

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK
TERHADAP PROFIL EKSPRESI mRNA HMGB1, PROTEIN
HMGB1, dan PROTEIN TLR4 PADA CEDERA
MUSKULOSKELETAL MENCIT BALB/c**

**SYSTEMIC LIDOCAINE ADMINISTRATION INFLUENCES OF
PROFILE HMGB1 mRNA EXPRESSION, HMGB1 PROTEIN,
and TLR4 PROTEIN on BALB/c MICE'S
MUSCULOSKELETAL INJURY**

ROBERT HOTMAN SIRAIT

(NPM: P0200314036)



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

2018

**PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK
TERHADAP PROFIL EKSPRESI mRNA HMGB1, PROTEIN
HMGB1, dan PROTEIN TLR4 PADA CEDERA
MUSKULOSKELETAL MENCIT BALB/c**

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Mencapai Gelar Doktor

**Program Studi
Ilmu Kedokteran**

Disusun dan diajukan oleh

**ROBERT HOTMAN SIRAIT
(NPM: P0200314036)**

Kepada

**SEKOLAH PASCASARJANA
PROGRAM S3 ILMU KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK
TERHADAP PROFIL EKSPRESI mRNA HMGB1, PROTEIN HMGB1,
dan PROTEIN TLR4 PADA CEDERA MUSKULOSKELETAL
MENCIT BALB/c**

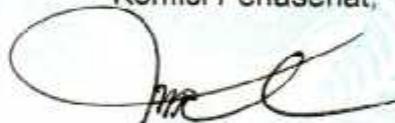
Disusun dan diajukan oleh

ROBERT HOTMAN SIRAIT
Nomor Pokok P0200314036

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 8 Maret 2018
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Komisi Penasehat,



Prof. Dr. dr. Muhammad Ramli SpAn., KMN/KAP
Promotor



Prof. Dr.dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran



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



Dr. dr. Syafri K. Arif, SpAn., KIC-KKV
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin



Prof. Dr. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS

TIM PENILAI UJIAN PROMOSI

Promotor : Prof. Dr. dr. Muhammad Ramli SpAn., KMN-KAP

Kopromotor : Prof. Dr.dr Andi Asadul Islam, SpBS(K)

Dr. dr. Syafri K. Arif, SpAn., KIC-KKV

Penilai : Dr. dr. Carmen Siagian, MS., SpGK

Prof. dr. Moch. Hatta, PhD., SpMK(K)

Prof.dr. Peter Kabo, SpJP., PhD

Prof.dr.Muh.Nasrum Massi, PhD

Dr.dr. Burhanudin Bahar., MS

Dr.dr. Hisbullah, SpAn., KIC-KKV

PERNYATAAN KEASLIAN PENELITIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Robert Hotman Sirait

Nomor Mahasiswa : P0200314036

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa penelitian yang saya tulis ini adalah benar-benar merupakan hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan usulan penelitian ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Maret 2018

Yang menyatakan,

Robert Hotman Sirait

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala berkat dan karunia yang dilimpahkan-Nya kepada kita semua. Berkat kehendak dan perkenan-Nya jualah saya dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul:

PENGARUH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK TERHADAP PROFIL EKSPRESI mRNA HMGB1, PROTEIN HMGB1, dan PROTEIN TLR4 PADA CEDERA MUSKULOSKELETAL MENCIT BALB/c

Pada kesempatan ini saya haturkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu saya selama menjalani Program Pendidikan Doktor (S3) dan dalam penyusunan disertasi ini. Sebagai manusia yang tak sempurna, saya juga hendak menyampaikan permohonan maaf kepada semua pihak terkait atas kekhilafan saya selama menjalani pendidikan di Departemen Program Pendidikan Doktor (S3) Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Saya menyadari bahwa selesainya program doktor yang saya jalani ini, tidak lepas dari bantuan, dukungan, serta perhatian dari berbagai pihak. Untuk itu, ijin saya menyampaikan ucapan terima kasih ini.

Pada kesempatan yang berbahagia ini, perkenankan saya untuk menyampaikan ucapan terima kasih kepada Rektor Universitas Hasanuddin **Prof. Dr. Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA** yang telah memberikan kesempatan bagi saya untuk mengikuti Program Doktor Ilmu Kedokteran di Universitas Hasanuddin Makassar yang beliau pimpin.

Kepada **Prof.Dr. dr. Andi Asadul Islam, SpBS(K)** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, dan juga sebagai Kopromotor 1 yang saya hormati, saya mengucapkan terima kasih atas kesempatan yang diberikan kepada saya untuk mengikuti program S3 ini dan terimakasih yang tidak terhingga juga saya sampaikan kepada beliau atas bimbingan, asupan dan koreksi yang diberikan pada penulisan naskah penelitian disertasi ini.

Kepada **Prof. dr. Mochammad Hatta, PhD., SpMK(K)** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran FKUH, dan anggota/ penilai disertasi, saya menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga, yang telah banyak memberi inspirasi, membantu mengatasi masalah, memberi bimbingan dan motivasi, dan dengan teliti mengoreksi naskah laporan penelitian hingga menjadi disertasi yang jauh lebih sempurna.

Kepada seluruh staf administrasi Program studi S3 ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran UNHAS pak Dakhyar, pak Akmal, pak Mumu, ibu Ida, dan ibu Nur saya ucapkan banyak terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya untuk semua bantuannya dalam melancarkan proses perkuliahan.

Kepada **Prof. Dr. dr. Muhammad Ramli, SpAn., KAP-KMN** selaku Ketua/ promotor, yang sangat saya hormati dan kagumi, saya sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya, yang demikian teliti dan sabar meluangkan sebagian besar waktunya untuk mengajar dan mengawal penelitian ini bahkan ditengah-tengahkesibukan beliau dalam memberikan pelayanan anestesi di kamar bedah. Beliau memberikan bimbingan, petunjuk, arahan, doa, senyuman, dan perhatian kepada saya serta kemudahan dalam menyelesaikan penelitian ini. Beliau telah memberikan kepercayaan yang begitu besar kepada saya mulai dari mengembangkan ide penelitian, pelaksanaan

penelitian, hingga penulisan disertasi ini. Saya sangat bersyukur dapat memperoleh kesempatan bimbingan yang sangat berharga dari beliau selama menjalani pendidikan ini.

Kepada **DR.dr. Syafri K. Arif, SpAn., KIC-KKV**, selaku kopromotor 2 dan, wakil Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin bidang Administrasi Keuangan saya mengucapkan terima kasih dan hormat yang sebesar-besarnya atas segala saran, asupan, bimbingan dan pengarahan yang berharga yang telah diberikan dengan tulus pada saat saya berkonsultasi ditengah-tengah kesibukan beliau. Kerendahan hati beliau patut diteladani.

Terima kasih saya haturkan kepada **Prof.dr. Muh. Nasrum Massi, PhD**, selaku panitia anggota/ penilai yang berkenan meluangkan waktu untuk menjadi penguji ditengah-tengah kesibukan beliau sebagai Wakil Dekan bidang kemahasiswaan dan alumni. Beliau banyak memberikan asupan, saran, koreksi, dan dorongan dalam menyelesaikan penelitian ini.

Terima kasih dan penghargaan saya sampaikan kepada **Dr.dr. Carmen Siagian, MS., SpGK**, selaku anggota/ penguji eksternal dari luar FK-Unhas. Perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih yang tak terhingga atas kesediaannya datang dari Jakarta untuk menguji dan menilai saya ditengah-tengah kesibukannya. Beliau telah banyak memberikan bimbingan, pengarahan, dan koreksi sehingga disertasi ini menjadi lebih sempurna.

Terima kasih dan penghargaan juga saya sampaikan kepada **Prof.dr. Peter Kabo, SpJP(K), PhD**, selaku anggota/ penilai, yang telah bersedia menguji saya. Terima kasih atas kecermatan, asupan dan kemudahan yang telah diberikan untuk penyempurnaan disertasi ini.

Kepada **Dr.dr. Burhanuddin Bahar, MS**, selaku anggota/ penilai, saya ucapkan terima kasih yang tulus dan sebesar-besarnya atas kesediaannya meluangkan waktu di sela-sela kesibukannya dan juga atas bimbingan, pengarahan yang selama ini beliau berikan khususnya di bidang pengolahan statistik dan metode penelitian.

Terima kasih saya haturkan kepada **Dr.dr. Hisbullah, SpAn., KIC-KKV**, selaku anggota/ penilai yang telah bersedia menguji dan memberikan masukan bimbingan, koreksi, dan dukungan serta arahan selama saya melakukan penelitian sehingga disertasi ini menjadi lebih sempurna.

Kepada **Prof.dr. Mochammad Hatta, PhD., SpMK(K)**, selaku Kepala bagian beserta seluruh staff Laboratorium Mikrobiologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Saya ucapkan terima kasih yang tulus atas waktu yang telah diberikan saat saya berkonsultasi dengan beliau mengenai model hewan coba dan pemeriksaan darah yang saya lakukan. Beliau telah banyak memberikan bantuan mulai dari penyediaan sarana dan prasarana penelitian, hewan coba, serta penyediaan reagen pemeriksaan darah sehingga penelitian ini dapat berjalan dengan baik. Terimakasih yang tulus juga saya sampaikan pada seluruh staff laboratorium Mikrobiologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin: Bpk Romi Usman, Bpk Mus, dan Bpk Marwani yang telah banyak membantu dalam proses penelitian.

Kepada staf administrasi S3 ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran UNHAS pak Dakhyar, pak Akmal, pak Mumu, ibu Ida, dan ibu Nur saya ucapkan terimakasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya untuk semua bantuannya dalam melancarkan proses perkuliahan.

Kepada Rektor Universitas Kristen Indonesia yang lalu Bapak **DR. Maruarar Siahaan, SH., MH**, dan yang baru Bapak **DR Dhaniswara K.**

Hardjono, SH., MH., MBA serta Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Indonesia **dr. Marwito Wiyanto, M.Biomed., AIFM**, yang saya hormati beserta seluruh jajarannya saya ucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas dukungan moril maupun materil yang diberikan selama saya menempuh jenjang pendidikan doktor ini sehingga dapat selesai tepat waktu.

Kepada teman sejawat dr. Erica Gilda Simanjuntak, SpAn., KIC., dr. Ratna Emelia Hutapea, SpAn dan dr. Eliezer Permana, SpAn., KIC, dari Departemen ilmu Anestesiologi FKUKI/ RSUKI saya ucapkan terima kasih banyak untuk pengertian, bantuan dan kerjasama yang diberikan selama ini atas keterbatasan saya dalam membagi waktu, tenaga dan pikiran antara sekolah dan tugas mengajar di FK UKI serta pelayanan anestesi kamar operasi RSUKI.

Terimakasih yang tulus dan penghargaan yang sebesar-besarnya juga saya sampaikan untuk segenap guru dan dosen yang telah membimbing saya dalam semua tahapan pendidikan yang telah saya lalui hingga jenjang pendidikan doktor ini.

Kepada orang tua saya yang saya muliakan **ayahanda St Janner W. Sirait** dan **ibunda Lidia Manurung**, sembah sujud dan terima kasih yang tak terhingga ananda sampaikan atas segala doa dan dukungan yang diberikan sejak saya dalam kandungan, dilahirkan dan dibesarkan hingga saat ini saya dapat menyelesaikan jenjang pendidikan doktor. Dan kepada kedua mertua saya yang sangat saya hormati, **alm Drs Nathaniel Ritha** dan **Ester Bangalino** terima kasih dan salam hormat atas dukungan serta doa selama ini.

Kepada keluarga saya yang tercinta khususnya kepada istriku tercinta dan tersayang, **drg. Agriaty Ritha**, terima kasih yang tulus saya sampaikan

atas segala pengertian dan dukungan moril yang telah kau berikan selama ini, baik dalam tugas saya sehari-hari maupun saat saya menyelesaikan disertasi ini. Untuk anak-anakku tersayang, **Gilbert M.C.R Sirait** dan **Christofer O.R. Sirait** terima kasih untuk semua hal yang selalu membuat saya menjadi ayah yang paling beruntung dan berbahagia di dunia ini. Ayah mohon maaf kalau urusan pekerjaan dan pendidikan ini sangat mengurangi waktu dan perhatian papa terhadap kalian.

Kepada seluruh keluarga besar tercinta yang tidak dapat saya sebut satu persatu, saya ucapkan terimakasih atas segala dukungan dan pengertian yang diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan doktor ini.

Kepada teman-teman seperjuangan mahasiswa/i pascasarjana S3 ilmu kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin angkatan 2014: Tigor Peniel Simanjuntak, dr., SpOG., M.Kes, Bambang Suprayogi Resi Utomo, dr., SpTHT., M.Sc, Titus Tambaip, dr., M.Kes, Marni br Karo, SST., M.Kes, Tetty Rina Aritonang, SST.,M.Keb, Lenny Irmawaty Sirait, SST., M.Keb, Sri Rahayu, SST.,M.Kes, terimakasih untuk kebersamaan dalam suka dan duka, serta bantuan dan dukungan yang diberikan selama kita bersama-sama dalam menempuh pendidikan S3 ilmu kedokteran ini.

Tentu masih banyak lagi pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dan berkontribusi dalam pendidikan doktor saya, termasuk dalam pelaksanaan penelitian dan penyelesaian disertasi ini. Namun semata-mata karena keterbatasan yang saya miliki, saya tidak mampu menyebutkan satu persatu. Untuk itu saya hanya mampu mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan berdoa semoga Tuhan Yang Maha Esa memberikan balasan yang setimpal atas segala bantuan dan amal yang telah diberikan berbagai pihak kepada saya.

Semoga disertasi ini membawa manfaat bagi pengembangan ilmu dan pelayanan kesehatan.

Makassar, Maret 2018

Robert Hotman Sirait

ABSTRAK

ROBERT HOTMAN SIRAIT. Pengaruh Pemberian Lidokain Sistemik Terhadap Profil Ekspresi mRNA HMGB1, Protein HMGB1, dan Protein TLR4 Pada Cedera Muskuloskeletal Mencit BALB/c (dibimbing oleh Muhammad Ramli, Andi Asadul Islam, dan Syafri K. Arif).

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan manfaat pemberian lidokain sistemik sebagai anti inflamasi pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal dengan menghambat ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4.

Penelitian ini adalah penelitian hewan coba laboratorium prospektif dengan metode acak sederhana. Dua puluh ekor mencit BALB/c jantan, sehat, umur 10-12 minggu, berat badan 35-40 gram, dibagi menjadi kelompok lidokain dan kontrol. Cedera muskuloskeletal dilakukan dengan cara mematahkan tulang paha kiri mencit secara tertutup. Setelah 4 jam mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal, kelompok lidokain diberi injeksi lidokain 2 mg/kgBB setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam melalui vena ekor, sedangkan kelompok kontrol diberi injeksi aquades steril dengan volume yang sama sebagai pengganti lidokain. Darah mencit BALB/c diambil dari vena ekor sebelum mengalami cedera, 4 jam sesudah cedera, dan 2 jam setelah pemberian injeksi lidokain dan air steril selesai. Ekspresi mRNA HMGB1 diperiksa dengan *quantitative real time polymerase chain reaction* (qPCR) sedangkan kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 diperiksa dengan *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

Hasil penelitian menunjukkan ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 menurun secara bermakna pada kelompok lidokain ($p < 0,05$) sedangkan pada kelompok kontrol meningkat secara bermakna ($p < 0,05$).

Kata kunci: cedera muskuloskeletal, mRNA HMGB1, TLR4, lidokain.



ABSTRACT

ROBERT HOTMAN SIRAIT. Systemic Lidocaine Administration Influences of Profile HMGB1 mRNA Expression, HMGB1 Protein, and TLR4 Protein in BALB/c Mice's Musculoskeletal Injury (supervised by Muhammad Ramli, Andi Asadul Islam, and Safri K. Arif).

This research aimed to demonstrate efficacy of systemic lidocaine administration as anti- inflammation properties to inhibit HMGB1 mRNA expression, HMGB1 protein and TLR4 protein in a BALB/c mouse model with musculoskeletal injury.

This research is prospective animal laboratory experiment with simple random sampling method. Twenty healthy male BALB/c mice, aged 10-12 weeks, body weight 35-40 grams were divided into lidocaine and control groups. The musculoskeletal injury was performed by closely fracturing the left thigh bone of the mice. Four hours after the BALB/c mice underwent the musculoskeletal injury, the lidocaine groups was injected with 2 mg/kg BW lidocaine through tail vein injection, once every 2 h, continuously for 24 h. The control group was given the same volume of distilled water instead of lidocaine. Mice BALB/c blood was extracted from tail vein before injury, 4 h after injury, and 2 h after the injection of lidocaine and distilled water is completed. The HMGB1 mRNA expression was examined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) while the HMGB1 protein, and TLR4 protein level was determined with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The research result indicates the HMGB1 mRNA expression, HMGB1 protein, and TLR4 protein level was significantly decreased in the lidocaine group ($p < 0.05$) while in the control group significantly increased ($p < 0.05$).

Key words: musculoskeletal injury, HMGB1 mRNA, TLR4, lidocaine.



DAFTAR ISI

	hal
HALAMAN SAMPUL	I
HALAMAN JUDUL	II
LEMBAR PENGESAHAN	III
TIM PENILAI UJIAN PRA PROMOSI	IV
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	V
KATA PENGANTAR	VI
ABSTRAK	XIII
ABSTRACT	XIV
DAFTAR ISI	XV
DAFTAR SINGKATAN	XIX
DAFTAR TABEL	XXII
DAFTAR GAMBAR	XXIII
DAFTAR GRAFIK	XXIV
BAB I PENDAHULUAN	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. RUMUSAN MASALAH	4
C. HIPOTESIS	5

D. TUJUAN PENELITIAN	5
E. KEGUNAAN PENELITIAN	6
Kegunaan Ilmiah	6
Kegunaan Praktis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
A. HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)	7
1. Aktivitas Sitokin HMGBI	12
2. HMGBI adalah mediator penting penyebab kematian pada peradangan steril dan infeksius	12
3. Peran MD-2 pada HMGB1-TLR4	16
4. Reaksi Reduksi Oksidasi dan Aktivitas Sitokin HMGB1	17
5. HMGB1 thiol adalah mediator kemotaksis poten	21
6. Dinamika HMGBI Redoks Selama Kematian Sel Dan Cidera	22
7. Asetilasi dan Aktivitas Sitokin HMGB1 Hiperasetilasi	23
8. Piroptosis dan Hiperasetilase	25
9. Modifikasi Redoks HMGB1 dan Autofagi	26
10. Metode Mendeteksi Modifikasi Post-Translasional dan Batasan HMGB1	27
11. Dinamika Translokasi HMGB1 Sewaktu Kematian Sel	31
12. Jalur Pelepasan HMGB1	40
13. Respon Inflamasi Seluler dan Reseptor HMGB1	43
14. Respon Fisiologi dan Patofisiologi HMGB1	49

15. Endotoksemia	49
B. TOLL-LIKE RECEPTORS	51
C. LIDOKAIN	55
D. EKSTRASI DNA	60
E. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	63
BAB III KERANGKA TIORI	70
BAB IV KERANGKA KONSEP	73
BABV METODE PENELITIAN	74
A. RANCANGAN PENELITIAN	74
B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN	74
C. POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN	74
D. KRITERIA INKLUSI	75
E. KRITERIA EKSKLUSI	75
F. KRITERIA <i>DROP OUT</i>	75
G. PENENTUAN JUMLAH SAMPEL	75
H. CARA PENGAMBILAN SAMPEL	76
I. METODE KERJA	76
J. ALUR PENELITIAN	84
K. IJIN PENELITIAN DAN <i>ETHICAL CLEARANCE</i>	85
L. IDENTIFIKASI VARIABEL DAN KLASIFIKASI VARIABEL PENELITIAN	86

1. Identifikasi Variabel	86
2. Klasifikasi Variabel	86
M. DEFINISI OPERASIONAL DAN KRITERIA OBJEKTIF	87
N. PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA	90
BAB VI HASIL PENELITIAN	91
BAB VII PEMBAHASAN	107
BAB VIII SIMPULAN DAN SARAN	115
DAFTAR PUSTAKA	117
DAFTAR LAMPIRAN	125

DAFTAR SINGKATAN

ACTH	: acetylcholine
ADP	: adenosine diphospat
ALU	: adjuvant aluminium
APAP	: acetaminophen
AP1	: activation protein 1
CINC-1	: chemokine induced neutrophil chemoattractant -1
CLP	: cecal ligation and puncture
DAMPs	: damaged associated molecular patterns
DDT	: dithiothreitol
dNTP	: deoksiribonukleotida trifosfat
EDTA	: etilen diamin tetra acetat
HMGB1	: high mobility group box 1
IL	: interleukin
IFN	: interferon
IRF3	: interferon respon factor 3
LPS	: lipopolysaccharide
MD2	: myeloid differentiation protein 2
MGF	: mesenchymal growth factor.
MIP	: makrofag inflammatory protein
mRNA	: masenger Ribonucleic acid
MS	: mass spectrometri
MPO	: mieloperoksidase

MAMPS	: microbe associated molecular patterns
MSU	: monosodium urate
MyD88	: myeloid differentiation primary response protein 88
NF- κ B	: nuclear Factor Kappa β
NLS	: nuclear localization signal
NK	: natural killer
NE	: neutrophil elastase
NETS	: neutrophil extracellular traps
NLR	: nucleotide binding oligomerization domain receptor
NGF	: nerve growth factor
PABA	: para amino benzoic acid
PAMPS	: pathogen associated molecular patterns
PCR	: polymerase chain reaction
PDGF	: platelet derived growth factor
PMNs	: polymorphonuclear granulocytes
RFLP	: restriction fragment length polymorphism
PKR	: ds RNA dependent protein kinase
RAGE	: receptor for advanced glycation end products
ROS	: reactive oxygen species
RT-PCR	: real time polymerase chain reaction
SLE	: systemic lupus erythematosus
siRNA	: small interfering RNA
SDS	: sodium dodecyl sulfate

TIR : toll/interleukin-1 receptor
TLR : toll like receptor
TNF- α : tumor necrotic factor- α
TRIF : TIR domain-containing adapter inducing IFN β

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Fungsi Kompartemen Spesifik HMGB1	11
Tabel 2.2. Aktivitas Biologi HMGB1 Ekstraseluler	44
Tabel 6.1.1. Profil Ekspresi mRNA HMGB1 awal dan setelah cedera Muskuloskeletal	92
Tabel 6.1.2. Profil Ekspresi mRNA HMGB1 kedua kelompok setelah injeksi	93
Tabel 6.2.1. Profil kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok setelah cedera muskuloskeletal	95
Tabel 6.2.2. Profil kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok setelah injeksi	96
Tabel 6.3.1. Profil kadar protein TLR4 pada kedua kelompok setelah cedera muskuloskeletal	98
Tabel 6.3.2. Profil kadar protein TLR 4 pada kedua kelompok setelah injeksi	99
Tabel 6.4. Gambaran ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain	101
Tabel 6.5. Gambaran Ekspresi mRNA HMGB1 dan Kadar Protein TLR 4 pada Kelompok Perlakuan	103
Tabel 6.6. Gambaran Kadar Protein HMGB1 dengan Protein TLR 4 pada masing-masing Kelompok Perlakuan.	104

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur kimia High Mobility Group Box 1 (HMGB1)	8
Gambar 2.2. Mekanisme pelepasan HMGB1 dan isoform HMGB	113
Gambar 2.3. Asetilasi dan Redoks Pelepasan HMGB dari Makrofag Merespon Aktifasi Inflamasi	24
Gambar 2.4. Ikatan HMGB1 dengan TLR4 dan RAGE	31
Gambar 2.5. HMGB1 sebagai mediator proinflamasi	48
Gambar 2.6. Struktur, Lokasi, dan Spesifikasi TLRs Mamalia	53
Gambar 2.7. Struktur Kimia Lidokain	56
Gambar 2.8. Mekanisme kerja anestesi lokal pada inflamasi	59
Gambar 2.9. <i>Polymerase Chain Reaction</i>	67
Gambar 3.1. Kerangka Tiori Penelitian	70
Gambar 3.2. Kerangka Konsep Penelitian	73
Gambar 5.1. Rancangan Alur Penelitian	84
Gambar 6.1. Gambaran Ekspresi mRNA HMGB1 dan Kadar ProteinHMGB1 pada Kelompok Lidokain	102
Gambar 6.2. Gambaran Ekspresi mRNA HMGB1 dan Kadar Protein TLR 4 pada Kelompok Lidokain	104
Gambar 6.3. Gambaran Kadar Protein HMGB1 dan Kadar Protein TLR 4 pada Kelompok Lidokain	105

DAFTAR GRAFIK

Grafik 6.1. Dinamika Mean Ekspresi mRNA HMGB1 Kedua Kelompok	94
Grafik 6.2. Dinamika Mean Protein HMGB1 Kedua Kelompok	97
Grafik 6.3. Dinamika Mean Protein TLR4 Kedua Kelompok	100

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Rekomendasi Persetujuan Etik

Lampiran 2. Lembar Penelitian Akhir

Lampiran 3. Data Dasar Sampel Laboratorium Penelitian

Lampiran 4. Data Dasar Hasil Statistik

Lampiran 5. Uraian Prosedur Pemeriksaan Kadar Protein HMGB1

Lampiran 6. Uraian Prosedur Pemeriksaan Kadar Protein TLR4

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Trauma dan stres pembedahan akan merangsang sistem kekebalan tubuh memproduksi berbagai mediator inflamasi untuk fungsi proteksi/ perlindungan tubuh. Respon inflamasi berlebihan bila dibiarkan berlangsung terus akan mengganggu sistem homeostasis tubuh, menimbulkan *systemic inflammatory response syndrome*, dan gagal multi organ. *High mobility group box 1* (HMGB1) adalah protein nukleus berlimpah yang mengaktivasi sistem kekebalan tubuh bawaan dalam merespon inflamasi yang mengancam tubuh baik karena trauma steril dan infeksi. Mekanisme molekuler mengungkapkan, ikatan HMGB1 dan sinyal *toll-like receptor 4* (TLR4) akan memediasi pelepasan sitokin dan kerusakan jaringan (Andersson U dkk, 2011). Peningkatan kadar sitokin inflamasi seperti interleukin (IL-1, IL-6) dan *tumor necrosis factor α* (TNF- α) akan memediasi respon sistemik dan memperburuk kegagalan organ (Harris HE dkk,2012).

Penelitian klinik menunjukkan, peningkatan kadar HMGB1 sudah mulai terjadi pada akhir prosedur pembedahan besar steril dan terus berlanjut sampai pada hari ke dua. *High Mobility group box 1* (HMGB1) adalah protein nukleus faktor transkripsi, faktor pertumbuhan, dan telah diidentifikasi sebagai mediator sitokin proinflamasi dini pada trauma/ cedera steril dan mediator sitokin proinflamasi lambat pada infeksi dan sepsis berat (Wang HL dkk, 2014).

HMGB1 mengandung komponen kromatin berlimpah di berbagai tempat, berada dalam nukleus sel eukariotik dengan struktur nukleosom stabil serta berperan dalam kompleks nukleoprotein. HMGB1 disekresikan oleh aktivasi sel makrofag dan menyebabkan kematian pada percobaan model tikus sepsis (Anderson U dkk, 2011). HMGB1 tidak hanya dilepas dari aktivasi sel makrofag tetapi juga bertindak sebagai mediator poten aktivasi makrofag. HMGB1 menginduksi *tumor necrosis factor* (TNF- α), interleukin IL-1 α , IL-1 β , IL-6, dan IL-8, dan *macrophage inflammatory proteins* (MIP-1 α dan MIP-1 β) dalam monosit/ makrofag manusia (Anderson U dkk, 2011).

HMGB1 selalu dikaitkan dengan kegagalan fungsi berbagai organ dan menjadi penyebab kematian utama di ruang terapi intensif. Reseptor pertama yang terlibat sebagai partner pengikat HMGB1 adalah ligan *receptor for advanced glycation end products* (RAGE), transmembran, permukaan sel, dan anggota keluarga besar multi ligand immunoglobulin. Sinyal HMGB1 melalui RAGE memperantarai kemotaksis dan merangsang pertumbuhan sel, dan meningkatkan regulasi reseptor permukaan sel, termasuk RAGE dan *toll like receptor* (TLR4). HMGB1 secara fisik berinteraksi dengan RAGE, tetapi interaksi dengan TLR4 diperlukan untuk aktivasi HMGB1 melepas sitokin makrofag (Abusoglu S dkk, 2013).

Pemberian obat-obat anti HMGB1 seperti antibodi anti HMGB1 memberikan perlindungan bermakna pada model binatang percobaan dari gagal organ dan kematian, pemberian trombomodulin rekombinan meningkatkan kelangsungan hidup tikus yang mengalami endotoksemia mematikan. Lidokain, obat anestesi lokal golongan amida sudah lama digunakan dalam praktek klinik untuk mengatasi

nyeri pembedahan maupun nyeri yang timbul dari proses penyakit, dan untuk mengatasi aritmia ventrikel, lidokain juga diketahui memiliki kasiat antiinflamasi (Hollmann dkk, 2000). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian injeksi lidokain dapat menghambat ekspresi HMGB1 makrofag tikus sepsis dan melindungi tikus dari berbagai kegagalan organ. Penggunaan lidokain sistemik diketahui mempunyai efek anti inflamasi dan telah terbukti mampu memodulasi kaskade peradangan dan memberi perlindungan, dengan menghambat ekspresi HMGB1 terhadap cedera iskemia hati, paru, dan jantung pada model tikus sepsis (De Oliveira GS Jr dkk, 2011). Penelitian Wang HL dkk (2011), menunjukkan pemberian lidokain sistemik mempunyai efek proteksi pada tikus sepsis dengan menghambat ekspresi HMGB1 dan aktivasi *nuclear factor kappa-β* (NF-κβ). Penelitian Gallos G dkk, 2004 pemberian lidokain sistemik signifikan meningkatkan kelangsungan hidup tikus yang menderita sepsis peritonitis yang diinduksi dengan *cecal ligation and puncture* (CLP). Abusoglu S dkk, 2013 menyebutkan pemberian lidokain sistemik mempengaruhi kadar peroksida lemak jaringan hati model tikus septik. Liu J dkk, 2014 mengatakan pemberian lidokain 10% melindungi tikus sepsis dari disfungsi renal dan hepar yang diinduksi lipopolisakarida dengan menurunkan regulasi *toll-like receptor* (TLR4). Penelitian Wang HL dkk, 2014 menunjukkan pemberian lidokain sistemik intraoperatif pada wanita yang menjalani histerektomi radikal dalam anestesi umum telah terbukti menghambat pelepasan dan transkripsi mRNA HMGB1 sel mononuklear darah tepi.

Pada akhirnya dapat disimpulkan bahwa pemberian lidokain sistemik mempunyai efek anti inflamasi karena mampu menghambat pelepasan sitokin

inflamasi dan sitokin pro inflamasi, menghambat aktifitas metabolik leukosit, dan pelepasan histamin (Caracas HCPM dkk, 2009; Hollmann MW dkk, 2000). Mekanisme kerja lidokain sistemik sebagai obat anti inflamasi pada cedera steril pada tingkat sitokin pro inflamasi menjadi pintu masuk penelitian ini.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan kasiat pemberian injeksi lidokain intravena sebagai obat anti inflamasi pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal dihubungkan dengan dinamika profil ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan uraian dalam latar belakang masalah tersebut diatas, maka dapat dirumuskan pertanyaan penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimanakah ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 darah mencit BALB/c sebelum mengalami cedera muskuloskeletal ?
2. Apakah ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 darah mencit BALB/c meningkat setelah mengalami cedera muskuloskeletal ?
3. Apakah pemberian injeksi lidokain sistemik menurunkan ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 darah mencit BALB/c setelah mengalami cedera muskuloskeletal ?

C. HIPOTESIS

Hipotesis yang diajukan dalam penelitian ini adalah.

1. Terjadi peningkatan ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 pada mencit BALB/c yang mengalami radang steril akibat cedera muskulo skeletal.
2. Pemberian injeksi lidokain intravena menurunkan ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 mencit BALB/c setelah mengalami cedera muskuloskeletal.

D. TUJUAN PENELITIAN

Tujuan umum

Untuk melihat pengaruh injeksi lidokain intravena sebagai obat anti inflamasi terhadap ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan kadar protein TLR4 pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal.

Tujuan khusus

1. Mengetahui ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 mencit BALB/c sebelum mengalami cedera muskuloskeletal.
2. Mengetahui ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 mencit BALB/c setelah mengalami cedera muskuloskeletal.

3. Mengetahui pengaruh pemberian lidokain sistemik sebagai obat anti inflamasi terhadap ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal.

E. KEGUNAAN PENELITIAN

Kegunaan Ilmiah

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah baru bahwa pemberian injeksi lidokain intravena dapat digunakan sebagai obat anti inflamasi pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal dilihat dari penurunan ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 yang meningkat pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal.

Kegunaan Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan bahwa injeksi lidokain intravena dapat digunakan dalam praktek klinik untuk mengatasi inflamasi yang dialami pasien-pasien yang menderita cedera muskuloskeletal.

BAB II

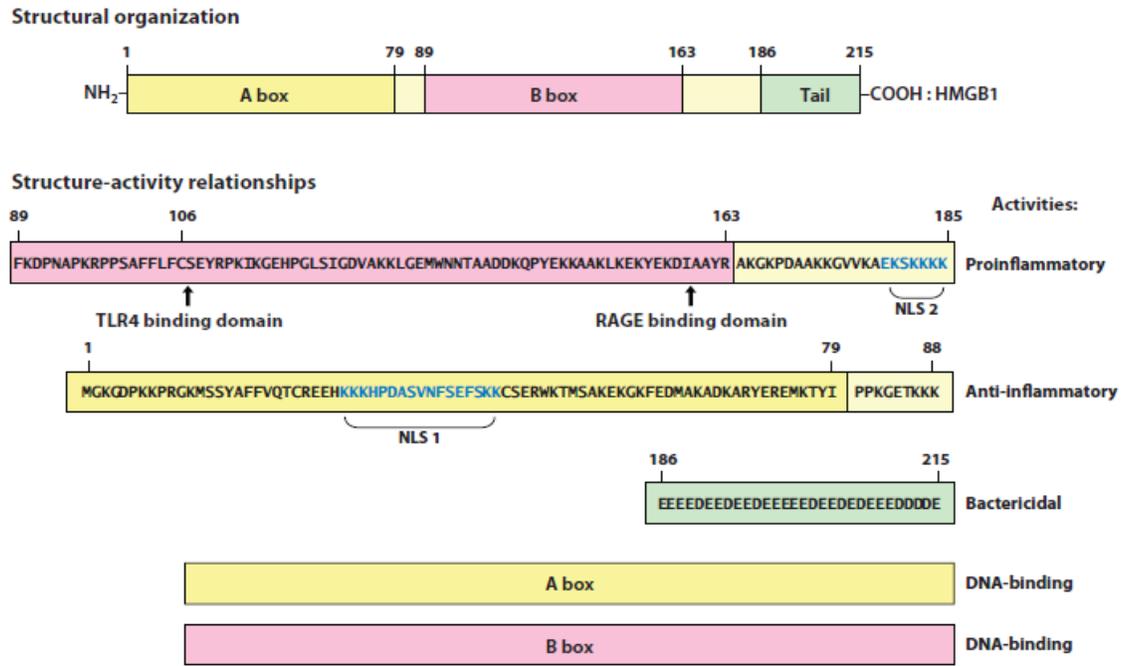
TINJAUAN PUSTAKA

A. *HIGH MOBILITY GROUP BOX 1 (HMGB1)*

HMGB1 dideskripsikan sebagai protein nuklir pengikat DNA, dan fungsi utamanya adalah sebagai kofaktor nukleus dalam regulasi transkripsi. Sebagai kofaktor nukleus, HMGB1 diketahui memiliki peran sebagai molekul pengantar pesan intraseluler, dilepaskan dari sel tertentu ke ekstraseluler untuk berefek pada reseptor sel tertentu. Peran lain dari HMGB1 adalah sitokin proinflamasi yang berkontribusi penting dalam banyak kasus inflamasi steril, infeksi termasuk sepsis. Ikatan HMGB1 dengan reseptor permukaan sel imun, akan mengaktifkan respon intraseluler untuk mengatur fungsi imunitas sel termasuk kemotaksis dan modulasi sistem imun (Yang H dkk,2012).

HMGB1 adalah anggota pertama dari keluarga *high mobility group box* (HMGB). Keluarga HMGB terdiri dari HMGB 1, 2, dan 3. HMGB4 sudah diidentifikasi sebagai anggota baru dari keluarga HMGB, namun identik dengan HMGB3 sehingga selanjutnya dinamai sebagai HMGB3. Struktur semua protein keluarga HMGB sangat identik (> 80 % mirip). Ekspresi HMGB1 terdapat dimana-mana, di hampir semua jenis sel mamalia yang diperiksa, ekspresi HMGB2 terbatas pada jaringan limfoid dan testis di hewan dewasa, sedangkan HMGB3 ekspresinya terbatas pada embrio dan sel punca hematopoetik. Diantara ketiga jenis protein HMGB, HMGB1 adalah protein inti non histon yang paling berlimpah,

dan pada beberapa tingkatan tertentu terdapat juga di sitoplasma, seakan-akan terangkut kembali dan keluar dari inti (Zetterstrom CK dkk, 2006).



Gambar 2.1. Struktur kimia High Mobility Group Box 1 (HMGB1).

(Dikutip dari : Anderson U, Tracey KJ. HMGB1 is Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 139-62)

HMGB1 adalah suatu protein dengan berat molekul 25 kDa dari 215 asam amino. Protein tersebut terbagi menjadi tiga bagian, dua bagian ikatan DNA bermuatan positif yang disebut kotak A dan B, serta satu bagian ekor yang bersifat asam bermuatan negatif dibentuk oleh 30 asam glutamat dan aspartat, dan sekitar 20 % sisanya adalah lisin. Struktur kotak A dan B adalah heliks, sebagian ditutupi ekor yang terlipat diatas protein. Ada dua sinyal pembawa nukleus dibagian proksimal kotak A dan kotak B dan dapat berikatan dengan nukleus *exportin CRM1*. Pada pemotongan kotak A dan B HMGB1, diperlihatkan bahwa aktivitas

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

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

HMGB1 ekstraseluler telah menjadi pusat perhatian terkait perannya yang terlibat dalam berbagai respon imun, berperan sebagai alaram sinyal prototipik karena HMGB1 memiliki fungsi spesifik. Penelitian fungsi struktural HMGB1, mengungkapkan bahwa aktivitas sitokin mengekspresikan aktivitas sitokin, sedangkan anti sitokin sendiri berperan sebagai antagonis HMGB1 spesifik, tetapi

mekanismenya masih tetap belum dimengerti. HMGB1 mengandung 3 residu sistein pada posisi 23, 45 di kotak A dan posisi 106 di kotak B, sensitif pada modifikasi reaksi redoks. Penemuan terbaru menunjukkan bahwa redoks dan modifikasi asetil secara langsung mengontrol sitokin dan aktifitas kemotaksis HMGB1 (Anderson U dkk, 2011).

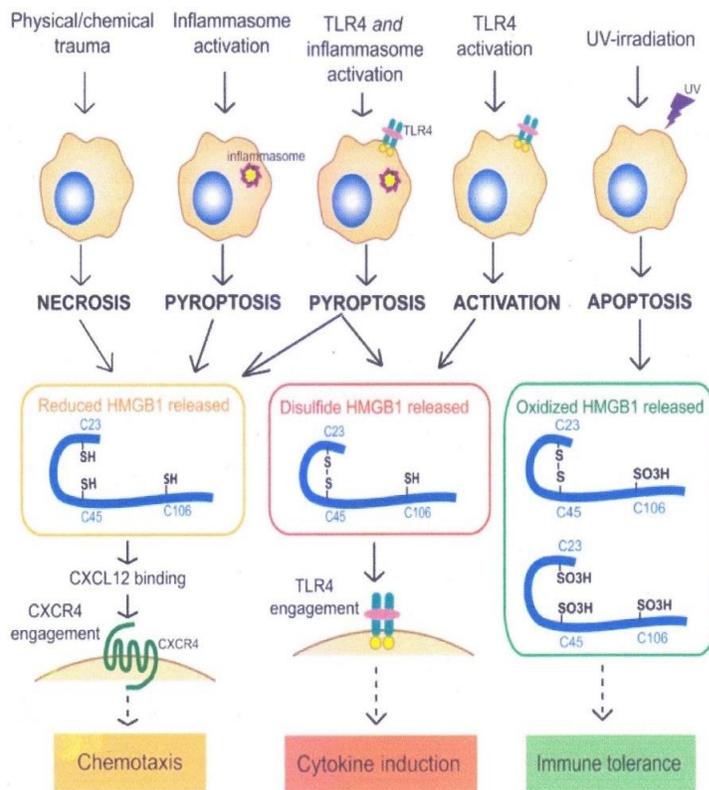
Tabel 2.1. Fungsi kompartemen spesifik HMGB1

(Dikutip dari Yang H dkk. The many faces of HMGB1 molecular structure-functionale activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leuco Biol* 2013.)

<p style="text-align: center;">Nukleus</p>	<p>Pengikat DNA: regulasi transkripsi (14) Stabilisasi kromatin (15) Kumpulan Kromosom (16) Replikasi Sel (14) Perbaikan DNA (17)</p>
<p style="text-align: center;">Intraseluler</p>	<p>PKR/aktivasi peradangan (13) Autofagi: C106 dibutuhkan untuk induksi autofagi [18] Sistein-sistein, ikatan disulfida dibutuhkan untuk induksi autofagi (18) Sebagai jalan pelepasan (1,5) Formasi vesikel (19)</p>
<p style="text-align: center;">Ekstraseluler</p>	<p>Ikatan membran memproduksi neurit (20) Aktivasi trombosit (21) Ekstraseluler: proangiogenik (22) Antibakterial (23) Penurunan seluruh sistein : inflamasi Menyerupai kemokin : kemotaksis (24,25) Semua sistein yang teroksidasi: non inflamasi (24,26) Sistein dan ikatan disulfida: inflamasi, menyerupai sitokin, menginduksi sitokin (3,26) Hiperasetilasi lisin: inflamasi, induksi sitokin (13)</p>

1. Aktivitas Sitokin HMGB1

HMGB1 adalah mediator sitokin patogenesis penyakit inflamasi. Sebagai bagian dari respon imun yang aktif, HMGB1 dapat disekresikan secara aktif dari berbagai jenis sel-sel termasuk makrofag, sejumlah sel-sel *natural killer* (NK), sel-sel dendrit (DCs), sel-sel endotelial, dan trombosit. HMGB1 dapat dilepaskan secara pasif dari sel-sel nekrotik, trauma, dan cedera secara signifikan ke ekstraseluler. Meskipun sel apoptosis dapat melepaskan jumlah HMGB1 lebih sedikit dibanding sel nekrotik, makrofag yang diselubungi sel apoptosis dapat menginduksi pelepasan HMGB1 secara aktif. Piroptosis, sel nekrotik yang kematiannya diprogramkan dan di induksi oleh kaspase-1, telah di demonstrasikan sebagai alur penting untuk pelepasan HMGB1 secara aktif yang dikontrol oleh *dsRNA-dependent protein kinase* (PKR) dan inflamosom. Aktivasi Inflamosom pengatur kaspase-1, memediasi piroptosis dan melepaskan IL-1 β , EL-18, dan HMGB1, (Magna M dkk, 2014).



Gambar 2.2. Mekanisme pelepasan HMGB1 dan isoform HMGB1.

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

Seperti yang diilustrasikan gambar diatas, berbagai macam mekanisme pelepasan (nekrosis, pyroptosis, aktivasi makrofag, dan apoptosis) dapat menyebabkan pelepasan HMGB1 bentuk redoks berbeda. Sel nekrosis dan piroptosis melepaskan bentuk thiol semua atau tereduksi sepenuhnya, bentuk ini dapat mengikat kemokin CXCL12 dan memberi isyarat melalui reseptor CXCR4 untuk merangsang kemotaksis. Kombinasi piroptosis dengan stimulasi ligan TLR4, menyebabkan pelepasan HMGB1 tereduksi dan HMGB1 ikatan disulfida C23 dan

C45 dan C106 dalam bentuk thiol. Bentuk HMGB1 ini merangsang produksi sitokin melalui sinyal TLR4. Aktivasi makrofag juga melepaskan sitokin HMGB1 bersamaan dengan aktivasi TLR4. Sel apoptosis melepaskan HMGB1 teroksidasi penuh, dengan sistein bentuk sulfonat, tidak dapat menstimulasi sitokin atau memicu kemotaksis; ekspresi sel-sel apoptosis bentuk HMGB1 teroksidasi dapat memicu toleransi (Magma M dkk, 2014).

Pemberian HMGB1 pada hewan normal akan menghasilkan respon inflamasi sistemik, termasuk demam, penurunan berat badan, anoreksia, cidera paru-paru akut, disfungsi sawar epitel, artritis, dan kematian. Terapi HMGB1 antagonis atas dasar antibodi, HMGB1 antagonis spesifik lainnya, atau obat-obat farmakologi, telah terbukti dalam skala besar sukses dan berhasil dalam mengobati model penyakit inflamasi preklinik, mengurangi berat penyakit dan mengurangi efek kematian.

2. HMGB1 adalah mediator penting penyebab kematian pada radang steril dan infeksi

Respon inflamasi bisa juga disebabkan oleh kekacauan luka steril atau infeksi. Selama infeksi, imunitas bawaan diaktivasi oleh produk molekular asing seperti *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), *lipopolysaccharide* (LPS), *double-stranded* (dsRNA), dan CpG-DNA. Selama trauma steril atau iskemia, sel yang sama teraktivasi oleh pemaparan *damage associated molecular patterns* (DAMPs) endogenus, yang termasuk molekul protein yang dipanaskan,

asam urat, aneksin, dan IL-1 α . DAMPs dan PAMPs menginduksi kaskade yang sama pada inflamasi, kerusakan jaringan, kegagalan berbagai organ. HMGB1 dilepaskan oleh aktivasi sel imun dan luka atau sel nekrotik, berperan penting pada respon host pada kedua tipe ancaman dengan demikian menjadi mediator kritis di akhir rangkaian morbiditas dan mortalitas selama infeksi dan luka steril (Yang H dkk, 2013; Magna M dkk, 2014).

HMGB1 adalah penjaga universal untuk mediasi asam nukleat pada respon imun bawaan HMGB1 dan anggota keluarga dari HMGB 2, dan 3 menjadi sensor universal bagi asam amino sitosolik. Tian dkk, 2007; Ivanov dkk, 2007 secara simultan menemukan kesimpulan yang sama bahwa HMGB1 terlibat dalam kompleks yang mengandung DNA dalam merespon imun melalui TLR4. Yanai H dkk, 2009 mengkonfirmasi bahwa HMGB1 berikatan dengan semua asam nukleat imunogenik yang diperiksa dan memediasi respon imun melalui stimulasi transkripsi tipe 1 IFN, IL-6, dan RANTES dari sel-sel imun atau fibroblas embrio tikus. Tentu saja, kekurangan ekspresi HMGB1 banyak mengurangi respon imun saat di stimulasi dengan DNA/RNA mirip virus yang dibandingkan oleh kontrol WT. Penghentian ketiga protein HMGB ini akan menghambat respon pada stimulasi asam nukleat viral dibandingkan dengan penghentian salah satu HMGBI, menunjukkan bahwa protein HMGB1 berbagi fungsional yang sama. Protein HMGB1 berperan penting dalam pengaturan sentinel universal dalam aktivasi asam nukleat merespon kekebalan bawaan tetapi masih dengan mekanisme yang belum terpecahkan. Reseptor memediasi aktivitas keluarga HMGB1 dari seluler, HMGB1 sekali terlepas ke lingkungan ekstraselular HMGB1 akan berikatan

dengan reseptor sel permukaan untuk menimbulkan respon inflamasi. Reseptor yang memediasi signal HMGB1 yaitu *Reseptor for Advanced Glycation End Product* (RAGE), TLR2, TLR4, dan TLR9, antigen makrofag-1, syndecan-3, CD24-Siglec-10, CSCR4, dan sel T Ig mucin-3 (5, 24, 25, 32, 41, 43, 45, 46); TLR4 adalah reseptor primer yang dibutuhkan untuk promosi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin, dan kerusakan jaringan. Terpisah dari interaksi reseptor secara langsung, HMGB1 mungkin membentuk heterokompleks dengan molekul lain, seperti IL-1, CCL12, DNA, RNA, histon, atau LPS, yang menghasilkan respon sinergistik dibandingkan semua produk hasil komponen individual. Sinyal kompleks ini dari reseptor resiprok untuk molekul pasangan HMGB1 sebagai modus aksi (1, 25, 32), HMGB1 berperan pada formasi heterokompleksnya sendiri, menginisiasi respon kekebalan bawaan, termasuk aktivitas kemotaksis dan pelepasan sitokin proinflamasi, menyebabkan demam, disfungsi sawar epitel, dan inflamasi kronis dan akut (Anderson U dkk, 2011; Yang H dkk, 2013).

3. Peran MD-2 pada HMGB1-TLR4

Aktivitas TLR4 (*toll-like receptor 4*) dan interaksinya dengan ligan bergantung pada kolaborasi molekular dengan protein adaptor ekstraselular *myeloid differentiation protein 2* (MD-2). Penelitian Biacore dkk, 2009 dengan menggunakan biosensor resonansi plasmon permukaan, memperlihatkan bahwa HMGB1 seperti halnya LPS, mengikat MD2 dengan afinitas tinggi (K_d nyata-8 nM), tidak hanya berikatan dengan TLR4 sendiri. Penginduksi HMGB1 non sitokin,

dihasilkan dengan pembentukan mercury thiolat C106, oleh substitusi sistein, atau oleh modifikasi redoks, tidak mengijinkan interaksi pengikatan HMGB1 dengan MD-2, produksi TNF, atau translokasi NF-kB nuklear di makrofag. Hasilnya mendemonstrasikan bahwa HMGB1 seperti LPS, perlu berikatan dengan komponen MD-2 dari kompleks TLR4/MD-2 untuk menginduksi sitokin, sehingga tingkat redoks sistein HMGB1 yang mengontrol interaksi ikatan ini (Harris HE dkk, 2011)

Percobaan yang dilakukan untuk menghentikan MD2 dengan transfeksi siRNA spesifik yang menargetkan MD-2 sebagai sel mirip makrofag RAW 264,7 atau sel monositik manusia THP-1. Pengurangan pelepasan TNP secara signifikan dan aktivasi NF-kB dengan stimulasi HMGB 1 diobservasi dengan membandingkan dengan sel transfeksi dengan kontrol siRNA, mendukung bahwa MD2 membutuhkan, untuk mode ini, sinyal HMGB1 dalam makrofag/ monosit. Eksperimen peningkatan fungsi mengkonfirmasi bahwa MD-2 cukup untuk mengembalikan induksi HMGB 1 melepas IL-8 ginjal embrionik manusia 293 sel mengekspresi TLR4 berlebihan. Hasil ini mengungkapkan bahwa MD2 penting untuk respon induksi TLR4 oleh HMGB1 selain itu, semua sistein dalam HMGB1 penting untuk interaksi penempatan MD2.

4. Reaksi Reduksi Oksidasi dan Aktivitas Sitokin HMGB1

HMGB1 mungkin menjalani modifikasi pasca-translasi secara ekstensif, termasuk oksidasi sistein terminal yang dapat reversibel, asetilasi, metilasi, ADP ribosilasi, glikosilasi, dan fosforilasi. Beberapa modifikasi ini telah didemonstrasikan

mempengaruhi pengikatan DNA dan stabilitasnya, lokalisasi selular dan regulasi transkripsi yang dimediasi oleh HMGB1. Penelitian sebelumnya berpusat pada tingkat redoks bahwa ketiga residu sistein tetap dalam regulasi HMGB1 dan kemampuan reseptor pengikatnya dan hasil biologis selanjutnya. Seperti yang di deskripsikan diatas, mekanisme redoks pasca translasi ini akan mengontrol aktivitas proinflamasi HMGB1 selama patogenesis sepsis dan HMGB1 memediasi penyakit inflamasi lainnya (Magna M dkk, 2014).

Aktivitas sitokin HMGB1 membutuhkan C23 dan C45, untuk membentuk ikatan disulfida, dan C106 bentuk reduksi (ikatan disulfida HMGB1). Reduksi thiol C106 dibutuhkan untuk aktivitas sitokin HMGB1. Sitokin yang menginduksi aktivitas HMGB1, bergantung pada tingkatan redoks C106, yang berada didalam domain pengikat DNA kotak B pada HMGB1. Posisi C106 mengekspresikan grup thiol, bersifat wajib untuk pengikatan HMGB1 pada TLR4/ MD2. Substitusi C106 HMGB1 menentukan interaksi pengikatannya dengan TLR4/ MD2 dan stimulasi pelepasan sitokin berikutnya dari makrofag. Selanjutnya, peptida 20-mer sintetis yang mengandung C106 yang memediasi pelepasan TNF di makrofag, dimana penggantian C106 dengan residu serine meniadakan kapasitas ini. Modifikasi lain dari C106 HMGB1 oleh pemaparan dengan merkuri membentuk grup merkuri thiolate atau pusat oksidasi menjadi sulfonat oleh H_2O_2 mengeliminasi aktifitas stimulasi sitokin pada HMGB1. Hasil penelitian ini tidak memungkiri bahwa C106 dan tingkatan reduksinya dibutuhkan untuk sinyal HMGB1 dengan stimulasi pelepasan sitokin dan inflamasi TLR4 (Harris HE dkk, 2012).

Ikatan disulfida antara C23 dan C45 di kotak A juga dibutuhkan untuk aktivasi sitokin HMGB1. Hubungan fungsi struktural C23 dan C45 dalam kemampuan untuk memediasi induksi sitokin belum diketahui. Analisis LC-MS/MS mengungkapkan bahwa induksi sitokin oleh HMGB1 membutuhkan kehadiran ikatan disulfida diantara C23 dan C45, bersamaan dengan C106 yang terekspresi didalam bentuk thiol-nya. Reduksi ikatan disulfida pada C23-C45 oleh pemaparan oleh agen reduksi DTT atau oksidasi menggunakan H₂O₂ untuk menghasilkan kelompok asam sulfonat secara lengkap menentukan aktivitas sitokin HMGB1. Substitusi C23 dan C45 dengan serin atau alanin tentu saja mereduksi aktifitas sitokin itu sendiri. Laporan sebelumnya menitik beratkan pada keadaan bahwa C23 dan C46 telah membentuk ikatan disulfida yang meningkatkan stabilitas molekul HMGB1 rantai panjang. Hasil penelitian ini mendemonstrasikan dengan jelas mekanisme redoks spesifik pasca-translasi untuk mengontrol aktivitas sitokin HMGB1 sehingga tingkatan redoks pada ketiga sistein HMGB1 sangat penting dalam peran sitokin.

Dalam penelitian in vivo redoks penting untuk mendukung aktivitas sitokin HMGB1 yang tepat. Relevansi fungsi in vivo HMGB1 yang termodifikasi secara redoks telah di konfirmasi dalam model eksperimental pada hewan. Komponen inflamasi APAP yang memediasi hepatotoksisitas adalah HMGB1 yang memediasi proses yang telah digunakan dalam penelitian ini. Perlakuan dengan antagonis yang ditandai dengan HMGB1 spesifik memperbaiki hepatotoksisitas yang diinduksi APAP. Pemaparan APAP toksik utamanya menghasilkan kematian sel hepatosit secara nekrotik dalam model murin bersamaan dengan pengeluaran nuklir HMGB1 secara sistemik dan masif, yang pada masa awal dari penyakit,

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

Hasil penelitian ini juga menunjukkan hubungan fungsional penting antar metabolisme, model kematian sel, dan biologi HMGB1. Tikus dipuasakan selama 24 jam sebelum overdosis APAP tidak dapat menghasilkan kematian sel hepatosit secara apoptosis selama fase inflamasi dan perbaikan jaringan, karena penghabisan ATP basal diperlukan untuk apoptosis yang membutuhkan energi menjalankan aktivasi kaspase-3. Letalitas dan keparahan penyakit adalah lebih besar pada tikus yang dipuasakan dibandingkan dengan binatang yang diberi makan dengan baik setelah overdosis APAP. Kaspase-3 yang dijalankan oleh apoptosis pada tikus yang diberi makan menghasilkan oksidasi HMGB1 terminal dengan kapasitas inflamasi yang rendah atau tidak ada, sebuah proses yang tidak terjadi pada tikus yang dipuasakan selama proses nekrotik.

5. HMGB1 thiol adalah mediator kemotaksis poten

Kebutuhan redoks diperlukan HMGB1 untuk menginduksi aktivitas kemotaksis poten untuk merekrut neutrofil dan monosit menuju bagian yang inflamasi dibandingkan yang dibutuhkan untuk aktivitas induksi oleh sitokin. Ketiga sistein harus sepenuhnya tereduksi supaya HMGB1 dapat melakukan kemotaksis. Bentuk molekul HMGB1 ini memungkinkan terjadinya formasi sebuah hetero kompleks dengan kemokin CXCL12 (*stromal cell-derived factor 1*), yang akan memberi sinyal melalui kompleks reseptor CXCR4 dalam mode sinergistik.

Oksidasi terminal salah satu sistein oleh *reactive oxygen species* (ROS) akan membatalkan seluruh aktivitas kemotaksis. Sistein sendiri tidak dibutuhkan untuk chemotaxis, karena sistein dapat disubstitusi dengan serin yang diawetkan atau bahkan memperbesar performa sehubungan dengan rekrutmen leukosit. Hal ini sangat bertentangan dengan hal yang dibutuhkan untuk induksi sitokin. Kondisi vital bagi HMGB1 untuk memperbesar kemotaksis adalah tidak ada sistein yang dioksidasi untuk suatu alasan yang perlu diinvestigasi lebih lanjut

Keadaan HMGB1 dan aktivitas sitokin adalah proses reversibel. HMGB1 yang terpapar DTT mengekspresikan semua thiol sistein tidak menstimulasi produksi TNF di medium makrofag. Tetapi, oksidasi ringan dengan konsentrasi rendah H₂O₂ HMGB1 yang terpapar DTT mengembalikan aktifitas induksi TNF dengan menginduksi jembatan disulfide antara C23 dan C45 di domain kotak A (bentuk ikatan disulfida), menunjukkan bahwa aktifitas sitokin dari HMGB1 adalah reversibel. Karakteristik HMGB1 ini memiliki dampak klinis, yaitu ada perubahan keadaan redoks dari HMGB1 selama trauma jaringan, contohnya APAP yang

terinduksi pada trauma hati. Setelah diberi APAP, pengeluaran awal isoform HMGB1 adalah semua bentuk thiol kemotaksis, selanjutnya bentuk utama serum HMGB 1 selama onset inflamasi hati yang parah adalah bentuk inflamasi ikatan disulfida. Seiring dengan berkurangnya inflamasi hati, bentuk utama dari HMGB1 yang tersirkulasi mengandung C106 yang terminalnya teroksidasi. Maka, bentuk inflamasi serum HMGB1 berhubungan dengan inflamasi hepatic selama toksisitas hepatis yang diinduksi oleh *acetaminophen* (APAP)

6. Dinamika HMGB1 Redoks Selama Kematian Sel Dan Cidera

Bentuk HMGB1 redoks intraselular dan ekstraselular dalam kematian sel dan trauma adalah dinamis. Penelitian-penelitian sebelumnya memperlihatkan bahwa HMGB1 intraselular sel istirahat, semua bentuknya adalah bentuk sistein tereduksi, sedangkan HMGB1 yang disekresi semua mengandung thiol dan ikatan disulfida. Penelitian juga menunjukkan bahwa ikatan disulfida HMGB1 dapat ditemukan pada serum tikus yang mengalami intoksikasi hepatic yang diinduksi dengan APAP, dan hal ini berkorelasi dengan tingkat keparahan penyakit. Kadar ROS intraseluler yang ditinggi karena H_2O_2 atau SOD1 (Cu, Zn SOD), *small interfering RNA* (siRNA) mempromosikan pengeluaran HMGB1 dalam beberapa tipe sel, termasuk makrofag, menunjukkan bahwa senyawa oksigen reaktif (ROS) memainkan peranan penting di dalam menginduksi pengeluaran HMGB1 atau sekresi aktif. Antioksidan alami atau sintetis dapat menghambat kematian sel dan respon inflamasi, dan telah dibuktikan dapat menghambat pengeluaran HMGB1

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

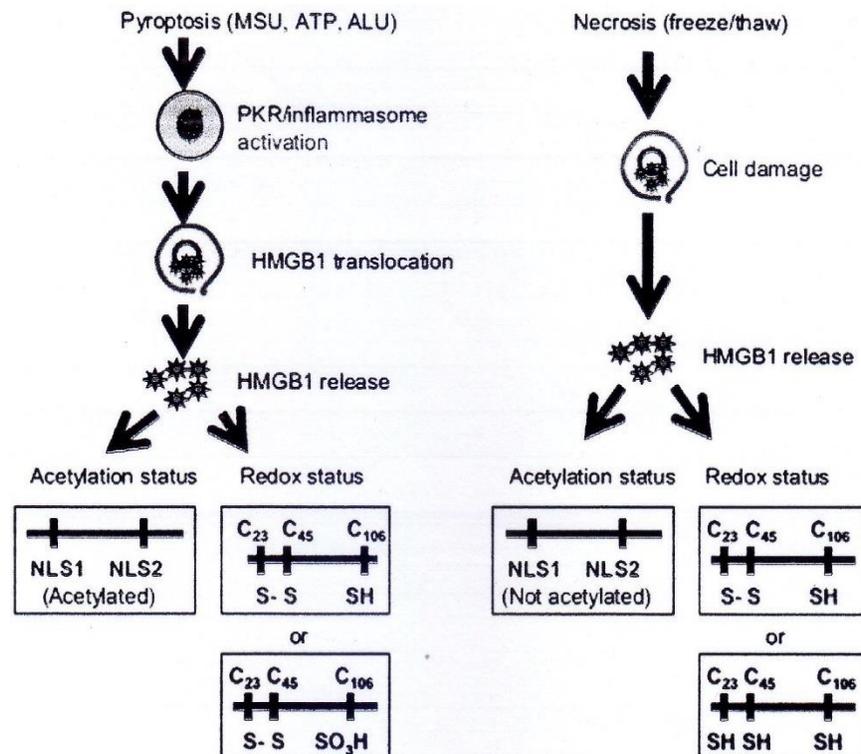
7. Asetilasi dan Aktivitas Sitokin HMGB1 Hiperasetilasi

Asetilasi kunci residu lisin dalam dua *nuclear localization signal* (NLS) dari HMGB1 menentukan mekanisme regulasi perubahan bolak-balik dari HMGB1 intrasel, menuju pengaktifan lepasnya HMGB1 dari aktivasi monosit, makrofag, dan mungkin dari jenis sel lainnya. Hiperasetilasi NLS di lisin akan mengubah keseimbangan HMGB1 dari posisi nuklear dominan menuju akumulasi sitoplasma dengan mencegah masuk kembalinya HMGB1 ke nuklir karena perpindahan terus menerus antara nukleus dan sitosol.

Kadar serum asetat HMGB1 dalam induksi hepatotoksik *acetaminophen* pada pasien terbukti menjadi biomarker yang sensitif dan spesifik untuk memperkirakan hasil klinis. HMGB1 yang dilepas pada *in vivo* memberikan hasil iskemia/ reperfusi hati pada tikus yang menunjukkan terjadinya hiperasetilasi, dan pada *in vitro*, HMGB1 yang dilepas mengakibatkan hepatosit mengalami stress oksidatif. Efek ini diindikasikan sebagai penyebab kegagalan aktivitas deasetilasi histon untuk menghilangkan kelompok asetil dari residu lisin secara adekuat.

Ketika menentukan dampak modifikasi pasca-translasi hubungan struktur fungsional HMGB1, penting untuk dicatat bahwa asetilasi residu lisin dapat mengubah potensial elektrostatik dan mempengaruhi pKa dari kelompok thiol

sistein. Namun, tidak ada kelompok amino lisin yang hadir dalam 8 A dari kelompok thiol di dalam struktur 3 dimensi HMGB1, oleh karena itu tidak mungkin HMGB1 menjadi penyebab dampak dari peradangan.



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

Asetilasi dan keadaan redoks dari HMGB1 yang dikeluarkan oleh makrofag dalam merespons aktivasi inflammasom (MSU, ATP, ALU) atau dengan nekrosis (*freeze/thaw*). Piroptosis, diinduksi oleh MSU, ATP, atau ALU, menyebabkan PKR/

aktivasi inflammasom dan translokasi HMGB1 dari nukleus menuju sitosol/ pengeluaran ekstraseluler. Analisis MS memperlihatkan bahwa HMGB 1 yang dilepaskan adalah ter-asetilasi pada bagian NLS1 dan -2, sedangkan HMGB1 yang keluar karena diinduksi oleh nekrosis (melalui *freeze/thaw* berulang) bentuknya ter-asetilasi. Karakteristik MS bentuk redoks ke tiga sistein HMGB1 menunjukkan bahwa HMGB1 yang diinduksi piroptosis dan diinduksi nekrosis mengandung bentuk HMGB1 yang dapat menstimulasi sitokin ikatan disulfida dan tereduksi oleh nekrosis (Magna M dkk, 2014).

8. Piroptosis dan Hiperasetilase

Penelitian sebelumnya oleh Lu B dkk, 2012 menunjukkan bahwa hiperasetilasi HMGB1 adalah sebagai biomarker untuk pyroptosis. Pada percobaan tikus, makrofag terangsang oleh prototipe pegan bahaya seperti ATP, MSU, atau ALU. HMGB1 lepas di ekstrasel melalui aktivasi PKR dan sistem inflamasi. Analisis MS membuktikan bahwa HMGB1 yang lepas mengalami asetilasi tinggi pada NLS1 dan NLS2. Sebagai perbandingan, HMG1 yang dilepas dari makrofag melalui akibat nekrosis oleh karena pembekuan maupun pencairan tidak mengalami hiperasetilasi dalam ragam NLS. Reaksi redoks pada ketiga sistein HMGB1 menunjukkan bahwa HMGB1 yang dilepas oleh piroptosis mungkin aktif mengandung ikatan disulfida dan bentuk oksidasi terminal, sedangkan HMGB1 yang dilepas selama nekrosis dapat mengandung MD2/ ikatan TLR4 atau semua bentuk thiol.

Dengan demikian, dalam beberapa penelitian mengindikasikan pelepasan HMGB1 selama proses inflamasi adalah dalam bentuk asetilasi. Inflamasom adalah multi protein kompleks yang mempromosikan sekresi sitokin *pro-inflammatory* IL-1 dan L-18. Data kami menunjukkan, HMGB1 digunakan sebagai identifikasi dan kuantifikasi piroptosis, sebuah proses fisiologis yang hingga sekarang, mengganggu *biomarker*. Dalam beberapa penelitian terakhir nampak bahwa pelepasan HMGB1 pada makrofag selama piroptosis tidak terlalu memberikan efek besar, sedangkan macam agonis dari permukaan sel TLR mengalami perubahan karena rilisnya HMGB1 dari bentuk kemotaksis (semua sistein thiol) ke bentuk agonis TLR4 oleh makrofag

9. Modifikasi Redoks HMGB1 dan Autofagi

Autofagi adalah mediasi lisosom, yaitu proses memakan diri sendiri yang penting sebagai pertahanan sel selama stress. HMGB1 penting pada regulasi autofagi. Rangsangan yang menambah ROS juga mampu meningkatkan translokasi HMGB1 dari nukleus ke sitosol dan dengan demikian, menambah perubahan autofagia terus menerus. Modifikasi sistein HMGB1 mengubah-ubah kegiatan autofagia. Mutasi C106 pada HMGB1, tapi tidak pada C23 dan C45, mendukung translokasi HMGB1 ke sitosol dan autofagi. Terapi dengan sistein yang semuanya tereduksi namun tidak teroksidasi, HMGB1 mampu meningkatkan autofagi pada sel kanker. Terlebih, jembatan disulfida antara C23 dan C45 dibutuhkan untuk berikatan dengan Beclin 1 untuk menopang proses

autofagia. Dengan demikian, HMGB1 yang diatur oleh modifikasi redoks pasca translasi, memainkan peranan penting dalam autofagi yang mendukung pertahanan sel dalam respon sel terhadap stress/ tekanan.

10. Metode Mendeteksi Modifikasi Post-Translasi dan Batasan HMGB1

Dengan diketahuinya analisis protein berdasar tandem *mass spectrometry* (MS), disertai dengan teknik molekular dan pembacaan imunologis, telah membantu menjelaskan dasar hubungan struktur-fungsi yang dihubungkan dengan modifikasi redoks dari residu sisteine atau modifikasi asetilasi pada lisin dari HMGB1. Dengan melihat redoks, determinasi pasti dari spesies kimia yang dipublikasikan telah dibuat dapat dilakukan melalui belahan enzimatis dari HMGB1 setelah diferensiasi alkalisasi dari gugus thiol (diikuti dengan reduksi dan lalu ikatan disulfida yang ter-alkalisasi).

Campuran peptida ini lalu dipecah-pecah oleh nano-LC dan dianalisis dengan MS/MS. Pendekatan ini tidak hanya memungkinkan determinasi dari modifikasi post-translasi tertentu tetapi juga dapat menunjuk secara tepat asam amino yang dimodifikasi. Tetapi, meski dapat secara akurat dan sensitifitas dalam menentukan modifikasi post-translasi pada peptida melalui *mass spectrometry*, terdapat beberapa batasan.

Pertama, metode yang dipublikasikan adalah *low-throughput* dan tidak dapat digunakan pada *screening* di *high-throughput*. Kedua, hingga saat ini, tidak ada antibodi spesifik untuk mengidentifikasi isoform fungsional yang berbeda

dari HMGB1, dan analisis MS/MS-based sekarang tetap menjadi pilihan utama untuk identifikasi akurat. Sampai pengembangan dari *assay ELISA-based*, yang menawarkan *accessible* lebih dan opsi *throughput* yang lebih tinggi, akan ada *trade-off* antara kecepatan analisa dan presisi indentifikasi dari *analyte*. Ketiga, ionisasi diferensial dari peptida juga menimbulkan tantangan bagi kualifikasi absolut dan relatif bagi peptida yang berbeda (dengan modifikasi redoks atau asetil yang jelas) lintas set sampel dan mengenai HMGB1.

Hal ini menunjukkan daerah yang tidak terpenuhi dan salah satu yang tidak tidak dimunculkan oleh laporan yang dipublikasikan akhir-akhir ini. Tetapi, kemajuan pada penanda isobarik untuk teknologi kuantifikasi absolut dan relatif dan penggunaan dari standar peptida yang telah diberi banyak label akan mengijinkan lebih lanjut analisis serupa pada studi selanjutnya. Karena sekarang karakterisasi kimiawi yang tepat dari perubahan yang bergantung pada redoks di HMGB1 atau modifikasi asetil dapat dihubungkan dengan fungsi biologis, pusat dari riset harus berpusat pada metode untuk kuantifikasi absolut. Saat ini, hanya beberapa laporan yang telah dipublikasikan yang menjelaskan tentang kuantifikasi akurat dari isoform HMGB1 yang telah dimodifikasi secara post-translational oleh MS. Menjadi penting untuk bekerja lebih pada riset translasional sehingga penemuan dasar dapat menghasilkan akibat klinis, sebagai contoh potensi isoform fungsional HMGB1 sebagai biomarker spesifik penyakit.

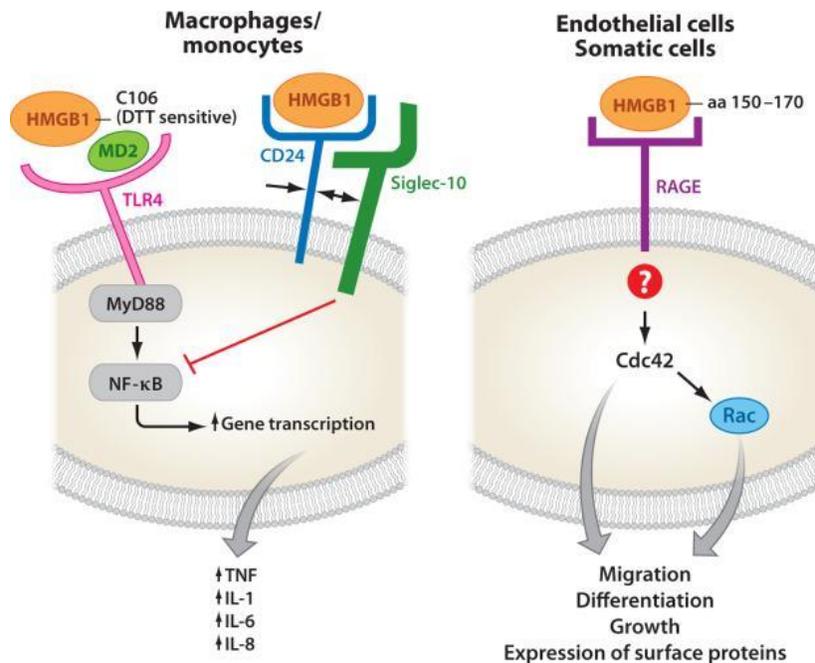
HMGB1 adalah protein murni yang diekspresikan oleh sel-sel imun bawaan dalam merespon produk patogen dan sel steril yang mati, menempati peran sentral dalam patogenesis peradangan dalam sistim kekebalan. Kerusakan sel inang akan

mengaktifkan respon pertahanan tubuh dasar (imunitas bawaan) untuk bisa membedakan respon yang dihasilkan oleh mikroba dan patogen (Kang H dkk, 2011).

Kemajuan biologi molekuler mengungkapkan bahwa sitokin spesifik adalah mediator patogen penting dan secara selektif melemahkan tanda-tanda klinis dan gejala inflamasi dari penyakit. Inflamasi dapat digambarkan sebagai reaksi tubuh melawan kejadian-kejadian yang berbahaya seperti cedera jaringan atau adanya invasi patogen. Pelepasan mediator vasoaktif dari sel mast (histamin, leukotrin), trombosit, dan komponen plasma (bradikinin) menyebabkan vasodilatasi dan peningkatan permeabilitas pembuluh darah akan mengarah pada tanda-tanda peradangan klasik kemerahan (rubor) dan panas (kalor). Edema akan menyebabkan pembengkakan (tumor), dan interaksi mediator inflamasi dengan sistem sensoris menimbulkan nyeri (dolor). Inflamasi lokal bila berlanjut terus akan menimbulkan respon sistemik yang disebut sebagai reaksi fase akut di ikuti peningkatan protein fase akut (protein C reaktif, faktor komplemen C3, fibrinogen, dan albumin serum), dan aktivasi sistem mediator (kinin, komplemen, lipid, dan sitokin). Pelepasan sitokin lokal interleukin (IL-1, IL-6, dan TNF) memicu respon inflamasi dan kemotaksis netrofil ditempat cedera (Hollmann MW dkk, 2000; Cassuto J dkk, 2006). *Tumor necrosis factor* (TNF), IL-1, dan IL-6 telah menjadi andalan pengobatan berbasis sitokin inflamasi di klinik. Sitokin inflamasi ini telah diidentifikasi sebagai target terapi dalam patofisiologi endotoksemia, demam, sepsis, dan penyakit autoimun (Harris HE dkk, 2012).

Meluasnya penggunaan antagonis penetralisir HMGB1 pada model penyakit praklinis secara langsung terlibat mengatur molekul imunitas bawaan dan adaptif pada saat sehat dan sewaktu menderita artritis, radang usus, iskemiasteril, luka trauma, kanker, dan infeksi. HMGB1 adalah protein struktural yang tinggal dalam nukleus, berfungsi untuk menstabilkan struktur DNA dan memodulasi aktivitas transkripsi. Fitur struktural utama HMGB1 adalah dua domain ikatan DNA, daerah homolog terdiri dari 80 asam amino panjang yang diistilahkan sebagai protein kotak A dan B, dan domain C terminal terdiri dari asam aspartat dan glutamat. Penemuan eksploitasi terapi sitokin yang merusak setelah infeksi dan cedera mengungkapkan bahwa HMGB1 secara aktif disekresi sitokin, diproduksi oleh sel makrofag dan sel inflamasi lain dalam menghadapi invasi (Hollmann MW dkk, 2000).

Secara biologis HMGB1 aktif diekspresikan pada membran plasma atau dilepas sel-sel inflamasi, in vivo menumpuk selama infeksi dan cedera, mengubah metabolisme dan aktivitas imunologi hematopoietik, epitel, dan sel-sel saraf, memperantarai demam, anoreksia, respon fase akut, dan sindrom kebocoran pembuluh darah. Sinergi aktifitas HMGB1 dipengaruhi oleh sitokin dan molekul patogen yang diturunkan, pemberian obat yang menghambat aktivitas HMGB1 (antibodi, protein antagonis, inhibisi pelepasan) pada hewan iskemia dan penyakit inflamasi menghalangi perkembangan cedera jaringan dan menekan respon inflamasi (Harris HE dkk, 2012).



Gambar 2.4. Ikatan HMGB1 dengan TLR4 dan RAGE. Ikatan HMGB1 dengan TLR4 akan mengaktifkan pelepasan sitokin dari makrofag dan monosit (kiri), sedangkan ikatan HMGB1 dengan RAGE akan memodulasi fungsi sel tumor dan endotel (kanan). (Dikutip dari: Anderson U, Tracey KJ. HMGB1 is Therapeutic Target for Sterile Inflammation and Infection. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 139-62)

11. Dinamika Translokasi HMGB1 Sewaktu Kematian Sel

Secara imunologi penelitian terbaru telah memperluas kategorisasi bentuk kematian sel, seluruh mengarah kepada pelepasan HMGB1 dan mempengaruhi patogenesis dari inflamasi dan penyakit autoimun. Penanda sifat kematian sel tersebut merupakan kunci untuk memahami asal HMGB1 pada sekitar peradangan (sinovial, kelenjar air ludah, otot, lidah dll.) karena cakupan jauh melebihi apoptosis dan nekrosis yang mampu menghantarkan temuan-temuan histopatologis, seperti

hilangnya inti HMGB1, ekspresi sitoplasmik HMGB1 atau pelepasan ekstraseluler HMGB1 (Magna M dkk,2014).

Nekrosis

Nekrosis adalah bentuk kematian sel karena trauma kimiawi maupun fisik. Nekrosis dapat digambarkan dapat mudah terjadi dan bersifat instan, proses nekrosis sebenarnya terjadi berurutan, dengan jenis agen yang mempengaruhi perubahan biokimia sel dan translokasi molekul HMGB1. Suatu tanda nekrosis adalah destruksi sel dan difusi kandungan intraseluler keluar dari tempat kematian sel tersebut.

Penelitian Scaffidi P dkk, 2002 mengenai translokasi HMGB1 sewaktu proses kematian sel terjadi dengan menggunakan uji kadar biofisikal sensitif, menunjukkan bahwa HMGB1 sel hidup memperlihatkan bahwa mobilitas intraseluler cepat terpisah dari histon. Ikatan hubungan HMGB1 dengan kromatin lemah sehingga HMGB1 dapat segera keluar dari dalam sel ketika integritas membran sel hilang pada nekrosis.

Pada penelitian ini juga ditemukan bahwa HMGB1 nukleus bentuk reduksi menumpuk dan mobilitasnya berkurang pada apoptosis intranukleus. Kandungan HMGB1 sel mati kurang dan gagal untuk memproduksi sitokin, penelitian ini menunjukkan bahwa HMGB1 merupakan pemain imun dominan selama kematian sel terprogram.

Karena nekrosis adalah bersifat heterogen, serangkaian penelitian telah dilakukan untuk mengeksplorasi translokasi HMGB1 dalam berbagai bentuk sel

mati seperti mencairkan, membekukan, memanaskan, etanolisasi, dan hidrogen peroksida (H₂O₂), dan menggunakan sel Jurkat sebagai model. Setiap langkah perawatan membunuh sel secara efektif, HMGB1 banyak dilepas selama kematian sel, seperti *blotting of culture supernatants* yang diteliti oleh Western (Scaffidi P dkk, 2002). Pencairan-pembekuan memproduksi pelepasan HMGB1 segera dan banyak, pelepasan lebih berurutan dengan langkah lainnya, tetapi dengan etanol gambaran terbatas. Penelitian ini menunjukkan bahwa pelepasan HMGB 1 bukan merupakan gambaran variabel nekrosis, temuan ini harus dipertimbangkan untuk menilai peran selama kematian sel.

Sangat sulit untuk memprediksi kasus dari sel-sel mati dan hasil-hasilnya pada situasi invitro dan invivo, karena kematian sel invivo dapat dipengaruhi kondisi hipoksia, asidosis, atau oksidasi. Penelitian (Venereau E dkk, 2012) Menunjukkan pada tikus percobaan cedera otot, bahwa HMGB1 berkurang didalam sel nucleus. Ketika terlepas dari sel netrotik setelah perawatan otot dengan cardiotoxin, meskipun, dapat dioksidasi secara ekstraseluler ke dalam bentuk HMGB1 disulfida pada lingkup oksidatif yang dihasilkan oleh infiltrasi leukosit. Lingkungan ekstraseluler selama nekrosis dapat mempengaruhi biokimiawi dan fungsi pelepasan HMGB1.

Apoptosis

Sebagai sebuah mekanisme umum kematian sel somatik, apoptosis adalah pasangan utama dari nekrosis. Apoptosis secara klasik didefinisikan sebagai sebuah bentuk kematian sel terprogram yang dapat terjadi baik pada keadaan

fisiologik dan patologik; nekrosis cenderung bersifat patologis. Dalam apoptosis, aliran enzim berujung pada adanya pembelahan nukleolitik dan proteolitik yang menyebabkan perubahan morfologikal sel. Walaupun terjadi gangguan-gangguan ini, integritas keutuhan membran sel tetap bertahan sampai tahap terakhir sel apoptosis dengan cepat dikenali dan dibuang oleh sel-sel fagosit seperti makrofag. Hasilnya, material intraseluler termasuk HMGB1 terlindungi sistem imun, menjadikannya diam secara imunologis. Jika dibiarkan tak tersentuh atau tak dibersihkan sel-sel apoptik dapat memasuki fase apoptosis lanjutan atau nekrosis sekunder yang meliputi pecahnya membran dan kandungan intraseluler keluar. Transisi ini sudah sering dihubungkan dengan patogenesis penyakit autoimun *systemic lupus erythematosus* (SLE), karena genetik abnormal seperti defisiensi komoplemen atau *system clearance* selular atau humoral dapat menyebabkan produksi auto antibodi pada pasien dan hewan percobaan. Antibodi paling spesifik pada kondisi ini langsung diarahkan ke DNA atau histon, pasangan HMGB1, nukleus, dan dianggap sebagai hasil respon imun terhadap sisa sel mati dengan DAMP dianggap sebagai auto adjuvan.

Laporan awal menunjukkan sebuah perbedaan yang ditandai dalam pergerakan HMGB1 selama nekrosis dan apoptosis. Penelitian-penelitian menunjukkan bahwa, selama apoptosis HMGB1 kehilangan mobilitas intranukleusnya. Ikatan kuat HMGB1 dengan kromatin ini membuat HMGB1 dapat tetap berada di dalam nukleus walaupun integritas membran rusak. Sehubungan dengan interaksi HMGB1 dengan DNA atau histon, temuan-temuan ini menunjukkan modifikasi paska-translasi mengubah pola biasa ikatan intermolekular.

Karena trikostatin A, zat inhibisi asetilasi histon, dapat mengubah lokasi HMGB1, temuan-temuan ini menunjukkan histon paling tidak sebagai satu molekul yang mengalami modifikasi.

Pola dari penyimpanan intranukleus HMGB1 yang digambarkan pada penelitian awal *invitro* ini berbeda dari yang diobservasi peneliti-peneliti lain terhadap translokasi ekstraselular DNA, histon, atau nukleosom selama apoptosis. Seperti yang ditunjukkan dalam kedua studi *invitro* dan *invivo*, selama kematian sel apoptosis, DNA dapat berpindah ke lokasi ekstraselular, dan tentu kadarnya dapat meningkat lebih tinggi dalam darah tikus setelah kecemasan stimulus apoptotic spesifik (misalnya: perawatan anti Fas). Kadar-kadar DNA darah naik pada banyak kondisi yang sama dengan HMGB1 termasuk Sistemik Lupus Eritematosus.

Untuk menyesuaikan hasil perbedaan translokasi molekul nuklir, sistim model tambahan diinvestigasi. Pendekatan secara, (Bell CW dkk, 2006). Menunjukkan bahwa, sel nekrotik, sel apoptotik, dapat melepaskan HMGB1 secara *invitro* sesuai aturan waktu. Peneliti-peneliti lain telah mengeksplorasi peran modifikasi redoks HMGB1 selama apoptosis, bertujuan untuk mengidentifikasi peran molekul talerogenik dalam menginduksi sel-sel apoptosis. Penelitan (Kazama H dkk, 2008) menunjukkan HMGB1 tereduksi penuh didalam nukleus sel hidup. Situasinya berubah saat apoptosis, namun karena kadar ROS yang tinggi (hasil efek caspase pada mitokondria) menyebabkan oksidasi akhir dari sistem kritis HMGB1 menjadi bersulfonasi, meniadakan aktivitas imunostimulator. Seperti yang ditunjukkan penelitian ini, peniadaan aktivitas HMGB1 oleh ROS

berkontribusi terhadap kemampuan sel apoptosis untuk memicu toleransi melawan respon adaptif.

Diantara kejadian-kejadian yang terjadi selama apoptosis, *autofagi* dapat mengubah pola ekspresi HMGB1 dan pelepasan ekstraseluler sel-sel yang mati. Seperti ditunjukkan dalam model *in vitro* perawatan sel-sel kanker dengan agen sitotoksik tertentu dapat memicu *autofagi*. Pada situasi induksi autophagy, aktivasi caspase dan penyimpanan HMGB1 dapat terjadi. Pengaruh antara autofagi dan apoptosis sangat kompleks, namun penelitian (Tang D dkk, 2010) menunjukkan bahwa HMGB1 memainkan peran krusial pada perdebatan ini. Hasil penelitian mereka menunjukkan bahwa perawatan sel kanker dengan HMGB1 yang menurun dapat memicu autofagi dengan mengikat RAGE dan mendorong resistensi obat sitotoksik, sebaliknya, HMGB1 yang teroksidasi dapat meningkatkan sitotoksitas dan mendorong apoptosis. Hasil penelitian ini secara bersama-sama menunjuk autofagi sebagai sebuah kunci penentu pelepasan HMGB1 pada saat sitotoksitas.

HMGB1 terlepas sebagai gantinya mengatur mekanisme kematian. Meskipun pelepasan HMGB1 dapat terjadi saat apoptosis, konsekuensi imunologikal dapat berbeda dari nekrosis bukan hanya karena waktu dan tingkat pelepasan tapi juga karena perubahan redoks. Sementara kesimpulan ini konsisten dengan hasil penelitian terhadap aktivitas tolerogenik sel apoptotik, penggabungannya kedalam model SLE bisa jadi bermasalah, karena oksidasi menyebabkan hilangnya aktivitas imunologis HMGB1 sulfonasi secara permanen, transisi dari apoptosis ke apoptosis lanjutan atau nekrosis sekunder tidak akan

memunculkan aktivitas baru yang dapat mendorong autoimunitas, kecuali jika oksidasinya tidak komplit.

Apoptosis sebagai sumber material nuklir pada SLE adalah soal dugaan. Dengan demikian kemungkinan kematian sel paling relevan terjadi melalui satu dari dua jalur tersebut.

Piroptosis

Dua bentuk kematian sel tambahan lain yang sudah teridentifikasi dan relevan dengan inflamasi dan penyakit autoimun adalah piroptosis dan NETosis, menambah sumber potensial HMGB1 ekstraseluler. Semua sel dapat mengalami kematian terprogram piroptosis dianggap sebagai bentuk kematian teratur sel makrofag dan sel dendrit. Seperti apoptosis, piroptosis menyebabkan perubahan nuklir, dengan kondensasi dan pembelahan DNA terjadi karena aktivitas nuklea yang tidak teridentifikasi. Piroptosis mengikuti aktivasi inflamasom, berujung pada ekspresi caspase-1 dan efek- efek hilirnya, termasuk kemunculan sitokin IL-1B dan IL-18 melalui pembelahan prekursornya. Inflamasom dapat dipicu oleh berbagai macam molekul, mungkin muncul karena beberapa tekanan sel.

Mengingat beragam molekul yang ditampilkan bakteri (misal: PAMPs), agen-agen infeksi berpotensi menstimulasi TLR dan penandaan oligomerisasi ikatan-nukleotid reseptor domain/ *nucleotid-binding oligomezation domain receptor* (NLR) secara serentak. Aktivasi ganda ini masuk dalam imunitas bawaan, dapat mempersulit interpretasi mekanisme HMGB1. Untuk menyelidiki peran penanda yang berbeda-beda pada translokasi dan modifikasi paska translasi HMGB1,

(Nystrom S dkk, 2013) menciptakan makrofag penanda inflamasom melalui NLRC4 yang dapat merangsang ekspresi intraseluler dari sebuah rangkaian *flagellin*.

Mereka membuktikan bahwa sel-sel yang diaktifkan melalui NLRC4 mengalami pelepasan piroptosis HMGB1 dalam bentuk semua redoks-thiol, pyroptosis sendiri tidak merangsang produksi ROS. Sebaliknya stimulasi TLR dapat memicu disfungsi mitokondria dan pelepasan ROS. Hasilnya, sel-sel yang terinduksi NLRC4, pada permukaan sel ligan TLR, dapat melepaskan dua redoks isoform HMGB1 berbeda: HMGB1 bentuk- thiol dan bentuk thiol disulfide-Cys106-thiol. Asetilasi HMGB1 dapat terlibat dengan atau tanpa persiapan LPS. Hasil-hasil ini menunjukkan bahwa aktivasi imun dapat memunculkan bentuk HMGB1 yang berbeda tergantung cara mana TLR atau inflamasom-yang di aktifkan.

NETosis

NETosis adalah bentuk lain dari kematian sel teratur yang terjadi umumnya dengan neutrofil. Pada saat inflamasi terjadi, neutrofil ditarik ke tempat peradangan untuk fagositosis dan untuk mengurangi patogen dan debris sel. Setelah kematian neutrofil oleh apoptosis, makrofag akan membersihkan sisa-sisannya dengan proses yang disebut *efferocytosis* .Sebagai tambahan untuk apoptosis, neutrofil dapat menampilkan respon lain yang lebih dramatis terhadap rangsangan seperti bakteri, LPS dan sitokinesis, mungkin proses yang disebut NETosis. Proses ini berujung pada kematian sel, melepaskan struktur yang disebut *neutrophil extracellular traps* (NETs). NETs menyerupai sebuah jaringan yang terdiri dari

DNA dan histon maupun protein dari butiran *cytoplasmic* seperti *neutrophil elastase* (NE) dan *mieloperoksidase* (MPO) yang telah tercampur selama proses ini. Tidak mengejutkan, HMGB1 adalah komponen NET. Formasi NET membutuhkan produksi ROS dan aktivasi oksidase NADPH. Adanya NE dan MPO serta molekul nuclear seperti HMGB1 dan histon NET mendasari aksi antibakteria memungkinkan mekanisme perangkap fisik dan pembasmian lokal dengan penggunaan *immunofluorescence microscopy* dan pengujian kadar logam biokemikal, NETosis dapat diidentifikasi dalam *synovium*, cairan *synovial* dan letak peradangan pembuluh darah pada vaskulitis.

Penelitian Garcia RGS dkk, 2011 menggambarkan keseimbangan antara apoptosis dan NETosis dalam autoimunitas. Mereka menemukan bahwa neutrofil pasien SLE mati dengan apoptosis *in vitro* namun, sel-sel ini berganti ke NETosis saat distimulasi dengan antibodi anti-NRP, autoantibodi antinuklear yang umum ditemukan pada pasien sehubungan dengan ini, istilah NETosis mengacu pada acara kematian sel neutrofil dimana NET dilepaskan. Baru-baru ini, penelitian (Yipp BG dkk, 2007) menunjukkan respon terhadap organisme positif-Gram, bahwa neutrofil dapat mengusir NETS dan, kendati enukleasi, tetap bertahan untuk bertahan beberapa waktu, dapat bermigrasi dan menunjukkan aktivitas *fagocitic*.

Biokimia HMGB1 yang dilepaskan selama NETosis belum dianalisis secara mendalam. Karena lingkungan yang dipenuhi neutrofil kemungkinan mengandung oksidan tinggi, namun, aktivitas dari HMGB1 tidaklah pasti. Proses pelepasan NET, dengan atau tanpa kematian sel, dapat menjadi sumber HMGB1 ekstraseluler yang muncul didalam jaringan atau dapat berperan sebagai penanda

biomarker. Material ini juga dapat menjadi sumber *autoantigen* untuk mengstimulasi produksi antibodi atau membentuk kompleksitas imun, pola translokasi HMGB1 saat kematian sel. Sel-sel apoptosis dapat menahan kuat HMGB1 tetap terikat kromatin dalam nukleus, tapi saat apoptosis lanjut atau nekrosis sekunder, protein ini dapat lepas, isoform ini teroksidasi dan memiliki aktivitas imunologis. Selama nekrosis, membran plasma dan membran nukleus kehilangan integritas, mengeluarkan bentuk *proinflammatory* dari HMGB1.

Selama piroptosis terbentuk aktivitas inflamasi, membran plasma terbuka dan lepaskan HMGB1 terjadi piroptosis, TLR, sebuah bentuk induksi-sitokin juga dapat dilepaskan. Meskipun NETosis memicu inflamasi dan melepaskan nukleus, kondisi redoks HMGB1 yang dilepaskan pada kematian sel ini belumlah diketahui, simbol spiral melambangkan DNA. Di NETosis, DNA dilepaskan dalam bentuk benang atau jaring-jaring, sementara DNA memiliki berat molekuler besar dengan nekrosis, ini tidak tertata atau terhubung dengan protein sitoplasma titik biru menunjukkan struktur nukleosom. Dalam apoptosis piroptosis, DNA terbelah, penanggulangan terjadi pada apoptosis tapi tidak pada piroptosis.

12. Jalur Pelepasan HMGB1

Pelepasan HMGB1 ke dalam sirkulasi melalui dua jalur yaitu invasi patogen atau cedera steril, salah satu bersifat aktif dan lainnya pasif. Pelepasan pasif diprakarsai oleh kerusakan integritas selular yang terjadi seketika. Sekresi aktif HMGB1 diprakarsai oleh transduksi sinyal seluler melalui interaksi reseptor membran plasma dengan produk ekstraseluler, terjadi lebih lambat. Sekresi aktif

HMGB1 terjadi ketika monosit, makrofag, sel-sel *natural killer*, sel dendrit, sel endotel, trombosit, dan sel-sel imunologis kompeten lain terpapar dengan *microbe associated molecular patterns (MAMPs)*, *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)*, dan secara endogen berasal dari mediator inflamasi termasuk TNF α , IL-1, dan IFN- γ (Huan LW dkk, 2014; Harris HE dkk, 2012).

Sel-sel lain yang bisa dirangsang untuk mengeluarkan HMGB1 secara aktif termasuk neuron, astrosit, sel eritroleukemia, sel-sel neuroblastoma, dan sel-sel tumor. Kebanyakan sel, termasuk monosit dan makrofag, menyusun ekspresi protein HMGB1 dan mRNA dalam kondisi basal. Setelah makrofag diaktivasi dengan liposakarida (LPS) kadar HMGB1 mRNA meningkat selama beberapa jam dan tetap tinggi selama 24-48 jam. Sekresi aktif HMGB1 ke ekstraseluler dimulai 8-12 jam setelah ligasi reseptor *Toll-like (TLRs)* dan terus meningkat selama 18-36 jam, rangkaian waktu secara signifikan lebih lambat dibandingkan dengan TNF dan IL-1, prototipe sitokin proinflamasi awal. Pelepasan HMGB1 dari kematian sel terprogram terjadi melalui dua cara (Anderson U dkk, 2011; Kim TH dkk, 2011) :

- a) Secara langsung dari sel apoptosis
- b) Melalui aktivasi monosit setelah terpapar sel apoptosis.

Bukti mengungkapkan bahwa sel yang mengalami apoptosis melepas sejumlah besar HMGB1 tetapi secara imunologi tidak aktif. Artinya, secara signifikan gagal merangsang pelepasan TNF dari respon makrofag dibandingkan dengan pelepasan HMGB1 secara pasif selama nekrosis sel. Jawaban penting untuk dikotomi ini terletak dalam senyawa oksigen reaktif yang dihasilkan oleh sel

apoptosis mitokondria yang menekan aktivitas inflamasi HMGB1 dengan membakar sistein posisi 106, residu kritis diposisikan dalam kotak imunostimulan domain kotak B imunostimulan dari protein rantai panjang. Mekanisme ini memberikan pemahaman mengapa apoptosis gagal mengaktifkan respon inflamasi signifikan karena secara eksperimen menghalangi langkah oksidasi HMGB1 (mencegah deaktivasi imunogenik) mengubah peristiwa apoptosis, menjadi peristiwa yang secara imunologis menstimulasi proinflamasi (Harris HE dkk, 2012; Hollmann MW dkk, 2000; Hreggvidsdotir HS dkk, 2009).

Sudah diketahui bahwa HMGB1 endogen (berasal dari sel-sel nekrotik) diperlukan untuk menstimulasi pelepasan TNF monosit dan subjek *High Mobility Group Box 1* rekombinan (rHMGB1) untuk kondisi oksidasi ringan secara imunologis menjadi tidak aktif menjelaskan bahwa C 160 penting dalam mekanisme inflamasi molekuler yang dimediasi HMGB1. Dengan demikian, HMGB1 endogen menempati peran fungsional penting sebagai molekul sinyal pemberi informasi ke sel-sel lain bahwa kerusakan atau invasi telah terjadi (Liu J dkk, 2013; Li LC dkk, 2014).

13. Respon Inflamasi Seluler dan Reseptor HMGB1

HMGB1 dikelompokkan sebagai mediator proinflamasi klasik karena:

- a. Pelepasan HMGB1 dirangsang oleh cedera dan infeksi
- b. Mengaktifkan sel-sel imunokompeten untuk menghasilkan TNF- α , IL 1, dan respon proinflamasi lain
- c. Menjadi perantara demam, anoreksia, dan sindrom penyakit in vivo
- d. Aktivasi secara sinergis meningkat dengan adanya agonis TLR eksogen dan sitokin proinflamasi
- e. Secara khusus menjadi target terapi menguntungkan pada inflamasi steril dan sindrom penyakit infeksi yang dihubungkan peningkatan kadar HMGB1.

Ringkasan respon inflamasi seluler HMGB1 dapat dilihat pada tabel di bawah.

Tabel 2.2. Aktivitas Biologi HMGB1 Ekstraseluler (Dikutip dari Harris HE, Andersson U, Pisetsky PS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev Rheumatol.* 2012;8:195-02).

Sel-sel Target	Respon Seluler HMGB1 (referensi)
Makrofag/ Monosit	Induksi sitokin, kemokin, dan sintesis metalloproteinase, migrasi transendotel monosit
Sel-sel Dendritik	Pematangan dan migrasi kelenjar getah bening, peningkatan imunogenisitas antigen, sekresi mediator proinflamasi
Neutrofil	Aktivasi, kemotaksis
Trombosit	Aktivasi prokoagulan HMGB1 membran permukaan sel
Limfosit T	Proliferasi limfosit T, polarisasi Th1
Limfosit B	Bantuan nuklir rekombinasi VDJ, potensial aksi kompleks HMGB1-DNA-IgG
Sel Epitel	Hiperpermeabilitas menyebabkan disfungsi sawar GIT dan saluran respirasi, efek bacterial
Sel Endotel	Proangiogenik, meningkatkan regulasi adesi molekul
Sel Otot Polos	Migrasi, proliferasi, reorganisasi sitoskeleton
Sel Punca P. Darah	Proliferasi, migrasi transendotelial
Kardiomyosit	Merekrut dan aktivasi sel-sel prekursor untuk perbaikan, efek inotropik (-)
Osteoklas	Migrasi, peningkatan osteoklastogenesis dan sintesis TNF melalui interaksi HMGB1 dengan promotor TNF
Neurons	Perkembangan neurit selama embriogenesis
Astrofit	Aktivasi proinflamasi, pelepasan glutamat
Sel-sel Mikroglial	Aktivasi proinflamasi, pelepasan glutamat
Sel-sel Tumor	Proliferasi, induksi enzim proteolitik untuk invasi, memfasilitasi metastasis

Salah satu perbedaan HMGB1 dari sitokin proinflamasi konvensional (misalnya, TNF- α dan IL-1) adalah bahwa HMGB1 memunculkan respon inflamasi seluler dan biologis melaluisinyal transduksi reseptor yang sebelumnya telah diidentifikasi untuk berinteraksi dengan molekul asing. Tidak seperti TNF dan IL-1, keluarga reseptor membran plasma serumpun secara jelas disebut bahwa HMGB1 berinteraksi dengan beberapa reseptor yang tampaknya tidak berhubungan tetapi sebelumnya telah diidentifikasi kemampuan mereka untuk sinyal aktivasi transduksi dari eksogen (TLR2, TLR4, dan TLR9) dan ligand endogen (RAGE). Para imunologis menduga bahwa secara biokimia kebutuhan fungsional keluarga reseptor sitokin dibatasi pada persiapan terbatas sitokin serumpun yang dikejutkan dengan realitas bahwa HMGB1 khusus memodulasi respons selular melalui reseptor yang dapat diaktifkan dengan eksogen, ligand, benda asing.

Hal ini mengungkapkan bahwa HMGB1 adalah protein yang sangat lestari dan evolusi tua yang mampu mengaktifkan rekaman seragam berbagai respon inflamasi terhadap kerusakan infeksi atau steril. Seperti yang dibahas secara rinci di bawah, peran sentral HMGB1 dalam menjembatani besarnya respon inflamasi terhadap sindrom klinis yang terkait dengan cedera steril dan infeksi diungkapkan dengan mengamati hilangnya aktivitas proinflamasi setelah pemberian antagonis HMGB1 dan dengan menghapus HMGB1 atau reseptor melalui teknik gugus genetik (Scaffidi P dkk, 2002).

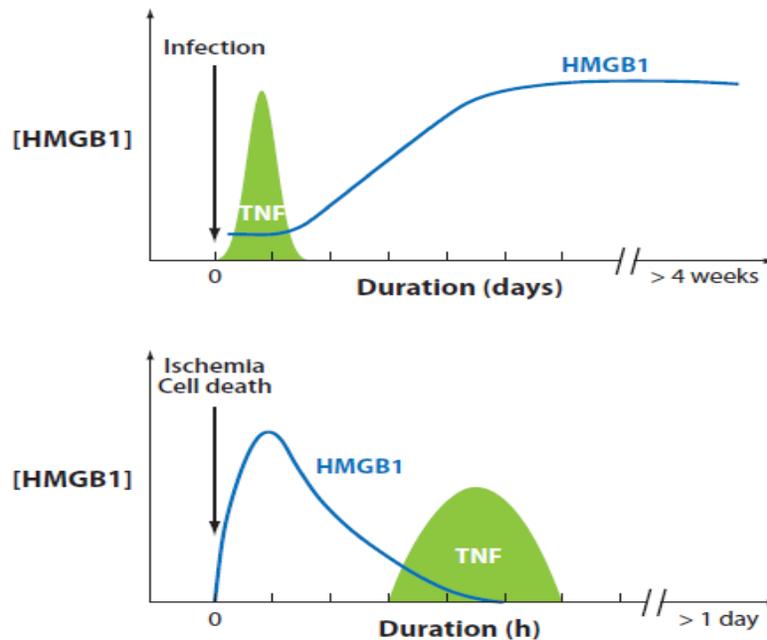
Reseptor pertama yang terlibat sebagai partner pengikat HMGB1 adalah *receptor for advanced glycation end product* (RAGE), transmembran, permukaan

sel, multi ligand anggota keluarga besar immunoglobulin. HMGB1 memberi sinyal melalui RAGE menjadi perantara kemotaksis dan stimulasi pertumbuhan sel, diferensiasi sel-sel imun, migrasi imun dan sel otot halus, dan meningkatkan regulasi permukaan sel termasuk RAGE dan TLR4. HMGB1 secara fisik berinteraksi dengan RAGE tetapi interaksi dengan TLR4 diperlukan untuk mengaktifasi pelepasan HMGB1 dari sitokin makrofag, RAGE menggugurkan makrofag, dan TLR2 menekan makrofag untuk menghasilkan TNF bila terpapar dengan HMGB1, tetapi interaksi dengan TLR4 tidak (Tomori H dkk, 1998; Ueda T dkk, 2010).

Ikatan HMGB1 pada TLR4-MD2 sebagai ukuran resonansi permukaan plasmon dan sinyal transduser yang merangsang makrofag melepas TNF. Pengikatan dan sinyal keduanya membutuhkan sistein redoks-sensitif posisi 106, dan substitusi posisi ini mencegah HMGB1 mengikat TLR4. TLR4 adalah reseptor utama HMGB1 ekstraseluler endogen dalam mediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin, dan cedera jaringan. Sinyal ini mengaktifkan *IKB kinase* (IKK) - β dan IKK- α (endotoksin aktif hanya IKK- β) dan translokasi nuklir aktif NF- $\kappa\beta$. Ada perbedaan signifikan dalam HMGB1 dan endotoksin-dimediasi sinyal karena HMGB1 mengikat TLR4 dengan jauh lebih sedikit dibandingkan dengan afinitas LPS, dan aktivasi pola ekspresi gen berbeda dibandingkan pola ekspresi mediasi endotoksin. HMGB1 dan LPS baik secara signifikan meningkatkan translokasi nuklir NF- $\kappa\beta$ dan fosforilasi Akt dan p38 MAPK, tetapi LPS menyebabkan lebih tinggi aktivasi NF- $\kappa\beta$ dan pelepasan TNF dibandingkan dengan HMGB1. Selain itu,

induksi Pelepasan TNF oleh HMGB1 menunjukkan profil kinetik bifasik, sedangkan endotoksin induksi tunggal merangsang pelepasan TNF monofasik (Harris HE dkk, 2012).

Penelitian pada hewan percobaan menunjukkan bahwa kadar HMGB1 meningkat secara signifikan pada cedera iskemia-reperfusion, meningkat dalam waktu 1 jam setelah reperfusion dan masih tetap tinggi sampai 24 jam. Pengobatan tikus *wild type* (C3H/HeOuj) dengan antibodi anti-HMGB1 signifikan melindungi kerusakan hati, tetapi penilaian antibodi gagal melindungi defek TLR4 (C3H/Hej) tikus, juga kurang mengalami kerusakan dibandingkan dengan tipe liar (C3H/Hej) tikus. Penanda atau sinyal HMGB1 melalui TLR4 diperlukan untuk cross-presentasi antigen pada tumor padat yang mengalami radiasi atau kemoterapi. Ekspresi TLR4 tubulus ginjal dari donor ginjal meninggalkan noda HMGB1 positif, secara langsung penanda HMGB1-TLR4 berimplikasi dalam pengembangan radang cangkang ginjal dan cedera steril manusia. Selain itu, jika HMGB1 pada TLR4 dalam fibroblas sinovial manusia dari pasien reumatoid arthritis (RA) dapat terungkap dengan uji kedekatan ligasi, menunjukkan bahwa molekul berinteraksi dalam lingkungan seluler inflamasi (Wang HL dkk, 2013; Yang H dkk, 2013).



Gambar 2.5. HMGB1 sebagai pro inflamasi. HMGB1 adalah mediator pro inflamasi cepat pada cedera steril dan mediator lambat pada infeksi. (Dikutip dari; Anderson U dkk, 2011. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29: 139-62)

Masih spekulatif apakah ikatan protein HMGB1 berpartisipasi dalam melepas sitokin dalam patogenesis infeksi dan cedera steril, termasuk TLR2, TLR9, CXCL12, thrombospondin, syndecan, TREM1 dan MAC1. HMGB1 dapat memfasilitasi ambilan DNA, dan bukti terbaru telah menempatkan mekanisme ini dalam konteks inflamasi. Ditetapkan prinsip bahwa HMGB1 memodulasi respon inflamasi terhadap ancaman steril dan infeksi melalui sinyal reseptor TLR4. HMGB1 juga mengikat CD24, membran protein diekspresikan oleh imunosit, pada gilirannya berhubungan dengan Siglec-10 untuk secara selektif menekan translokasi nuklir NF- κ B yang disebabkan oleh HMGB1 dan dimediasi aktivasi

TLR4, tetapi bukan patogen yang dimediasi aktivasi TLR. Bersama-sama, hasil ini menunjukkan bahwa penanda HMGB1 melalui TLR4, dalam konteks cedera steril atau infeksi, dapat dibedakan dipengaruhi oleh cross talk dari penanda HMGB1 melalui *CD24-Siglec-10* (Harris HE dkk, 2012).

14. Respon Fisiologi dan Patofisiologi HMGB1

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

15. Endotoksemia

HMGB1 dilepas selama endotoksemia, menjadi perantara hilir mematikan dari sitokin proinflamasi awal. Pemberian endotoksin dosis mematikan pada mammalia akan mengaktifkan respon bifasik sitokin dan dapat dibagi menjadi profil awal dan akhir. Respon sitokin proinflamasi klasik terjadi lebih awal dengan kadar puncak TNF atau IL-1 terjadi dalam beberapa jam. Pelepasan HMGB1 secara

signifikan terjadi kemudian, mencapai puncak 16-23 jam setelah timbul endotoksemia. Peristiwa HMGB1 timbul lambat diperlukan untuk ekspresi penuh inflamasi mematikan endotoksemia. Pemberian sejumlah non toksis HMGB1 bersama-sama dengan dosis mematikan LPS adalah bersinergi toksis atau mematikan (Li LC dkk, 2014).

Pemberian antibodi anti-HMGB1 pada hewan endotoksemia beberapa jam setelah puncak awal TNF memberikan perlindungan signifikan dari kematian. Pemberian lambat antibodi anti-HMGB1 menunjukkan bahwa terapi endotoksemia dapat dimodulasi dengan ambang yang lebih luas dari pada yang sudah dijelaskan sebelumnya. Strategi lain untuk menetralkan aktifitas HMGB1 ekstraseluler adalah mengelola rekombinan trombomodulin terlarut yang mengikat HMGB1 melalui trombomodulin di domain lektin ujung N dan secara signifikan meningkatkan kelangsungan tikus yang mengalami endotoksemia yang mematikan (Gallos G dkk, 2004).

Obat-obat farmakologis yang dapat mencegah pengeluaran HMGB1 dari nukleus monosit aktif dan hambatan pelepasan seluler dapat digunakan untuk terapi menguntungkan pada model endotoksemia mematikan. Penanda nervus vagus eferen mencegah pengeluaran HMGB1 melalui *alpha7-nicotinic Acetylcholine mediated signaling*, suatu mekanisme yang diperantai oleh jalur anti inflamasi kolinergik. Stimulasi listrik nervus vagus dan pemberian selektif *alpha7-nicotinic Acetylcholine reseptor agonists* menurunkan kadar HMGB1 ekstraseluler dan mencegah kematian dari endotoksemia mematikan (Berger C dkk, 2014).

B. TOLL-LIKE RECEPTORS

Toll-like receptors (TLRs) adalah pola reseptor pengenalan dalam mengawali respon kekebalan tubuh bawaan terhadap berbagai produk yang dihasilkan oleh mikroba patogen, *pathogen associated molecular patterns* (PAMPS) dan molekul-molekul endogen yang dilepaskan oleh sel-sel yang mengalami cedera atau mati, *damaged associated molecular patterns* (DAMPs). TLRs ditemukan pada setiap bentuk evolusi kehidupan mulai dari invertebrata hingga mamalia. Toll awalnya diidentifikasi sebagai gen *Drosophila* yang terlibat dalam pembentukan sumbu ventral dan dorsal embriogenesis lalat buah (*fruit fly*), namun diketahui bahwa protein Toll juga memperantai respon antimikroba. Bagian sitoplasma Toll hampir sama dengan bagian sitoplasma reseptor sitokin interleukin (IL-1) sehingga penemuan ini menjadikan Toll mamalia dinamakan *toll-like receptors* (Couture LA dkk, 2012; Abbas KA dkk, 2016).

TLRs adalah glikoprotein membran tipe I yang berfungsi sebagai pola pengenalan reseptor. Reseptor-reseptor ini menyusun secara lengkap komponen sistem kekebalan bawaan. TLRs banyak mengandung leusin yang kaya sistein di ekstraseluler, pada bagian ekor sitoplasma terdapat *toll interleukin-1 receptor* (TIR) yang penting untuk sinyal, dan berikatan dengan *ligand*. TIR yang sama juga ditemukan pada sitoplasma reseptor sitokin IL-1 dan IL-8 (Abbas KA dkk, 2016).

Klasifikasi TLRs

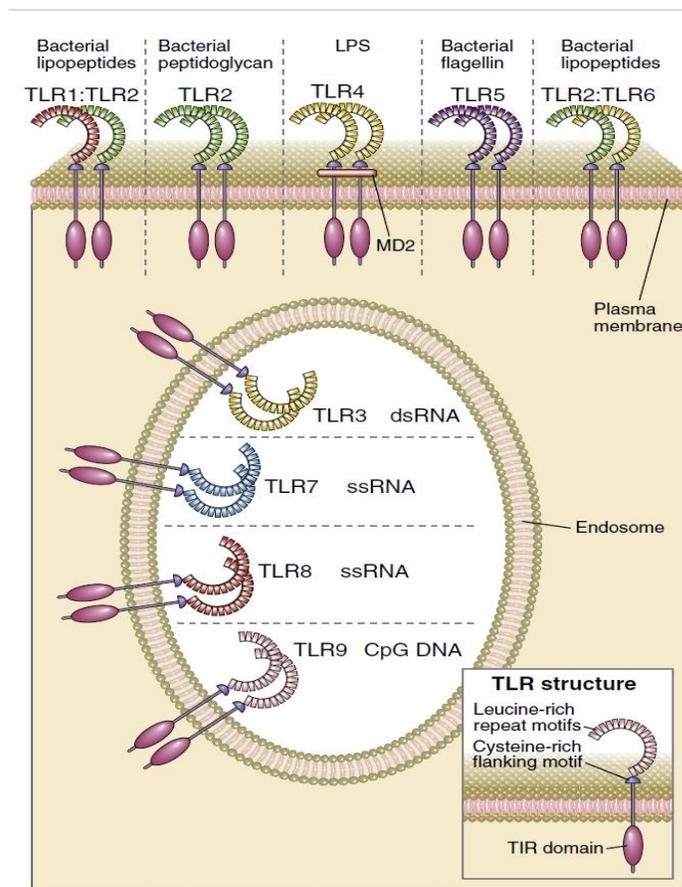
TLRs dapat diklasifikasikan menjadi TLRs ekstraseluler dan intraseluler. TLRs mamalia terdiri dari 13 jenis sedangkan TLRs manusia terdiri dari 9 jenis.

TLRS ekstraseluler ditemukan di permukaan seluler dan membran plasma terdiri dari TLRs 1, 2, 4, 5, dan 6. TLRs ekstraseluler mampu mengenal berbagai komponen molekul yang dihasilkan mikroba yang berasal dari lingkungan seluler. TLRs intraseluler ditemukan di retikulum endoplasma dan endosome terdiri dari TLRs 3, 7, 8, dan 9. Fungsi utama TLRs intraseluler adalah untuk mendeteksi asam nukleat yang dihasilkan oleh virus meskipun juga dapat mengenal mikroba lainnya (Tian J dkk, 2007; Blasius AL dkk, 2013).

TLRs mamalia terlibat dalam merespon berbagai macam molekul yang dihasilkan oleh mikroba patogen tapi bukan oleh sel-sel mamalia sehat. Ligan yang berbeda-beda tersebut dikenal oleh berbagai macam struktur TLRs dan termasuk semua jenis produk-produk yang dilepas oleh mikroorganisme, produk ini disebut *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Contoh produk bakteri ligan pengikat TLRs adalah *lipopolysaccharide* (LPS) untuk bakteri negatif gram, asam lipoikoid untuk bakteri positif gram dan flagelin suatu komponen protein flagella dari bakteri motila. Contoh asam nukleat yang merupakan ligan TLRs adalah RNA rantai ganda yang membentuk genom beberapa virus yang dihasilkan selama siklus kehidupan, namun bukan yang diproduksi sel-sel eukariotik. RNA rantai tunggal dibedakan dari transkrip RNA rantai tunggal sitoplasma seluler karena berlokasi di endosom dan banyak mengandung guanosisin, uridin, dinukleotida *cytosine-guanine-rich oligonucleotide* (CpG) tidak bermielin.

TLRs mamalia juga terlibat dalam merespon berbagai endogen yang menggambarkan kerusakan sel, molekul-molekul endogen ini disebut *Damage-Associated Molecular patterns* (DAMPs). Contoh molekul inang yang melibatkan

molekul TLRs adalah *heat shock protein* (HSP) suatu pendorong untuk menanggapi berbagai stres dan *high-mobility group box 1* (HMGB1) suatu pengikat protein DNA berlimpah yang terlibat dalam transkripsi dan perbaikan DNA. HSP dan HMGB1 umumnya terdapat di intraseluler tetapi bila sel mengalami trauma atau rusak akan dilepas ke ekstraseluler, dari lokasi ekstraseluler mereka akan mengaktifkan sinyal TLR2 dan TLR4 sel-sel makrofag, dendrit, dan sel-sel imunologis lainnya (Couture LA dkk, 2012; Abbas KA dkk, 2016).



Gambar 2.6. Struktur, Lokasi dan spesifikasi TLRs mamalia. (Dikutip dari Abbas KA,

Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular IMMUNOLOGY^{8th}

Chapter 4. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2016: 51-85.)

Jalur dan Sinyal TLRs

Jalur dan sinyal ini diinisiasi oleh ikatan ligan dan TLRs pada permukaan sel atau pada retikulum endoplasma atau endosome menjadikan dimerisasi protein TLRs. Dimerisasi ligan TLRs diprediksi membawa TIR dari ekor sitoplasma masing-masing protein yang berdekatan, diikuti dengan protein adaptor yang mengandung TIR memfasilitasi perekrutan dan pengaktifan berbagai protein kinase yang kemudian mengaktifkan faktor-faktor transkripsi yang berbeda.

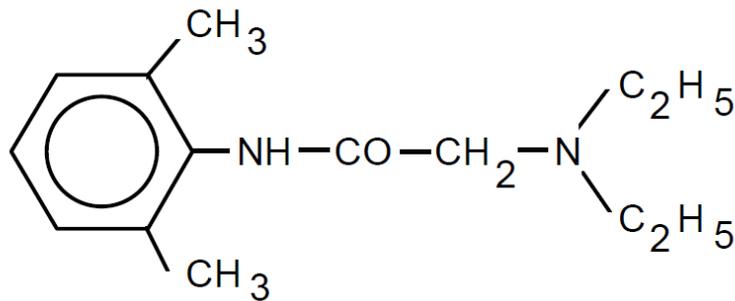
Faktor transkripsi utama yang diaktifkan oleh jalur sinyal TLRs adalah *nuclear factor κ B* (NF- κ B), *activation protein 1* (AP-1), *interferon response factor 3* (IRF3), and *IRF7*. NF- κ B dan AP-1 merangsang ekspresi gen banyak molekul yang dibutuhkan untuk respon inflamasi termasuk sitokin inflamasi seperti TNF dan IL-1, kemokin seperti CCL2 dan CXCL8, dan molekul-molekul adesi endothelial seperti E-selektin. IRF3 dan IRF7 mempromosikan produksi interferon tipe I (IFN- α dan IFN- β) yang penting untuk merespon sistem kekebalan tubuh bawaan antivirus (Furlani D dkk, 2012; Blasius AL dkk, 2013).

Perbedaan kombinasi-kombinasi adaptor dan sinyal intermedia yang digunakan oleh TLRs yang berbeda pula, bertanggung jawab atas efek-efek yang umum timbul dan unik dari TLRs. TLRs permukaan sel mengikat adaptor MyD88 mengaktifkan NF- κ B, dan sinyal TLRs adaptor yang digunakan disebut TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*) mengaktifkan IRF3. Semua TLRs kecuali sinyal TLR3 melalui MyD88 yang mampu mengaktifkan NF- κ B dan

menyebabkan respon inflamasi. Sinyal TLR3 melalui TRIF kemudian mengaktifkan IRF3 dan mengekspresikan interferon tipe I. Sinyal TLR4 melalui MyD88 dan TRIF dan keduanya mampu menginduksi respon (Couture LA dkk, 2012). TLR7 dan TLR9 sangat banyak ditemukan di dalam plasma sitoplasma sel-sel dendrit, sinyal MyD88 dependen, jalur bebas TRIF yang mengaktifkan NF- κ B dan IRFs. TLR7 dan TLR9 seperti TLR4 menyebabkan respon inflamasi dan antivirus.

C. LIDOKAIN

Lidokain adalah obat anestesi lokal golongan amida yang sudah lama digunakan dalam praktek kedokteran untuk menghambat sensasi nyeri. Anestesi lokal terdiri dari bagian lipofilik dan hidropilik yang dihubungkan oleh rantai hidrokarbon. Bagian hidropilik disusun oleh amine tersier seperti *diethylamine* sedangkan bagian lipofilik disusun oleh cincin aromatik tidak jenuh seperti *para aminobenzoic acid* (PABA). Berdasarkan struktur tersebut anestesi lokal dapat diklasifikasikan menjadi golongan amino-ester dan amino-amida. Bagian lipofilik menentukan aktifitas anestesi dari obat anestesi lokal tersebut. Anestesi lokal bekerja dengan cara mengurangi permeabilitas membran sel pada saluran ion natrium, menghalangi depolarisasi, dan dengan demikian konduksi stimulasi saraf nyeri tidak terjadi. Saluran ion natrium disusun oleh satu subunit α besar tempat dimana ion natrium lewat dan satu atau dua subunit β yang lebih kecil.



Gambar 2.7. Struktur Kimia Lidokain (Dikutip dari: Miller RD dkk. Miller's Anesthesia. 7th ed. Chapter 30. Miller RD et al eds. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010: 913-940.)

Lidokain pertama kali ditemukan oleh ahli kimia berkebangsaan Swedia bernama Nils Lofgren pada tahun 1943. Lidokain [*2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl) acetamide*] mempunyai rumus kimia yang terdiri dari tiga komponen dasar yaitu gugus amin hidrofil, gugus residu aromatik, dan gugus intermedier yang menghubungkan ke dua gugus tersebut. Gugus amin merupakan amin tersier atau sekunder, antara gugus residu aromatik dan gugus intermedier dihubungkan ikatan amida. Lidokain bersifat basa lemah dengan pKa 8, ikatan protein 64 %, kelarutan lemak 1. Lidokain sampai saat ini masih obat terpilih untuk berbagai tindakan dalam bidang kedokteran karena lidokain mempunyai potensi anestesi yang kuat, mula kerja cepat, masa kerja cukup panjang, dan batas keamanan lebar. Lidokain hanya efektif bila diberikan parenteral. Pada pemberian parenteral lidokain cepat diabsorpsi oleh saluran cerna dan saluran pernapasan. Lidokain di Hati mengalami dealkilasi oleh enzim oksidasi fungsi ganda menjadi *monoethylglycine xylidide* dan *glycine xylidide* dan kemudian dimetabolisme

menjadi *monoethylglycine* dan *xylidide*. Sebagian besar, 80 % *monoethylglycine xylidide* berkasiat anti inflamasi (Miller RD dkk, 2010). Pada pemberian intravena kadar puncak plasma akan dicapai dalam waktu 3-5 menit dan waktu paruh 30-120 menit. Efek samping lidokain akan terjadi bila kadar konsentrasi plasma > 10 µg/ml. Dosis lidokain untuk tindakan pembedahan adalah 4-5 mg/kgBB, dosis dapat ditingkatkan sampai 7 mg/kgBB bila dicampur dengan adrenalin 1:200.000.

Lidokain digunakan juga sebagai obat anti aritmia kelas I B (penyekat saluran natrium). Pada otot ventrikel lidokain merupakan stabilator elektrofisiologi bermakna karena mampu mengurangi durasi aksi potensial, periode refrakter efektif, respon dan otomisasi membran sistim his-purkinje, tetapi kurang berefek pada atrium. Lidokain menempati reseptornya pada saluran natrium saat fase aktif (fase 0) atau fase inaktif (fase 2) karena pada ke dua fase inilah afinitas lidokain tinggi terhadap reseptornya. Dosis lidokain untuk terapi aritmia ventrikel (takikardia) 1-1,5 mg/kgBB bolus intravena kemudian diikuti dengan pemberian infus 1-4 mg/kgBB/jam.

Beberapa kasiat anestesi lokal selain analgetik yang pernah dilaporkan, (Hollmann MW dkk, 2000; Cassuto J dkk, 2006; Caracas HC dkk, 2009; Thal DM dkk, 2016):

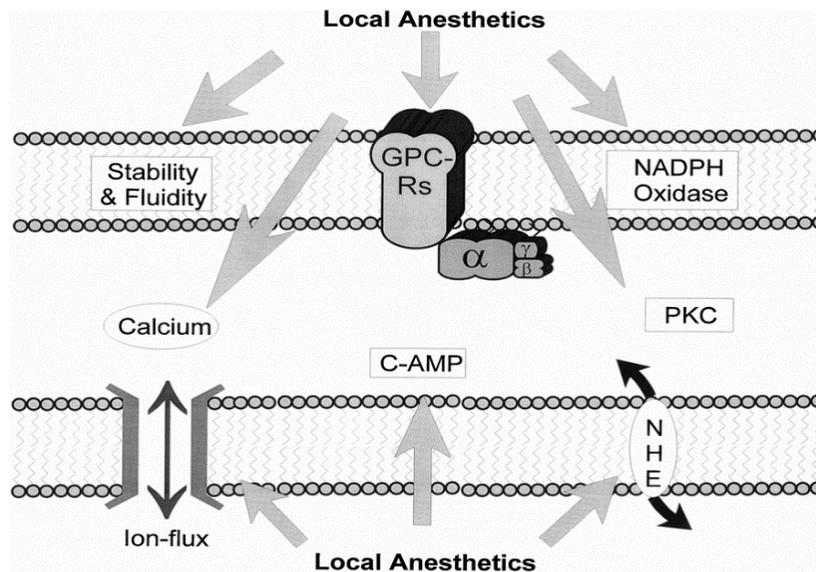
1. Efek antinosiseptif: menghambat saluran ion natrium membran saraf, menghambat pertukaran ion kalium, menghambat reseptor muskarinik presinaps, menghambat reseptor dopamin.
2. Efek antiaritmia: menghambat saluran ion natrium otot jantung

3. Efek antitrombotik: mengurangi trombosis vena dalam, mengurangi agregasi trombosit, mengurangi amplitudo maksimum dari *thrombelastography* (TEG).
4. Efek terhadap fungsi sistem saraf pusat: menghambat reseptor asetilkolin nikotik medulla spinalis, menghambat saluran kalsium presinaps medulla spinalis, meningkatkan konsentrasi sinaps dopamin, meningkatkan neurotransmisi GABA, menghambat reseptor opioid, menghambat adrenoseptor α , menghambat reseptor kolinergik muskarinik, menghambat ikatan substansi P dengan reseptor sel *natural killer*.

Menariknya, kasiat anti inflamasi yang didapat ini terjadi pada konsentrasi obat anestesi yang lebih rendah daripada dosis yang diperlukan untuk menghambat saluran natrium. Kasiat anti inflamasi lidokain pada respon inflamasi, khususnya terhadap sel-sel inflamasi *polymorphonuclear granulocytes* (PMN), makrofag, dan monosit bukan karena efek blokade anestesi lokal pada saluran natrium.

PMN *priming* dapat diuraikan sebagai respon potensial PMN setelah terpapar dengan *agent priming* seperti TNF- α , *platelet-activating factor*, IL-8, lipopolisakarida, atau faktor koloni yang menstimulasi faktor makrofag. *PMN priming* merupakan mekanisme yang mengatur fungsi PMN dan berperan penting dalam menstimulasi jalur inflamasi secara berlebihan yang menyebabkan jaringan rusak. Beberapa mekanisme yang diduga penyebabnya adalah karena anestesi lokal mampu menghambat beberapa sinyal *G protein-coupled receptors* (GPC-Rs) yang memperantarai respon-respon inflamasi seperti asam lisopospatidik dan tromboksan A2 maupun reseptor asetikolin muskarinik m1. GPC-Rs terdiri dari

reseptor asetilkolin muskarinik M1-M5 yang mengatur banyak fungsi sistem saraf pusat dan perifer. Secara khusus sub tipe reseptor M1 dan M4 adalah target pengobatan terhadap berbagai gangguan sistem saraf pusat, seperti penyakit Alzheimer, skizofrenia, dan adiksi obat.



Gambar 2.8. Mekanisme kerja anestesi lokal pada inflamasi. (Dikutip dari: Hollman MW, Durieux ME. Local Anesthetics and the Inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology*. 2000; 93:858-75)

Wang HL dkk, 2013; Liu J dkk, 2013 menyebutkan efek anti inflamasi lidokain dapat terjadi pada berbagai jenis sel PMN termasuk monosit, dan makrofag. Lidokain mampu menghambat pembentukan superoksida dan aktivitas leukosit. Pada penelitian in vitro dan in vivo lidokain menunjukkan kemampuannya mengurangi respon inflamasi dan mempunyai efek anti infeksi. Lidokain juga dapat mengurangi agregasi trombosit, pelepasan histamin, melindungi permeabilitas

pembuluh darah, sebagai pemulung radikal bebas untuk radikal hidroksil, dan *oxygen singlets*.

Penelitian Liu J dkk, 2013 pada tikus sepsis yang diinduksi dengan injeksi *lipopolysaccharida* (LPS), menunjukkan pemberian lidokain intravena memberikan efek perlindungan terhadap disfungsi ginjal dan hati tikus sepsis dengan menurunkan regulasi TLR4, menghambat aktivasi NF- κ B dan menurunkan kadar sitokin pro inflamasi IL-6 dengan menghambat jalur penanda TLR4. Penelitian Wang HL dkk, 2011 membuktikan pemberian lidokain sistemik pada tikus sepsis yang diinduksi dengan *caecocolic ligation and puncture* (CLP) memberikan efek perlindungan terhadap cedera reperfusi iskemia dan peritonitis septik. Penelitian Wang HL dkk, 2014 pada pasien wanita yang menjalani histerektomi radikal, pemberian lidokain sistemik mampu melemahkan kadar protein HMGB1 serum, menghambat pelepasan HMGB1 sel mononuklear darah perifer, dan menghambat transkripsi mRNA HMGB1 sel mononuklear darah perifer.

D. EKSTRAKSI DNA

Isolasi DNA merupakan proses mengidentifikasi DNA dari suatu makhluk hidup dengan suatu proses ekstraksi DNA di dalam sel. Tujuan isolasi DNA adalah untuk memisahkan genom DNA dari molekul lain didalam suatu sel. DNA manusia dapat diisolasi melalui darah. Darah manusia terdiri dari plasma darah, globulus lemak, substansi kimiawi (karbohidrat, protein, dan hormon) serta gas (oksigen, nitrogen, dan karbondioksida). Plasma darah terdiri dari eritrosit (sel darah merah),

leukosit (sel darah putih), dan trombosit. Komponen darah yang diisolasi adalah sel darah putih. Sel darah putih dipilih karena memiliki nukleus, dimana terdapat DNA didalamnya (Yuwono T dkk, 2006).

Banyak metode yang digunakan untuk mengisolasi DNA tergantung pada spesimen yang akan dideteksi. Metode tersebut pada dasarnya memiliki prinsip yang sama, namun ada beberapa hal tertentu yang biasanya digunakan modifikasi untuk menghancurkan inhibitor yang ada didalam masing-masing specimen (Wikipedia, 2015).

Ada dua metode untuk mengisolasi DNA, yaitu: metode fisik dan metode kimiawi. Metode fisik adalah merusak sel secara mekanis, sel dibuat syok dengan cara memanaskan dan membekukan. Untuk metode pemanasan dan pembekuan, sel dilisiskan pada suhu tinggi dan kemudian didinginkan secara tiba-tiba dalam *freezer* sehingga sel mengalami syok, kemudian sel didenaturasi pada suhu 90-94^oC. Pada metode kimiawi sel dilisis dengan suatu zat kimia sehingga integrasi barrier sel terganggu. Prinsip isolasi DNA dengan teknik kimia ada dua, yaitu sentrifugasi dan presipitasi. Prinsip sentrifugasi adalah memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat terletak didasar sedangkan substansi yang lebih ringan berada diatas. Teknik sentrifugasi tersebut dilakukan didalam mesin sentrifuge dengan kecepatan yang bervariasi (Hatta M dkk, 2007).

Beberapa metode kimia yang dapat digunakan untuk ekstraksi DNA, antara lain:

1. Metode enzim proteinase-K

Dalam metode ini setelah sampel mendapat perlakuan dengan enzim, maka bila jumlah atau volume sampel kecil (kurang dari 100 μ l) dilanjutkan dengan metode Boom. Bila volume sampel besar (lebih dari 100 μ l) dilanjutkan dengan metode ekstraksi fenol dan presipitasi alkohol.

2. Metode Boom

Metode ini tidak dipakai jika sampel mengandung darah karena hemoglobin akan mempengaruhi proses PCR dan hemoglobin akan berikatan dengan bahan diatom yang dipergunakan.

3. Metode ekstraksi fenol dan presipitasi alkohol

Metode ini biasa digunakan untuk ekstraksi DNA pada sampel darah dan cairan tubuh. Hemoglobin dapat dihilangkan pada ekstraksi fenol. Metode kimia yang digunakan yaitu sel dihancurkan menggunakan senyawa kimia seperti buffer TES yang terdiri dari Tris, EDTA (*Etilen Diamin Tetra Acetat*) dan SDS (*Sodium Deodesil Sulfat*). Larutan EDTA berfungsi sebagai merusak sel dengan cara mengikat ion magnesium. Ion Magnesium tersebut untuk mempertahankan integritas sel dan aktivitas enzim nuklease yang dapat merusak asam nukleat. Adapun SDS adalah sejenis detergen yang bersifat basa kuat dapat digunakan untuk merusak membran sel. Hal ini mengakibatkan sel mengalami lisis. Kotoran atau debris yang timbul dari pengrusakan sel oleh EDTA dan SDS dibersihkan dengan proses

sentrifugasi sehingga yang tertinggal hanya molekul nukleotida (DNA dan RNA). Untuk menghilangkan protein dari larutan digunakan fenol kloroform dimana fenol berfungsi mengikat protein dan sebagian kecil RNA, sedangkan kloroform berfungsi untuk membersihkan protein dan polisakarida dari larutan. Protein juga dapat dihilangkan dengan bantuan enzim proteinase. Agar molekul RNA bersih dari larutan digunakan enzim RNase untuk merusak molekul tersebut, dengan hilangnya protein dan RNA maka dapat diisolasi DNA secara utuh. Untuk memurnikan DNA dilakukan dengan etanol 70% dan memekatkan DNA ditambahkan NH₄ asetat. Isopropanol ditambahkan untuk mengendapkan DNA berupa tepung berwarna putih, endapan DNA tersebut dimurnikan kembali sebelum dilarutkan dengan buffer TE (Hatta M dkk, 2007).

E. POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Reaksi rantai polimerasi (PCR) adalah suatu metode enzimatik untuk amplifikasi DNA dengan cara *in-vitro*. PCR pertama kali dikembangkan tahun 1985 oleh Kary B. Mullis. DNA pada PCR dapat dicapai bila menggunakan primer oligonukleotida yang disebut amplimers. Primer DNA merupakan suatu sekuens oligonukleotida pendek yang berfungsi mengawali sintesis rantai DNA PCR yang memungkinkan dilakukan pelipatgandaan suatu fragmen DNA. Umumnya primer yang digunakan pada PCR terdiri dari 20-30 nukleotida. DNA *template* (cetakan) yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan dan berasal dari patogen yang

terdapat dalam spesimen klinik. Enzim DNA polimerase merupakan enzim termostabil Taq dari bakteri termofilik *Thermus aquaticus*. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) menempal pada ujung 3' primer ketika proses pemanjangan dan ion magnesium merangsang aktivasi polimerase.

Pada proses PCR diperlukan beberapa komponen utama, yaitu:

1. DNA cetakan, yaitu fragmen DNA yang akan dilipatgandakan. DNA cetakan yang digunakan sebaiknya berkisar antara 10⁵–10⁶ molekul. Dua hal penting tentang cetakan adalah kemurnian dan kuantitas.
2. Oligonukleotida primer, yaitu suatu sekuens oligonukleotida pendek (18 – 28 basa nukleotida) yang digunakan untuk mengawali sintesis rantai DNA yang mempunyai kandungan G + C sebesar 50 – 60 % untuk kestabilan penempelan primer.
3. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dNTP, mengikat ion magnesium sehingga dapat mengubah konsentrasi efektif ion. Komponen ini yang diperlukan untuk reaksi polimerasi.
4. Enzim DNA Polimerase yaitu enzim yang melakukan katalis reaksi sintesis rantai DNA. Enzim ini diperoleh *Eubacterium* yang disebut *Thermus aquaticus*, spesies ini diisolasi dari taman *Yellowstone* pada tahun 1969. Enzim *polymerase Taq* tahan terhadap pemanasan berulang-ulang yang akan membantu melepaskan ikatan primer yang tidak tepat dan meluruskan wilayah yang mempunyai struktur sekunder.
5. Komponen pendukung yang lain adalah senyawa buffer. Larutan buffer PCR umumnya mengandung Tris-HCL 10-50 mM pH 8,3–8,8 (suhu 20⁰C);

KCl 50 mM; gelatin 0,1 % atau *Bovine Serum Albumine* (BSA); Tween 20 sebanyak 0,01 % atau dapat diganti dengan Triton X-100 sebanyak 0,1 % disamping itu perlu ditambahkan $MgCl_2$ 1,5 Mm (Yuwono T dkk, 2006).

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

a. Denaturasi

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

b. *Annealing* (penempelan primer)

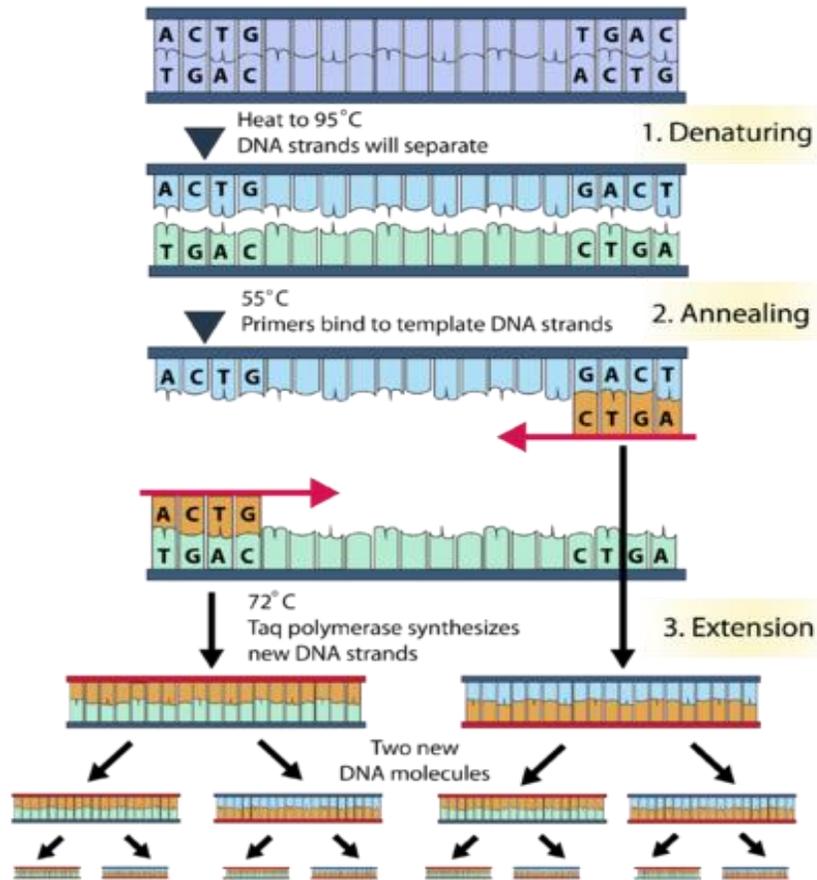
Kriteria yang umum digunakan untuk merancang primer yang baik adalah bahwa primer sebaiknya berukuran 18–25 basa, mengandung G + C 50-60 %

untuk kestabilan penempelan primer, pada proses ini kedua primer tersebut sebaiknya sama. Sekuens DNA masing-masing primer itu sebaiknya tidak saling berkomplemen karena, hal ini akan mengakibatkan terbentuknya struktur sekunder pada primer tersebut dan akan mengurangi efisiensi PCR.

Waktu *annealing* yang biasa digunakan dalam PCR adalah 30–45 detik. Semakin panjang ukuran primer yang diperiksa semakin tinggi temperatur yang dipakai. Kisaran temperatur penempelan yang digunakan adalah antara 36–72⁰C, namun suhu yang biasa dilakukan adalah antara 50–60⁰C.

c. *Extension* (pemanjangan primer)

Selama tahap ini Taq polimerase memulai aktivitasnya memperpanjang DNA primer dari ujung 3'. Kecepatan penyusunan nukelotida oleh enzim tersebut pada suhu 72⁰C diperkirakan 35–100 nukelotida/ detik. Hal ini bergantung pada buffer, pH, konsentrasi garam, dan molekul DNA target. Dengan demikian untuk menghasilkan PCR dengan panjang 2000 pasang basa waktu 1 menit sudah lebih dari cukup untuk tahap perpanjangan primer ini. Biasanya diakhir siklus PCR waktu yang digunakan untuk tahap ini bisa diperpanjang sampai 5 menit sehingga seluruh produk PCR diharapkan dapat membentuk DNA untai ganda.



Gambar 2.9. *Polymerase Chain Reaction* (Dikutip dari: Wikipedia. *Polymerase Chain Reaction*. (http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_Chain_Reaction)). Diakses 14 Juni 2015.

Reaksi-reaksi tersebut diatas diulangi lagi setiap 25–30 kali (siklus) sehingga pada akhir siklus akan diperoleh molekul-molekul DNA rantai ganda baru yang merupakan hasil polimerasi dalam jumlah yang jauh lebih banyak dibandingkan dengan jumlah DNA cetakan yang digunakan. Banyaknya siklus amplikasi tergantung pada konsentrasi DNA target dalam campuran reaksi.

Metode pemeriksaan PCR sangat sensitif, sensitifitas tersebut dapat digunakan untuk melipat gandakan satu molekul DNA. Metode ini juga sering digunakan untuk memisahkan gen-gen berkopi tunggal dari sekelompok sekuens genom. Dengan menggunakan metode PCR dapat diperoleh pelipat gandaan suatu fragmen DNA (110 bp, 5×10^{-19} mol) sebesar 200.000 kali setelah dilakukan 20 siklus reaksi selama 220 menit. Hal ini menunjukkan bahwa pelipat gandaan suatu fragmen DNA dapat dilakukan secara cepat. Kelebihan metode PCR adalah bahwa reaksi ini dapat dilakukan dengan menggunakan komponen dalam jumlah sangat sedikit, misalnya cetakan DNA yang diperlukan hanya sekitar 5 μ g, oligonukleotida yang diperlukan hanya sekitar 1 mM dan reaksi ini biasa dilakukan dalam volume 50–100 μ l. DNA cetakan yang digunakan juga tidak memerlukan pemurnian terlebih dahulu sehingga metode PCR dapat digunakan untuk melipatgandakan suatu sekuens DNA dalam genom bakteri hanya dengan mencampurkan kultur bakteri didalam tabung PCR.

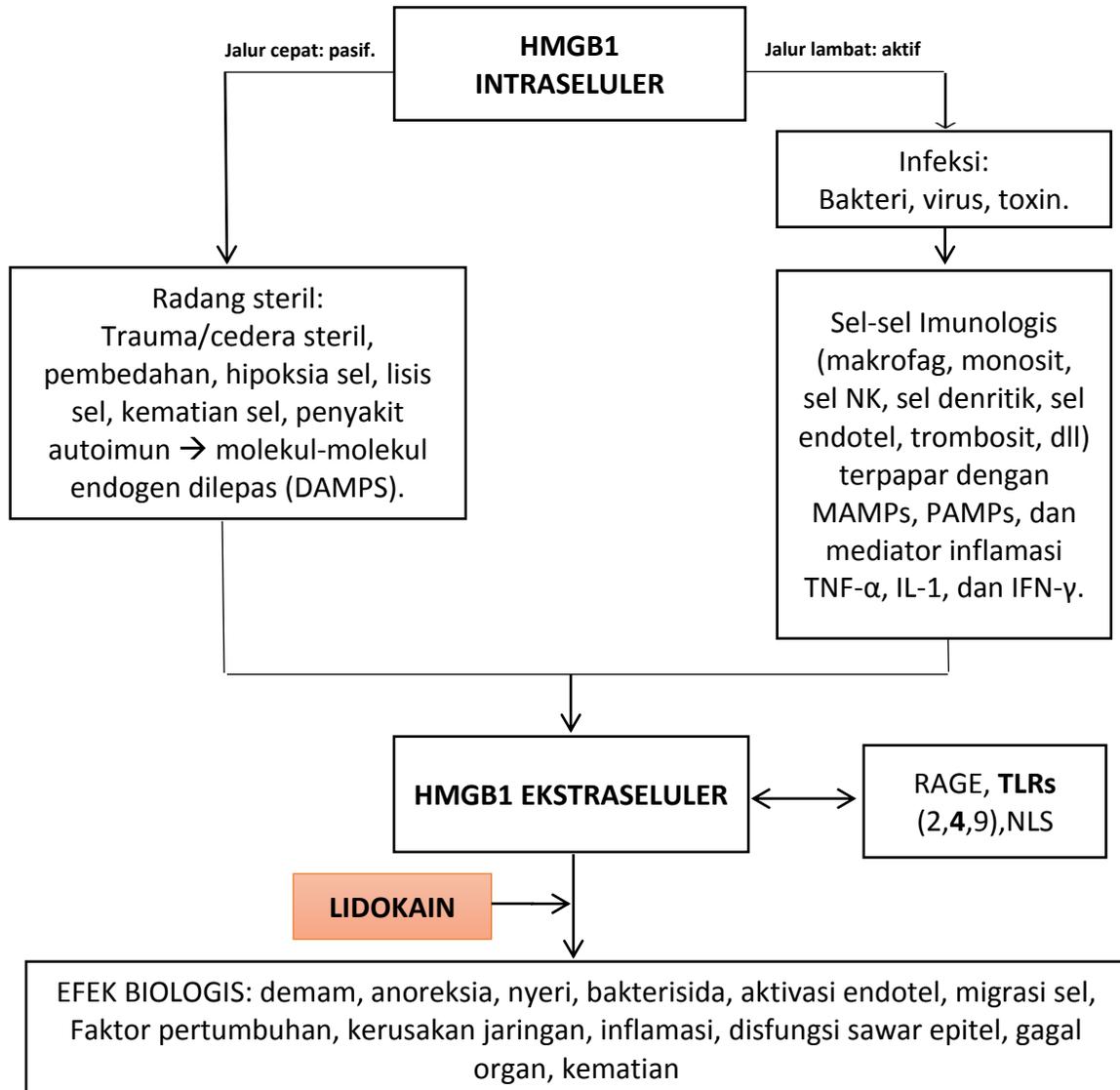
Teknik PCR dapat dimodifikasi ke dalam beberapa cara, yaitu:

- 1) *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), metode ini digunakan untuk membedakan organisme berdasarkan analisis model derivat dari perbedaan DNA.
- 2) *Inverse-PCR*, metode ini digunakan ketika hanya satu sekuens internal yang diketahui. *Template* dicerna dengan enzim restriksi yang memotong bagian luar daerah yang akan diamplifikasi, fragmen restriksi yang dihasilkan ditempelkan dengan ligasi dan diamplifikasi dengan menggunakan sekuens primer yang memiliki jarak titik ujung yang jauh satu

sama lain dengan segmen eksternal yang telah tergabung. Metode ini khusus digunakan untuk mengidentifikasi sekuens antara dari beragam gen.

- 3) *Nested-PCR*, proses ini memungkinkan untuk mengurangi produk selama amplikasi dari penyatuan primer yang tidak diperlukan dengan menggunakan dua set primer.
- 4) *Quantitative-PCR*, digunakan untuk pengukuran berulang hasil produk PCR. Metode ini secara tidak langsung digunakan untuk mengukur kuantitas jumlah DNA, cDNA, atau RNA. Hasil metode ini menampilkan kopi dari sampel.
- 5) *Reverse Transcriptase-PCR (RT-PCR)*, metode ini biasa digunakan untuk amplikasi, isolasi, atau identifikasi sekuens sel atau jaringan RNA. Metode ini dibantu oleh *reverse transcriptase* (RNA diubah menjadi cDNA), mencakup pemetaan, menggambarkan kapan dan dimana gen diekspresikan.

BAB III
KERANGKA TIORI



High mobility group box 1 (HMGB1) adalah protein kromatin yang ikut serta memelihara struktur nukleosom dan mengatur transkripsi genetik. Berbagai bukti memperlihatkan bahwa HMGB1 diperlukan dan merupakan mediator penting dari sepsis berat. Ketika dilepas dari inti sel, HMGB1 ekstraseluler diketahui dapat berinteraksi dengan berbagai reseptor dan sensor imun. Reseptor-reseptor ini termasuk *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) dan *toll-like receptors* (TLR2, TLR4, dan TLR9). Ikatan HMGB1 dengan reseptor TLR4 akan mengaktifasi jalur sinyal *nuclear factor kB* (NF-kB) dan memproduksi sitokin-sitokin seperti interleukin 6 (IL-6) dan *necrosis factor α* (TNF-α) melalui makrofag (Magna M dkk, 2014).

HMGB1 telah diteliti secara luas sebagai faktor transkripsi dan faktor pertumbuhan, dan telah diidentifikasi sebagai mediator sepsis berat. HMGB1 adalah sitokin proinflamasi yang cepat muncul pada cedera steril dan lambat muncul pada infeksi dan selalu dihubungkan dengan inflamasi sistemik dan memperburuk kegagalan organ. HMGB1 serum meningkat secara signifikan 8-72 jam setelah terpapar endotoksemia dibanding sitokin inflamasi TNF α dan IL-1β yang muncul lebih awal. Stresor inflamasi yang dipicu oleh tindakan pembedahan diperlukan untuk proses penyembuhan luka namun respon inflamasi yang berlebihan akan menyebabkan kegagalan organ.

Mekanisme kerja anti inflamasi anestesi lokal dihubungkan dengan kemampuannya menghambat sinyal dari beberapa reseptor gerbang protein G (*G protein-coupled receptors*) yang memediasi respon inflamasi. Lidokain sebagai anti inflamasi, bekerja menstabilkan membran sel dengan mengurangi pelepasan

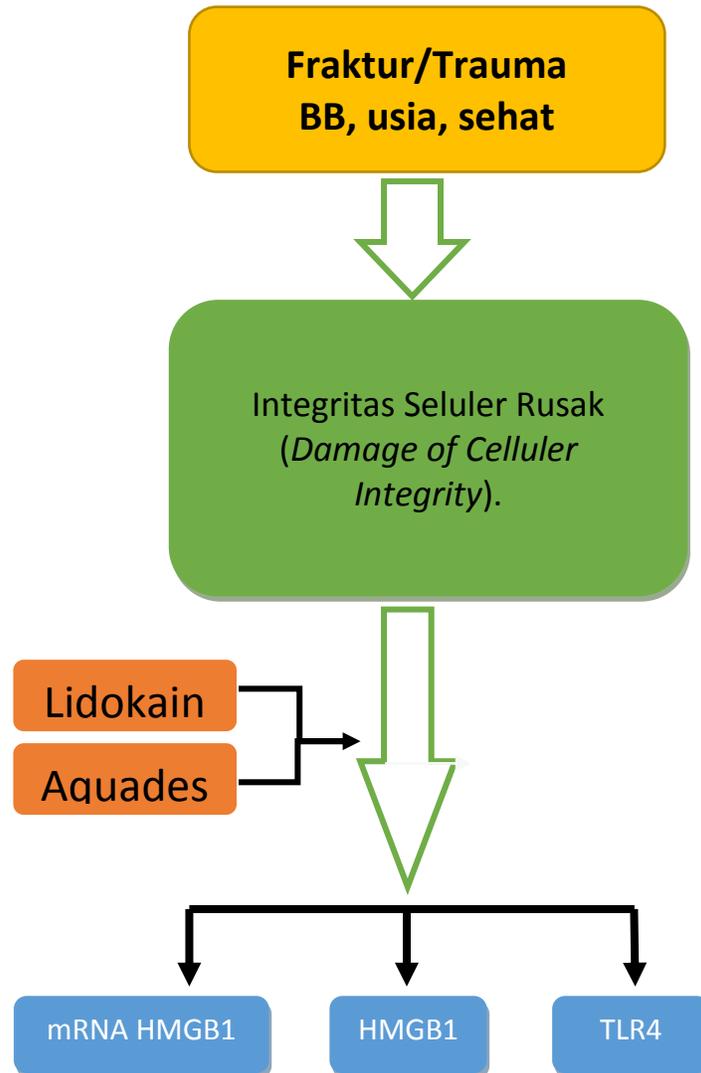
protease dari neutrofil atau makrofag. Lidokain mampu menghambat pelepasan sitokin inflamasi seperti leukotrin B₄, interleukin-1 α , dan histamin. Lidokain parenteral juga memperlihatkan kemampuan menghambat adesi neutrofil, migrasi dan akumulasi, aktivitas makrofag dan pelepasan enzim.

Penelitian Kang H dkk, 2011 mengungkapkan pemberian injeksi lidokain intravena pada model tikus sepsis dapat menghambat ekspresi HMGB1 makrofag, menurunkan tingkat serum HMGB1 tikus sepsis dan melindungi kegagalan organ hewan penelitian.

Penelitian Liu dkk, 2013 pada model sepsis tikus *Sprague-Dawley* menyatakan pemberian injeksi lidokain intravena memberikan efek perlindungan terhadap disfungsi hati dan ginjal dengan menurunkan regulasi *toll-like receptor 4* (TLR4).

BAB IV

KERANGKA KONSEP



Variabel bebas



Variabel kendali



Variabel antara



Variabel tergantung

BAB V

METODE PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorium prospektif pada hewan coba mencit BALB/c dengan menggunakan rancangan acak sederhana.

B. TEMPAT DAN WAKTU PENELITIAN

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar. Penelitian dilaksanakan pada bulan November sampai dengan Desember 2016 setelah seminar usulan penelitian disetujui dan mendapat persetujuan *ethical clearance* dari komite etik penelitian kesehatan FK UNHAS Makassar.

C. POPULASI DAN SAMPEL PENELITIAN

Populasi Sampel

Populasi penelitian ini menggunakan hewan coba mencit alur BALB/c putih, jantan, dewasa, sehat.

Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah semua populasi hewan coba mencit alur BALB/c putih, jantan, dewasa, sehat yang memenuhi kriteria inklusi.

D. KRITERIA INKLUSI

1. Mencit BALB/c putih, jantan, dewasa, sehat.
2. Umur 10-12 minggu.
3. Berat badan 35-40 gram
4. Tidak ada kecacatan

E. KRITERIA EKSKLUSI

Hewan coba alergi dengan injeksi ketamin, lidokain

F. KRITERIA *DROP OUT*

Hewan coba mati sebelum seluruh sampel darah diambil.

G. PENENTUAN JUMLAH SAMPEL

Jumlah sampel penelitian ditentukan mengikuti etika pemanfaatan hewan coba dalam penelitian kesehatan, dengan menggunakan prinsip *replacement*, *reduction*, dan *refinement* (Ridwan T dkk, 2013). Rumus Federer digunakan: $(t-1)(n-1) \geq 15$, dimana t adalah jumlah kelompok perlakuan dan n adalah jumlah sampel. Pada penelitian ini ada 2 kelompok perlakuan maka sesuai rumus diatas dibutuhkan setidaknya 8 ekor mencit per perlakuan. Jumlah total sampel yang diperlukan, yaitu 2 kelompok x 8 ekor = 16 ekor. Kemungkinan *drop out* hewan coba kira-kira 10-15 %, maka jumlah mencit yang dibutuhkan dibulatkan menjadi 20 ekor atau 10 ekor per kelompok.

H. CARA PENGAMBILAN SAMPEL

Cara pengambilan sampel adalah secara acak sederhana yaitu sesuai urutan pengambilan subyek penelitian dari kandang.

I. METODE KERJA

Subyek penelitian terdiri dari:

a. Kelompok lidokain (perlakuan)

Kelompok perlakuan adalah mencit BALB/c setelah 4 jam mengalami cedera muskuloskeletal diberi injeksi lidokain 2 mg/KgBB intravena melalui vena ekor, setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam. Dosis milligram lidokain di konversi menjadi volume dengan satuan mililiter (ml).

b. Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol adalah mencit BALB/c setelah 4 jam mengalami cedera muskuloskeletal diberi injeksi aquades steril intravena melalui vena ekor sebagai pengganti injeksi lidokain intravena.

Cara Penelitian

a. Persiapan Alat dan Bahan Penelitian

Alat penelitian yang digunakan :

1. Kandang, makanan, dan minuman Mencit.
2. Ketamin injeksi.
3. Meja tindakan, *needle holders* 2 buah.

4. Timbangan berat badan.
5. Spuit 1 ml, 3 ml, dan 5 ml.
6. Larutan lidokain 2 %, larutan aquades steril.
7. Tabung tempat darah.
8. Pipet mikro dan tip.
9. Sarung tangan steril dan non steril.
10. Alat tulis.
11. Kit PCR dan Kit ELISA.

Subjek penelitian sebelum dibuat mengalami cedera muskuloskeletal, darah mencit diambil terlebih dahulu dari vena ekor sebanyak 0,3 ml dan dicampur dengan larutan IL6 untuk mendapatkan ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan TLR4 pertama. Mencit kemudian di anestesi dengan injeksi ketamine 50 mg/ kg BB secara intraperitoneal. Setelah mencit tertidur dalam anestesia, paha kiri dicukur bersih. Cedera muskuloskeletal dilakukan secara steril, pangkal paha mencit dijepit kuat dengan satu *needle holders* untuk fiksasi dan pertengahan tulang paha yang sama juga dijepit dengan satu *needle holders* yang lain. Tulang paha kiri mencit dipatahkan dengan cara menggerakkan *needle holders* yang terdapat dibagian pertengahan paha ke arah atas dan ke bawah, berlawanan dengan *needle holders* yang ada di pangkal paha sampai terdengar bunyi krek, dan terasa krepitasi tulang pada paha yang patah ketika digerakkan dengan tangan. Mencit kemudian diletakkan tertidur dikandanganya, sesudah 4 jam mencit mengalami cedera

muskuloskeletal, darah mencit diambil kembali melalui vena ekor sebanyak 0,3 ml untuk menilai ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan TLR4 ke dua.

Mencit kelompok lidokain kemudian diberi injeksi lidokain dosis 2 mg/ kg BB melalui vena ekor, setiap 2 jam sekali secara terus menerus selama 24 jam, sedangkan kelompok kontrol diberi injeksi aquades steril sebagai pengganti lidokain. Dua jam setelah pemberian injeksi lidokain dan aquades steril selesai, darah mencit diambil kembali sebanyak 0,3 ml melalui vena ekor, untuk menilai ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 ke tiga. Semua sampel darah diperiksa laboratorium Mikrobiologi Molekuler dan Imunologi FK-UNHAS Makassar. Kadar protein HMGB1 dan protein TLR4 dideteksi dengan ELISA, sementara ekspresi mRNA HMGB1 dianalisis dan ditentukan dengan *quantitative real-time PCR*.

b. Preparasi DNA

1. Isolasi DNA dengan metode Boom (Hatta and Smits, 2007)

Reagen yang digunakan adalah suspensi diatom, larutan L6 (*buffer lisis*), larutan L2 (*buffer pencuci*), dan *TE buffer elusi*. Suspensi diatom dibuat dengan cara menambahkan 50 ml H₂O dan 500 µl dari 32 % (W/V) HCl (atau 445 µl dari 36 % HCl) kedalam 10 gr *high purity analytical grade cellite* (diatom) Jansen Chimica (Beerse, Belgium 10. 864. 79). Suspensi diatom dibagi dalam beberapa tabung steril kapasitas 2 ml, dimana setiap bagian terdiri dari 0,5 ml. Tabung hasil aliquots ditutup rapat dan disimpan

dalam kotak pada ruangan steril (mix room), 20 µl dari suspensi ini akan menangkap 10 µg DNA darah mencit.

2. Ekstraksi DNA dengan Metode Boom

100 µl sampel dicampur dengan 900 µl larutan buffer lisis L6 pada tabung yang mempunyai penutup berupa skrup kemudian campuran ini disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Sedimen sampel yang telah dipekatkan ini dihomogenkan selama 30 menit. Sebelum ditambah suspensi diatom, campuran buffer L6 yang telah mengandung DNA hasil ekstraksi disentrifus selama 2-3 menit dengan kecepatan 12.000 rpm, dengan tujuan agar hasil ekstraksi DNA mengendap di dasar tabung. Suspensi diatom 20 µl ditambahkan kedalam tabung, suspensi diatom harus selalu divortex dan diaduk dengan menggunakan *gyratory shake* dengan kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran diatom dan buffer L6 divortex kembali menggunakan mikrosentrifus Eppendorf dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dari setiap tabung dipisahkan menggunakan pengisap pipet Pasteur plastik tanpa balon udara dan dihubungkan dengan *Vacuum Pump*, untuk mencegah hilangnya diatom dalam suspensi sekitar 10 mikroliter suspensi tersebut disisakan.

Supernatan dicuci sebanyak 2 kali dengan menggunakan 1 ml pencuci L2. Buffer pencuci L2 ditambahkan sebanyak 1 ml, divortex dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik, kemudian supernatan dibuang. Endapan dicuci kembali dengan 1 ml etanol 70 %

sebanyak 2 kali, lalu divortex dan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik, supernatannya dibuang, endapan dicuci lagi dengan 1 ml aseton, divortex dan di sentrifus pada 12.000 rpm selama 15 detik kemudian supernatan kembali dibuang. Aseton yang tersisa dalam endapan diuapkan dengan membuka penutup vial dan dipanaskan dengan oven pada suhu 50-55 °C selama kurang lebih 10 menit.

Setelah sedimen mengering, *TE buffer elusi* ditambahkan sebanyak 60 ml, kemudian divortex secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut dalam larut. Kemudian vial diinkubasi dalam oven pada suhu 56°C selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 30 detik, supernatan diambil sebanyak 40-50 µl secara hati-hati dan dimasukkan kedalam tabung vial baru. Hasil ekstraksi ini disimpan pada suhu -20°C atau -80°C.

c. Deteksi Ekspresi mRNA HMGB1 dengan PCR (Zetterstorm CK dkk, 2006)

1. Cara kerja realtime PCR untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen HMGB1.

Proses gen spesifik oligonukleotida primer untuk GAPDH sebagai house keeping gene (internal kontrol).

Mendeteksi gen mRNA HMGB1 dengan menggunakan primer spesifik forward: GAG ATC CTA AGA AGC CGA GA, dan HMGB1 reverse: CTT CCT CAT CCT CCT ATC. Protokol PCR: dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94°C selama 3 menit, siklus diulang 38 kali dengan 54°C (30 detik). Mendeteksi gen GAPDH dengan menggunakan forward/ sense primer: GAC CAC AGT CCA

TGC CAT CA, dan GAPDH reverse/ antisense primer: CAT CAC BCC ACA CTT TCC. Protokol PCR: 94°C (10 menit); 32 siklus 54°C (30 detik). QRT-PCR menggunakan Green QRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrumen M x 4000. 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 4°C 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 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 disentrifus dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin *real time* PCR (CFX Connect system, Biorad Laboratories, real time PCR 96 well 0.1 ml, USA)

2. 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:

KONSENTRASI 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 (= $\log 50 = 1.698$)

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.

Normalisasi konsentrasi gen target, jumlah dengan sendirinya dapat digunakan untuk membandingkan jumlah relatif gen target di berbagai sampel, ditentukan dengan membagi konsentrasi target oleh konsentrasi GAPDH.

3. Membandingkan 2 sampel gen

Setelah RT-PCR maka dilakukan kuantisasi amplifikasi gen dengan menentukan ambang siklus (Ct).

Kuantisasi relatif ekspresi gen target dievaluasi menggunakan metode perbandingan Ct.

Nilai ΔCt ditentukan dengan cara mengurangkan target Ct masing-masing sampel dengan nilai Ct dari GAPDHnya.

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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

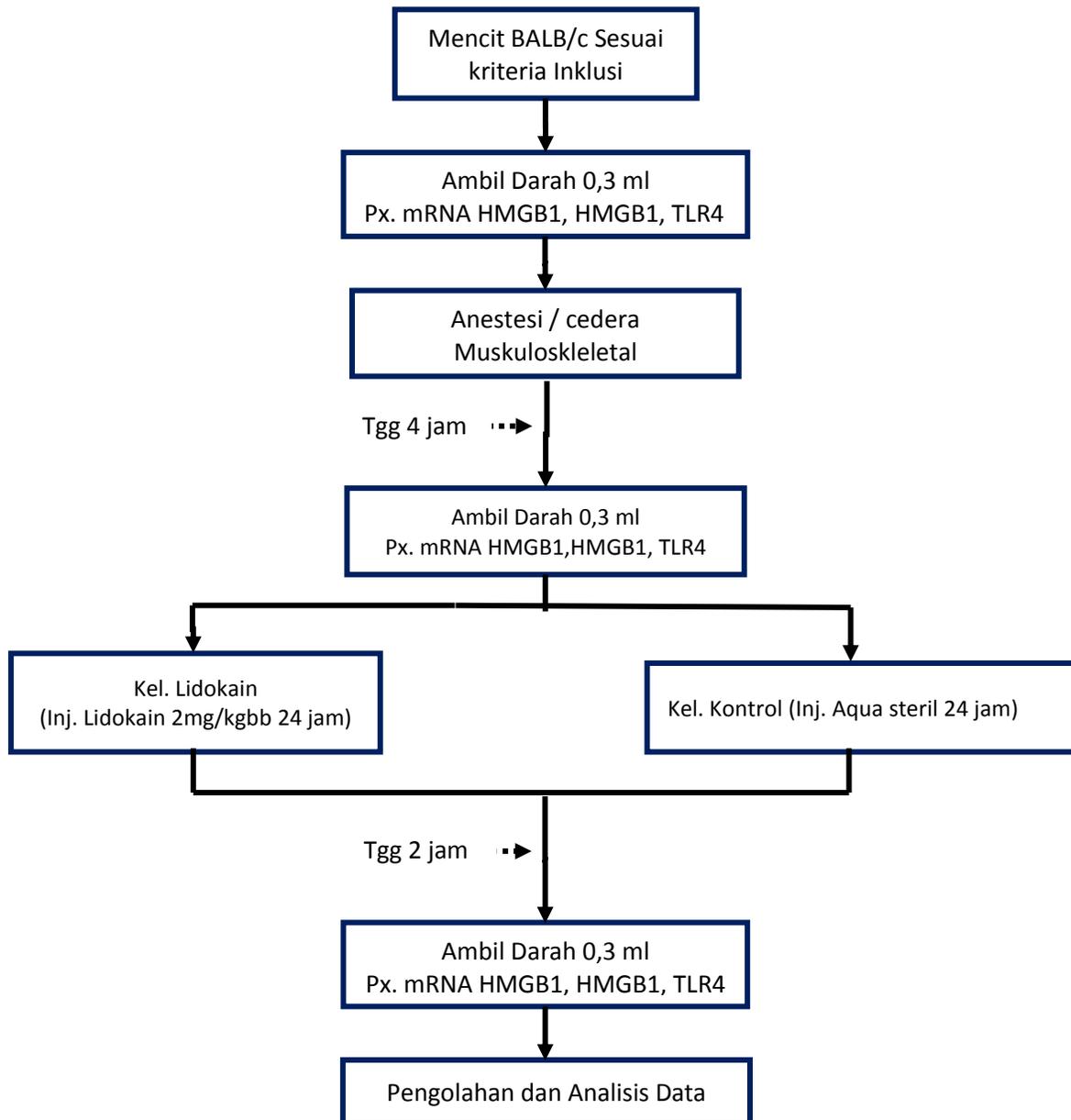
RUMUS :

Perbedaan kelipatan dalam membandingkan ekspresi gen 1 dengan ekspresi gen 2 = $[2^{-\Delta\Delta Ct}]$

Dimana:

$\Delta\Delta Ct = \{rata\ rata\ (triplicate)\ Ct\ (\Delta Ct_1)\ sampel\ 1\} - \{rata\ rata\ (triplicate)\ Ct\ (\Delta Ct_2)\ sampel\ 2\}$

I. ALUR PENELITIAN



Gambar 5.1. Rancangan alur penelitian

J. IJIN PENELITIAN DAN *ETHICAL CLEARANCE*

a. Ijin Penelitian

Penelitian dilaksanakan setelah mendapatkan rekomendasi persetujuan etik (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan nomor registrasi UH16050436 tertanggal 28 Oktober 2016. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Molekular dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar pada akhir bulan November 2016 sampai awal Desember 2016.

b. *Ethical Clearance* (Etika Penelitian)

Perlakuan terhadap hewan coba mengikuti tata cara dan prinsip yang telah baku yaitu perjanjian Helsinki. Hewan mencit akan diberlakukan sebagai berikut :

- Sebagai makhluk perasa.
- Perlakuan pengandangan, pencahayaan dan ventilasi serta pemberian makanan selama percobaan disesuaikan dengan prosedur perlakuan hewan coba untuk penelitian kedokteran.
- Pembiusan serta perlakuan trauma/ cedera muskuloskeletal terhadap hewan coba disesuaikan dengan acuan penelitian kedokteran.
- Sterilitas tindakan pembiusan dan trauma/ cedera muskuloskeletal dibuat menyerupai sterilitas tindakan operasi pada manusia.
- Sebelum trauma/ cedera muskuloskeletal dilakukan terhadap mencit, maka subjek penelitian dibius dengan teknik yang baik dan tidak menyakiti hewan.

- Hewan yang telah selesai diteliti akan dieuthanasia dan dikubur seleyaknya seperti manusia, sesuai perilaku etik terhadap hewan coba.

K. IDENTIFIKASI VARIABEL DAN KLASIFIKASI VARIABEL PENELITIAN

1. Identifikasi Variabel

- a) Larutan lidokain 2%
- b) Larutan aquades steril
- c) Berat badan mencit
- d) Cedera muskuloskeletal paha kiri mencit
- e) Ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 sebelum mencit BALB/c mengalami cedera steril.
- f) Ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4 setelah 4 jam mencit BALB/c mengalami cedera steril.
- g) Ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1 dan protein TLR4 setelah 2 jam BALB/c selesai mendapat injeksi lidokain dan aquades steril secara terus menerus selama 24 jam.

2. Klasifikasi Variabel

a. Berdasarkan Jenis Data dan Skala Pengukuran

1. Variabel kategorial

- a) Kelompok kontrol: larutan aquades steril

b) Kelompok perlakuan: larutan lidokain 2%

2. Variabel numerik

- Berat badan mencit, ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4.

b. Berdasarkan Jenis Variabel

1. Variabel bebas :

Larutan lidokain 2%, larutan aquade steril.

2. Variabel tergantung :

Ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4.

3. Variabel kendali :

Umur, berat badan, tidak cacat, derajat cedera.

4. Variabel antara :

Kerusakkan integritas seluler

L. DEFINISI OPERASIONAL DAN KRITERIA OBJEKTIF

Definisi Operasional

a) Kelompok Lidokain

Kelompok lidokain adalah semua mencit BALB/c yang diambil darahnya sebelum mengalami cedera muskuloskeletal, sesudah 4 jam mengalami cedera muskuloskeletal, dan setelah 2 jam pemberian injeksi lidokain intravena 24 jam selesai.

b) Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol adalah semua mencit BALB/c yang diambil darahnya sebelum mengalami cedera muskuloskeletal, sesudah 4 jam mengalami cedera muskuloskeletal, dan setelah 2 jam pemberian injeksi aquades steril intravena 24 jam selesai.

c) Cedera muskuloskeletal.

Adalah cedera muskuloskeletal yang dilakukan setelah mencit BALB/c dianestesi dengan injeksi ketalar 50 mg/KgBB intraperitoneal.

Cedera muskuloskeletal dilakukan secara tertutup, pangkal paha mencit dijepit kuat dengan satu *needle holders* dan pertengahan tulang paha yang sama dijepit juga dengan satu *needle holders* yang lain. Tulang paha kiri mencit dipatahkan dengan cara menggerakkan *needle holders* yang terdapat dibagian pertengahan paha ke arah atas dan ke bawah, berlawanan dengan *needle holders* yang ada di pangkal paha sampai terdengar bunyi krek, dan terasa krepitasi tulang pada paha yang patah ketika digerakkan.

d) Umur mencit BALB/c

Umur semua sampel penelitian berkisar antara 10-12 minggu.

e) Berat badan mencit BALB/c

Berat badan semua sampel penelitian berkisar antara 35-45 gram.

f) Penyuntikan lidokain intravena

Penyuntikan lidokain dilakukan setelah mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal selama 4 jam, darah mencit diambil sebanyak 0,3 ml dari vena ekor, lalu mencit diberi injeksi lidokain 2 mg/KgBB melalui vena ekor, setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam.

g) Penyuntikan aquades steril

Penyuntikan aquades steril dilakukan setelah mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal selama 4 jam, darah mencit diambil sebanyak 0,3 ml dari vena ekor, lalu mencit diberi injeksi aquades steril sebagai pengganti injeksi lidokain, setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam

h) Pengukuran ekspresi mRNA HMGB1

Pemeriksaan ekspresi mRNA HMGB1 dideteksi dengan teknik RT-PCR sebelum mencit cedera muskuloskeletal, 4 jam sesudah mengalami cedera muskuloskeletal, dan 2 jam sesudah injeksi lidokain dan aquades steril intravena 24 jam selesai.

i) Pengukuran kadar protein HMGB1, protein TLR4

Pemeriksaan kadar protein HMGB1, protein TLR4 dideteksi dengan teknik ELISA sebelum mencit mengalami cedera muskuloskeletal, 4 jam sesudah mengalami cedera muskuloskeletal, dan 2 jam sesudah pemberian injeksi lidokain dan aquades steril intravena 24 jam selesai.

Kriteria Objektif

- a. Mencit BALB/c dikatakan sehat bila aktif bergerak, mata bersinar, bulu tidak kusam, dan tidak ada cacat.

- b. Dosis mg/KgBB lidokain dikonversi menjadi volume dengan satuan ml.
- c. Larutan aquades steril diberikan dalam satuan ml disesuaikan dengan volume lidokain.
- d. Ekspresi mRNA HMGB1 dinilai dalam *relative level*.
- e. Kadar protein HMGB1 dinyatakan dalam pikogram (pg/ml).
- f. Kadar protein TLR4 dinyatakan dalam nanogram (ng/ml).

M. PENGOLAHAN DAN ANALISIS DATA

Data yang diperoleh diolah dan hasilnya ditampilkan dalam bentuk narasi, tabel atau grafik. Analisis statistik menggunakan peranti SPSS 23 dengan metode uji sebagai berikut:

1. Normalitas ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 hewan coba diuji dengan uji Kolmogorov-Smirnov .
2. Perubahan dinamika ekspresi mRNA HMGB1 dengan kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 diantara kelompok perlakuan hewan coba diuji dengan uji t.
3. Dinamika perubahan kadar protein HMGB1 dengan protein TLR4 pada masing-masing kelompok perlakuan hewan coba diuji dengan uji t.
4. Hubungan antara parameter sitokin pro inflamasi protein HMGB1 dan protein TLR4 pada masing-masing kelompok hewan coba diuji dengan uji t.

BAB VI

HASIL PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar dari tanggal 28 November 2016 sampai dengan 2 Desember 2016. Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi proses inflamasi yang terjadi setelah mencit BALB/c mengalami cedera tertutup tulang paha kiri (muskuloskeletal) dan untuk mengetahui kasiat pemberian injeksi lidokain intravena sebagai anti inflamasi terhadap inflamasi yang terjadi dilihat dari dinamika profil ekspresi mRNA HMGB1, Protein HMGB1, dan protein TLR4.

Pemeriksaan data dasar meliputi berat badan, jenis kelamin, dan usia mencit. Subjek penelitian kemudian dibagi menjadi 2 kelompok yaitu kelompok perlakuan (lidokain) dan kelompok kontrol (aquades steril), masing-masing terdiri dari 10 ekor mencit BALB/c.

Sebagai langkah awal sebelum intervensi dilakukan terhadap kedua kelompok penelitian, sampel darah diambil sebanyak 0,3 ml dari vena ekor setiap mencit untuk memperoleh nilai dasar ekspresi mRNA HMGB1 diperiksa dengan teknik qPCR dan nilai dasar kadar protein HMGB1 dan protein TLR4 diperiksa dengan teknik ELISA. Data yang diperoleh selanjutnya di olah menggunakan peranti lunak statistik SPSS Versi 23.

Normalitas sampel data dianalisis dengan uji Kolmogorov-Smirnov dan sampel data di uji statistik dengan uji t.

1. Ekspresi mRNA HMGB1

Profil ekspresi mRNA HMGB1 pada kedua kelompok penelitian dapat dilihat pada tabel 6.1.1 dan tabel 6.1.2.

Tabel 6.1.1. Profil Ekspresi mRNA HMGB1 sebelum cedera dan setelah cedera muskuloskeletal

Kelompok	(Mean ± SD) Ekspresi mRNA HMGB1		P
	Awal (Sebelum Cedera)	4 Jam Setelah Cedera	
Kontrol (n=10)	6,75± 0,36	11,29 ± 0,64	0,00
Lidokain (n=10)	6,73± 0,66	11,90± 0,62	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai p < 0,05 dinyatakan signifikan.

Ekspresi mRNA HMGB1 pada awal / sebelum cedera pada kelompok lidokain adalah mean 6,73 dan pada kelompok kontrol adalah mean 6,75. Ekspresi mRNA HMGB1 setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal meningkat pada ke dua kelompok, masing-masing pada kelompok perlakuan mean

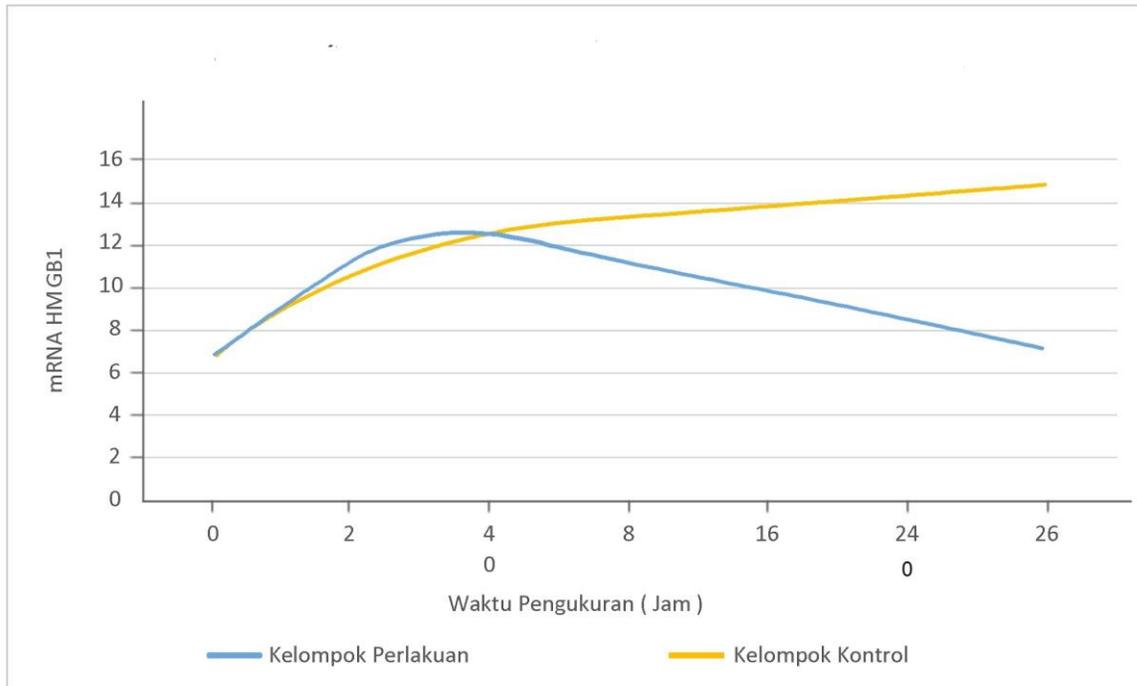
11,90 dan kelompok kontrol mean 11,29. Peningkatan ekspresi mRNA HMGB1 ini secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.

Tabel 6.1.2. Profil Ekspresi mRNA HMGB1 kedua kelompok setelah injeksi lidokain

Kelompok	(Mean \pm SD) Ekspresi mRNA HMGB1		P
	4 Jam Setelah cedera (sebelum injeksi lidokain)	2 Jam setelah injeksi Lidokain	
Kontrol (n=10)	11,29 \pm 0,64	13,49 \pm 0,49	0,00
Lidokain (n=10)	11,90 \pm 0,62	6,94 \pm 0,51	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai $p < 0,05$ dinyatakan signifikan.

Pengamatan terhadap profil ekspresi mRNA HMGB1 setelah pemberian injeksi lidokain intravena didapatkan, ekspresi mRNA HMGB1 turun dari nilai mean 11,90 ke mean 6,94, dan secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$. Sedangkan pada kelompok kontrol setelah pemberian injeksi aquades steril intravena selesai, ekspresi mRNA HMGB1 meningkat terus dari mean 6,75 ke mean 11,29 dan ke mean 13,49 dan peningkatan ini secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.



Grafik 6.1. Dinamika mean ekspresi mRNA HMGB1 pada kedua kelompok penelitian.

2. Kadar Protein HMGB1

Profil kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok penelitian dapat dilihat pada tabel 6.2.1 dan tabel 6.2.2.

Tabel 6.2.1. Profil kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok setelah cedera Muskuloskeletal.

Kelompok	(Mean \pm SD) Protein HMGB1		P
	Awal (Sebelum cedera)	4 jam setelah cedera	
Kontrol (n=10)	303,33 \pm 188,05	1682,67 \pm 274,62	0.00
Lidokain (n=10)	306,44 \pm 158,54	1819,66 \pm 239,50	0.00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai p < 0,05 dinyatakan signifikan.

Kadar protein HMGB1 pada awal pengambilan darah/ sebelum cedera pada kelompok lidokain adalah mean 306,44 dan pada kelompok kontrol adalah 308,33. Kadar protein HMGB1 setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal meningkat pada kedua kelompok, masing-masing pada kelompok lidokain nilai mean 1819,66 dan pada kelompok kontrol nilai mean 1682,67. Kadar protein HMGB1 awal bila dibandingkan dengan kadar protein HMGB1 setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal, terjadi peningkatan dan secara statistik

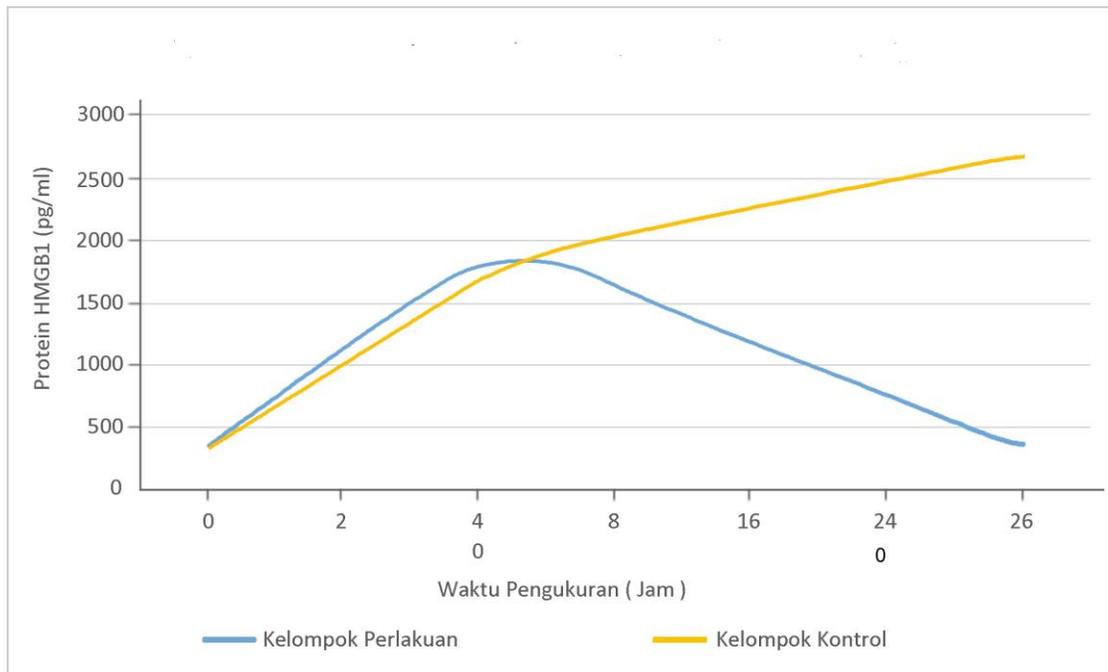
bermakna, nilai $p < 0,05$. Cedera muskuloskeletal yang dialami mencit BALB/c menimbulkan radang steril.

Tabel 6.2.2. Profil kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain.

Kelompok	(Mean \pm SD) Protein HMGB1		P
	4 jam setelah cedera (sebelum injeksi lidokain)	2 jam setelah injeksi lidokain	
Kontrol (n=10)	1682,67 \pm 274,62	2662,70 \pm 269,98	0.00
Lidokain (n=10)	1819,66 \pm 239,50	417,00 \pm 222,86	0.00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai $p < 0,05$ dinyatakan signifikan.

Pengamatan terhadap profil kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain setelah 2 jam pemberian injeksi lidokain intravena selesai, nilai mean turun dari 1819,66 ke mean 417,00, dan secara statistik penurunan ini bermakna, nilai $p < 0.05$. Pada kelompok kontrol kadar protein HMGB1 meningkat terus setelah pemberian injeksi aquades steril intravena selama 24 jam selesai, dari mean 308,33 ke mean 1682,67 dan ke mean 2662,79 dan peningkatan ini secara statistik bermakna, $p < 0,05$.



Grafik 6.2. Dinamika mean kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok penelitian.

3. Kadar Protein TLR4

Profil kadar protein TLR 4 pada kedua kelompok penelitian dapat dilihat pada tabel 6.3.1 dan tabel 6.3.2.

Tabel 6.3.1. Profil kadar protein TLR4 pada kedua kelompok setelah cedera muskuloskeletal

Kelompok	(Mean \pm SD) Kadar Protein TLR4		P
	Awal (sebelum cedera)	4 jam setelah cedera	
Kontrol (n=10)	0,31 + 0,18	1,67 \pm 0,26	0,00
Lidokain (n=10)	0,30 \pm 0,13	1,83 \pm 0,24	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai p < 0,05 dinyatakan signifikan.

Kadar protein TLR 4 pada awal pengambilan darah (sebelum cedera steril) pada kelompok lidokain adalah mean 0,30 dan pada kelompok kontrol adalah mean 0,31. Kadar protein TLR4 setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal meningkat pada kedua kelompok penelitian, masing-masing meningkat dari mean 0,30 ke mean 1,83 pada kelompok lidokain dan dari mean 0,31 ke mean 1,67 pada

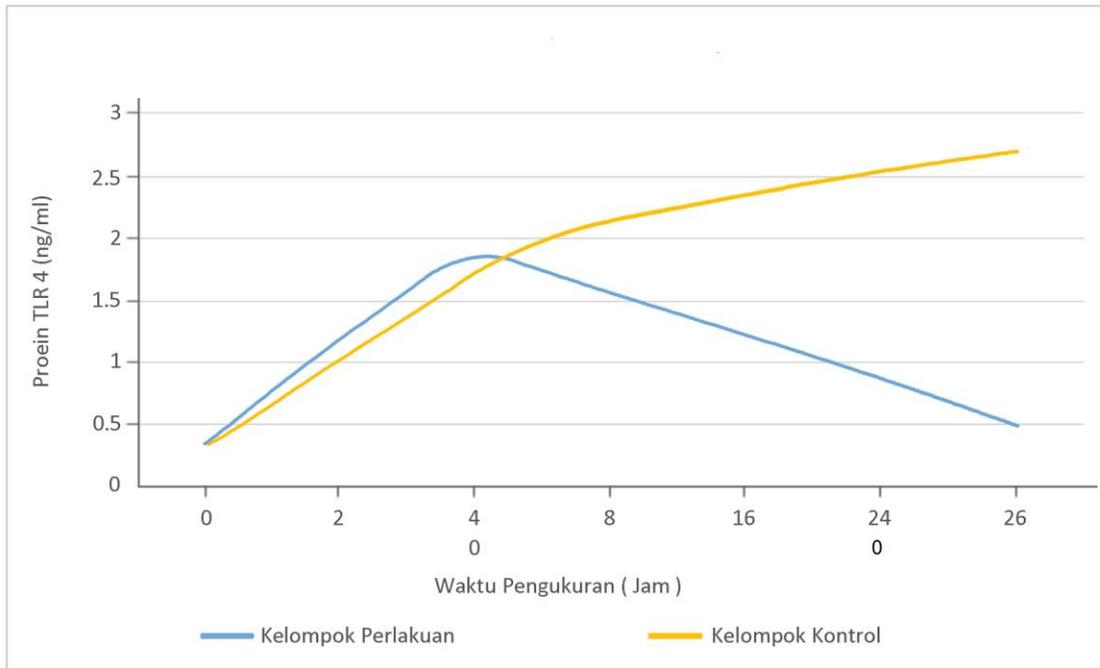
kelompok kontrol. Peningkatan kadar protein TLR4 ini secara statistik bermakna pada kedua kelompok penelitian, nilai $p < 0,05$.

Tabel 6.3.2. Profil kadar protein TLR4 pada kedua kelompok setelah injeksi lidokain.

Kelompok	(Mean \pm SD) Kadar Protein TLR4		P
	4 jam setelah cedera (sebelum injeksi lidokain)	2 jam setelah injeksi lidokain	
Kontrol (n=10)	1,67 \pm 0,26	2,65 \pm 0,28	0,00
Lidokain (n=10)	1,83 \pm 0,24	0,56 \pm 0,17	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai $p < 0,05$ dinyatakan signifikan.

Pengamatan terhadap profil kadar protein TLR4 setelah 2 jam pemberian injeksi lidokain intravena, nilai mean pada kelompok perlakuan turun dari nilai mean 1,83 ke mean 0,56 dan penurunan ini secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$. Sedangkan pada kelompok kontrol setelah 2 jam pemberian injeksi aquades steril intravena kadar TLR4 terus meningkat terus dari nilai mean 0,31 ke mean 1,67 dan ke mean 2,65 dan peningkatan ini secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.



Grafik 6.3. Dinamika mean protein TLR 4 pada kedua kelompok penelitian.

Hasil analisis ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain dapat dilihat pada tabel 6.4.

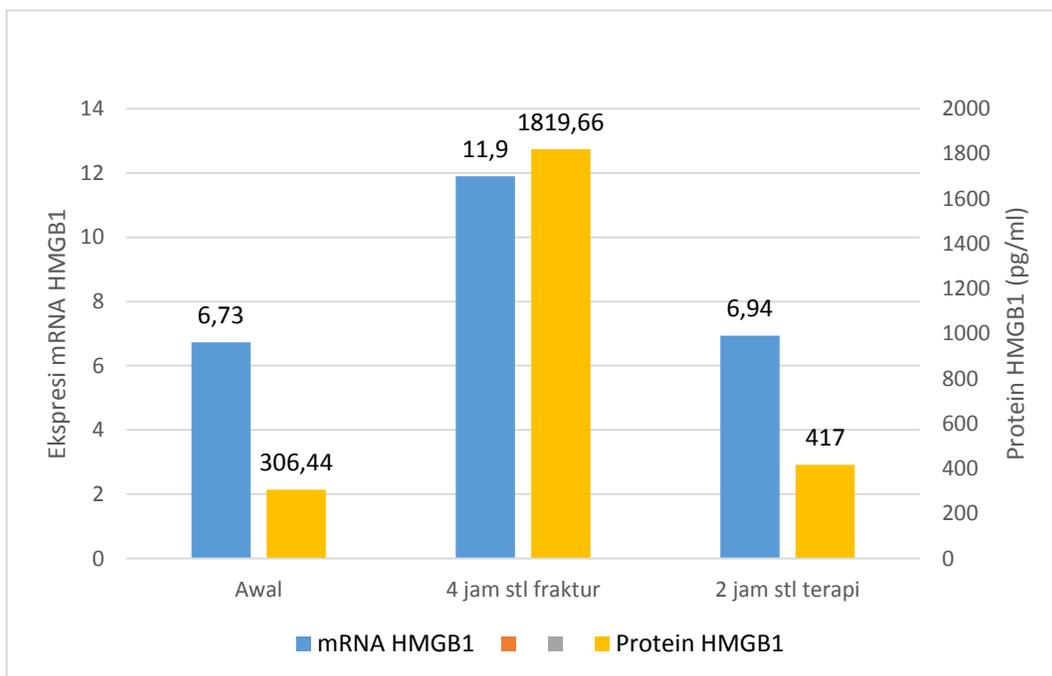
Tabel 6.4. Gambaran ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain

Variabel	Ekspresi mRNA HMGB1 dan Protein HMGB1 (Mean \pm SD)			P
	Awal (sebelum cedera)	4 jam setelah cedera (sebelum Injeksi lidokain)	2 jam setelah injeksi lidokain	
mRNA HMGB1 (n=10)	6,73 \pm 0,66	11,90 \pm 0,62	6,94 \pm 0,51	0,00
Protein HMGB1 (n=10)	306,44 \pm 158,54	1819,66 \pm 239,50	417,00 \pm 222,86	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai p < 0,05 dinyatakan signifikan.

Pengamatan terhadap dinamika ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada kedua kelompok setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal menunjukkan peningkatan tinggi, dan secara statistik bermakna, nilai p < 0,05. Selanjutnya pada pengamatan 2 jam setelah pemberian injeksi lidokain 2 mg/kgBB intravena setiap 2 jam sekali selama 24 jam selesai, peningkatan ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 turun pada kelompok lidokain, masing-masing mRNA HMGB1 turun dari nilai mean 11,90 ke mean 6,94 dan kadar protein HMGB1 turun dari mean 1819,66 ke mean 417,00.

Bila dibandingkan nilai mean awal kelompok lidokain mRNA HMGB1 dengan nilai mean setelah 2 jam pemberian injeksi lidokain intravena 24 jam selesai, terjadi peningkatan tetapi secara statistik tidak bermakna, nilai $p > 0,05$. Begitu juga peningkatan kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain secara statistik tidak bermakna, nilai $p > 0,05$.



Gambar 6.1. Gambaran ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain.

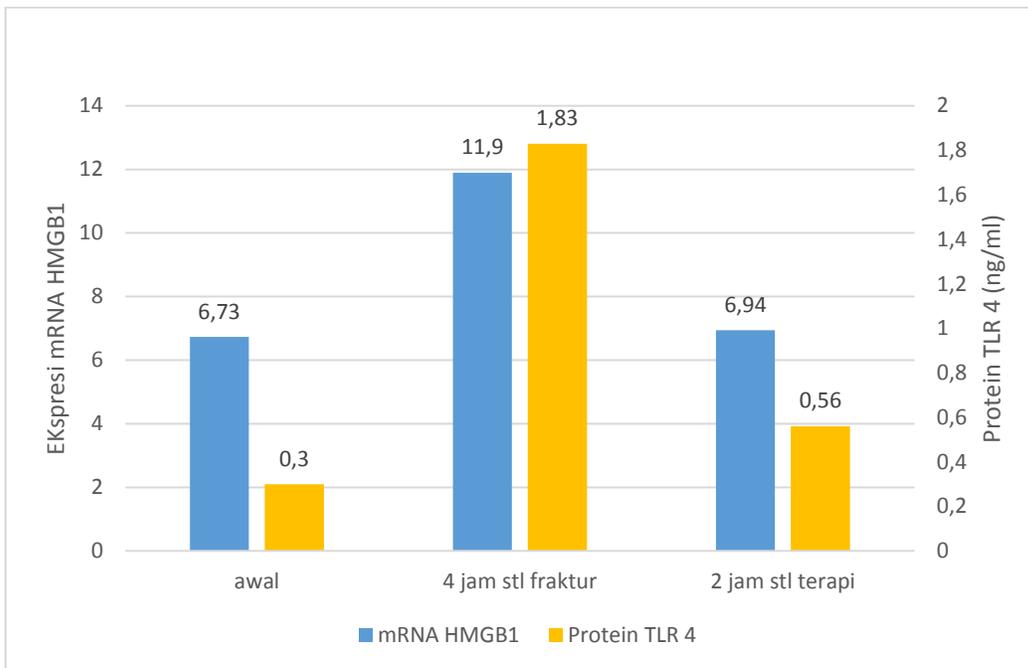
Hasil analisis ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein TLR4 kelompok lidokain dapat dilihat pada tabel 6.5.

Tabel 6.5. Gambaran ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein TLR4 pada kelompok lidokain

Variabel	Ekspresi mRNA HMGB1 Dan Protein TLR4 (Mean \pm SD)			P
	Awal (sebelum cedera)	4 jam stlh cedera (sblm injeksi lidokain)	2 jam setelah injeksi lidokain	
mRNA HMGB1 (n=10)	6,73 \pm 0,66	11,90 \pm 0,62	6,94 \pm 0,51	0,00
Protein TLR4 (n=10)	0.30 \pm 0,13	1,83 \pm 0,24	0,56 \pm 0,17	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai p < 0,05 dinyatakan signifikan.

Pengamatan terhadap dinamika ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein TLR4 pada kedua kelompok lidokain setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal menunjukkan peningkatan bila dibandingkan dengan nilai awal masing-masing kelompok dari mean 6,73 menjadi 11,90 dan dari mean 0.30 menjadi 1,83. Peningkatan ini secara statistik bermakna, nilai p < 0,05. Dua jam setelah pemberian injeksi lidokain intravena 24 jam selesai, ekspresi mRNA HMGB1 dan protein TLR4 turun, masing-masing dari nilai mean 11,90 ke mean 6,94 dan dari mean 1,83 ke mean 0,56. Nilai mean awal mRNA HMGB1 bila dibandingkan dengan nilai mean akhir mRNA HMGB1 pada kelompok lidokain, terjadi peningkatan tetapi secara statistik tidak, nilai p > 0,05.



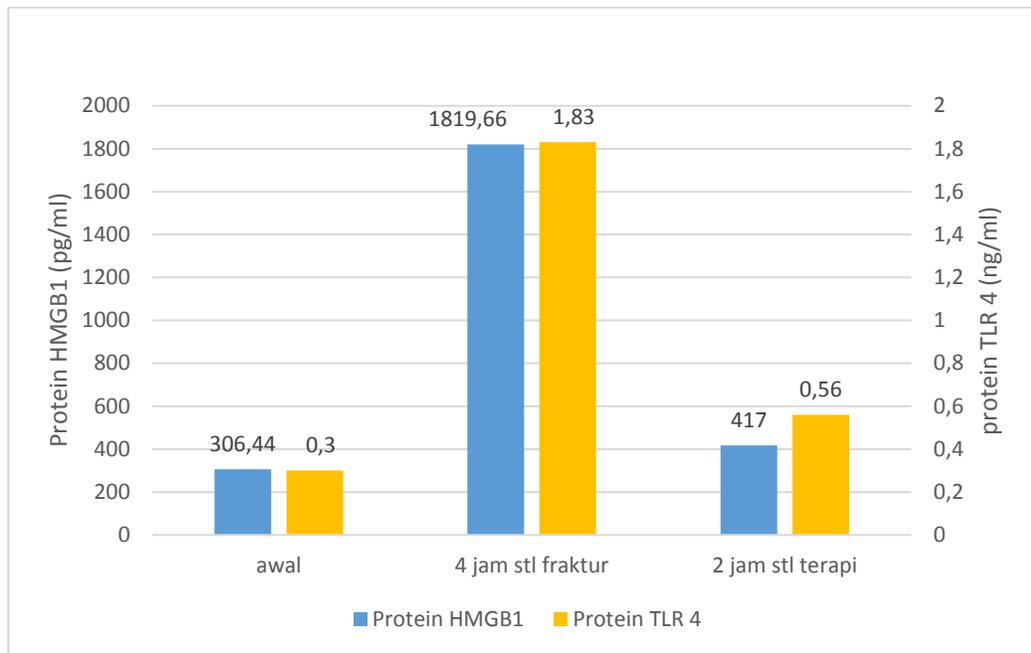
Gambar 6.2. Gambaran ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein TLR4 pada kelompok lidokain.

Tabel 6.6. Gambaran kadar protein HMGB1 dan protein TLR4 pada kedua kelompok lidokain.

Variabel	Kadar protein HMGB1 dan Protein TLR4 (Mean \pm SD)			P
	Awal (sebelum cedera)	4 jam setelah cedera (sblm injeksi lidokain)	2 jam setelah Injeksi lidokain	
Protein HMGB1 (n=10)	306,44 \pm 158,53	1819,66 \pm 239,50	417,00 \pm 222,86	0,00
Protein TLR4 (n=10)	0.30 \pm 0,13	1,83 \pm 0,24	0,56 \pm 0,17	0,00

Data disajikan dalam bentuk nilai mean dan standard deviasi. Nilai p di uji dengan uji-t, nilai p < 0,05 dinyatakan signifikan.

Pengamatan terhadap kadar protein HMGB1 dan kadar protein TLR4 pada masing-masing kelompok lidokain menunjukkan peningkatan, nilai mean kadar protein HMGB1 meningkat dari 306,44 ke mean 1819,66 dan nilai mean TLR4 meningkat dari mean 0,30 ke mean 1,83. Peningkatan kadar protein HMGB1 dan protein TLR4 secara statistik bermakna, nilai p < 0,05. Dua jam setelah pemberian injeksi lidokain intravena selama 24 jam selesai, kadar protein HMGB1 turun dari mean 1819,66 ke mean 417,00. Kadar protein HMGB1 awal bila dibandingkan dengan kadar protein HMGB1 2 jam setelah pemberian lidokain intravena 24 jam selesai, secara statistik tidak terjadi peningkatan bermakna, nilai p > 0,05.



Gambar 6.3. Gambaran kadar protein HMGB1 dan kadar protein TLR4 kelompok lidokain.

BAB VII

PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek pemberian injeksi lidokain intravena sebagai obat anti inflamasi terhadap radang steril yang timbul dari cedera muskuloskeletal yang dialami mencit BALB/c dengan mendeteksi ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4.

A. Pemberian injeksi lidokain sistemik mampu menghambat ekspresi mRNA HMGB1 yang meningkat.

Segera setelah terjadi trauma/ cedera jaringan maka integritas seluler jaringan menjadi rusak. Akan dilepaskan berbagai mediator dan sitokin pro inflamasi kedalam sistim sirkulasi darah. Mediator pro inflamasi dilepaskan berdasarkan urutan tertentu dari berbagai jenis sel-sel imunologis yang bertanggung jawab pada proses peradangan dan memainkan peran penting dalam terjadinya sepsis. Peningkatan protein fase akut (protein C-reaktif, komplemen faktor 3, fibrinogen, dan albumin serum) akan diikuti aktivasi beberapa sistim mediator (sistim kinin, sistim komplemen, mediator lipid, dan sitokin). Beberapa sitokin (interleukin-1, interleukin-6, dan TNF- α) akan dilepas dari tempat inflamasi dan memperantarai respon sistemik. Sitokin inflamasi ini akan menimbulkan demam, reaksi fase akut, memobilisasi netrofil dari sumsum tulang, dan proliferasi limfosit (Hollmann MW dkk, 2000, Cassuto J dkk, 2006, Caracas HCPM dkk, 2009).

HMGB1 adalah suatu protein nukleus non histon dan termasuk protein mediator pro inflamasi klasik karena kadarnya akan segera meningkat tinggi dalam darah bila terjadi radang steril. Peningkatan kadarprotein HMGB1 berlebihan selalu dikaitkan dengan perburukan dan gagal multi organ (Anderson U dkk, 2011; Harris HE dkk, 2012; Abusoglu S dkk, 2013).

Pada penelitian ini setelah empat jam mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal terdeteksi ekspresi mRNA HMGB1 meningkat pada kedua kelompok penelitian. Nilai rerata mean mRNA HMGB1 pada kedua kelompok penelitian meningkat sebesar 1,8 kali lipat, hal ini menandakan bahwa cedera muskuloskeletal yang dialami mencit BALB/c menimbulkan inflamasi/ radang hebat, (tabel 6.1.1). Peningkatan nilai rerata mRNA HMGB1 pada kedua kelompok penelitian secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.

Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Wang HL dkk, 2014 yang menemukan ekspresi mRNA HMGB1 meningkat dalam beberapa jam pada wanita yang menjalani pembedahan histerektomi total. HMGB1 adalah mediator pro inflamasi dini pada radang steril dan kadarnya meningkat dalam beberapa jam pertama setelah trauma/ cedera steril terjadi dan bertahan selama 24-48 jam (Anderson U dkk, 2011).

Untuk menguji apakah pemberian injeksi lidokain intravena memiliki kasiat anti inflamasi menghambat ekspresi mRNA HMGB1 yang meningkat pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal, kepada mencit kelompok lidokain setelah 4 jam mengalami cedera muskuloskeletal diberikan injeksi lidokain 2 mg/KgBB intravena setiap 2 jam sekali, secara terus-menerus

selama 24 jam melalui vena ekor. Hasil pengamatan pada kelompok lidokain memperlihatkan setelah 2 jam pemberian injeksi lidokain intravena selama 24 jam selesai, ekspresi mRNA HMGB1 menjadi turun. Penurunan nilai rerata mean ekspresi mRNA HMGB1 pada kelompok lidokain secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$ (tabel 6.1.2). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian injeksi lidokain 2 mg/KgBB intravena, setiap 2 jam sekali secara terus menerus selama 24 jam berkasiat menghambat transkripsi ekspresi mRNA HMGB1 yang meningkat pada cedera muskuloskeletal. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Wang HL dkk, 2014 pemberian lidokain 1,5 mg/kgBB bolus intravena sebelum operasi diikuti dengan infus lidokain 1,5 mg/kgBB kontiniu selama operasi berlangsung mampu menghambat transkripsi mRNA HMGB1. Nilai rerata ekspresi mRNA HMGB1 awal bila dibandingkan dengan nilai rerata ekspresi mRNA HMGB1 setelah injeksi lidokain pada kelompok lidokain secara statistik tidak menunjukkan peningkatan bermakna, nilai $p > 0,05$. Pada kelompok kontrol nilai rerata ekspresi mRNA HMGB1 meningkat terus sejak mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal, dan setelah pemberian injeksi aquades steril selama 24 jam selesai, hal ini menunjukkan bahwa pemberian injeksi aquades steril selama 24 jam tidak berkasiat anti inflamasi. Peningkatan nilai rerata ekspresi mRNA HMGB1 yang terjadi pada kelompok kontrol secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.

B. Pemberian injeksi lidokain sistemik mampu menurunkan kadar protein HMGB1 yang meningkat.

Setelah trauma/ cedera steril dilakukan integritas seluler menjadi rusak, HMGB1 sebagai mediator sitokin proinflamasi dini segera dilepas dan kadarnya dapat dideteksi di dalam serum darah (tabel 6.2.1), (Magna M dkk, 2014).

Untuk mengetahui apakah peningkatan transkripsi ekspresi mRNA HMGB1 diikuti dengan peningkatan translasi kadar protein HMGB1 serum, maka kami lakukan pemeriksaan ELISA terhadap darah mencit. Hasil penelitian kami menunjukkan peningkatan nilai rerata ekspresi mRNA HMGB1 diikuti dengan peningkatan kadar protein HMGB1.

Untuk menguji apakah pemberian lidokain sistemik dapat menghambat translasi protein HMGB1 pada tingkat serum, setelah empat jam mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal diambil darahnya sebanyak 0,3 ml melalui vena ekor, kemudian diberikan injeksi lidokain 2 mg/KgBB secara intravena setiap 2 jam sekali secara terus-menerus selama 24 jam. Hasil penelitian kami memperlihatkan nilai rerata mean kadar protein HMGB1 turun pada kelompok lidokain dibandingkan dengan kelompok kontrol. Penurunan nilai rerata kadar protein HMGB1 pada kelompok lidokain secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$. Nilai rerata mean kadar protein HMGB1 awal bila dibandingkan dengan nilai rerata mean kadar protein HMGB1 setelah pemberian injeksi lidokain sistemik selama 24 jam secara statistik tidak menunjukkan peningkatan bermakna, nilai $p > 0,05$.

Sejalan dengan hipotesis kami, bahwa pemberian injeksi lidokain 2 mg/kg BB intravena setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam pada kelompok kontrol dapat melemahkan translasi kadar protein HMGB1 bila dibandingkan dengan kelompok kontrol, (tabel 6.2.2.).

Gallos G dkk, 2004; Berger C dkk, 2014 menyebutkan pemberian lidokain sistemik memiliki khasiat anti inflamasi pada sejumlah penyakit atau model penyakit sepsis dan gagal multi organ pada hewan coba.

Hasil penelitian kami ini sesuai dengan hasil penelitian Sirait RH dkk, 2017 terdahulu, pemberian injeksi lidokain 2 mg/kgBB, 3 mg/kgBB, dan 4 mg/kgBB intravena setiap 2 jam sekali selama 24 jam mampu menghambat transkripsi dan translasi HMGB1 pada mencit yang mengalami fraktur tertutup muskuloskeletal. Penelitian Wang HL dkk, 2013 sebelumnya juga menunjukkan hasil yang sama, injeksi lidokain 3mg/kgBB, 6 mg/kgBB, dan 9 mg/kgBB secara intraperitoneal selama 10 jam pada tikus sepsis yang diinduksi dengan *cecal ligation and puncture* mampu menghambat transkripsi HMGB1 dengan menekan faktor transkripsi NF- κ B.

Pemberian injeksi aquades steril intravena pada kelompok kontrol setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam tidak berkasiat anti inflamasi pada mencit BALB/c yang mengalami cedera muskuloskeletal. Nilai rerata mean kadar protein HMGB1 pada kelompok kontrol terus meningkat, dan peningkatan ini secara statistik bermakna, $p < 0,05$

C. Pemberian injeksi lidokain sistemik mampu melemahkan kadar protein TLR4 yang meningkat.

HMGB1 biasa ditemukan di intrasel, namun bila sel mengalami cedera/ trauma, lisis, apoptosis, nekrosis, piroptosis, dan NETosis akan segera dilepas ke ekstrasel. Reseptor eksogen pertama yang terlibat sebagai partner pengikat HMGB1 adalah TLR4 untuk mengaktivasi pelepasan sitokin makrofag (Anderson U dkk, 2011; Harris HE dkk, 2012; Magna M dkk, 2014). Untuk menguji apakah peningkatan kadar protein HMGB1 juga diikuti dengan peningkatan kadar protein TLR4, kami deteksi dengan pemeriksaan ELISA. Pada penelitian ini didapat peningkatan ekspresi mRNA HMGB1 dan kadar protein HMGB1 diikuti dengan peningkatan kadar protein TLR4 pada kedua kelompok setelah 4 jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal, nilai rerata mean kadar protein TLR4 meningkat sebesar enam kali, (tabel 6.3.1) dan peningkatan ini secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$. Peningkatan ini terjadi karena HMGB1 yang dilepas ke ekstrasel akan mengaktifkan alur transduksi sinyal TLR2 dan TLR4 makrofag, sel dendrit, dan sel-sel imunologis lainnya (Kagan JC dkk, 2008; Ueda T dkk, 2010). Jalur sinyal transduksi TLR4 terutama diperantarai oleh jalur *My D88 dependent* untuk mengaktifkan faktor transkripsi NF- κ B. NF- κ B adalah salah satu faktor transkripsi penting dari ekspresi gen proinflamasi untuk memproduksi sitokin IL-1, IL-6, IL-8, dan TNF (Anderson U dkk, 2011; Couture LA, dkk 2012).

Pemberian injeksi lidokain 2 mg/kgBB intravena setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam pada kelompok lidokain mampu menurunkan transkripsi ekspresi mRNA HMGB1 dan translasi kadar protein HMGB1. Penurunan terjadi karena pemberian injeksi lidokain intravena menyebabkan jalur sinyal TLR4 menjadi tidak aktif, tabel 6.3.2. Nilai rerata mean kadar protein TLR4, dan penurunan ini secara statistik bermakna, $p < 0,05$. Hasil penelitian ini sesuai dengan hasil penelitian Liu J dkk, 2013 sebelumnya, pemberian injeksi lidokain 5 mg/kgBB intravena setiap jam secara terus menerus selama 24 jam pada tikus sepsis yang diinduksi liposakarida memberikan efek perlindungan terhadap mortalitas karena menekan disfungsi ginjal dan hepar dengan menghambat regulasi TLR4.

Pada kelompok kontrol nilai rerata kadar protein TLR4 meningkat terus sejak mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal sampai dengan selesainya pemberian injeksi aquades steril selama 24 jam. Pemberian injeksi aquades steril tidak berkasiat anti inflamasi, peningkatan kadar protein TLR4 pada kelompok kontrol secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.

Pengamatan terhadap gambaran ke tiga variabel ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan kadar protein TLR4 pada masing-masing kelompok lidokain menunjukkan peningkatan bila diperhatikan dari awal sebelum mencit BALB/c mengalami cedera muskuloskeletal, dan sesudah empat jam mencit mengalami cedera muskuloskeletal. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa cedera muskuloskeletal yang dialami mencit BALB/c menimbulkan

inflamasi/radang hebat pada semua kelompok penelitian. Peningkatan gambaran ke tiga variabel ini secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.

Caracas HCPM dkk, 2009; Hollmann MW dkk, 2000; Nystrom S dkk, 2013 menyebutkan, lidokain sistemik selain berkasiat sebagai analgesik dan anti aritmia, juga mempunyai manfaat anti inflamasi pada beberapa penyakit kronis seperti reumatik arthritis, colitis, dan penyakit autoimun.

Pemberian injeksi lidokain 2 mg/kgBB intravena, setiap 2 jam sekali, secara terus menerus selama 24 jam pada semua kelompok lidokain berkasiat anti inflamasi karena mampu menghambat/ menekan peningkatan nilai rerata ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1 dan kadar protein TLR4,sepertiterlihat pada gambar 6.1, 6.2, dan 6. 3. Penurunan gambaran ke tiga variabel tersebut (ekspresi mRNA HMGB1, protein HMGB1, dan protein TLR4) pada semua kelompok lidokain, secara statistik bermakna, nilai $p < 0,05$.

BAB VIII

SIMPULAN DAN SARAN

A. Simpulan

1. Penelitian ini telah memperlihatkan bahwa ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 dapat ditemukan pada darah mencit BALB/c normal.
2. Penelitian ini telah membuktikan secara bermakna, bahwa cedera muskuloskeletal yang dialami mencit BALB/c menyebabkan inflamasi dilihat dari ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4 yang meningkat.
3. Penelitian ini telah membuktikan secara bermakna, bahwa pemberian injeksi lidokain intravena mampu menghambat/ menekan peningkatan ekspresi mRNA HMGB1, kadar protein HMGB1, dan protein TLR4.

B. Saran-saran

Saran Akademik

1. Perlu dilakukan pengamatan waktu yang lebih singkat untuk mengevaluasi manfaat pemberian lidokain sistemik sebagai antiinflamasi pada cedera muskuloskeletal.
2. Perlu dilakukan penelitian terhadap beberapa penanda sitokin proinflamasi lain seperti IL-1, IL-6, TNF- α , dan IFN- γ untuk mengetahui manfaat anti inflamasi lidokain sistemik lebih lanjut pada cedera muskuloskeletal.

Saran Klinik

1. Pemberian injeksi lidokain 2 mg/KgBB intravena setiap 2 jam sekali selama 24 jam dapat digunakan sebagai salah satu pilihan untuk mengatasi inflamasi yang terjadi pada cedera muskuloskeletal.

DAFTAR PUSTAKA

- Abbas KA, Lichtman AH, Pillai S. Cellular and Molecular IMMUNOLOGY 8th Chapter 4. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016: 51-85.
- Abusoglu S, Onur E, Celik HT, Guvenc Y, Sakarya M, Sakarya A, Var A, Uyanik BS. The Effect of Lidocaine on Liver Tissue Lipid Peroxide Levels in Septic Rat Model. *Int J of Mevlana Medical Sciences*. 2013;1(2): 31-34
- Anderson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29: 139-62.
- Bell CW, Jiang W, Reich CF, 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 291;C1318-25. [PubMed]
- Berger C, Rossaint J, Aken HV, Westphal M, Hanenkamp K, Zarbock A. Lidocaine Reduces Neutrophil Recruitment by Abolishing Chemokine-Induced Arrest and Transendothelial Migration in Septic Patients. *J Immunol*. 2014; 192: 367-376.
- Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity Review*. 20013; 32: 305-315.
- Caracas HC, Maciel JV, Martins PM, de Souza MM, Maia LC. The use of lidocaine as an anti-inflammatory substance: a systematic review. *J Dent*. 2009; 37: 93-7.

- Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anesthesiol Scand* 2006; 50: 265-282
- Couture LA, Piao W, Ru LW, Vogel SN, Toshchakov VY. Targeting Toll-like Receptor (TLR) Signaling by Toll/Interleukin-1 Receptor (TIR) Domain-containing Adaptor Protein/MYD88 Adapter-like (TIRAP/MAL)-derived Decoy Peptides. *The J of BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 2012; 287(29): 24641-24648.
- De Oliveira GS Jr, Fitzgerald P, Streicher LF, Marcus RJ, McCarthy RJ. Systemic lidocaine to improve postoperative quality of recovery after ambulatory laparoscopic surgery. *Anesth Analg*. 2012; 115: 262-7.
- Furlani D, Donndrof P, Westian I, Ugurlukan M, Pitterman E, Wang W, Li W, et al. HMGB-1 induces c-kit⁺ cell microvascular rolling and adhesion via both toll-like receptor-2 and toll-like receptor-4 of endothelial cells. *J. Cell. Mol. Med*. 2012; 16: 1094-1105.
- Gallos G, Jones DR, Nasr SH, Emala CW, lee HT. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology*. 2004; 101: 902-11.
- Garcia-Romo GS, et al. Netting neutrophils are major inducers of Type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci. Transl. Med*. 2013;3:73-80. [PMC free articles] [PubMed]
- Hadzic A, Vloka JD. Peripheral nerve block principle and practice. New York School of Regional Anesthesia. The McGraw-Hill Companies, Inc. 2004. New York.

Harris HE, Andersson U, Pisetsky PS. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease. *Nat. Rev Rheumatol.* 2012;8:195-02.

Hatta M, and Smits H. Detection of *Salmonella thypi* by Nested Polymerase Chain Reaction in Blood, Urine dan Stool Samples. *Am J.Med.Hyg.* 2007; 76(1):139-143.

Hollmann MW, Durieux ME. Local anesthetics and the inflammatory response: a new therapeutic indication? *Anesthesiology.* 2000;93:858-75.

Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wahamaa H, et al. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signal to promote inflammation. *J Leukoc Biol.* 2009; 86: 655-62.

Kagan JC, Su T, Horng T, Chow A, Akira S, Medzhitov R. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat. Immunol.* 2008; 9: 361-368.

Kang H, Kim BG. Intravenous lidocaine for effective pain relief after inguinal herniorrhaphy: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J Int Med Res.* 2011; 39: 435-45.

Kazama H, et al. Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase-dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein. *Immunity.* 2008;29:21-32. [PMC free article] [PubMed]

Kim TH, Kang H. Intraperitoneal and intravenous lidocaine for effective pain relief after laparoscopic appendectomy: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Surg Endosc.* 2011; 25: 3183-90.

Li LC, Gao J, Li J. Emerging role of HMGB1 in fibrotic diseases. *J. Cell. Mol. Med.* 2014; 18(12): 2231-39.

Liu J, Zhang H, Qi Z, Zheng X. Lidocaine protects against renal and hepatic dysfunction in septic rats via downregulation of Toll-like receptor 4. *Molecular Medicine Reports.* 2014; 9: 118-124.

Lu, B., Nakamura, T., Inouye, K., Li, J., Tang, Y., Lundback, P., Valdes-Ferrer, S. I., Olofsson, P., Kalb, T., Roth, J., Zou, Y., Erlandsson-Harris, H., Yang, H., Ting, J. P., Wang, H., Andersson, U., Antoine, D. J., Chavan, S. S., Hotamisilgil, G, S. Tracey, K. J. (2012) Novel role of PKR In inflammasome activation and HMGB1 release, *Nature 488, 670-674*

Magna M, Pisetsky DS. The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of inflammatory and Autoimmune Diseases. *Mol Med.* 2014; 20(1): 138-146.

Miller RD. Miller's Anesthesia. 7th ed. Chapter 30. Miller RD, Eriksson LI, Fleisher LA, Kronish JPW, Young WL eds. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier, 2010: 913-940.

Nystrom S, et al. TLR activation regulates damage-associated molecular pattern isoforms released during pyroptosis. *EMBO J.* 2013;32;86-99. [PMC free article] [PubMed]

Ridwan T. Etika Pemanfaatan Hewan Percobaan dalam Penelitian Kesehatan. *J Ind Med Assoc.* 2013; 3: 63-65.

Scaffidi P, Mistell T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature.* 2002; 418: 191-5.

- Sirait RH, Hatta M, Ramli M, Simanjuntak TP, Suprayogi P, Islam AA, Arief SK.
The Analysis of the Effective Systemic Lidocaine Dosage on the Expression of HMGB1 mRNA on Mice with Sterile Musculoskeletal Injury. *Open Journal of Anesthesiology*. 2017; 7: 35-41.
- Tang D, et al. HMGB1 release and redox regulates autophagy and apoptosis in cancer cells. *Oncogene*. 2010; 29: 5299-310. [PMC free article] [PubMed]
- Thal D M, Sun B, Feng D, Nawaratne V, Leach K, Felder C C, Bures M G, Evans D A, Weis W I, Bachhawat P, Kobilka T S, Sexton P M, Kobilka B K, and Christopoulos A. Crystal Structure of the M₁ and M₄ Muscarinic Acetylcholine Receptors. *Nature*. 2016 March 17;53(7594):335-340.
- Tian, J., Avalos, A. M., Mao, S. Y., Chan, B., Senthil, K., Wu, H., Parocche, P., Drabic, S., Gollenbock, D., Sirois, C., Ua, J., An, L. L., Audoly, L., LaRossa, G. Pierhaus, Nawerd, W., Marshak-Rothstein, A., Crow, M., Fitzgerald, K., Latz, E., Khiner, P., Choile, A.J. (2007) Toll-like receptor 9 dependent activation by DNA-containing immunocomplex is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat immuno*. **8**, 487-496.
- Tomori H, Shiraishi M, Koga H, Toure M, Taira K, Higa T, Okuhama Y, Hiroyasu S, Muto Y. Protective effects of lidocaine in hepatic ischemia/ reperfusion injury in vitro. *Transplant Proc*. 1998; 30: 3740-2.
- Ueda T, Yoshida M. HMGB1 proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1799: 114-8.

Venereau E, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med*. 2012;209:1519-28. [PMC free article] [PubMed]

Wang HL, Liu YY, Yan HD, Wang XS, Hyang R, Lie WF. Intraoperative systemic lidocaine inhibits the expression of HMGB1 in patients undergoing radical hysterectomy. *Int J Clin Exp Med*. 2014; 7(10): 3398-3403.

Wang HL, Ying YQ, Yu YX, Rong F, Lei WF, Zhang WH. The protective effect of lidocaine on septic rats via the inhibition of high mobility group box 1 expression and NF- κ B activation. *Mediators Inflamm*. 2013; 570: 370.

Wang HL, Zhang WH, Lei WF, Zhou CQ, Ye T. The inhibitory effect of lidocaine on the release of high mobility group box 1 in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Anesth Analg*. 2011; 112: 839-44.

Wikipedia. Polymerase Chain Reaction. ([http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase Chain Reaction](http://en.wikipedia.org/wiki/Polymerase_Chain_Reaction)). Diakses 14 Juni 2015.

Yanai, H., Ban, T., Wang, Z., Choi, M. K., Kawamura, T., Negishi, H., Nakasato, M., Lu, Y., Hangai, S., Koshiba, R., Savitsky, D., Ronfani, L., Akira, S., Bianchi, M. E., Honda, K., Taruma, T., Kodama, T., Taniguchi, T. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature* 2009.462; 99-103.

Yang H, Antonie DJ, Andersson U, et al. The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis. *J Leukoc Biol*. 2013; 93: 865-73.

Yang H, Hreggvidsdottir HS, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107: 11942-7

Yipp BG, et al. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18:1386-93. [PubMed]

Yuwono T. Teori dan Aplikasi Polymerase Chain Reaction, Panduan Eksperimen PCR untuk Memecahkan Masalah Biologi Terkini. *Penerbit Andi*, Yogyakarta. 2006.

Zetterstorm CK, Strand ML and Soder O. The high mobility group box chromosomal protein 1 is expressed in the human and rat testis where it may function as antibacterial factor. *Human Rep*. 2006; 21(11): 2801-09

Lampiran 1

KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN



Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
RSPTN Universitas Hasanuddin

RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo Makassar

Sekretariat : Lantai 2 Gedung Laboratorium Terpadu FKUH

JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10 MAKASSAR 90245

Contact Person: dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD, SpGK Telp. 081241850858, Fax : 0411-581431

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK

Nomor : 1336 /H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2016

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, RSPTN UH, RSUP dr. Wahidin Sudirohusodo setelah melalui pembahasan dan penilaian , memutuskan penelitian berjudul:

Profil Ekspresi High Mobility Group Box 1 (HMGB1), TNF α , IL-6 Pada Cedera Steril Muskuloskeletal Tikus Setelah Pemberian Lidokain Sistemik

dengan Peneliti Utama: **dr. Robert Hotman Sirait, Sp.An**

No. Register

U	H	1	6	0	5	0	4	3	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Yang diterima pada tanggal : **20 Mei 2016**

Perbaikan diterima pada tanggal : **21 Oktober 2016**

dapat disetujui untuk dilaksanakan di Laboratorium Biomolekular dan Imunologi FKUH Makassar.

Persetujuan Etik ini berlaku satu tahun sejak tanggal ditetapkan. Laporan perkembangan penelitian diserahkan kepada KEPK FKUH, RSPTN UH dan RSWS Makassar setiap tiga bulan/~~enam bulan~~/satu tahun.

Pada akhir penelitian, **laporan akhir penelitian** harus diserahkan kepada KEPK FKUH, RSPTN UH dan RSWS Makasar paling lambat **28 Oktober 2017** . Jika ada perubahan protokol dan /atau perpanjangan penelitian, harus mengajukan kembali permohonan kajian etik penelitian (amandemen protokol).

Makassar, 28 Oktober 2016

Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fak. Kedokteran Unhas

Ketua

Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK

NIP 19600504 1986 01 2 002

Sekretaris

dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD, SpGK

NIP 19700821 1979 03 1 001

Lampiran 2

LEMBAR PENELITIAN AKHIR MAHASISWA PASCA SARJANA S3 FK UNHAS NOV 2016
PROFIL EKSPRESI HMGBl PADA CEDERA STERIL MUSKULOSKELETAL MENCIT
SETELAH PEMBERIAN LIDOKAIN SISTEMIK
 (dr. Robert H. Sirait, NPM : P 0201402876)

Tanggal :
 Mencit Balb C ke , BB mg.
 Ketamin mg/ ml.
 Lidokain/Plasebo mg/ ml.

Awal	#	L/P	Th										
I	II	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	...	III
Pkl

- Keterangan :
- I. Pengambilan darah awal
 - II. Pengambilan darah sesudah fraktur
 - III. Pengambilan darah sesudah terapi
 - L/P. Lidokain/Plasebo.

Lampiran 3

I. Kelompok Lidokain (Tgl 28 November – 29 November 2016)

NO	Mencit Balb /C (Lidokain)			Sampel I (Awal sbml fraktur) : Kel.A		Sampel II (4 jam stlh fraktur) : Kel.B		Sampel III (2 Jam stlh terapi L selesai) : Kel.C	
	BB	VOLUME	WAKTU MULAI	SERUM	L6	SERUM	L6	SERUM	L6
1	40,3 mg	0,08 ml	12.04	A01	A01	B01	B01	C01	C01
2	39,2 mg	0,08 ml	12.06	A02	A02	B02	B02	C02	C02
3	42,9 gr	0,086 ml	12.08	A03	A03	B03	B03	C03	C03
4	43,2 gr	0,09 ml	12.10	A04	A04	B04	B04	C04	C04
5	38 gr	0,08 ml	12.12	A05	A05	B05	B05	C05	C05
6	46 gr	0,092 ml	12.14	A06	A06	B06	B06	C06	C06
7	41,6 gr	0,083 ml	12.16	A07	A07	B07	B07	C07	C07
8	48 gr	0,1 ml	12.18	A08	A08	B08	B08	C08	C08
9	48,9 gr	0,1 ml	12.20	A09	A09	B09	B09	C09	C09
10	45,3 gr	0,09 ml	12.22	A10	A10	B10	B10	C10	C10

II. Kelompok Plasebo (Tgl 30 November – 1 Desember 2016)

NO	Mencit Balb /C (Plasebo)			Sampel I (Awal sbml fraktur) : Kel.A		Sampel II (4 jam stlh fraktur) : Kel.B		Sampel III (2 Jam stlh terapi P selesai) : Kel.C	
	BB	VOLUME	WAKTU MULAI	SERUM	L6	SERUM	L6	SERUM	L6
11	33,9 gr	0,07 ml	10.20	A11	A11	B11	B11	C11	C11
12	34,1 gr	0,068 ml	10.22	A12	A12	B12	B12	C12	C12
13	27,1 gr	0,054 ml	10.24	A13	A13	B13	B13	C13	C13
14	33 gr	0,66 ml	10.26	A14	A14	B14	B14	C14	C14
15	34,4 gr	0,07 ml	10.28	A15	A15	B15	B15	C15	C15
16	29,8 gr	0,06 ml	10.30	A16	A16	B16	B16	C16	C16
17	30 gr	0,06 ml	10.32	A17	A17	B17	B17	C17	C17
18	46,3 gr	0,09 ml	10.34	A18	A18	B18	B18	C18	C18
19	35,9 gr	0,072 ml	10.36	A19	A19	B19	B19	C19	C19
20	41 gr	0,08 ml	10.38	A20	A20	B20	B20	C20	C20
21	47,9 gr	0,096 ml	10.40	A21	A21	B21	B21	C21	C21

I. Real Time – PCR HMGB1 (Kelompok Lidokain)

NO	Sampel I (Awal) : Kel.A		Sampel II (Perlakuan) : Kel.B		Sampel III (Terapi L) : Kel.C	
	ER Mean	ER SD	ER Mean	ER SD	ER Mean	ER SD
1	6,93784	0,18771	12,13345	0,26350	6,82583	0,15177
2	7,29711	0,15011	11,82486	0,19655	6,98678	0,14731
3	6,88163	0,24173	11,44794	0,14844	6,79351	0,13868
4	6,82788	0,15503	12,30119	0,07937	7,08712	0,362295
5	6,11620	0,092992	10,94127	0,17692	7,58469	0,07638
6	6,45535	0,14572	11,69049	0,50269	6,54814	0,15133
7	5,24397	0,19218	12,02453	0,48418	6,31418	0,12858
8	6,95626	0,19140	11,75155	0,16523	6,71702	0,07572`
9	6,99902	0,17243	12,90287	0,18009	6,53524	0,20033
10	7,58303	0,16093	12,02959	0,12662	7,98845	0,219393

II. Real Time – PCR HMGB1 (Kelompok Plasebo)

NO	Sampel I (Awal) : Kel.A		Sampel II (Perlakuan) : Kel.B		Sampel III (Plasebo) : Kel.C	
	ER Mean	ER SD	ER Mean	ER SD	ER Mean	ER SD
11	6,71267	0,17214	11,15577	0,17692	13,94535	0,24028
12	7,09782	0,08737	12,01244	0,11240	13,24945	0,11676
13	6,29666	0,05000	11,41485	0,11533	13,68227	0,09644
14	6,38178	0,26083	10,35274	0,15000	12,69426	0,11533
15	7,04426	0,21548	11,53956	0,10066	13,82054	0,10408
16	7,09224	0,24062	10,74502	0,23544	12,79873	0,08505
17	6,31460	0,12000	10,51479	0,20207	13,54840	0,12897
18	7,19889	0,05033	11,01545	0,12055	13,76515	0,21071
19	6,90054	0,17156	12,22338	0,29052	13,95727	0,16803
20	6,49824	0,12288	11,88825	0,13503	13,48595	0,06506

I. ELISA TLR4 (Kelompok Lidokain)

NO	Sampel I (Awal) : Kel.A		Sampel II (Perlakuan) : Kel.B		Sampel III (Terapi L) : Kel.C	
	Konsentrasi (ng/ml)	OD	Konsentrasi (ng/ml)	OD	Konsentrasi (ng/ml)	OD
1	0,198	0,146	1,538	0,451	0,695	0,259
2	0,400	0,192	1,547	0,453	0,532	0,222
3	0,477	0,2095	2,028	0,5625	0,530	0,2215
4	0,299	0,169	1,859	0,524	0,484	0,211
5	0,488	0,212	2,197	0,601	0,868	0,2985
6	0,306	0,1705	1,918	0,5375	0,655	0,25
7	0,321	0,174	2,032	0,5635	0,585	0,234
8	0,220	0,151	1,521	0,447	0,484	0,211
9	0,099	0,1235	1,986	0,553	0,214	0,1495
10	0,813	0,1425	1,659	0,478	0,541	0,1235

II. ELISA TLR4 (Kelompok Plasebo)

NO	Sampel I (Awal) : Kel.A		Sampel II (Perlakuan) : Kel.B		Sampel III (Plasebo) : Kel.C	
	Konsentrasi (ng/ml)	OD	Konsentrasi (ng/ml)	OD	Konsentrasi (ng/ml)	OD
11	0,422	0,222	1,773	0,5335	2,754	0,7595
12	0,513	0,243	1,1261	0,4155	2,797	0,7695
13	0,283	0,190	1,472	0,464	2,929	0,8
14	0,270	0,187	1,541	0,48	2,400	0,678
15	0,303	0,1945	1,504	0,4715	3,070	0,831
16	0,132	0,155	1,893	0,561	2,619	0,7285
17	0,214	0,174	1,860	0,5535	2,476	0,6975
18	0,099	0,1475	1,875	0,557	2,476	0,6955
19	0,173	0,1645	1,474	0,4645	2,170	0,625
20	0,693	0,2845	2,112	0,6115	2,860	0,784

Lampiran 4

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Normal Parameters ^{a,b} Mean Std. Deviation	6.7418 .51586	11.5955 .65131	10.2164 3.39581	307.3913 169.28550	1751.1724 260.44925	1539.8562 1176.94484	.3047 .15486	.6095 .30990	1.7525 2.5912	3.4782 .52051	1.6074 1.09854	3.2146 2.19734		
Most Extreme Absolute Differences	.166 .095	.108 .089	.267 .244	.118 .118	.177 .177	.227 .227	.158 .158	.158 .158	.186 .186	.170 .170	.250 .250	.249 .249		
Test Statistic	-.166 .166	-.108 .108	-.267 .267	-.096 .118	-.132 .177	-.218 .227	-.092 .158	-.092 .158	-.159 .186	-.129 .170	-.215 .250	-.215 .249		
Asymp. Sig. (2-tailed)	.149 ^c	.200 ^{c,d}	.001 ^e	.200 ^{c,d}	.099 ^e	.008 ^e	.200 ^{c,d}	.200 ^{c,d}	.068 ^e	.133 ^e	.002 ^e	.002 ^e		

- Test distribution is Normal.
- Calculated from data.
- Lilliefors Significance Correction.
- This is a lower bound of the true significance.

Lampiran 5

Uraian Prosedur Kadar Protein HMGB1 Mencit

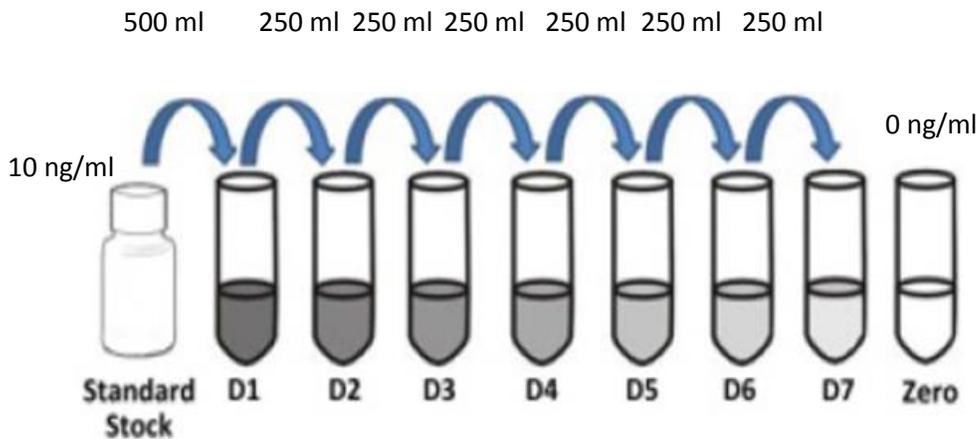
Pedoman pengujian ini didasarkan atas prinsip sandwich ELISA. Setiap well dari *supplied microtiter plate* telah dilapisi dengan antibodi penangkap target spesifik.

Prosedur pengujian.

Semua reagen dan sampel dibawa ke dalam suhu kamar tanpa pemanasan dan diaduk rata, memutar, dan secara lembut sebelum di pipet untuk menghindari terjadi busa.

1. Membuat larutan standar.

Tambahkan 1,0 mililiter sampel dilusi ke dalam tabung lyophilized standard ((berisi 10 ng/ml) Standar stock solution) inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar dan goyang secara halus (menghindari busa)



2. Membuat peta kurva dan sampel standard rangkap 2.

	1	2	3	4	
	Dilusi Standar 1	Dilusi Standar 1	Sampel A	Sampel E	
	Dilusi Standar 2	Dilusi Standar 2	Sampel A	Sampel E	
	Dilusi Standar 3	Dilusi Standar 3	Sampel B	Sampel F	
	Dilusi Standar 4	Dilusi Standar 4	Sampel B	Sampel F	
	Dilusi Standar 5	Dilusi Standar 5	Sampel C	Sampel G	
	Dilusi Standar 6	Dilusi Standar 6	Sampel C	Sampel G	
	Dilusi Standar 7	Dilusi Standar 7	Sampel D	Sampel H	
	Kontrol Negatif	Kontrol Negatif	Sampel D	Sampel H	

3. Tambahkan 100 µl standard, Blank, atau sampel per well, tutup dengan plate seller dan ikubasi selama 2 jam pada suhu 37 °C
4. Aspirasi cairan dari setiap well, jangan dicuci.
5. Tambahkan 100 mikroliter larutan Detection reagent A kedalam masing-masing well, tutup dengan plate seller, goyang secara halus untuk memastikan telah tercampur sempurna, inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C
6. Lakukan aspirasi cairan dari setiap well dan cuci 3x.
Cuci dengan menambahkan ± 300ml wash buffer 1x menggunakan botol penyemprot, pipet multisaluran, dispenser, manifold atau mesin cuci otomatis. Setiap proses pencucian diamankan selama 1-2 menit sebelum dilakukan aspirasi lengkap. Setelah pencucian terakhir lakukan aspirasi untuk menghilangkan sisa wash buffer lalu balikan plate dan bersihkan dengan menekan kertas penyerap.
7. Tambahkan 100 µl larutan detaction Reagent B kemasing-masing well, tutup dengan plate seller baru dan inkubasi selama 60 menit pada suhu 37 °C

8. Lakukan aspirasi cairan dari setiap well dan cuci 5x seperti diuraikan pada langkah 5.
9. Tambahkan 90 μ l larutan TMB Substrate ke dalam masing-masing well, tutup dengan plate seller baru, inkubasi selama 15-30 menit pada suhu 37°C. Lindungi dari cahaya dan monitor secara berkala sampai perubahan warna optimal tercapai.
10. Tambahkan 50 μ l ke Stop Solution ke dalam masing-masing well. Warna biru akan segera berubah menjadi warna kuning.jika warna perubahan tidak seragam, tekan plate dengan lambat untuk memastikan telah tercampur sempurna. Stop Solution harus ditambahkan ke masing-masing well dengan urutan dan waktu yang sama seperti larutan TMB Substrate.
11. Tentukan kepadatan optik (optical density) masing-masing well dengan segera menggunakan microplate reader set 450 nm.

Lampiran 6.

Uraian Prosedur Pemeriksaan Kadar Protein TLR4 Mencit

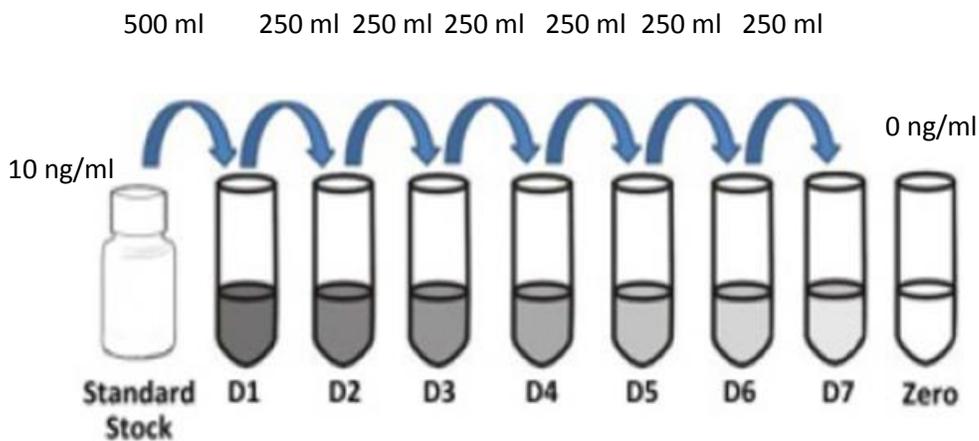
Pedoman pengujian ini didasarkan atas prinsip sandwich ELISA. Setiap well dari supplied microtiter plate telah dilapisi dengan antibodi penangkap target spesifik.

Prosedur pengujian.

Semua reagen dan sampel dibawa ke dalam suhu kamar tanpa pemanasan dan diaduk rata, memutar, dan secara lembut sebelum di pipet untuk menghindari terjadi busa.

1. Membuat larutan standar.

Tambahkan 1,0 mililiter sampel dilusi kedalam tabung lyophilized standard ((berisi 10 ng/ml) Standar stock solution) inkubasi selama 10 menit pada suhu kamar dan goyang secara halus (menghindari busa)



2. Membuat peta kurva dan sampel standard rangkap 2.

	1	2	3	4	
	Dilusi Standar 1	Dilusi Standar 1	Sampel A	Sampel E	
	Dilusi Standar 2	Dilusi Standar 2	Sampel A	Sampel E	
	Dilusi Standar 3	Dilusi Standar 3	Sampel B	Sampel F	
	Dilusi Standar 4	Dilusi Standar 4	Sampel B	Sampel F	
	Dilusi Standar 5	Dilusi Standar 5	Sampel C	Sampel G	
	Dilusi Standar 6	Dilusi Standar 6	Sampel C	Sampel G	
	Dilusi Standar 7	Dilusi Standar 7	Sampel D	Sampel H	
	Kontrol Negatif	Kontrol Negatif	Sampel D	Sampel H	

3. Tambahkan 100 μ l standard, Blank, atau sampel per well, tutup dengan plate seler dan ikubasi selama 90 menit pada suhu 37 °C
4. Aspirasi cairan dari setiap well, jangan dicuci.
5. Tambahkan 100 mikroliter larutan Biotinylated Detection antibody 1x kedalam masing-masing well, tutup dengan plate seller, goyang secara halus untuk memastikan telah tercampur sempurna, inkubasi selama 1 jam pada suhu 37 °C
6. Lakukan aspirasi cairan dari setiap well dan cuci 3x.
Cuci dengan menambahkan \pm 300ml wash buffer 1x menggunakan botol penyemprot, pipet multisaluran, dispenser, manifold atau mesin cuci otomatis. Setiap proses pencucian diamkan selama 1-2 menit sebelum dilakukan aspirasi lengkap. Setelah pencucian terakhir lakukan aspirasi untuk menghilangkan sisa wash buffer lalu balikan plate dan bersihkan dengan menekan kertas penyerap.

7. Tambahkan 100 μ l larutan HRP conjugate 1x ke masing-masing well, tutup dengan plate seller baru dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37 °C
8. Lakukan aspirasi cairan dari setiap well dan cuci 5x seperti diuraikan pada langkah 5.
9. Tambahkan 90 μ l larutan TMB Substrate ke dalam masing-masing well, tutup dengan plate seller baru, inkubasi selama 15 menit pada suhu 37 °C. Lindungi dari cahaya dan monitor secara berkala sampai perubahan warna optimal tercapai.
10. Tambahkan 50 μ l ke *Stop Solution* ke dalam masing-masing well. Warna biru akan segera berubah menjadi warna kuning. Jika warna perubahan tidak seragam, tekan plate dengan lembut untuk memastikan telah tercampur sempurna. *Stop Solution* harus ditambahkan ke masing-masing well dengan urutan dan waktu yang sama seperti larutan TMB Substrate.
11. Tentukan kepadatan optik (*optical density*) masing-masing well dengan segera menggunakan microplate reader set 450 nm.

