) terdapat perbedaan signifikan pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal (rasio IL-10/IL-2; 0,11 vs. 0,20; beda rerata -0,09; IK 95% -0,15 – (-0,03); p=0,08). Juga didapatkan perbedaan rasio signifikan pada rasio sitokin pro-inflamatorik jalur Th2 (IL-4) dan jalur Th1 (IFN-gamma) pasca induksi pristane dibandingkan mencit balb/c normal (rasio IL-4/IFN-gamma; 0,06 vs. 0,16; beda rerata -0,09; IK 95% -0,13 – (-0,06); p<0,001). Analisis korelasi menunjukkan hubungan linier antara IL-10/IL-2 (R=0,567; p=0,003) dan linier terbalik antara IL-4/IFN-gamma (R=-0,785; p<0,001). Hal ini menunjukkan, pada penelitian ini pasca induksi lupus dengan pristane pada mencit balb/c terjadi pergeseran keseimbangan *T-helper* ke arah Th1. Terlihat pula penurunan kadar IL-4 dan peningkatan kadar IFN-gamma mempunyai korelasi yang lebih kuat dibandingkan dengan perubahan pada kadar sitokin anti-inflamatorik terkait jalur Th1 (IL-2) dan Th2 (IL-10).

Dominansi aktivasi jalur Th1 dibandingkan Th2 telah lama diketahui sebagai salah satu komponen penting dalam patogenesis LES. Takahashi dkk. telah menunjukkan pada model mencit MRL-lpr/lpr dan MRL.Yaa peningkatan ekspresi mRNA IFN-gamma dibandingkan IL-10 merupakan karakteristik akselerasi patogenesis LES.(Takahashi et al., 1996) Hal ini juga didukung pada penelitian Viillard dkk. yang membandingkan pasien LES dengan kontrol sehat, dimana mereka menemukan respons peningkatan sitokin IL-2 dan IFN-gamma

secara berlebihan dibandingkan IL-4 dan IL-10.(Viallard et al., 1999) Kedua peneliti ini juga menemukan pada kondisi stabil, baik model mencit maupun pasien LES, sama-sama mempunyai kadar IL-10 yang meningkat dibandingkan kontrol sehat. Sehingga dapat disimpulkan, meskipun peningkatan kadar IL-10 merupakan bagian dari patogenesis LES, namun pergeseran aktivitas ke arah Th1 dengan peningkatan IL-2 dan IFN-gamma merupakan karakteristik akselerasi patogenesis LES.

Pada penelitian ini intervensi dengan metformin memberikan peningkatan rasio Th2 dibandingkan Th1 secara signifikan. Perbandingan rasio IL-10/IL-2 pada kelompok normal saline dibanding metformin oral dan intraperitoneal adalah 0,09 vs. 0,18 vs. 0,22 (NS vs. metformin oral $p=0,031$; NS vs. metformin IP $p=0,03$; metformin oral vs. metformin IP $p=0,164$). Analisis korelasi menunjukkan bahwa terdapat hubungan linier antara IL-10/IL-2 ($R=0,685$; $p=0,005$) dan linier terbalik antara IL-4/IFN-gamma ($R=-0,724$; $p=0,002$). Terlihat bahwa pada penelitian ini metformin mampu menggeser keseimbangan kembali ke arah aktivitas terkait Th2, dengan peningkatan sekresi IL-4 dan IL-10. Terlihat pula bahwa metformin mempunyai kekuatan korelasi yang lebih baik dalam menurunkan rasio IL-4/IFN-gamma dibandingkan IL-10/IL-2.

Metformin diketahui bekerja pada metabolisme sel T yang terganggu pada kondisi LES, di mana terjadi pergeseran ke arah oksidasi, abnormalitas mitokondrial, aktivasi mTORC1 dan peningkatan aliran masuk glukosa ke dalam sel.(Morel, 2017; Yin et al., 2016) Nath dkk. pada penelitian dengan model ensefalitis

autoimun menunjukkan bahwa metformin mampu menekan progresivitas penyakit, menurunkan infiltrasi sel inflamatorik ke sistem saraf pusat dan menurunkan ekspresi sitokin inflamatorik seperti IFN-gamma.(Nath et al., 2009) Yin dkk. juga memberikan hasil yang serupa pada model mencit LES, di mana pemberian metformin dapat memulihkan metabolisme sel T dan menurunkan produksi IFN-gamma.(Yin et al., 2016, 2015) Sehingga disimpulkan efek metformin terhadap imunomodulasi aktivitas sel Th1 dicapai melalui efeknya terhadap metabolisme sel T, penekanan kompleks mTORC1 dan aktivasi AMPK.

Pengaruh metformin terhadap keseimbangan sitokin pro-inflamatorik dan anti-inflamatorik pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan pergeseran keseimbangan sitokin ke arah pro-inflamatorik pada mencit balb/c yang diinduksi dengan pristane. Rasio IL2/IFN-gamma pasca induksi pristane menunjukkan penekanan rasio pada kelompok model LES dibandingkan mencit balb/c normal (0,31 vs. 0,48; beda rerata -0,17; IK 95% -0,23 – (-0,10); $p < 0,001$). Rasio IL-10/IFN-gamma pasca induksi pristane juga menunjukkan penekanan rasio pada kelompok model LES dibandingkan mencit balb/c normal (0,03 vs. 0,10; beda rerata -0,06; IK 95% -0,03 – 0,03; $p < 0,001$). Analisis korelasi menunjukkan hubungan linier terbalik antara IL-2/IFN-gamma ($R = -0,696$; $p < 0,001$) dan IL-10/IFN-gamma ($R = -0,855$; $p < 0,001$).

Pasca terapi dengan metformin didapatkan perbaikan signifikan dari rasio sitokin anti-inflamatorik dibandingkan pro-inflamatorik. Rasio IL-2/IFN-gamma pada kelompok normal saline dibandingkan metformin oral dan intraperitoneal

didapatkan 0,33 vs. 0,40 vs. 0,51 (NS vs. metformin oral $p=0,029$; NS vs. metformin IP $p<0,001$; metformin oral vs. metformin IP $p=0,004$). Rasio IL-10/IFN-gamma pada kelompok normal salin dibandingkan metformin oral dan intraperitoneal didapatkan 0,03 vs. 0,07 vs. 0,11 (NS vs. metformin oral $p=0,008$; NS vs. metformin IP $p<0,001$; metformin oral vs. metformin IP $p=0,003$). Analisis korelasi menunjukkan hubungan linier terbalik antara IL-2/IFN-gamma ($R=-0,787$; $p<0,001$) dan IL-10/IFN-gamma ($R=-0,690$; $p=0,004$).

Interleukin-2 diketahui sebagai sitokin yang memainkan peranan penting dalam patogenesis LES, selain berperan dalam aktivasi, ekspansi dan kesintasan sel Treg FOXP3+, sitokin ini juga mengatur ekspansi sel T melalui mekanisme apoptosis.(Liao et al., 2013) Mencit dengan defisiensi IL-2 mengalami autoimunitas berat sebagai akibat dari penurunan jumlah Treg dan ekspansi sistemik sel T efektor patogenik.(Lieberman and Tsokos, 2010) Beberapa terapi yang menggunakan suplementasi IL-2 dosis rendah telah diketahui mampu mencegah terjadinya GVHD(Koreth et al., 2011) dan memperpanjang kesintasan pada mencit MRL/lpr dan NZB x NZW F1.(Gutierrez-Ramos et al., 1990)

Pada studi ini nampak metformin mempunyai kemampuan untuk meningkatkan kembali kadar IL-2 pasca induksi pristane dan memperbaiki rasio IL-2/IFN, sehingga menggeser aktivitas jalur Th1 ke arah anti-inflamatorik. Hal ini menggambarkan salah satu fungsi penting dari IL-2, karena meskipun merupakan sitokin yang penting sebagai *growth factor* untuk sel T, namun sekresinya lebih menguatkan aktivitas dari sel Treg dan menekan Th17 beserta sekresi IL-

17.(Laurence et al., 2007; Setoguchi et al., 2005) Efektivitas metformin dalam mengembalikan kadar IL-2 diketahui melalui mekanisme regulasi metabolisme mitokondrial dan kendali glikolisis pada sel T, sebagaimana ditunjukkan pada studi Yin dkk, diketahui sel T CD4+ pada pasien dan model LES mempunyai gangguan pada metabolisme selular yang dapat dipulihkan dengan pemberian metformin.(Yin et al., 2015)

Model mencit terinduksi pristane, merupakan model lupus dengan komponen reaksi inflamasi yang tinggi, ditandai dengan penurunan ekspresi IL-10 (sitokin anti-inflamatorik) dan peningkatan ekspresi IFN-gamma dan IL-17 (sitokin pro-inflamatorik).(Mardani et al., 2018) Pada penelitian ini nampak kemampuan metformin untuk meningkatkan kembali kadar IL-10 dan menurunkan kadar IFN-gamma, sehingga memperbaiki rasio IL-10/IFN-gamma. Perbaikan rasio ini membuktikan metformin mampu menggeser keseimbangan sitokin anti/pro-inflamatorik selain IL-2, yakni IL-10/IFN-gamma.

Metformin diketahui memainkan peranan dalam meningkatkan kadar IL-10 dan menekan kadar IFN-gamma melalui efeknya terhadap jalur AMPK-mTOR. Pada studi terhadap mencit NOD (model insulitis autoimun), pemberian metformin secara signifikan memperbaiki insulitis autoimun melalui penekanan sel T CD4+ INF- γ + dan peningkatan sel T CD4+ IL-10+.(Duan et al., 2019) Hasil ini juga didukung oleh penelitian Nath dkk. terhadap model mencit ensefalitis autoimun, di mana pemberian metformin menekan produksi IFN-gamma dan meningkatkan kadar IL-10 melalui aktivasi AMPK baik di makrofag dan juga di sel limpa. Nath

dkk. juga menunjukkan pergeseran aktivitas ke arah anti-inflamatorik pada mencit yang diberikan terapi metformin, dengan terjadinya penekanan sintesis fosfolipid, sitokin pro-inflamatorik terinduksi LPS dan mediator-mediator inflamasi seperti iNOS dan cyclooxygenase 2. (Nath et al., 2009) Selain itu metformin juga diketahui mampu menekan terbentuknya mediator-mediator pro-inflamatorik melalui efeknya terhadap ekspresi RAGE dan NF κ B pada model tikus dengan diabetes. (Zhou et al., 2016)

Pengaruh metformin terhadap keseimbangan sitokin terkait sel T-regulator dan T-autoreaktif pada model mencit terinduksi pristane

Pada penelitian ini didapatkan peningkatan aktivitas sitokin terkait sel T-autoreaktif dan penekanan sitokin terkait sel T-regulator. Perbandingan rasio IL-2/IL-17 menunjukkan penekanan kadar IL-2 dibandingkan IL-17 (1,58 vs. 2,50; beda rerata -0,92; IK 95% -1,18 – (-0,66); $p < 0,001$) pada mencit terinduksi pristane dibandingkan balb/c normal. Selain itu rasio IL-10/IL-17 juga menunjukkan hasil yang serupa (0,18 vs. 0,52; beda rerata -0,33; IK 95% -0,43 – (-0,23); $p < 0,001$) pada mencit terinduksi pristane dibandingkan balb/c normal. Analisis korelasi menunjukkan hubungan linier terbalik antara IL-2/IL-17 ($R = -0,666$; $p < 0,001$) dan IL-10/IL-17 ($R = -0,808$; $p < 0,001$).

Pasca terapi dengan metformin didapatkan perbaikan signifikan dari rasio sitokin terkait aktivitas sel T-regulator dibandingkan sel T-autoreaktif. Rasio IL-2/IL-17 pada kelompok normal saline dibandingkan metformin oral dan intraperitoneal didapatkan 1,62 vs. 1,98 vs. 2,50 (NS vs. metformin oral $p = 0,017$; NS vs.

metformin IP $p < 0,001$; metformin oral vs. metformin IP $p = 0,003$). Rasio IL-10/IL-17 pada kelompok normal saline dibandingkan metformin oral dan intraperitoneal didapatkan 0,16 vs. 0,36 vs. 0,57 (NS vs. metformin oral $p = 0,008$; NS vs. metformin IP $p < 0,001$; metformin oral vs. metformin IP $p = 0,013$). Analisis korelasi menunjukkan hubungan linier terbalik antara IL-2/IL-17 ($R = -0,562$; $p = 0,029$) dan IL-10/IL-17 ($R = -0,761$; $p = 0,001$).

Keseimbangan IL-2/IL-17 diketahui merupakan salah satu patogenesis kunci pada LES, di mana IL-2 berperan dalam toleransi perifer dan aktivasi Treg sedangkan IL-17 berkaitan dengan Th17 dan autoimunitas. Sebuah studi mencit MRL/Fas(lpr/lpr) yang diberikan IL-2 dosis rendah segera setelah awitan penyakit, menunjukkan perbaikan dalam infiltrasi mono-nuklear dan gangguan patologi jaringan sebagai akibat dari penurunan aktivitas sel-sel yang memproduksi IL-17. (Mizui et al., 2014) Namun, studi terhadap manusia menunjukkan hal yang sedikit berbeda, di mana pemberian IL-2 rekombinan dosis rendah meningkatkan jumlah Treg, Th folikular dan Th17, namun menekan sel-sel terkait Th1 dan Th2. (J. He et al., 2016) Sampai saat ini belum ada studi yang mempelajari langsung efek metformin terhadap keseimbangan IL-2/IL-17, namun diduga mekanismenya tetap melalui jalur aktivasi AMPK dan penekanan kompleks mTORC1.

Ketidakimbangan sitokin terkait Treg (IL-10) dan Th17 (IL-17) merupakan salah satu mekanisme kunci dalam patogenesis LES. Studi pada mencit NZB menunjukkan ekspansi sel B CD5+ yang memproduksi IL-10 dikaitkan dengan

penekanan ekspansi sel CD4+ yang memproduksi IL-17A dan IFN-gamma.(Baglaenko et al., 2015) Demikian juga studi pada pasien LES, menunjukkan individu dengan LES aktif memiliki kadar IL-10 lebih rendah dan IL-17 lebih tinggi dibandingkan pasien LES tenang. Studi yang sama juga menunjukkan perbandingan kadar IL-17 dibandingkan IL-10 yang lebih tinggi pada keterlibatan organ yang lebih berat, seperti lupus neuropsikiatrik.(Yao et al., 2016)

Metformin diketahui mampu memperbaiki keseimbangan antara IL-10 dan IL-17 melalui aktivitasnya terhadap jalur AMPK, sebagaimana ditunjukkan pada sebuah studi tentang model ensefalitis autoimun oleh Nath dkk.(Nath et al., 2009) Sebagaimana telah dijelaskan dibagian sebelumnya, melalui efeknya terhadap metabolisme sel T CD4+, metformin mampu menggeser aktivitas Treg menjadi lebih kuat dibandingkan Th17 dan Th1.(Nath et al., 2009; Yin et al., 2015) Studi lain pada model mencit Sjogren (NOD/ShiLtj), pemberian metformin menurunkan populasi sel terkait Th17 dan Th1 serta meningkatkan populasi sel Treg. Pada studi ini metformin juga menunjukkan kemampuannya dalam menurunkan diferensiasi sel B dan menekan produksi imunoglobulin G.(Kim et al., 2019)

Ringkasan hasil penelitian

Pada penelitian ini, model mencit balb/c terinduksi pristane, menunjukkan terjadinya perubahan histopatologis serupa dengan nefritis lupus manusia. Perubahan histopatologis yang terjadi disertai dengan penurunan ekspresi mRNA FOXP3+ yang merupakan penanda dari aktivitas sel Tregulator. Selain itu terjadi

juga penekanan sekresi IL-2 dan IL-10, di mana IL-2 merupakan sitokin yang berperan dalam maturasi dan ekspansi Treg, sedangkan IL-10 merupakan sitokin yang diekskresikan oleh Treg dalam keterkaitannya meregulasi reaksi imunitas.

Selain terjadi penekanan aktivitas dan sekresi sitokin-sitokin terkait Treg, induksi pristane juga menyebabkan meningkatnya sekresi sitokin terkait Th17, yakni IL-17. Sitokin ini merupakan sitokin pro-inflamatorik yang sangat kuat dan dikaitkan dengan patogenesis lupus nefritis baik pada model mencit maupun manusia. Peningkatan sekresi sitokin pro-inflamatorik ini juga diikuti dengan pergeseran aktivitas ke arah jalur Th1 dibandingkan Th2, ditandai dengan meningkatnya sekresi IFN-gamma dan menurunnya sekresi IL-4.

Intervensi dengan metformin menunjukkan kemampuan obat ini sebagai terapi potensial bagi penyintas LES. Metformin pada penelitian ini mampu mengembalikan tingkat ekspresi FOXP3+, meningkatkan sekresi IL-2, IL-4 dan IL-10, serta menekan kadar sekresi IFN-gamma dan IL-17. Intervensi-intervensi untuk meningkatkan ekspresi FOXP3+, menaikkan kadar IL-2 dan menekan IFN-gamma dan IL-17 telah menunjukkan hasil yang menjanjikan sebagai terapi LES. Terkait peningkatan IL-4 dan IL-10, sepanjang pengamatan peneliti ini adalah studi pertama yang menunjukkan bahwa metformin dapat meningkatkan kadar kedua sitokin tersebut pada model LES.

Pada penelitian ini metformin terlihat mampu meningkatkan ekspresi FOXP3+ melalui perbaikan metabolisme sel T CD4+ dan aktivasi jalur AMPK, yang meskipun tidak dilakukan pada penelitian ini, sebelumnya telah dilakukan oleh

Yin dkk.(Yin et al., 2016) dan menunjukkan hasil perubahan yang serupa. Perbedaan penelitian ini dengan Yin dkk. adalah pada model mencit yang dipilih, pemeriksaan IL-4 dan IL-10 serta pemberian metformin metode oral dibandingkan intraperitoneal. Pada penelitian ini metformin terlihat mempunyai efek *dose-dependent* terhadap kemampuannya meregulasi kelainan terkait nefritis lupus, dimana dari penelitian-penelitian sebelumnya telah diketahui pemberian secara intraperitoneal memberikan kadar plasma yang lebih tinggi dibandingkan oral.

Metformin pada penelitian ini juga terlihat mampu memberikan hasil perbaikan histopatologis yang menjanjikan. Evaluasi tersamar dari ahli patologi menunjukkan bahwa dari segi infiltrasi interstitial dan glomerulonefritis, kelainan paling ringan terjadi pada kelompok metformin intraperitoneal, diikuti dengan metformin oral dan kontrol normal salin. Hasil ini diduga oleh karena efektivitas metformin dalam menurunkan kadar IL-17 dan IFN-gamma, serta meningkatkan ekspresi mRNA FOXP3+ dan IL-2, di mana penelitian-penelitian sebelumnya telah menunjukkan deposisi kompleks imun dan kerusakan jaringan yang lebih rendah terkait perubahan-perubahan di atas.

Keterbatasan penelitian

Penelitian ini memiliki beberapa keterbatasan, diantaranya adalah tidak dilakukannya pemeriksaan antibodi terkait patogenesis lupus seperti anti-dsDNA, anti-Sm dan anti-RNP1. Namun demikian beberapa model penelitian dengan menggunakan mencit balb/c terinduksi pristane sudah menunjukkan keberhasilan metode ini untuk menginduksi produksi auto-antibodi terkait.(Richards et al.,

1998; Satoh et al., 2000; Satoh and Reeves, 1994) Penelitian ini juga tidak memeriksa respons penurunan autoantibodi terkait pasca pemberian terapi dengan metformin, namun demikian beberapa penelitian sudah membuktikan pemberian terapi dengan metformin mampu menurunkan produksi autoantibodi terkait lupus.(Lee et al., 2017; Wang et al., 2015; Yin et al., 2015)

Penelitian ini juga tidak memeriksa secara khusus ekspresi mRNA terkait Th17 seperti ROR γ t dan STAT3, namun demikian beberapa penelitian telah mengkaitkan secara erat aktivitas Th17 dengan sekresi IL-17.(Conti et al., 2009; Huber et al., 2013; Voo et al., 2009) Sehingga pada penelitian ini aktivitas dari Th17 dapat diwakili dengan pemeriksaan kadar IL-17 dalam plasma. Hal yang sama juga berlaku untuk IFN-gamma dan IL-4, di mana sekresi kedua sitokin ini berkaitan erat dengan aktivitas jalur Th1 dan Th2.(Balomenos et al., 1998; Luzina et al., 2012; Viallard et al., 1999) Selain itu seiring dengan penemuan-penemuan terkini yang menunjukkan bahwa keseimbangan sitokin memainkan peranan penting dalam menentukan subset sel T yang aktif, dan berkontribusi terhadap patogenesis lupus, maka pemeriksaan keseimbangan sitokin pada penelitian ini juga bermakna.(Guimarães et al., 2017; Talaat et al., 2015)

VI. Kesimpulan dan Saran

VI.1. Kesimpulan

1. Mencit balb/c terinduksi pristane dapat dijadikan sebuah model patogenesis lupus yang menyerupai dengan lupus pada manusia, terutama subset lupus yang terinduksi oleh toksin lingkungan, dalam hal ini adalah senyawa-senyawa hidrokarbon aromatik.
2. Ketidakimbangan sitokin-sitokin terkait aktivitas sel Treg (IL-10, IL-2) dibandingkan Th17 (IFN-gamma, IL-17) memainkan peranan dalam terjadinya gangguan histopatologis pada model mencit balb/c terinduksi pristane.
3. Ketidakimbangan sitokin-sitokin terkait aktivitas Th1 (IFN-gamma, IL-2) dibandingkan Th2 (IL-4, IL-10) memainkan peranan dalam terjadinya gangguan histopatologis pada model mencit balb/c terinduksi pristane.
4. Induksi pristane pada mencit balb/c menghasilkan terjadinya gangguan histopatologis ginjal dalam kaitannya dengan penurunan ekspresi FOXP3+ (Treg) dan peningkatan kadar IL-17 (Th17) di dalam plasma.
5. Metformin merupakan terapi potensial untuk lupus, melalui mekanismenya terhadap pengembalian fungsi Treg (meningkatkan FOXP3+, IL-2 dan IL-10), menekan aktivitas Th17 (menekan kadar IL-17) dan mengembalikan keseimbangan jalur ke arah Th2 dibandingkan Th1 (IL-4 dan IL-10 vs. IFN-gamma dan IL-2).

6. Metformin intraperitoneal memberikan efek terapi lebih kuat dalam mengembalikan keseimbangan sitokin dan memperbaiki ekspresi mRNA FOXP3+ dibandingkan metformin oral.

VI.2. Saran

1. Diperlukan uji model hewan lebih lanjut untuk membuktikan manfaat terapi metformin pada subset lupus yang disebabkan oleh karena gangguan genetik (NZBxNZWF1, NZM2410 atau MRL/lpr) dan gangguan fungsi sel B (model transgenik atau *knockout*).
2. Diperlukan uji klinis pada pasien dengan lupus nefritis secara uji acak tersamar ganda, untuk menentukan efektivitas, keamanan dan dosis optimal terapi metformin pada lupus.

Referensi

- Amarilyo, G., Lourenço, E. V., Shi, F.-D., La Cava, A., 2014. IL-17 Promotes Murine Lupus. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400931>
- Arbuckle, M.R., McClain, M.T., Rubertone, M. V., Hal Scofield, R., Dennis, G.J., James, J.A., Harley, J.B., 2003. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021933>
- Baglaenko, Y., Manion, K.P., Chang, N.H., Loh, C., Lajoie, G., Wither, J.E., 2015. Suppression of autoimmunity by CD5 + IL-10-producing B cells in lupus-prone mice. *Genes Immun.* <https://doi.org/10.1038/gene.2015.17>
- Balomenos, D., Rumold, R., Theofilopoulos, A.N., 1998. Interferon- γ is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI750>
- Ban, T., Sato, G.R., Nishiyama, A., Akiyama, A., Takasuna, M., Umehara, M., Suzuki, S., Ichino, M., Matsunaga, S., Kimura, A., Kimura, Y., Yanai, H., Miyashita, S., Kuromitsu, J., Tsukahara, K., Yoshimatsu, K., Endo, I., Yamamoto, T., Hirano, H., Ryo, A., Taniguchi, T., Tamura, T., 2016. Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.015>
- Bertsias George et al, 2012. Systemic Lupus Erythematosus: Pathogenesis and Clinical Features. Eular On-line Course Rheum. Dis.
- Blenman, K.R.M., Duan, B., Xu, Z., Wan, S., Atkinson, M.A., Flotte, T.R., Croker, B.P., Morel, L., 2006. IL-10 regulation of lupus in the NZM2410 murine model. *Lab. Investig.* <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700468>
- Burchill, M.A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B.R., Farrar, M.A., 2007. IL-2 Receptor β -Dependent STAT5 Activation Is Required for the Development of Foxp3 + Regulatory T Cells. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.1.280>
- Cervera, R., Piette, J.C., Font, J., Khamashta, M.A., Shoenfeld, Y., Camps, M.T., Jacobsen, S., Lakos, G., Tincani, A., Kontopoulou-Griva, I., Galeazzi, M., Meroni, P.L., Derksen, R.H.W.M., De Groot, P.G., Gromnica-Ihle, E., Baleva, M., Mosca, M., Bombardieri, S., Houssiau, F., Gris, J.C., Quéré, I., Hachulla, E., Vasconcelos, C., Roch, B., Fernández-Nebro, A., Boffa, M.C., Hughes, G.R.V., Ingelmo, M., 2002. Antiphospholipid syndrome: Clinical and immunologic manifestations and patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. *Arthritis Rheum.* <https://doi.org/10.1002/art.10187>

- Chae, B.S., Shin, T.Y., Kim, D.K., Eun, J.S., Leem, J.Y., Yang, J.H., 2008. Prostaglandin E2-mediated dysregulation of proinflammatory cytokine production in pristane-induced lupus mice. *Arch. Pharm. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1185-6>
- Chen, J., Ou, Y., Li, Y., Hu, S., Shao, L.W., Liu, Y., 2017. Metformin extends *C. Elegans* lifespan through lysosomal pathway. *Elife.* <https://doi.org/10.7554/eLife.31268>
- Chiche, L., Jourde-Chiche, N., Whalen, E., Presnell, S., Gersuk, V., Dang, K., Anguiano, E., Quinn, C., Burtey, S., Berland, Y., Kaplanski, G., Harle, J.R., Pascual, V., Chaussabel, D., 2014. Modular transcriptional repertoire analyses of adults with systemic lupus erythematosus reveal distinct type i and type ii interferon signatures. *Arthritis Rheumatol.* <https://doi.org/10.1002/art.38628>
- Choi, J., Kim, S.T., Craft, J., 2012. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus-an update. *Curr. Opin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.10.004>
- Chung, M.M., Nicol, C.J., Cheng, Y.C., Lin, K.H., Chen, Y.L., Pei, D., Lin, C.H., Shih, Y.N., Yen, C.H., Chen, S.J., Huang, R.N., Chiang, M.C., 2017. Metformin activation of AMPK suppresses AGE-induced inflammatory response in hNSCs. *Exp. Cell Res.* <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.01.017>
- Conti, H.R., Shen, F., Nayyar, N., Stocum, E., Sun, J.N., Lindemann, M.J., Ho, A.W., Hai, J.H., Yu, J.J., Jung, J.W., Filler, S.G., Masso-Welch, P., Edgerton, M., Gaffen, S.L., 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20081463>
- Crispín, J.C., Liossis, S.N.C., Kis-Toth, K., Lieberman, L.A., Kyttaris, V.C., Juang, Y.T., Tsokos, G.C., 2010. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2009.12.005>
- Danchenko, N., Satia, J.A., Anthony, M.S., 2006. Epidemiology of systemic lupus erythematosus: A comparison of worldwide disease burden. *Lupus.* <https://doi.org/10.1191/0961203306lu2305xx>
- Deocharan, B., Marambio, P., Edelman, M., Putterman, C., 2003. Differential effects of interleukin-4 in peptide induced autoimmunity. *Clin. Immunol.* [https://doi.org/10.1016/S1521-6616\(03\)00096-2](https://doi.org/10.1016/S1521-6616(03)00096-2)
- Dinarello, C.A., 2007. Interleukin-18 and the Pathogenesis of Inflammatory Diseases. *Semin. Nephrol.* <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2006.09.013>
- Dolff, S., Bijl, M., Huitema, M.G., Limburg, P.C., Kallenberg, C.G.M., Abdulahad, W.H., 2011. Disturbed Th1, Th2, Th17 and T reg balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.clim.2011.08.005>

- Dowling, R.J.O., Lam, S., Bassi, C., Mouaaz, S., Aman, A., Kiyota, T., Al-Awar, R., Goodwin, P.J., Stambolic, V., 2016. Metformin Pharmacokinetics in Mouse Tumors: Implications for Human Therapy. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.03.006>
- Dowling, R.J.O., Zakikhani, M., Fantus, I.G., Pollak, M., Sonenberg, N., 2007. Metformin inhibits mammalian target of rapamycin-dependent translation initiation in breast cancer cells. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2310>
- Drappa, J., Kamen, L.A., Chan, E., Georgiev, M., Ashany, D., Marti, F., King, P.D., 2003. Impaired T cell death and lupus-like autoimmunity in T cell-specific adapter protein-deficient mice. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20021358>
- Duan, W., Ding, Y., Yu, X., Ma, D., Yang, B., Li, Y., Huang, L., Chen, Z., Zheng, J., Yang, C., 2019. Metformin mitigates autoimmune insulinitis by inhibiting Th1 and Th17 responses while promoting Treg production. *Am. J. Transl. Res.*
- Elewa, E.A., Zakaria, O., Mohamed, E.I., Boghdadi, G., 2014. The role of interleukins 4, 17 and interferon gamma as biomarkers in patients with Systemic Lupus Erythematosus and their correlation with disease activity. *Egypt. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1016/j.ejr.2013.10.003>
- Finzel, S., Schaffer, S., Rizzi, M., Voll, R.E., 2018. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Z. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1007/s00393-018-0541-3>
- Foretz, M., Hébrard, S., Leclerc, J., Zarrinpashneh, E., Soty, M., Mithieux, G., Sakamoto, K., Andreelli, F., Viollet, B., 2010. Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI40671>
- Fu, D., Senouthai, S., Wang, J., You, Y., 2019. Vasoactive intestinal peptide ameliorates renal injury in a pristane-induced lupus mouse model by modulating Th17/Treg balance. *BMC Nephrol.* <https://doi.org/10.1186/s12882-019-1548-y>
- Gatto, M., Zen, M., Ghirardello, A., Bettio, S., Bassi, N., Iaccarino, L., Punzi, L., Doria, A., 2013. Emerging and critical issues in the pathogenesis of lupus. *Autoimmun. Rev.* <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.09.003>
- Ge, F., Wang, F., Yan, X., Li, Z., Wang, X., 2017. Association of BAFF with PI3K/Akt/mTOR signaling in lupus nephritis. *Mol. Med. Rep.* <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7367>
- Gerriets, V.A., Kishton, R.J., Nichols, A.G., MacIntyre, A.N., Inoue, M., Ilkayeva, O., Winter, P.S., Liu, X., Priyadarshini, B., Slawinska, M.E., Haeberli, L., Huck, C., Turka, L.A., Wood, K.C., Hale, L.P., Smith, P.A., Schneider, M.A., MacIver, N.J.,

- Locasale, J.W., Newgard, C.B., Shinohara, M.L., Rathmell, J.C., 2015. Metabolic programming and PDHK1 control CD4⁺ T cell subsets and inflammation. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI76012>
- Guerra, S.G., Vyse, T.J., Cunninghame Graham, D.S., 2012. The genetics of lupus: A functional perspective. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/ar3844>
- Guertin, D.A., Sabatini, D.M., 2007. Defining the Role of mTOR in Cancer. *Cancer Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.05.008>
- Guimarães, P.M., Scavuzzi, B.M., Stadtlober, N.P., Franchi Santos, L.F.D.R., Lozovoy, M.A.B., Iriyoda, T.M.V., Costa, N.T., Reiche, E.M.V., Maes, M., Dichi, I., Simão, A.N.C., 2017. Cytokines in systemic lupus erythematosus: Far beyond Th1/Th2 dualism lupus: Cytokine profiles. *Immunol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/icb.2017.53>
- Gutierrez-Ramos, J.C., Andreu, J.L., Revilla, Y., Viñuela, E., Martinez-A, C., 1990. Recovery from autoimmunity of MRL/lpr mice after infection with an interleukin-2/vaccinia recombinant virus. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/346271a0>
- Hayashi, T., Hasegawa, K., Sasaki, Y., Mori, T., Adachi, C., Maeda, K., 2007. Systemic administration of interleukin-4 expressing plasmid DNA delays the development of glomerulonephritis and prolongs survival in lupus-prone female NZB × NZW F1 mice. *Nephrol. Dial. Transplant.* <https://doi.org/10.1093/ndt/gfm465>
- He, J., Zhang, Xia, Wei, Y., Sun, X., Chen, Y., Deng, J., Jin, Y., Gan, Y., Hu, X., Jia, R., Xu, C., Hou, Z., Leong, Y.A., Zhu, L., Feng, J., An, Y., Jia, Y., Li, C., Liu, X., Ye, H., Ren, L., Li, R., Yao, H., Li, Y., Chen, S., Zhang, Xuewu, Su, Y., Guo, J., Shen, N., Morand, E.F., Yu, D., Li, Z., 2016. Low-dose interleukin-2 treatment selectively modulates CD4⁺ T cell subsets in patients with systemic lupus erythematosus. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/nm.4148>
- He, X., Zhang, Y., Zhu, A., Zeng, K., Zhang, X., Gong, L., Peng, Y., Lai, K., Qu, S., 2016. Suppression of interleukin 17 contributes to the immunomodulatory effects of adipose-derived stem cells in a murine model of systemic lupus erythematosus. *Immunol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s12026-016-8866-y>
- Heiler, S., Lötscher, J., Kreuzaler, M., Rolink, J., Rolink, A., 2018. Prophylactic and therapeutic effects of interleukin-2 (IL-2)/anti-IL-2 complexes in systemic lupus erythematosus-like chronic graft-versus-host disease. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00656>
- Helmick, C.G., Felson, D.T., Lawrence, R.C., Gabriel, S., Hirsch, R., Kwoh, C.K., Liang, M.H., Kremers, H.M., Mayes, M.D., Merkel, P.A., Pillemer, S.R., Reveille, J.D., Stone, J.H., 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. *Arthritis Rheum.*

<https://doi.org/10.1002/art.23177>

- Horwitz, D.A., 2008. Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: Past, present and future. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/ar2511>
- Howell, J.J., Hellberg, K., Turner, M., Talbott, G., Kolar, M.J., Ross, D.S., Hoxhaj, G., Saghatelian, A., Shaw, R.J., Manning, B.D., 2017. Metformin Inhibits Hepatic mTORC1 Signaling via Dose-Dependent Mechanisms Involving AMPK and the TSC Complex. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.12.009>
- Hsieh, A.C., Liu, Y., Edlind, M.P., Ingolia, N.T., Janes, M.R., Sher, A., Shi, E.Y., Stumpf, C.R., Christensen, C., Bonham, M.J., Wang, S., Ren, P., Martin, M., Jessen, K., Feldman, M.E., Weissman, J.S., Shokat, K.M., Rommel, C., Ruggero, D., 2012. The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/nature10912>
- Hsu, H.C., Yang, P.A., Wang, J., Wu, Q., Myers, R., Chen, J., Yi, J., Guentert, T., Tousson, A., Stanus, A.L., Le, T.V.L., Lorenz, R.G., Xu, H., Kolls, J.K., Carter, R.H.R.H., Chaplin, D.D., Williams, R.W., Mountz, J.D., 2008. Interleukin 17-producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni1552>
- Huang, L., Kong, Y., Wang, J., Sun, J., Shi, Q., Qiu, Y.H., 2015. Reducing progression of experimental lupus nephritis via inhibition of the B7/CD28 signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3953>
- Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., Wittmann, E., Buch, T., Da Costa, O.P., Brüstle, A., Brenner, D., Mak, T.W., Mittrücker, H.W., Tackenberg, B., Kamradt, T., Lohoff, M., 2013. IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI63681>
- Jacob, C.O., Van Der Meide, P.H., McDevitt, H.O., 1987. In vivo treatment of (NZB × NZW)F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to γ interferon. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.166.3.798>
- Jakes, R.W., Bae, S.C., Louthrenoo, W., Mok, C.C., Navarra, S. V., Kwon, N., 2012. Systematic review of the epidemiology of systemic lupus erythematosus in the asia-pacific region: Prevalence, incidence, clinical features, and mortality. *Arthritis Care Res.* <https://doi.org/10.1002/acr.20683>
- Kang, K.Y., Kim, Y.K., Yi, H., Kim, J., Jung, H.R., Kim, I.J., Cho, J.H., Park, S.H., Kim, H.Y., Ju, J.H., 2013. Metformin downregulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int. Immunopharmacol.* <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.03.020>

- Kaplan, M.J., 2011. Neutrophils in the pathogenesis and manifestations of SLE. *Nat. Rev. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2011.132>
- Kato, H., Perl, A., 2014. Mechanistic Target of Rapamycin Complex 1 Expands Th17 and IL-4 + CD4 – CD8 – Double-Negative T Cells and Contracts Regulatory T Cells in Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1301859>
- Kelly, B., Tannahill, G.M., Murphy, M.P., O'Neill, L.A.J., 2015. Metformin inhibits the production of reactive oxygen species from NADH: Ubiquinone oxidoreductase to limit induction of interleukin-1 β (IL-1 β) and boosts interleukin-10 (IL-10) in lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.662114>
- kementrian kesehatan RI, 2016. Infodatin, Pusat Data dan Informasi.
- Kickstein, E., Krauss, S., Thornhill, P., Rutschow, D., Zeller, R., Sharkey, J., Williamson, R., Fuchs, M., Köhler, A., Glossmann, H., Schneider, R., Sutherland, C., Schweiger, S., 2010. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0912793107>
- Kim, J.W., Kim, S.M., Park, J.S., Hwang, S.H., Choi, J.W., Jung, K.A., Ryu, J.G., Lee, S.Y., Kwok, S.K., Cho, M. La, Park, S.H., 2019. Metformin improves salivary gland inflammation and hypofunction in murine Sjögren's syndrome. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/s13075-019-1904-0>
- Kleczynska, W., Jakiela, B., Plutecka, H., Milewski, M., Sanak, M., Musial, J., 2011. Imbalance between Th17 and regulatory T-cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochem. Cytobiol.* <https://doi.org/10.5603/FHC.2011.0088>
- Kluger, M.A., Melderis, S., Nosko, A., Goerke, B., Luig, M., Meyer, M.C., Turner, J.E., Meyer-Schwesinger, C., Wegscheid, C., Tiegs, G., Stahl, R.A.K., Panzer, U., Steinmetz, O.M., 2016. Treg17 cells are programmed by Stat3 to suppress Th17 responses in systemic lupus. *Kidney Int.* <https://doi.org/10.1038/ki.2015.296>
- Kluger, M.A., Nosko, A., Ramcke, T., Goerke, B., Meyer, M.C., Wegscheid, C., Luig, M., Tiegs, G., Stahl, R.A.K., Steinmetz, O.M., 2017. Ror γ t expression in Tregspromotes systemic lupus erythematosus VIA IL-17 secretion, alteration of Tregphenotype and suppression of Th2 responses. *Clin. Exp. Immunol.* <https://doi.org/10.1111/cei.12905>
- Koreth, J., Matsuoka, K.I., Kim, H.T., McDonough, S.M., Bindra, B., Alyea, E.P., Armand, P., Cutler, C., Ho, V.T., Treister, N.S., Bienfang, D.C., Prasad, S., Tzachanis, D., Joyce, R.M., Avigan, D.E., Antin, J.H., Ritz, J., Soiffer, R.J., 2011. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*

<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1108188>

- Lai, Z. wei, Marchena-Mendez, I., Perl, A., 2015. Oxidative stress and Treg depletion in lupus patients with anti-phospholipid syndrome. *Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.03.024>
- Lan, Q., Zhou, X., Fan, H., Chen, M., Wang, J., Ryffel, B., Brand, D., Ramalingam, R., Kiela, P.R., Horwitz, D.A., Liu, Z., Zheng, S.G., 2012. Polyclonal CD4+Foxp3+ Treg cells induce TGF β -dependent tolerogenic dendritic cells that suppress the murine lupus-like syndrome. *J. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjs040>
- Lateef, A., Petri, M., 2012. Unmet medical needs in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/ar3919>
- Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., Shevach, E.M., O'Shea, J.J.J., 2007. Interleukin-2 Signaling via STAT5 Constrains T Helper 17 Cell Generation. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.02.009>
- Lawrence, R.C., Felson, D.T., Helmick, C.G., Arnold, L.M., Choi, H., Deyo, R.A., Gabriel, S., Hirsch, R., Hochberg, M.C., Hunder, G.G., Jordan, J.M., Katz, J.N., Kremers, H.M., Wolfe, F., 2008. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum.* <https://doi.org/10.1002/art.23176>
- Lech, M., Anders, H.J., 2013. The pathogenesis of lupus nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* <https://doi.org/10.1681/ASN.2013010026>
- Lee, S.-Y., Moon, S.-J., Kim, E.-K., Seo, H.-B., Yang, E.-J., Son, H.-J., Kim, J.-K., Min, J.-K., Park, S.-H., Cho, M.-L., 2017. Metformin Suppresses Systemic Autoimmunity in Roquin *san/san* Mice through Inhibiting B Cell Differentiation into Plasma Cells via Regu. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403088>
- Lee, S.Y., Lee, S.H., Yang, E.J., Kim, E.K., Kim, J.K., Shin, D.Y., Cho, M. La, 2015. Metformin ameliorates inflammatory bowel disease by suppression of the stat3 signaling pathway and regulation of the between Th17/Treg Balance. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135858>
- Li, W., Titov, A.A., Morel, L., 2017. An update on lupus animal models. *Curr. Opin. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000412>
- Liao, W., Lin, J.X., Leonard, W.J., 2013. Interleukin-2 at the Crossroads of Effector Responses, Tolerance, and Immunotherapy. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>

- Lieberman, L.A., Tsokos, G.C., 2010. The IL-2 Defect in Systemic Lupus Erythematosus Disease Has an Expansive Effect on Host Immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1155/2010/740619>
- Liu, Y., Liu, A., Iikuni, N., Xu, H., Shi, F.-D., La Cava, A., 2014. Regulatory CD4 + T Cells Promote B Cell Anergy in Murine Lupus . *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302897>
- Liu, Y., Zhang, D.T., Liu, X.G., 2015. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.* <https://doi.org/10.3109/08830185.2014.933957>
- Liu, Z., Davidson, A., 2012. Taming lupus-a new understanding of pathogenesis is leading to clinical advances. *Nat. Med.* <https://doi.org/10.1038/nm.2752>
- Luzina, I.G., Keegan, A.D., Heller, N.M., Rook, G.A.W., Shea-Donohue, T., Atamas, S.P., 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of “alternatives.” *J. Leukoc. Biol.* <https://doi.org/10.1189/jlb.0412214>
- Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., Anderson, S.M., Abel, E.D., Chen, B.J., Hale, L.P., Rathmell, J.C., 2014. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.* <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>
- Maeda, K., Kosugi, T., Sato, W., Kojima, H., Sato, Y., Kamimura, D., Kato, N., Tsuboi, N., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Murakami, M., Maruyama, S., Kadomatsu, K., 2015. CD147/basigin limits lupus nephritis and Th17 cell differentiation in mice by inhibiting the interleukin-6/STAT-3 pathway. *Arthritis Rheumatol.* <https://doi.org/10.1002/art.39155>
- Mardani, F., Mahmoudi, M., Esmaeili, S.A., Khorasani, S., Tabasi, N., Rastin, M., 2018. In vivo study: Th1–Th17 reduction in pristane-induced systemic lupus erythematosus mice after treatment with tolerogenic *Lactobacillus* probiotics. *J. Cell. Physiol.* <https://doi.org/10.1002/jcp.26819>
- Matsuki-Muramoto, Y., Nozawa, K., Uomori, K., Sekigawa, I., Takasaki, Y., 2017. Bortezomib treatment prevents glomerulosclerosis associated with lupus nephritis in a murine model through suppressive effects on the immune and renin–angiotensin systems. *Mod. Rheumatol.* <https://doi.org/10.3109/14397595.2016.1170957>
- Mizui, M., Koga, T., Lieberman, L.A., Beltran, J., Yoshida, N., Johnson, M.C., Tisch, R., Tsokos, G.C., 2014. IL-2 Protects Lupus-Prone Mice from Multiple End-Organ Damage by Limiting CD4 – CD8 – IL-17–Producing T Cells . *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400977>

- Mohan, C., Putterman, C., 2015. Genetics and pathogenesis of systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Nat. Rev. Nephrol.* <https://doi.org/10.1038/nrneph.2015.33>
- Mok, C.C., Lau, C.S., 2003. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Pathol.* <https://doi.org/10.1136/jcp.56.7.481>
- Morel, L., 2017. Immunometabolism in systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2017.43>
- Moulton, V.R., Suarez-Fueyo, A., Meidan, E., Li, H., Mizui, M., Tsokos, G.C., 2017. Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends Mol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.05.006>
- Nakajima, A., Yagita, H., Okumura, K., Hirose, S., 1997. Roles of IL-4 and IL-12 in the Development of Lupus in NZB/W F1 Mice. *J. Immunol.*
- Namgaladze, D., Snodgrass, R.G., Angioni, C., Grossmann, N., Dehne, N., Geisslinger, G., Brüne, B., 2015. AMP-activated protein kinase suppresses arachidonate 15-lipoxygenase expression in interleukin 4-polarized human macrophages. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.678243>
- Nath, N., Khan, M., Paintlia, M.K., Hoda, M.N., Giri, S., 2009. Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0803563>
- Nickerson, K.M., Christensen, S.R., Shupe, J., Kashgarian, M., Kim, D., Elkon, K., Shlomchik, M.J., 2010. TLR9 Regulates TLR7- and MyD88-Dependent Autoantibody Production and Disease in a Murine Model of Lupus. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0902592>
- Niewold, T.B., Kariuki, S.N., Morgan, G.A., Shrestha, S., Pachman, L.M., 2010. Gene-gene-sex interaction in cytokine gene polymorphisms revealed by serum interferon alpha phenotype in Juvenile dermatomyositis. *J. Pediatr.* <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.04.034>
- Nowling, T.K., Gilkeson, G.S., 2011. Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/ar3528>
- Ohl, K., Tenbrock, K., 2011. Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1155/2011/432595>
- Ozmen, L., Roman, D., Fountoulakis, M., Schmid, G., Ryffel, B., Garotta, G., 1995. Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: the treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon- γ receptor inhibits the onset of

glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* <https://doi.org/10.1002/eji.1830250103>

- Pateinakis, P., Pyrpasopoulou, A., 2013. Targeting the B-cell pathway in lupus nephritis: Current evidence and future perspectives. *Sci. World J.* <https://doi.org/10.1155/2013/745239>
- Pathak, S., Mohan, C., 2011. Cellular and molecular pathogenesis of systemic lupus erythematosus: Lessons from animal models. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/ar3465>
- Peixoto, T.V., Carrasco, S., Botte, D.A.C., Catanozi, S., Parra, E.R., Lima, T.M., Ugriumov, N., Soriano, F.G., de Mello, S.B.V., Rodrigues, C.M., Goldenstein-Schainberg, C., 2019. CD4+CD69+ T cells and CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells imbalance in peripheral blood, spleen and peritoneal lavage from pristane-induced systemic lupus erythematosus (SLE) mice. *Adv. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1186/s42358-019-0072-x>
- Peng, H., Wang, W., Zhou, M., Li, R., Pan, H.F., Ye, D.Q., 2013. Role of interleukin-10 and interleukin-10 receptor in systemic lupus erythematosus. *Clin. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1007/s10067-013-2294-3>
- Peng, S.L., Moslehi, J., Craft, J., 1997. Roles of interferon- γ and interleukin-4 in murine lupus. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI119361>
- Perl, A., 2015. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* <https://doi.org/10.1111/nyas.12756>
- Perl, A., 2013. Oxidative stress in the pathology and treatment of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.147>
- Pisitkun, P., Ha, H.L., Wang, H., Claudio, E., Tivy, C.C., Zhou, H., Mayadas, T.N., Illei, G.G., Siebenlist, U., 2012. Interleukin-17 Cytokines Are Critical in Development of Fatal Lupus Glomerulonephritis. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.08.014>
- Pons-Estel, G.J., Alarcón, G.S., Scofield, L., Reinlib, L., Cooper, G.S., 2010. Understanding the Epidemiology and Progression of Systemic Lupus Erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2008.10.007>
- Pons-Estel, G.J., Andreoli, L., Scanzi, F., Cervera, R., Tincani, A., 2017a. The antiphospholipid syndrome in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.10.004>

- Pons-Estel, G.J., Ugarte-Gil, M.F., Alarcón, G.S., 2017b. Epidemiology of systemic lupus erythematosus. *Expert Rev. Clin. Immunol.* <https://doi.org/10.1080/1744666X.2017.1327352>
- Poole, B.D., Niewold, T.B., Clark, D.N., Salloum, R., 2010. Interferon alpha in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1155/2010/948364>
- Putterman, C., 2004. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun. Rev.* [https://doi.org/10.1016/S1568-9972\(03\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S1568-9972(03)00082-X)
- Reeves, W.H., Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Satoh, M., Lu, L., 2009. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.06.003>
- Rena, G., Hardie, D.G., Pearson, E.R., 2017. The mechanisms of action of metformin. *Diabetologia.* <https://doi.org/10.1007/s00125-017-4342-z>
- Richard, M.L., Gilkeson, G., 2018. Mouse models of lupus: What they tell us and what they don't. *Lupus Sci. Med.* <https://doi.org/10.1136/lupus-2016-000199>
- Richards, H.B., Satoh, M., Jennette, J.C., Croker, B.P., Yoshida, H., Reeves, W.H., 2001. Interferon- γ is required for lupus nephritis in mice treated with the hydrocarbon oil pristane. *Kidney Int.* <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00045.x>
- Richards, H.B., Satoh, M., Shaw, M., Libert, C., Poli, V., Reeves, W.H., 1998. Interleukin 6 dependence of anti-DNA antibody production: Evidence for two pathways of autoantibody formation in pristane-induced lupus. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.188.5.985>
- Sag, D., Carling, D., Stout, R.D., Suttles, J., 2008. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Promotes Macrophage Polarization to an Anti-Inflammatory Functional Phenotype. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8633>
- Sahra, I. Ben, Regazzetti, C., Robert, G., Laurent, K., Le Marchand-Brustel, Y., Auberger, P., Tanti, J.F., Giorgetti-Peraldi, S., Bost, F., 2011. Metformin, independent of AMPK, induces mTOR inhibition and cell-cycle arrest through REDD1. *Cancer Res.* <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1769>
- Santiago, M.L., Fossati, L., Jacquet, C., Müller, W., Izui, S., Reininger, L., 1997. Interleukin-4 protects against a genetically linked lupus-like autoimmune syndrome. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.185.1.65>
- Satoh, M., Kumar, A., Kanwar, Y.S., Reeves, W.H., 1995. Anti-nuclear antibody

production and immune-complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.10934>

Satoh, M., Reeves, W.H., 1994. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.180.6.2341>

Satoh, M., Richards, H.B., Shaheen, V.M., Yoshida, H., Shaw, M., Naim, J.O., Wooley, P.H., Reeves, W.H., 2000. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin. Exp. Immunol.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01276.x>

Schwartz, N., Goilav, B., Putterman, C., 2014. The pathogenesis, diagnosis and treatment of lupus nephritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1097/BOR.0000000000000089>

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T., Sakaguchi, S., 2005. Homeostatic maintenance of natural Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J. Exp. Med.* <https://doi.org/10.1084/jem.20041982>

Shah, D., Mahajan, N., Sah, S., Nath, S.K., Paudyal, B., 2014. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J. Biomed. Sci.* <https://doi.org/10.1186/1423-0127-21-23>

Shi, W.Y., Xiao, D., Wang, L., Dong, L.H., Yan, Z.X., Shen, Z.X., Chen, S.J., Chen, Y., Zhao, W.L., 2012. Therapeutic metformin/AMPK activation blocked lymphoma cell growth via inhibition of mTOR pathway and induction of autophagy. *Cell Death Dis.* <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.13>

Son, H.J., Lee, J., Lee, S.Y., Kim, E.K., Park, M.J., Kim, K.W., Park, S.H., Cho, M. La, 2014. Metformin attenuates experimental autoimmune arthritis through reciprocal regulation of Th17/Treg balance and osteoclastogenesis. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2014/973986>

Song, Y.C., Tang, S.J., Lee, T.P., Hung, W.C., Lin, S.C., Tsai, C.Y., Ng, W.V., Wu, M.F., Sun, K.H., 2010. Reversing interleukin-2 inhibition mediated by anti-double-stranded DNA autoantibody ameliorates glomerulonephritis in MRL-lpr/lpr mice. *Arthritis Rheum.* <https://doi.org/10.1002/art.27487>

Stylianou, K., Petrakis, I., Mavroei, V., Stratakis, S., Vardaki, E., Perakis, K., Stratigis, S., Passam, A., Papadogiorgaki, E., Giannakakis, K., Nakopoulou, L., Daphnis, E., 2011. The PI3K/Akt/mTOR pathway is activated in murine lupus nephritis and downregulated by rapamycin. *Nephrol. Dial. Transplant.* <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq496>

- Takahashi, S., Fossati, L., Iwamoto, M., Merino, R., Motta, R., Kobayakawa, T., Izui, S., 1996. Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/JCI118584>
- Talaat, R.M., Mohamed, S.F., Bassyouni, I.H., Raouf, A.A., 2015. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine.* <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.12.027>
- Teichmann, L.L., Schenten, D., Medzhitov, R., Kashgarian, M., Shlomchik, M.J., 2013. Signals via the Adaptor MyD88 in B Cells and DCs Make Distinct and Synergistic Contributions to Immune Activation and Tissue Damage in Lupus. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.017>
- Theofilopoulos, A.N., Koundouris, S., Kono, D.H., Lawson, B.R., 2001. The role of IFN- γ in systemic erythematosus: A challenge to the Th1/Th2 paradigm in autoimmunity. *Arthritis Res.* <https://doi.org/10.1186/ar290>
- Tone, Y., Furuuchi, K., Kojima, Y., Tykocinski, M.L., Greene, M.I., Tone, M., 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* <https://doi.org/10.1038/ni1549>
- Tsai, P.Y., Ka, S.M., Chang, J.M., Chen, H.C., Shui, H.A., Li, C.Y., Hua, K.F., Chang, W.L., Huang, J.J., Yang, S. Sen, Chen, A., 2011. Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.016>
- Tsokos, G.C., Lo, M.S., Reis, P.C., Sullivan, K.E., 2016. New insights into the immunopathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Rheumatol.* <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2016.186>
- Viallard, J.F., Pellegrin, J.L., Ranchin, V., Schaefferbeke, T., Dehais, J., Longy-Boursier, M., Ragnaud, J.M., Leng, B., Moreau, J.F., 1999. Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN- γ)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin. Exp. Immunol.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1999.00766.x>
- Viollet, B., Guigas, B., Sanz Garcia, N., Leclerc, J., Foretz, M., Andreelli, F., 2012. Cellular and molecular mechanisms of metformin: An overview. *Clin. Sci.* <https://doi.org/10.1042/CS20110386>
- Von Spee-Mayer, C., Siegert, E., Abdirama, D., Rose, A., Klaus, A., Alexander, T., Enghard, P., Sawitzki, B., Hiepe, F., Radbruch, A., Burmester, G.R., Riemekasten, G., Humrich, J.Y., 2016. Low-dose interleukin-2 selectively corrects regulatory T cell defects in patients with systemic lupus Erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.*

<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207776>

- Voo, K.S., Wang, Yui Hsi, Santori, F.R., Boggiano, C., Wang, Yi Hong, Arima, K., Bover, L., Hanabuchi, S., Khalili, J., Marinova, E., Zheng, B., Littman, D.R., Liu, Y.J., 2009. Identification of IL-17-producing FOXP3 + regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* <https://doi.org/10.1073/pnas.0900408106>
- Wang, H., Li, T., Chen, S., Gu, Y., Ye, S., 2015. Neutrophil extracellular trap mitochondrial DNA and its autoantibody in systemic lupus erythematosus and a proof-of-concept trial of metformin. *Arthritis Rheumatol.* <https://doi.org/10.1002/art.39296>
- Wang, Y., Zhang, S., Liang, Z., Feng, M., Zhao, X., Qin, K., Gao, C., Li, X., Guo, H., Luo, J., 2019. Metformin attenuates bleomycin-induced scleroderma by regulating the balance of Treg/Teff cells and reducing spleen germinal center formation. *Mol. Immunol.* <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.07.002>
- Wei, L., Laurence, A., O'Shea, J.J., 2008. New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. *Semin. Cell Dev. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.07.011>
- Wei, W., Zhou, L.L., Si, J.F., Yuan, D.P., 2010. Regulatory effect of melatonin on cytokine disturbances in the pristane-induced lupus mice. *Mediators Inflamm.* <https://doi.org/10.1155/2010/951210>
- Weigert, O., von Spee, C., Undeutsch, R., Kloke, L., Humrich, J.Y., Riemekasten, G., 2013. CD4+Foxp3+ regulatory T cells prolong drug-induced disease remission in (NZBxNZW) F1 lupus mice. *Arthritis Res. Ther.* <https://doi.org/10.1186/ar4188>
- Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L., Rao, A., 2006. FOXP3 Controls Regulatory T Cell Function through Cooperation with NFAT. *Cell.* <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.05.042>
- Xu, A., Liu, Y., Chen, W., Wang, J., Xue, Y., Huang, F., Rong, L., Lin, J., Liu, D., Yan, M., Li, Q.-Z., Li, B., Song, J., Olsen, N., Zheng, S.G., 2016. TGF- β -Induced Regulatory T Cells Directly Suppress B Cell Responses through a Noncytotoxic Mechanism. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501740>
- Xue, Y., Zhang, H., Sun, X., Zhu, M.J., 2016. Metformin improves ileal epithelial barrier function in interleukin-10 deficient mice. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168670>
- Yan, J.J., Lee, J.G., Jang, J.Y., Koo, T.Y., Ahn, C., Yang, J., 2017. IL-2/anti-IL-2 complexes ameliorate lupus nephritis by expansion of CD4 + CD25 + Foxp3 +

regulatory T cells. *Kidney Int.* <https://doi.org/10.1016/j.kint.2016.09.022>

Yang, J., Chu, Y., Yang, Xue, Gao, D., Zhu, L., Yang, Xinrong, Wan, L., Li, M., 2009. Th17 and natural treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* <https://doi.org/10.1002/art.24499>

Yang, J., Yang, X., Zou, H., Chu, Y., Li, M., 2011. Recovery of the immune balance between Th17 and regulatory T cells as a treatment for systemic lupus erythematosus. *Rheumatology* (Oxford). <https://doi.org/10.1093/rheumatology/ker116>

Yao, Y., Wang, J.B., Xin, M.M., Li, H., Liu, B., Wang, L.L., Wang, L.Q., Zhao, L., 2016. Balance between inflammatory and regulatory cytokines in systemic lupus erythematosus. *Genet. Mol. Res.* <https://doi.org/10.4238/gmr.15027626>

Yin, Y., Choi, S.-C., Xu, Z., Zeumer, L., Kanda, N., Croker, B.P., Morel, L., 2016. Glucose Oxidation Is Critical for CD4 + T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501537>

Yin, Y., Choi, S.C., Xu, Z., Perry, D.J., Seay, H., Croker, B.P., Sobel, E.S., Brusko, T.M., Morel, L., 2015. Normalization of CD4+ T cell metabolism reverses lupus. *Sci. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa0835>

Zeng, H., Cohen, S., Guy, C., Shrestha, S., Neale, G., Brown, S.A., Cloer, C., Kishton, R.J., Gao, X., Youngblood, B., Do, M., Li, M.O., Locasale, J.W., Rathmell, J.C., Chi, H., 2016. mTORC1 and mTORC2 Kinase Signaling and Glucose Metabolism Drive Follicular Helper T Cell Differentiation. *Immunity.* <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.017>

Zhou, G., Myers, R., Li, Y., Chen, Y., Shen, X., Fenyk-Melody, J., Wu, M., Ventre, J., Doebber, T., Fujii, N., Musi, N., Hirshman, M.F., Goodyear, L.J., Moller, D.E., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J. Clin. Invest.* <https://doi.org/10.1172/jci200113505>

Zhou, Z., Tang, Y., Jin, X., Chen, C., Lu, Y., Liu, L., Shen, C., 2016. Metformin Inhibits Advanced Glycation End Products-Induced Inflammatory Response in Murine Macrophages Partly through AMPK Activation and RAGE/NF B Pathway Suppression. *J. Diabetes Res.* <https://doi.org/10.1155/2016/4847812>

Zhu, Y.P., Brown, J.R., Sag, D., Zhang, L., Suttles, J., 2015. Adenosine 5'-Monophosphate-Activated Protein Kinase Regulates IL-10-Mediated Anti-Inflammatory Signaling Pathways in Macrophages. *J. Immunol.* <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401024>

Zhuang, H., Han, S., Lee, P.Y., Khaybullin, R., Shumyak, S., Lu, L., Chatha, A., Afaneh, A., Zhang, Y., Xie, C., Nacionales, D., Moldawer, L., Qi, X., Yang, L.J., Reeves, W.H., 2017. Pathogenesis of Diffuse Alveolar Hemorrhage in Murine Lupus. *Arthritis Rheumatol.* <https://doi.org/10.1002/art.40077>

Lampiran

LABORATORIUM HEWAN SUNTER

Astro Vetshop, Ruko Nirwana Sunter Asri Tahap 3 Blok J2 No.36-37

Telp. 021-6515344, 6515261/62, Fax. 021-65832392

No Sampel : D18 PA 121 (N dan M) dan D 18 PA 179 (6 – 20)
 Peneliti : Dr. Stevent

DATA HASIL EVALUASI HISTOPATOLOGI GINJAL

No Urut	No sampel	Deskripsi	Kategori
Note	Parameter Penilaian Skoring glomerular 0 = normal, 1 = mesangial expansion 2 = proliferasi endokapiler 3 = kapilaritis atau perubahan nekrosis 4 = crescents Skoring interstitial 0 = tidak ada, 1 = <25 % interstitial, , 3 = >50% interstitial. 2 = 25 – 50 % interstitial 3 = >50% interstitial.		
GROUP 1 (M1-M5)			
1	M1 Kiri dan kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 7- 14 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan serta berkisar 4 glomerular mesangial expansion 5 <u>Interstitialium</u> : multipel infiltrasi sel-sel radang mononukleus minimal – cukup +/- 17 fokus area (pada perivaskular 9 minimal dan 1 nyata pada perifer pelvis dan selebihnya minimal pada interstisium (distribusi kiri lebih banyak dari kanan 4 ringan) terlihat dibandingkan diintertubular (interstisium) , vaskular kongesti	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) Interstial 1 (minimal, cukup pada perifer pelvis)
2	M2 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 20 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan serta berkisar 4 mesangial expansion <u>Interstitialium</u> : multipel infiltrasi sel-sel radang mononukleus minimal – cukup di 18 fokus area pada perivaskular dan intertubular (11 fokus pada perivaskular dan 1 fokus di perifer pelvis selebihnya di intertubular (interstisium) , vaskular kongesti minimal	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal kiri lbh bny dari kanan) 3 (minimal) Interstial 2 (cukup nyata di perivaskular)

3	M3 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 7 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan serta berkisar 4 mesangial expansion <u>Interstisium</u> : multipel sel-sel radang mononukleus sangat minimal infiltrasi di 4 fokus area pada perivaskular 3 fokus dan selebihnya interstisium , vaskular kongesti minimal	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal kiri lbh bny dari kanan) 3 (minimal) Interstial 1 (sangat minimal))
4	M4 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 12-15 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion kiri dan kanan terlihat berkisar 5 glomerulus, vaskulitis <u>Interstisium</u> : multipel infiltrasi sel-sel radang mononukleus minimal – cukup di 15 fokus area pada perivaskular dan intertubular (7 fokus pada perivaskular cukup dan 1 fokus diperifer pelvis cukup banyak dan selbihnya minimal interstisium, vaskular kongesti	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal – cukup) Interstial 1 (cukup infiltrasi di ginjal kiri)
5	M5 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 3-8 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion 2 glomerulus) <u>Interstisium</u> : multipel infiltrasi sel-sel radang mononukleus minimal – cukup di 8 fokus area (perivaskular dan intertubular (kiri 2 fokus interstitium cukup selain 1 fokus pada perivaskular cukup nyata selebihnya minimal), minimal vaskular kongesti	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) Interstial 1 (minimal) → kiri lbh banyak infiltrasinya
Simpulan Tingkat Perubahan Group 1			M2,M4>M5,M1>M3
GROUP 2 (6-10)			
1	6 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal-cukup berkisar +/- 5-8 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion pada 4 glomerulus. Vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel sangat minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di +/- 13 fokus area (pada perivaskular 8 fokus minimal - cukup di ginjal kiri dan 1 fokus di kanan perifer pelvis selebihnya infiltrasi terlihat minimal di intertubular (interstisium), vaskular kongesti	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) 4. (minimal) Interstial 1 (minimal)
2	7 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal berkisar +/- 4-6 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion pada 4 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal-cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 7 fokus area pada perivaskular dan intertubular (2 fokus minimal pada perivaskular dan selebihnya di interstisium sangat minimal)	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) Interstial 1 (minimal)

3	8 Kiri dan kanan	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal-cukup berkisar +/- 5-18 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion 5 glomerulus. Vaskulitis sangat minimal</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di +/- 18 fokus area dengan kisaran 6 fokus cukup banyak pada perivaskular dan selebihnya di intertubular (interstisium) dengan populasi minimal, vaskular kongesti</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3. (minimal)</p> <p>Interstial 2 (25%lbh)</p>
4	9 Kiri dan Kanan	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal berkisar +/- 7-15 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion 5 glomerulus, vaskulitis sangat minimal</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 9 fokus area pada perivaskular dan intertubular (5 fokus pada perivaskular dengan populasi minimal dan selebihnya diinterstisium sangat minimal)</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal)</p> <p>Interstial 1 minimal (keduanya)</p> <p>Note kiri sangat minim perubahan</p>
5	10 Kiri dan kanan	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler sangat minimal-minimal berkisar +/- 2-6 glomerulus ginjal kiri dan kanan dan mesangial expansion 2-3 glomerulus. Vaskulitis sangat minimal</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di kisaran 10 fokus area (pada perivaskular ginjal kiri 6 fokus minimal -cukup di ginjal kiri, 1 perifer pelvis dan infiltrasi selebihnya terlihat sangat minimal – minimal diintertubular (interstisium), vaskular kongesti dan vaskulitis minimal</p>	<p>Glomerulus 1.(minimal) 2. (minimal) 3. (sangat minimal)</p> <p>Interstial 1 (minimal)</p> <p>Note: distribusi infiltrasi minimal lbh bny di ginjal kiri sdgkan agak sedikit bny di kanan tp Cuma di 2 fokus)</p>
Simpulan Tingkat Perubahan Group 2			8>10>9,6,7,
GROUP 3 (11-15)			
1	11 Kiri dan Kanan	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal pada sejumlah glomerulus +/- 5-15 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 6 glomerulus, vaskulitis minimal</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel infiltrasi minimal sel-sel radang mononukleus di 12 fokus area pada perivaskular dan intertubular : di kisaran 4 fokus pada perivaskular dengan populasi minimal dan selebihnya sangat minimal diinterstisium</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal)</p> <p>Interstial 1 minimal (inifitersi terdistribusi)</p>
2	12 Kiri dan Kanan	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler pada sejumlah glomerulus +/- 6-15 glomerulus ginjal kiri dan kanan mesangial expansion +/- 8 glomerulus, vaskulitis minimal</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal)</p>

		<u>Interstisium</u> : multipel infiltrasi sel-sel radang mononukleus minimal di 16 fokus pada perivaskular dan intertubular di kisaran 7 fokus pada perivaskular dengan populasi minimal dan selebihnya sangat minimal diinterstisium	Interstial 1 minimal
3	13 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler pada sejumlah glomerulus +/- 5-15 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 5 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 5 fokus area pada perivaskular dan intertubular (1 fokus pada perifer pelvis dengan populasi cukup dan selebihnya diinterstisium sangat minimal)	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) Interstial 1 minimal Note: Ginjal kiri perubahan lbh ringan
4	14 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 5-20 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 8 glomerulus, vaskulitis minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal – sangat nyata infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 25 fokus area pada perivaskular dan intertubular (15 fokus pada perivaskular dengan populasi cukup – nyata dan infiltrasi selebihnya diinterstisium minimal-cukup	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (cukup vaskulitis)) Interstial 2 (nyata)
5	15 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 6-12 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 3-5 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal – sangat nyata infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 20 fokus area pada perivaskular dan intertubular (12 fokus pada perivaskular dengan populasi cukup infiltrasi selebihnya diinterstisium minimal-cukup	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) Interstial 2 (cukup nyata)
Simpulan Tingkat Perubahan Group 3			14,15>12> 11, 13
GROUP 4 (16-20)			
1	16 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 8-11 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 2-4 glomerulus, vaskulitis sangat minimal, crescent + <u>Interstisium</u> : multipel minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 8 fokus area pada perivaskular dan intertubular (3 fokus pada perifer pelvis dengan infiltrasi cukup dan selebihnya di perivaskular dan interstisium sangat minimal -minimal	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) 4 (minimal) Interstial 1 minimal
2	17 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler berkisar +/- 15 pada glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 7 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 10-18 fokus area pada perivaskular dan intertubular (11 fokus pada	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) Interstial 1 minimal

		perivaskular dengan populasi minimal - cukup dan selbihnya diinterstisium sangat minimal)	
3	18 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler pada sejumlah glomerulus +/- 14 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/-5 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 13 fokus area pada perivaskular dan intertubular (6 fokus pada perivaskular dengan populasi minimal dan selbihnya diinterstisium sangat minimal)	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) 3 (minimal) Interstial 1 minimal Note : Renal kiri menunjukkan infiltrasi distribusinya lebih
4	19 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler +/- 2-9 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 3 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel sangat minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 3 fokus area pada perivaskular dan intertubular (2 fokus pada perivaskular dengan populasi sangat minim dan selbihnya diinterstisium sangat minimal sampai tidak ditemukan.	Glomerulus 1 (minimal) 2 (minimal) Interstial 1 (sangat minimal)
5	20 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler +/- 9 - 20 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion +/- 7 glomerulus, vaskulitis sangat minimal <u>Interstisium</u> : multipel minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 9 fokus area pada perivaskular dan interstisium (4 fokus pada perivaskular dengan populasi cukup dan selbihnya diintersitium sangat minimal)	Glomerulus 1. (minimal) 2. (minimal) 3. (minimal) Interstial 1 (sangat minimal) Interstial kanan sangat ringan
Simpulan Tingkat Perubahan Group 4			17>20>18,16,19
GROUP 5 (N6-N10)			
1	N6 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler pada hampir di setiap glomerulus ginjal kiri dan kanan, disertai dengan mesangial expansion glomerulus 4 <u>Interstisium</u> : multipel sangat minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 7 fokus area (1-2 di fokus perivaskular dan selbihnya diinterstisium. minimal vaskular kongesti	Glomerulus 1 (minimal) 2 (sangat nyata) 3 (minimal) Interstial 1 (sangat minimal → perivaskular dan intersitium)
2	N7 Kiri dan Kanan	<u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal berkisar +/- 25 glomerulus ginjal kiri dan kanan, dan mesangial expansion 8 glomerulus <u>Interstisium</u> : multipel minimal – cukup infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 10 fokus area dengan 3 fokus cukup di perivaskular selbihnya ringan di interstisium, vaskular kongesti sangat minimal	Glomerulus 1 (minimal) 2 (cukup) 3 (minimal) Interstial 1 (minimal perivaskular dan interstisium)

3	N8	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal – cukup +/- 10 glomerulus ginjal kiri dan kanan, mesangial expansion 9 glomerulus</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel minimal – sangat nyata infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 20 fokus area dengan sejumlah fokus nyata di interstisium, dan perivaskular (dalam kisaran distribusi yang sama), kongesti sangat minimal (sklerosis)</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (cukup) 3 (minimal)</p> <p>Interstial 3 (cukup perivaskular dan interstisium)</p>
4	N9	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi minimal +/- 1-7 glomerulus ginjal ginjal kiri dan kanan; mesangial expansion 1-2 glomerulus)</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel sangat minimal - minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 8 fokus area ; perivaskular 3 fokus dan selebihnya di interstisium</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (minamal) 3 (minimal)</p> <p>Interstial 1 (minimal)</p>
5	N10	<p><u>Glomerulus</u> : proliferasi endokapiler minimal -cukup +/- 1-12 glomerulus pada ginjal kiri dan kanan lebih ringan; mesangial expansion 1-4 glomerulus)</p> <p><u>Interstisium</u> : multipel sangat minimal – minimal infiltrasi sel-sel radang mononukleus di 1-6 fokus area dengan dengan distribusi populasi sel seimbang perivaskular maupun di interstisium</p>	<p>Glomerulus 1 (minimal) 2 (minamal) 3 (minimal)</p> <p>Interstial 1 (minimal)</p>
Simpulan Tingkat Perubahan Group 5			8> 6,7>9,10

Ulasan : berdasarkan hasil evaluasi kualitatif yang dituangkan pada deskripsi histopatologi menunjukkan bahwa perubahan patologi pada setiap anggota group sangat beragam, namun demikian dipertimbangkan bahwa group 5 (N6-N10) memberikan gambaran glomerulo dan interstitial tubulo nefritis nyata pada 2 anggota group tersebut dibandingkan terhadap group 2 (6-10), 3 (11-15) dan 4 (16-20), yang tergolong cukup mempresentasikan perubahan patologi interstisium tubulo nefritis pada hampir merata disetiap anggota dari group tersebut dibandingkan glomerunonefritis. Perubahan patologi yang ringan berupa interstitial tubulonefritis dipresentasikan pada group 1 (M1-M5).

Patologist,

TTD

Dr.drh. Erni Sulistiawati, SP1