

ISBN 978-602-73961-1-1



ISBN 978-602-73961-1-1

PROSIDING SEMINAR NASIONAL XX PERHIMPUNAN BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER INDONESIA (PBBMI)



# PROSIDING

## SEMINAR NASIONAL XX PERHIMPUNAN BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER INDONESIA (PBBMI)

*Indonesian Society for Biochemistry and Molecular Biology*

*“Current Excitement in Biochemistry and Molecular  
Biology for Agriculture and Medicine”*

**“Gairah Baru dalam Biokimia dan Biologi Molekuler  
untuk Bidang Pertanian dan Kedokteran”**

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung  
Bandar Lampung, 16-18 Desember 2016



The Indonesian Society  
for Biochemistry and  
Molecular Biology

PANITIA SEMINAR NASIONAL XX PBBMI  
BANDAR LAMPUNG  
2016

## PROSIDING

SEMINAR NASIONAL XX PERHIMPUNAN BIOKIMIA DAN BIOLOGI MOLEKULER  
INDONESIA (PBBMI)

*“Current Excitement in Biochemistry and Molecular Biology for Agriculture and  
Medicine”*

ISBN 978-602-73961-1-1

---

### EDITORIAL

Penanggungjawab

Dr. Syazili Mustofa, M.Biomed

Tim Review

Prof. Dr. Sutyarso, M.Biomed

Dr. Evi Kurniawati, M.Sc

Dr. Syazili Mustofa, M. Biomed

Soraya Rahmanisa, S. Si., M. Sc

Dr. Rizki Hanriko, Sp.PA

Dr. Hendri Busman, M.Biomed

Tim Editor

Dr. Evi Kurniawati, M.Sc

Dr. Syazili Mustofa, M. Biomed

Soraya Rahmanisa, S. Si., M. Sc

Dr. Giska Tri Putri

Cover Layout

Dr. Riyan Wahyudo

Dr. Ryan Falamy



Penerbit

FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS LAMPUNG



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah robbil'alamiin, berkat rahmat Allah SWT, tahun 2016 ini, Perhimpunan Biokimia dan Biologi Molekuler Indonesia atau Indonesian Society for Biochemistry and Molecular Biology dan disingkat PBBMI atau ISBMB telah berusia 40 tahun. Organisasi ini berdiri tahun 1976 di Jakarta. PBBMI berdiri dengan nama awal Perhimpunan Biokimia Indonesia (PERHIBI) dan berubah nama menjadi PBBMI pada Kongres VII di Jakarta tahun 1994.

PBBMI merupakan perhimpunan ilmiah dan bersifat otonom, yang ingin memajukan dan mengembangkan Ilmu Biokimia dan Biologi Molekuler dalam arti yang seluas-luasnya. Dalam memajukan dan mengembangkan ilmu biokimia dan biologi molekuler itu, PBBMI perlu mengadakan pertemuan, seminar, symposium ilmu biokimia dan biologi molekuler. Hal ini berkesesuaian dengan tujuan Pemerintah Indonesia yang telah membuat prioritas dalam upaya perbaikan kualitas manusia Indonesia. Selain hal tersebut seminar nasional ini adalah ajang mempererat hubungan antar anggota PBBMI sehingga organisasi ini menjadi solid dan mampu mencapai misi organisasi.

Seminar nasional ke XX diselenggarakan di FK Universitas Lampung. Hal ini juga dalam rangka memperingati dies natalis FK Unila yang ke 14. Disamping itu PBBMI cabang Lampung adalah cabang termuda PBBMI, yaitu cabang yang ke 19. Pada kegiatan terkumpul 85 abstrak yang dipresentasikan dalam bentuk presentasi oral maupun poster. Semoga kegiatan ini mendapatkan ridho Allaah SWT dan dapat memajukan ilmu biokimia dan biologi molekuler di Indonesia, dan mendatangkan manfaat yang sebesar besarnya bagi kemanusiaan. Aamiin ya Robbal'alamiin

Bandar Lampung, Desember 2016

Panitia semnas XX PBBMI



## DAFTAR ISI

Efek Kuratif Minyak Buah Merah ( <i>Pandanus Conoideus</i> Lam.) Terhadap Ekspresi Gen <i>Muc1 Aberrant</i> Pada Mencit Model Kolitis Ulserativa <b>Sijani Prahastuti, Lusiana Darsono, Khie Khiong</b> .....	1
Profil Antibodi Kucing Jalanan (Stray Cats) di Indonesia terhadap Virus Influenza <b>Kadek Rachmawati, Ema Qurnianingsih, Kuncoro P.Santoso, Rahmalia D. Suindari</b> .....	10
Analisa Sifat Antioksidan Kurkumin Pada Sel MCF-7 <b>Nunung Ainur Rahmah, Harliansyah, Arleni Bustami</b> .....	15
Peptidoglikan Membran Sel sebagai Target Antibakteri <b>Julkipli, Kholis Abdurachim Audah, Ayu M. Hapsari, Haryanto Wardoyo</b> .....	21
Kajian Bioinformatika: Prediksi Struktur dan Epitop Protein E ( <i>envelope</i> ) Virus ZIKA (ZIKV) untuk Pengembangan Vaksin <b>Tri Panjiasih Susmiarsih</b> .....	29
Kosentrasi <i>Telomeric Repeat Binding Factor 2</i> (Terf-2) Pada Sellaeosit Individu Usia Muda <b>Endang Purwaningsih, Tripanjiasih Susmiarsih, Yenni Zulhamidah, Achmad Sofwan, Sri Wuryanti</b> .....	40
Skrining Antibiotik Dari Bakteri Thermo-Halofilik Isolat Pria Laot Sabang (Pls Adan 76) <b>Teuku M. Iqbalsyah, Nurdin Saidi, Nova Maulyna, Hira Helwati, Naiwatul Aura, Febriani</b> .....	47
Efek Sticopus <i>Hermanii</i> dan Oksigen Hiperbarik terhadap kadarv CRP serum dan Glukosa darah pada Tikus Periodontitis disertai Diabetes <b>Dian Mulawarmanti, Kristanti Parisihni, Yoifah Rizka Wedarti</b> .....	56
Analisis Variasi Gen Akna Dan Kadar Cd154 Pada Penderita Penyakit Graves <b>Dwi Anita Suryandari, Luluk Yunaini, Dwi Yanti, Fatimah Eliana, Trisia Amir</b> .....	63
Gambaran Garis Lipat Tangan Pada Siswa Retardasi Mental Di SLB Dian Grahita & SLB Cempaka Putih, Jakarta <b>Etty Widayanti, Titiek Djannatun</b> .....	79
Rekayasa Biokimiawi dan Rekayasa Genetika dalam Produksi Antibiotik-Makrolida Baru <b>Umar Anggara Jenie</b> .....	87



# Efek Kuratif Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lam.) terhadap Ekspresi Gen *Muc1 Aberrant* pada Mencit Model Kolitis Ulserativa

Sijani Prahastuti, Lusiana Darsono, Khie Khiong

Fakultas kedokteran, Universitas Kristen Maranatha  
Jl. Prof.drg. Suria Sumantri No.65 Bandung 40164.

## Abstrak

Kolitis ulserativa (KU) merupakan salah satu bentuk *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) dapat berkembang menjadi kanker kolorektal. Pada biopsi kolon penderita KU tampak overekspresi gen *Muc1 aberrant*. Buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) berasal dari Papua memiliki kandungan antioksidan. tinggi dapat mencegah aktivasi NF- $\kappa$ B. Tujuan penelitian untuk mengetahui peranan minyak buah merah terhadap ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada mencit model KU. Penelitian ini menggunakan mencit galur Balb/C jantan dibagi dalam 4 kelompok (n=6). Kelompok kontrol negatif (KN) dan kontrol buah merah (KBM), merupakan kelompok yang tidak diinduksi kolitis ulserativa, sedangkan kelompok kontrol positif (KP) dan kelompok perlakuan buah merah (KPBM) diinduksi *Dextran Sulphate Sodium* (DSS), pada KPBM dilanjutkan diberi minyak buah merah 0,1 mL/hari melalui sonde lambung. Penelitian dilakukan di Laboratorium Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran (PPIK), Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung. Mencit dikorbankan pada akhir penelitian, ekspresi gen *Muc1 aberrant* dan HPRT kolon dinilai dengan RT-PCR dilanjutkan dengan elektroforesis, hasil dokumentasi dinilai dengan *Scion Image for Windows*. Uji statistik dilakukan dengan metode Analisis Varian (ANOVA) satu arah dilanjutkan dengan uji Tukey HSD ( $\alpha=0,05$ ). Kelompok Perlakuan Buah Merah memiliki rerata ekspresi gen *Muc1 aberrant* lebih rendah dibandingkan kelompok Kontrol positif ( $p<0,05$ ). Sedangkan antar Kelompok Perlakuan Buah Merah, kelompok Kontrol Negatif, dan Kelompok Buah Merah tidak terdapat perbedaan bermakna ekspresi gen *Muc1 aberrant* ( $p>0,05$ ). Minyak buah merah dapat menurunkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada mencit model KU. Buah merah mengandung antioksidan  $\beta$ -karoten, *phenolic*, *flavonoid*,  $\alpha$ -tokoferol dapat mengatasi inflamasi sehingga aktivasi NF- $\kappa$ B tertekan menyebabkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* menurun.

**Kata kunci:** buah merah, gen *Muc1 aberrant*, mencit model kolitis ulserativa

# The Effect of Red Fruit Oil (*Pandanus conoideus* Lam) towards *Muc1* Aberrant Gene Expression in Ulcerative Colitis Mice Model

Sijani Prahastuti, Lusiana Darsono, Khie Kiong

Faculty of Medicine, Maranatha Christian University,  
Prof. Drg. Suria Sumantri St. 65 Bandung 40164.

## Abstract

Ulcerative Colitis (UC) is a form of *Inflammatory Bowel Disease* group (IBD) that can thrive into colorectal cancer. Colon biopsy UC chronic patients expressed aberrant mRNA *Muc1*. Red fruit oil is originally from Papua that contains high antioxidant to suppress Nf-kB activation. The aim of this experiment is to determine the role of red fruit oil towards *Muc1* aberrant gene expression in UC mice model. The method of this research was using Randomized Complete Design (RCD), mice Balb/C were divided into four group treatments (n=6). Negative control (NC) was given aquadest, Red Fruit Control (RFC) was given red fruit, possitive control (PC) was given DSS and red fruit, Red Fruit Treated Group (RFTG) was given red fruit after DSS. The effect of red fruit oil againsts gen *Muc1* aberrant expression was measured by Reversed Transcriptase Chain Reaction (RT-PCR) method. After electrophoresis, all bands were analyze by Scion Image for Windows. Statistical analysis was performed using one way Analysis of Variance (ANOVA), followed by Tukey HSD with  $\alpha = 0.05$ . The result showed that the red fruit treated group gave significantly different level expression of *aberrant Muc1* gene compared to positive control group ( $p < 0.05$ ). There were non significant differences among red fruit-treated group, negative control, and red fruit control ( $p > 0.05$ ). Red fruit oil can suppress of *aberrant Muc1* gene expression. Red fruit oil contains bioactive compounds identified as antioxidant  $\beta$ -caroten, phenolic, flavonoid,  $\alpha$ -tocopherol which suggested can supress NF-kB activation along with suppression of *Muc1* aberrant gene expression.

**Keywords:** Red fruit, *Muc1* aberrant gene expression, ulcerative colitis mice model

## Pendahuluan

Kolitis ulserativa termasuk golongan IBD yang menyebabkan inflamasi kronik saluran pencernaan dengan manifestasi klinik berupa diare berdarah dan timbul ulserasi pada kolon desenden dan rektum menyebar kearah proksimal. Insidensi IBD bervariasi di berbagai negara sesuai dengan geografis dan ras Etiologi kolitis ulserativa dan patogenesisnya belum diketahui secara lengkap, berbagai teori mengaitkan dengan berbagai faktor diantaranya yang terpenting adalah faktor genetik, mukus, dan flora normal.<sup>1,2,3</sup> Akhir-akhir ini terjadi perubahan epidemiologi, yang mana insidensi kolitis ulserativa cenderung meningkat di berbagai negara Asia seperti: Jepang, Korea, Singapura, India. Kolitis ulserativa dapat terjadi pada semua kelompok usia, terutama pada usia 15 sampai 30 tahun serta meningkat cepat pada usia lebih dari 50 tahun.<sup>4,5,6</sup>

Gen *Muc1* merupakan gen yang memproduksi musin *Muc1* pada kolon sehat manusia, tikus dan mencit. Overekspresi gen *Muc1* memicu transformasi sel epitel melalui kemampuannya mengikat dan menghentikan degradasi  $\beta$ -katenin. Akibat keadaan tersebut terjadi akumulasi  $\beta$ -katenin dalam sitoplasma yang selanjutnya translokasi ke dalam nukleus yang akan meningkatkan aktivasi gen target kanker kolon.<sup>7,8</sup> Selain itu terjadi perpindahan domain gen *Muc1* ekstraseluler ke dalam nukleus sehingga terjadi ikatan antara gen *Muc1* dengan p65 NF- $\kappa$ B yang memicu transkripsi sitokin proinflamasi IL-6, TNF- $\alpha$  dan IFN- $\gamma$  dan juga akan menginduksi ekspresi gen *Muc1* di epitel kolon. Bila keadaan tersebut terus berlangsung dapat menyebabkan kerusakan epitel kolon.<sup>7,9</sup>

Overekspresi gen *Muc1* pada penderita Kolitis Ulserativa memproduksi musin *Muc1 aberrant (hypoglycosylated)*. Penyimpangan struktur musin tersebut mengakibatkan menurunnya fungsi pelindung mukus sehingga flora normal lebih mudah masuk ke dalam lamina propia kolon, memicu proses inflamasi sehingga terjadi akumulasi dan aktivasi berbagai sel *innate* sistem imun, bila tidak teratasi oleh antioksidan endogen dapat menimbulkan inflamasi kronik.<sup>10</sup>

Musin *Muc1 hypoglycosylated* mempunyai daya kemotaktik terhadap sel dendritik imatur, sel B dan dapat menginduksi penyimpangan maturasi dan profil sitokin.<sup>11</sup> Penipisan dan perubahan struktur musin *Muc1* juga akan mengaktifkan enzim NADPH oksidase yang terdapat pada makrofag dan neutrofil menghasilkan ROS.<sup>12</sup>

Bila produksi ROS dan mediator inflamasi melebihi kapasitas tubuh untuk menetralkan maka akan timbul 'stres oksidatif'. Kelebihan radikal bebas akan bereaksi dengan lipid, protein maupun asam nukleat sehingga menyebabkan kerusakan sel. PUFA yang terdapat pada membran sel merupakan senyawa yang paling rentan terhadap serangan radikal bebas. Bila stres oksidatif tidak segera teratasi, maka ROS akan berinteraksi dengan makromolekul lainnya yaitu protein menyebabkan hilangnya aktivitas enzim, efek terhadap asam nukleat terjadi perubahan struktur DNA sehingga timbul sel mutan, bila perubahan DNA ini bertahun-tahun akan menjadi sel kanker.<sup>12</sup>

Kolitis ulserativa dapat diinduksi pada model hewan dengan menggunakan DSS. Mekanisme terjadinya kolitis ulserativa pada model hewan diperkirakan DSS toksik terhadap sel epitel, menyebabkan peningkatan permeabilitas sel epitel dan aktivasi makrofag. Efek toksisitas DSS terhadap sel epitel kolon dan barrier epitel kolon, menyebabkan perubahan mikroflora, kerusakan kriptas dan erosi masif sehingga neutrofil dan makrofag masuk ke dalam lamina propia dan teraktivasi, selanjutnya akan dikeluarkan sitokin yang menyebabkan inflamasi pada mukosa kolon. Kelainan tersebut disertai dengan berkurangnya jumlah sel goblet sehingga terjadi penurunan produksi dan penyimpangan struktur mukus. Gejala klinis dan gambaran histopatologis mirip dengan kolitis ulserativa manusia.<sup>13</sup>

Hasi penelitian Surono dkk, menyimpulkan antioksidan yang terkandung dalam 100 gram minyak buah merah adalah:  $\alpha$ -karoten 130  $\mu\text{g}$ ,  $\beta$ -karoten 1,98  $\mu\text{g}$ ,  $\beta$ -kriptosantin 1,46  $\mu\text{g}$  dan  $\alpha$ -tokoferol atau vitamin E 21,2 mg.<sup>14</sup>

Menurut Khiong dkk, menyimpulkan pemberian minyak buah merah dosis 0,1 mL per oral pada model karsinoma kolon yang di induksi dengan DSS 2,5% dan *azoxymethane* (AOM) 12 mg/kgBB intra peritoneal (ip) terjadi penurunan kadar NF-kB, peningkatan produksi IL-10 dan IL-22 secara signifikan bila dibandingkan kontrol positif.<sup>15</sup>

Dengan demikian, penelitian ini dilakukan untuk memberikan gambaran mengenai pengaruh buah merah dalam menghambat ekspresi gen *Muc1 aberrant*.

## Metode

### ➤ Bahan penelitian

Bahan uji yang digunakan adalah buah merah (*Pandanus conoideus* Lam.) kultivar merah panjang dan berwarna merah terang, berasal dari Wamena, Papua yang ditanam pada ketinggian 1.500 dpl. Pembuatan minyak buah merah dilakukan di Laboratorium Farmakognostik, Sekolah Farmasi ITB, Bandung

### ➤ Subjek Penelitian

Subjek penelitian adalah mencit galur Balb/C jantan berumur 8 minggu, dengan berat badan rata-rata 25 gram diperoleh dari Laboratorium Penelitian dan Pemeliharaan Hewan Coba, Pusat Penelitian Ilmu Kedokteran (PPIK), Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Maranatha, Bandung, dari bulan Mei hingga Agustus 2012.

### ➤ Ukuran Sampel

Jumlah sampel ditentukan berdasarkan rumus Kemas Ali Hanafiah, 2005, pada penelitian ini dibutuhkan 24 ekor mencit Balb/c yang dibagi menjadi 4 kelompok secara acak.<sup>16</sup>

### ➤ Desain Penelitian

Penelitian ini bersifat prospektif eksperimental laboratorium sungguhan dengan rancangan acak lengkap (RAL), bersifat komparatif.

Mencit dibagi dalam 4 kelompok secara acak dengan masing-masing kelompok terdiri dari 6 ekor mencit dan mendapat perlakuan yang berbeda.

1. Kelompok kontrol negatif (KN) hanya diberi *aquades*
2. Kelompok kontrol buah merah (KBM) yang diberi minyak buah merah dosis 0,1 mL/hari
3. Kelompok kontrol positif (KP) diinduksi kolitis dengan DSS 2,5 % (w/v)
4. Kelompok perlakuan Buah Merah (KPBM) diinduksi kolitis dengan DSS 2,5 % (w/v) dan dilanjutkan diberi minyak buah merah dosis 0,1 mL/hari

Pada hari ke 18, semua mencit dikorbankan, dilakukan isolasi RNA, pembuatan cDNA, amplifikasi Gen *Muc1 aberrant* dan HPRT dengan metode RT-PCR. Amplifikasi *in-vitro* dengan teknik RT-PCR gen HPRT dan *Muc1 aberrant* dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yang dirancang dari urutan nukleotida gen HPRT dan *Muc1 aberrant Mus musculus*. Amplifikasi gen *Muc1 Aberrant* dengan metode PCR dilakukan dengan menggunakan pasangan primer yang dirancang dari urutan nukleotida gen *Muc1 aberrant Mus Musculus* dan HPRT *Mus Musculus* (sebagai pembanding).

## Pasangan primer :

### *Hypoxanthine Phosphoriboxyltransferase (HPRT)*

*Forward Primer HPRT* : 5'GAAGGAGATGGGAGGCCATCAC3'

*Reverse Primer HPRT* : 5'CATGACGAATTGGTCCCTTTCG3'

Hasil PCR yang diharapkan 298 bp

### *Muc1 aberrant*

*Forward Primer Muc1* : 5'CAAGTTCAGGTCAGGCTCCGTGG3'

*Reverse Primer Muc1* : 5'CCTGCCGAAACCTCCTCATAGGGGC3'

Hasil PCR yang diharapkan 426 bp

Hasil RT-PCR dielektroforesis dengan gel agarose 0,8% dengan 75V dan kemudian diwarnai dengan ethidium bromida (EtBr). Pita-pita hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah UV *transluminator* kemudian difoto dan dianalisis ketebalan pita-pitanya dengan menggunakan densitometer (*Scion Image*).

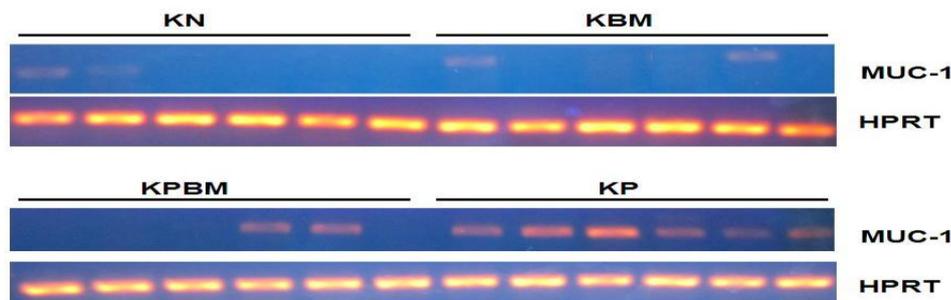
## Hasil

### Ekspresi *Muc1 aberrant* Kolon Mencit

Hasil penelitian pengaruh minyak buah merah terhadap ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada kolon mencit model kolitis ulserativa dapat di lihat pada Gambar 1.

Gambar 1 menunjukkan hasil elektroforesis RT-PCR gen *Muc1 aberrant* dan kontrol internal HPRT pada masing-masing kelompok perlakuan. Pada kelompok KN, KBM dan KPBM masing-masing kelompok terdapat dua mencit yang menunjukkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* yang tipis atau tidak ada, sedangkan pada kelompok KP semua mencit menunjukkan ekspresi gen *Muc1 aberrant*. Semua pita gen *Muc1 aberrant* kelompok perlakuan buah merah (KPBM) tampak tipis karena terekspresikan lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok KP. Semua pita gen *Muc1 aberrant* pada kelompok KP tampak tebal karena terekspresi dengan kuat. Tebal masing-masing pita DNA RT-PCR gen *Muc1 aberrant* dan HPRT diukur menggunakan perangkat lunak *Scion Image*.

Perhitungan persentase ekspresi gen *Muc1 aberrant* dilakukan dengan membandingkan tebal pita DNA hasil elektroforesis RT-PCR gen *Muc1 aberrant* masing-masing mencit dengan tebal pita DNA HPRT. Hasil perhitungan tersebut dapat dilihat pada Tabel 1.



Gambar 1. Persentase Kadar *Muc1 aberrant* Kolon antar Kelompok Perlakuan

**Tabel 1. Persentase Kadar *Muc1 aberrant* Kolon antar Kelompok Perlakuan Berdasarkan Pengukuran Densitometer**

Mencit	Rerata Kadar <i>Muc1 aberrant</i> (% terhadap HPRT)			
	KN	KBM	KP	KPBM
1	18,24	18,25	47,82	3,46
2	12,31	5,45	76,76	6,82
3	7,54	8,76	84,76	6,56
4	6,68	8,66	42,95	29,65
5	7,39	14,54	42,00	31,55
6	5,82	0,07	63,73	11,05
Rerata	9,66	9,29	59,67	14,85
Standar deviasi	4,77	6,46	18,28	12,45

**Keterangan:**

KN : Kontrol Negatif (*Aquadest* 0,1 mL)

KBM : Kontrol Buah Merah (minyak buah merah 0,1 mL)

KP : Kontrol Dextran sulfat sodium (DSS); DSS 2,5 % (v/w) dan *aquadest* 0,1 mL

KPBM : Kelompok Perlakuan Buah Merah; DSS 2,5 % (v/w) dan minyak buah merah 0,1 mL

Data yang tertera pada tabel 1 menunjukkan bahwa kelompok KP memiliki ekspresi gen *Muc1 aberrant* kolon yang paling tinggi bila dibandingkan dengan kelompok yang lain. Ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada kolon kelompok mencit model Kolitis Ulserativa yang diberi perlakuan dengan minyak buah merah (KPBM) lebih rendah bila dibandingkan dengan kelompok KP.

**Analisis Statistik**

Data yang diperoleh kemudian dianalisis secara statistik menggunakan uji ANAVA satu arah dengan derajat kemaknaan  $\alpha = 0,05$  untuk melihat apakah terdapat perbedaan ekspresi gen *Muc1 aberrant* antar kelompok perlakuan yang bermakna atau tidak.

**Tabel 2 . Hasil Uji ANAVA Ekspresi gen *Muc1 aberrant* Kolon Antar Kelompok Perlakuan**

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10657,621	3	3552,540	25,670	,000
Within Groups	2767,889	20	138,393		
Total	13425,489	23			

Data setelah diuji statistik menggunakan metode ANAVA didapatkan nilai  $p = 0,000$ . Pengujian hipotesis adalah sebagai berikut:

$F_{hitung} < F_{tabel}$  dengan  $p > \alpha \rightarrow H_0$  gagal ditolak

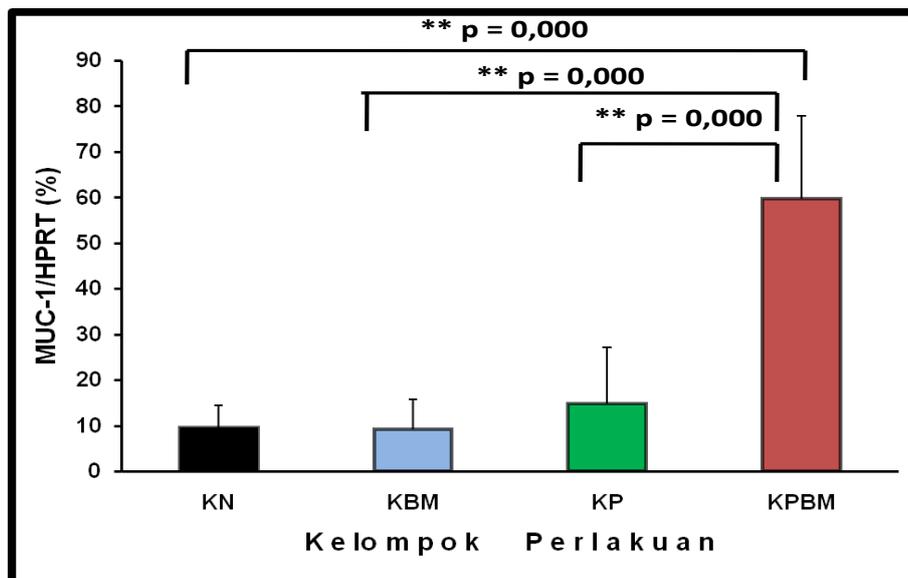
$F_{hitung} \geq F_{tabel}$  dengan  $p \leq \alpha \rightarrow H_0$  ditolak, terima  $H_1$  dan hal lainnya

$F_{hitung} = 25,670 \geq F_{tabel\ 0,05\ (3,\ 20)} = 3,10$  dengan  $p = 0,000 \leq \alpha \rightarrow H_0$  ditolak, terima  $H_1$  dan hal lainnya, yang berarti terdapat perbedaan rerata ekspresi gen *Muc1 aberrant* kolon minimal pada sepasang kelompok perlakuan.

Data selanjutnya dilakukan analisis *Post Hoc Test* menggunakan uji beda rerata Tukey HSD untuk melihat kelompok perlakuan mana yang berbeda secara statistik. Hasil analisis Tukey HSD dapat dilihat pada tabel 3 dan gambar 2.

**Tabel 3. Hasil Uji Beda Rerata Tukey HSD**

KELOMPOK	KN	KBM	KP	KPBM
KN		1,000 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>**</sup>	0,870 <sup>ns</sup>
KBM	1,000 <sup>ns</sup>		0,000 <sup>**</sup>	0,845 <sup>ns</sup>
KP	0,000 <sup>**</sup>	0,000 <sup>*</sup>		0,000 <sup>**</sup>
KPBM	0,870 <sup>ns</sup>	0,845 <sup>ns</sup>	0,000 <sup>**</sup>	



**Gambar 2. Grafik Rerata Ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada Masing-masing Kelompok Perlakuan (presentasi terhadap kontrol Internal HPRT)**

Hasil uji beda rerata Tukey HSD (tabel 3) menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan ekspresi gen *Muc1 aberrant* yang bermakna ( $p > 0,05$ ) antara kelompok kontrol negatif (KN), kelompok kontrol buah merah (KBM) dan kelompok perlakuan buah merah (KPBM). Sedangkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* berbeda sangat bermakna antara kelompok kontrol positif (KP) dengan 3 kelompok perlakuan lainnya yaitu dengan kelompok KN, KBM dan KPBM dengan masing-masing nilai  $p < 0,05$ . Ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada kelompok perlakuan buah merah (KPBM) bila dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (KN) dan kelompok buah merah (KBM) berbeda tidak bermakna ( $p > 0,05$ ).

## Diskusi

Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak buah merah dapat menurunkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada mencit model kolitis ulserativa. Penurunan ini diduga karena aktivitas antioksidan yang terkandung dalam buah merah.

Tebal masing-masing pita DNA RT-PCR gen *Muc1 aberrant* dan HPRT diukur menggunakan perangkat lunak *Scion Image*. Tabel 3 dan gambar 2 menunjukkan rasio *Muc1 aberrant*/HPRT kelompok kontrol positif sebesar 59,67. Rasio *Muc1 aberrant*/HPRT kelompok perlakuan Buah Merah (KPBM) sebesar 14,85. Hasil tersebut menunjukkan kelompok perlakuan Buah Merah dapat menurunkan rasio ekspresi gen *Muc1 aberrant*/HPRT.

Kemampuan Buah Merah dalam menurunkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* mungkin dikarenakan kandungan senyawa kimia di dalamnya seperti  $\beta$ -karoten, *phenolic*, flavonoid,  $\beta$ -kriptosantin dan  $\alpha$ -tokoferol.<sup>14</sup>

Hasil penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa kandungan antioksidan dalam buah merah yang dapat menekan aktivasi NF- $\kappa$ B adalah  $\beta$ -karoten, *phenolic* dan flavonoid. NF- $\kappa$ B merupakan faktor transkripsi yang menginduksi ekspresi gen *Muc1 aberrant*. Hambatan aktivasi NF- $\kappa$ B menyebabkan penekanan ekspresi gen *Muc1 aberrant*.  $\beta$ -kriptosantin merupakan antioksidan yang dapat menangkap radikal bebas yang dihasilkan proses inflamasi sedangkan  $\alpha$ -tokoferol mengatasi peroksidasi lipid.<sup>12,17</sup>

## Simpulan

Minyak buah merah dapat menurunkan ekspresi gen *Muc1 aberrant* pada kolon mencit model Kolitis Ulserativa.

## Daftar Pustaka

1. Rutgeerts P, Vermeire S, Van Assche G. Ulcerative colitis is a type of inflammatory bowel disease (IBD) that affects the large intestine (colon) and rectum. *Gastroenterol.* 2009 ;136(4).
2. Sollid LM, Johansen FE. Animal Models of Inflammatory Bowel Disease at the Dawn of the New Genetics Era. *PLoS Medicine.* 2008;5(9):1338-42.
3. Xavier RJ and Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *2007;448: 427-34.*
4. Lakatos PL. Recent trends in the epidemiology of inflammatory bowel diseases: Up or down?. *World J Gastroenterol.* 2006;12(38):6102-08.
5. Meira LB, Bugni JM, Green SL, Lee CW, Pang B, Borenshten D, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice. *J Clin Invest.* 2008;118 (7).2516-26.
6. Popivanova BK, Kitamura K, Wu Y, Kondo T., Kagaya T, Kaneko S, et al. Blocking TNF- $\alpha$  in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. *J Clin Invest.* 2008;118(2):560-70.
7. Cascio S, Lixin Z, Finn OJ. Muc1 Expression in tumor cells regulates transcription of proinflammatory cytokines by forming a complex with NF- $\kappa$ B p65 and binding to cytokine promoters: importance of extracellular domain. *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology.* 2011;1-10.
8. Furr AE, Ranganathan S and Finn OJ. Aberrant Expression of Muc1 Mucin in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. 2010;13:24-1.
9. Beatty PL, Plevy SE, Sepulveda AR, Finn OJ. Cutting Edge: Transgenic Expression of Human Muc1 in IL10-/- Mice Accelerates Inflammatory Bowel Disease and Progression to Colon Cancer. *Journal Immunology.* 2007;179:735-39.
10. Mc Auley JL, et al. Muc1 cell surface mucin is a critical element of the mucosal barrier to infection. *J. Clin. Invest.* 2007;117(8).2313-23.

11. Xavier RJ and Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. 2007 [diunduh 10 Desember 2009];448: 427-34. Tersedia dari: [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653185](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17653185)
12. Novo E and Parola M. Review article. Redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. In : *Fibrogenesis & tissue Repair*. 2008;1-58.
13. Kim TW, Seo JN, Suh YH, Park HJ, Kim JH, Oh KI. Involment of lymphocytes in dextran sulfate sodium-induced . *World J Gastroenterol*. 2006;12(2):302-05.
14. Surono IS, Nishigaki T, Endaryanto A. and Waspodo P. Indonesian Bioversities, from Microbes to Herbal Plants as Potensial Functional Foods. *J Fac Agricul Shinshu Univers*. 2008;44(1-2;23-7).
15. Khiong , Oey A. Pengaruh buah merah sebagai anti inflamasi dengan menekan Aktivitas NF-kB dan meningkatkan produksi IL-10 dan IL-22 pada mencit jantan galur Balb/C yang di induksi karsinoma kolorekta dengan DSS dan AOM. 2009.
16. Hanafiah KA. Prinsip percobaan dari rancangannya. Dalam Rancangan percobaan aplikatif aplikasi kondensional bidang pertamanan, perikanan, industri dan hayati. Ed. 1. Jakarta : PT Raja Grafindo Persada. 2005;10-2.
17. Rohman A, Riyanto S, Yuniarti N, Saputra WR, Utami R and Mulatsih W. Antioxidant activity, total phenolic, and total flavaonoid of extracts and fractions of red fruit (*Pandanus conoideus* Lam). *International Food Research Journal*. 2010;17:97-06.

# Profil Antibodi Kucing Jalanan (Stray Cats) Di Indonesia terhadap Virus Influenza Antibody Profile of Stray Cats in Indonesia Against Influenza Viruses

Kadek Rachmawati<sup>1,2</sup>, Ema Qurnianingsih<sup>2,4</sup>, Kuncoro P. Santoso<sup>1,2,3</sup>, Rahmalia D. Suindari<sup>2</sup>  
Ulvie Putri<sup>2</sup>, Muh. Y. Alamudi<sup>2</sup>, Reviany V. Nidom<sup>2,4</sup>, Chairul A. Nidom<sup>2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>Fakultas Kedokteran Hewan, <sup>2</sup>Avian Influenza Research Center (AIRC), <sup>3</sup>Project R4PGLAU Swiss-Indonesia, <sup>4</sup>Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran-Universitas Air langga

## Abstract

Stray cats is an animal whose existence between feral and pet cats. These animals are often found around the traditional market, hospital and other public places, that there is likely to be contact with other species animals. These animals may be can infected by pathogen that infect animals and humans including Influenza virus. There are three types of Influenza viruses, type A, B and C. Type A can infect humans and other species animal including birds, tiger and cat. Influenza B virus infects only humans. The aim of these research was to detect antibody profile of stray cats to Influenza virus type A and type B in Indonesia. Sampling was conducted on stray cat serum derived from East Java and Jakarta. The method used was the Hemagglutination Inhibition test. Antibody profile detectable include antibodies against Influenza A virus subtype H1 (2009) pandemic, H3, H5, H7 and H9, and Influenza virus B Yamagata and Victoria. HI test performed on serum samples of cats as much as 100 samples taken from traditional markets, with inactivation first performed at a temperature of 56°C for 30 minutes. The results showed that of the 100 serum samples cat tested, as many as 28 samples positive for Influenza virus subtype H1 (2009) pandemic, 27 samples were positive to the subtype H3, 55 serum samples were detected with antibodies Avian influenza subtype H5, 18 positive samples subtype H7, 8 positive samples against H9 subtype, 26 positive samples of influenza B Victoria, and 47 samples were positive influenza B Yamagata. Based on the results show that cats can be infected by influenza virus from birds and humans. These research was founded by e-ASIA Joint Research Projects (2015-2018)

**Keywords:** Antibody profile, HI test, stray cat, Type A and B Influenza Viruses

## Pendahuluan

Virus influenza beredar dan menyebabkan penyakit pada manusia setiap tahun.<sup>1</sup> Ada tiga kelompok besar atau tipe virus influenza yaitu tipe A, B, dan C. Virus influenza tipe A dibagi menjadi beberapa subtipe berdasarkan antigen eksternalnya (HA dan NA). Virus Influenza A dapat menyerang hewan unggas, mamalia termasuk manusia. Virus Influenza A subtipe H1 dan H3 adalah penyebab influenza musiman pada manusia, sedangkan subtipe H5, H7 dan H9 dapat menyerang unggas (avian influenza) tetapi bersifat zoonosis sehingga dapat menyerang mamalia serta manusia.<sup>2</sup> Virus Influenza tipe B menyebabkan Influenza musiman dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi terutama pada pasien anak-anak, orang yang berusia tua dan kondisi *immunocompromised*.

Virus H1N1 dan H3N2 juga sudah menjadi endemik pada populasi babi di seluruh dunia dan dianggap sebagai penyebab penyakit pernafasan yang paling berbahaya pada babi.<sup>3</sup> Wabah yang disebabkan oleh virus *Avian Influenza* subtipe H7 HPAI dan LPAI antara lain H7N1, H7N2, H7N3, H7N4 dan H7N7 telah mengakibatkan sekitar 75 juta unggas mati atau dimusnahkan. Kasus pertama yang pernah dilaporkan adanya infeksi virus subtipe H7 secara langsung dari unggas ke manusia terjadi pada tahun 1996 dengan gejala konjungtivitis pada wanita yang memelihara itik setelah sehari sebelumnya membersihkan kandang itik tersebut.<sup>4</sup> Oktober 2004, kebun binatang Thailand kembali melaporkan adanya wabah *Avian Influenza* subtipe H5N1 pada harimau setelah hewan diberi pakan karkas ayam, dimana 147 ekor harimau dari seluruh populasi 441 ekor mati karena adanya infeksi virus H5N1.<sup>5</sup> Pada tanggal 28 Februari 2006, virus *Avian Influenza* subtipe H5N1 terdeteksi pada seekor kucing yang mati di wilayah Utara Pulau Ruegen German, di tempat yang sama ditemukan juga lebih dari 100 ekor burung liar mati. Hasil pemeriksaan menunjukkan bahwa burung liar tersebut terinfeksi virus H5N1.<sup>6</sup>

*Virus Influenza* tipe B merupakan komponen yang penting dari keseluruhan penyakit utama *Influenza* pada manusia. Pada tahun 2005 di Australia, sekitar 26,6% hasil konfirmasi dari laboratorium merupakan kasus *Influenza* tipe B dari keseluruhan kasus *Influenza* yang muncul.<sup>7</sup>

Selama awal tahun 1980, sebuah strain baru *Influenza* tipe B mengancam manusia dengan adanya perbedaan secara *antigenic* dan *genetic* dari strain *Influenza* B yang ada. Sejak saat itu, strain baru ini dengan strain yang telah ada mengalami sirkulasi dan menyebabkan *outbreak* musiman di wilayah Australia dan Asia Pasifik. Dua strain baru ini adalah strain B/Victoria/2/87 dan B/Yamagata/16/88. Dua strain ini secara *antigenic* sangat berbeda sebagai antisera yang berkembang dalam ferret, strain pertama tidak mempunyai antibodi *cross-reactive neutralizing* terhadap strain kedua.<sup>8</sup>

Kucing merupakan hewan kesayangan yang banyak dipelihara oleh masyarakat Indonesia. Namun tidak sedikit kucing yang dibiarkan berkeliaran tidak ada yang memiliki, kucing tersebut dinamakan kucing jalanan (*stray cats*). Kucing jalanan dapat berkeliaran di kawasan pasar tradisional atau area publik lain seperti rumah sakit, rumah potong hewan. Pasar memiliki potensi sebagai tempat terjadinya penularan penyakit tidak terkecuali keberadaan virus *Influenza* mengingat pasar sebagai tempat yang memungkinkan terjadinya kontak langsung antara manusia pembawa virus *Influenza* dengan kucing.

Secara historis, virus *Influenza* belum dianggap sebagai *pathogen* utama pada kucing. Namun, sejak 2003 telah dilaporkan adanya infeksi alami *highly pathogenic virus Avian Influenza* H5N1 pada kucing domestik menyebabkan kasus yang fatal.<sup>9,10,11</sup> Selain itu, virus influenza subtipe H3 sudah menginfeksi beberapa spesies hewan seperti babi (H3N1 dan

H3N2), kuda (H3N8), dan anjing (H3N8 dan H3N2). Laporan lain, virus H3N2 anjing juga menular ke kucing di Korea dan Cina yang menyebabkan penyakit pernafasan. Temuan ini memberikan bukti lebih lanjut bahwa kucing harus dimasukkan diantara hewan yang bertanggung jawab untuk transmisi antarspesies dari virus influenza tipe A. Selain itu, temuan dari laporan ini menunjukkan bahwa kucing dapat berperan sebagai host perantara dimana potensi pandemi dapat memunculkan virus tersebut.<sup>12,13</sup>

Berdasarkan uraian di atas, maka diperlukan penelitian untuk memberikan penjelasan ilmiah mengenai kemungkinan kucing di Indonesia sebagai salah satu hewan yang terkait dalam mata rantai penularan virus influenza Adan B. Penelitian ini dilakukan untuk mendeteksi virus influenza A subtipe H1 pandemik 2009, H3, H5, H7, H9 dan virus influenza B (Yamagata dan Victoria) pada kucing di Indonesia melalui pemeriksaan antibodi virus dalam serum dengan uji hambatan hemaglutinasi (HI).

## Metoda

Penelitian ini dilakukan dengan pemeriksaan antibodi dalam serum terhadap virus Influenza A subtipe H1 pandemik 2009, H3, H5, H7, H9 dan Influenza B (Yamagata dan Victoria) melalui uji HI. Sebanyak 100 serum sampel dari kucing jalanan di berbagai pasar tradisional di Jawa Timur dan Jakarta, kemudian diinaktivasi pada suhu 56°C selama 30 menit pada *dry bath*. Selain itu diperlukan juga antigen standar dari virus Influenza H1 pandemik 2009, H3, H5, H7, H9 dan Influenza B (Yamagata dan Victoria) milik *Avian Influenza Research Center* Universitas Airlangga yang sebelumnya sudah dilakukan titrasi 4 HA Unit. Pada penelitian ini juga menggunakan RBC (*Red Blood Cell*) marmut 0,75% dan PBS.

Uji HI dilakukan dengan cara semua lubang pada *microplate* "U" diisi dengan PBS sebanyak 25 µl, kecuali lubang pada baris A (A1-A12). Sampel serum dimasukkan kedalam baris A (A1-A12) sebanyak 50 µl, kemudian dibuat pengenceran secara serial dengan cara mengambil 25 µl dari baris A kemudian dituang ke baris B dan dicampur hingga merata. Setelah itu, dari baris B diambil sebanyak 25 µl dan dimasukkan ke baris C. Demikian seterusnya sampai lajur H, sisa 25 µl dibuang. Khusus untuk kolom 11 dan 12, pengenceran hanya dilakukan sampai garis G karena lubang H11 dan H12 digunakan sebagai kontrol. Selanjutnya semua lubang *microplate* diisi dengan antigen 4 HA unit sebanyak 25 µl, kecuali pada lubang H11 antigen 4 HA unit diganti dengan PBS sebanyak 25 µl. Pada lubang ini tidak ada antigen didalamnya, sehingga eritrosit tidak mengalami aglutinasi dan digunakan sebagai kontrol positif. Sedangkan pada H12 tidak diberi serum tetapi diberi antigen, maka eritrosit yang ditambahkan akan mengalami aglutinasi, sehingga digunakan sebagai kontrol negatif.

Setelah penambahan antigen, *microplate* digoyang hingga serum dan antigen merata, diamkan pada suhu 22-25° C selama 30 menit. Selanjutnya semua lubang diisi dengan eritrosit marmut 0.75% sebanyak 50 µl, kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 30-60 menit. Hasil uji HI positif ditandai dengan adanya pengendapan eritrosit berbentuk cincin pada dasar lubang *microplate* "U".

## Hasil Penelitian dan Pembahasan

Berdasarkan hasil uji hambatan hemaglutinasi dari 100 sampel yang diperiksa, didapatkan 28 sampel positif adanya antibodi spesifik terhadap virus influenza A/H1 pandemik 2009, 27 sampel positif terhadap antibodi virus Influenza A subtipe H3, didapatkan 55 sampel positif adanya antibodi spesifik terhadap virus *Avian influenza* subtipe H5, 18

sampel positif terhadap antibodi virus Influenza sub tipe H7 dan 7 sampel positif terhadap antibodi virus Influenza A sub tipe H9. Sedangkan sampel yang positif terhadap antibodi virus Influenza B Yamagata ada sebanyak 47 serum darah, yang positif terhadap antibodi virus Influenza B Victoria ada 26 sampel serum darah, dan 24 sampel positif adanya kedua antibodi virus Influenza B Yamagata dan Victoria.

Uji hambatan hemaglutinasi ini dinyatakan positif apabila titer HI lebih dari atau sama dengan  $2^3$ .<sup>14</sup> Sampel yang menunjukkan hasil uji positif, berarti bahwa dalam serum kucing tersebut telah terbentuk antibodi terhadap virus Influenza. Nilai titer antibodi yang tinggi di atas titer protektif ( $2^4$ ) diduga diperoleh dari sistem pertahanan tubuh yang merespon paparan virus AI secara terus menerus dari lingkungan sehingga menyebabkan kucing jalanan ter vaksinasi secara natural.<sup>15</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kucing dapat terinfeksi oleh virus Influenza A maupun B yang sebenarnya bukan merupakan patogen alami pada kucing. Seperti penelitian yang dilakukan oleh Wardhani dan Damayanti (2016) menunjukkan bahwa di daerah Surabaya, Gresik, Sidoarjo, dan Jakarta terdapat sampel yang positif dengan titer antibodi yang tinggi ( $2^8$  dan  $2^7$ ), sementara pada hasil pengujian HA sampel swab keseluruhannya menunjukkan hasil yang negatif. Hal inimenunjukkan kucing mampu terinfeksi berbagai macam sub tipe virus influenza (*multi infection*), serta kemungkinan potensi kucing sebagai *mixing vessel*.

Virus Influenza A sub tipe H7 dan H9 sampai saat ini belum teridentifikasi di Indonesia. Hasil publikasi di China menunjukkan bahwa virus Influenza A sub tipe H9 mampu menyerang dan menular secara kontak udara pada spesies lain selain unggas seperti babi, anjing, dan anjing jalanan.<sup>16,17</sup> Namun dalam penelitian ini kenyataannya ditemukan antibodi terhadap kedua virus tersebut pada serum kucing yang diambil dari pasar tradisional.

Adanya sampel serum darah kucing yang positif terdapat antibodi virus *Influenza B* sub tipe B-Yamagata serta sampel serum darah positif terdapat antibodi virus *Influenza B* sub tipe B-Victoria masih perlu dipertanyakan. Vaksin Influenza yang digunakan di Indonesia masih menggunakan vaksin trivalent yang tidak berisi virus Influenza B, sementara kasus infeksi virus *Influenza B* jarang terjadi atau bisa jadi pernah terjadi namun tidak ada yang pernah membahas karena keberadaan virus *Influenza B* yang tidak membahayakan. Penelitian ini dapat memperkuat potensi kucing sebagai mamalia yang berperan sebagai inang dari virus Influenza tipe A (sub tipe H1, H3, H5, H7, H9) maupun Tipe B (sub tipe Bv dan By).

Pasar merupakan target utama pengambilan sampel karena merupakan tempat penjualan ayam-ayam dari berbagai daerah. Dalam hal ini, kemungkinan kucing terinfeksi virus *Avian Influenza* sub tipe H5 yang berasal dari ayam, kotoran ayam, bulu ayam yang berada di lingkungan pasar, atau penularan terjadi secara tidak langsung. Penularan virus *Avian Influenza* pada kucing belum diketahui secara pasti penyebabnya. Penularan virus ini dapat terjadi melalui kontak dengan unggas yang terinfeksi, memakan daging unggas mentah yang terinfeksi. Selain itu, menurut Rimmelzwaal *et al.*, (2006) sumber penularan juga dapat terjadi dari kontak antara kucing dan manusia yang terinfeksi *Avian Influenza* sub tipe H5 atau penularan antara bangsa kucing sendiri.<sup>18</sup>

Kucing yang mempunyai antibodi terhadap virus Influenza A dan B menunjukkan telah terinfeksi virus Influenza A dan B, karena infeksi virus Influenza dapat menyebabkan terbentuknya antibodi terhadap antigen tersebut. Pembentukan antibodi terjadi pada 3-7 hari setelah infeksi. Hal tersebut ditunjang oleh pendapat yang mengemukakan bahwa antibodi terhadap virus Influenza pada semua spesies hewan dapat terbentuk dalam kurun waktu 3-7 hari setelah infeksi dan akan mencapai puncak pada minggu kedua.<sup>19</sup> Treanor (2004) juga

mengemukakan bahwa puncak dari kadar antibodi tersebut dapat terlihat selama 4-7 minggu setelah infeksi. Antibodi tersebut masih dapat tetap dideteksi selama beberapa tahun setelah infeksi, bahkan tanpa terjadinya paparan ulang.

## Daftar Pustaka

1. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases for Avian Influenza A (H5N1) Reported to WHO; 2014.
2. CDC (Center for Disease Control and Prevention). Swine influenza A (H1N1) infection in two children-southern California, March-April 2009, MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep. 2009;58: 400-402
3. Nidom, C. A. Pandemi Influenza H1N1 2009. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan Unair;2010.
4. Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. Avian Pathol. 2004;33:393-404.
5. FAO. H5N1 in Cats. In: Animal Health Special Report. 2006. [disitasi 14 Mei 2016]. Tersedia dari [http://www.fao.org/AG/AGAINFO/SUBJECT/en/health/disease-card/avian\\_cats.html-27k](http://www.fao.org/AG/AGAINFO/SUBJECT/en/health/disease-card/avian_cats.html-27k)
6. WHO. Question and answers on avian influenza a selection of frequently asked question on animals, food and water. Geneva; 2006.
7. Australian Government Department of Health and Ageing. Laboratory Virology and Serology Reporting Scheme data; Canberra. 2006 (disitasi 9 Januari 2016). Tersedia dari [http://www.health.gov.au/internet/wcms/publishing.nsf/Content/Laboratory+surveillance+\(La+bVISE\)-2](http://www.health.gov.au/internet/wcms/publishing.nsf/Content/Laboratory+surveillance+(La+bVISE)-2)
8. Rota PA, Wallis TR, Harmon MW, Rota JS, Kendal AP, Nerome K. Co-Circulation of Two Distinct Evolutionary Lineages of *Influenza* Type B Virus Since 1983. *Virology* 1990;175:59-68
9. Songserm T., Amonsin, A., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Pariyothorn, N., Payungporn, S., Theamboonlers, A. and Poovorawan, Y. Avian Influenza H5N1 in Naturally Infected Domestic Cats. *Dis. CDC EID*. 12(4);2006 [disitasi 4 April 2006].
10. Yingst SL, Saad MD, Felt SA. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:1295-97
11. Klopfleisch R, Wolf PU, Uhl W, et al. *Vet Pathol*. 2007;44:261-268.
12. Song DS, An DJ, Moon H.J. *J Gen Virol*. 2011;92:2350-2355
13. Lei N, Yuan Z, Huang S, et al. *Vet Microbiol*. 2012;160:481-483.
14. OIE. Avian Influenza OIE Terrestrial Manual 2014; 2014.
15. Hadipour M.M., G. Habibi and A. Vosoughi, Prevalence of antibodies to H9N2 AIV in backyard chickens around Maharlo Lake in Iran. *Pak Vet J*. 2011;31:192-4
16. Xu, C., W. Fan, R. Wei, and H. Zhao. Isolation and identification of swine influenza recombinant A/Swine/Shandong/1/2003(H9N2) virus. *J Microbes and Infection*. 2004;6(10):919-92
17. Hasiri, M. A., S. Nazifi, E. Mohsenifard and M. Ansari-Lari. Seroprevalence of Avian H9N2 Influenza Virus in a Population of Iranian Domestic Dogs. *Journal of Basic & Applied Sciences*. 2012;8:339-43
18. Rimmelzwan, G.F., Van Riel, D., Baars, M., Bestebroer, T.M., Van Amerongen, G., Fouchier, R., Osterhous, A.D.M.E., and Kuiken, T. Influenza A Virus (H5N1) Infection in Cats Causes System Disease with Potencial Novel Routes of Virus Spread within and between Host. *A. J Pathol*. 2006;168: 176-83
19. Fenner, F.J., E. P. J. Gibss, F.A. Murphy, R. Rott, M. J. Studdert and D. O. White. *Veterinary Virologi* 2<sup>nd</sup> ed. Semarang: IKIP Semarang Press; 1995.
20. Treanor, J.J. Influenza Virus. In: Mandell GL., Bennet JE. and Dolin R., eds. *Mandell, Doulas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6<sup>th</sup> ed. CChurchill Livingstone; 2004.

# Analisa Sifat Antioksidan Kurkumin Pada Sel MCF-7

Nunung Ainur Rahmah<sup>1</sup>, Harliansyah<sup>2</sup>, Arleni Bustami<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departemen Patologi Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI Indonesia,

<sup>2</sup>Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Indonesia, <sup>3</sup> Laboratorium Terpadu, Universitas Indonesia.

## Abstrak

Kurkumin mempunyai aktivitas anti-karsinogenik dan anti-oksidan. Mekanisme penghambatan oleh kurkumin terhadap inisiasi pertumbuhan sel kanker telah dilakukan pada berbagai *cell line* kanker, tetapi mekanisme selular dan molekular kurkumin dalam menginduksi apoptosis belum jelas. Sel MCF-7 diberi variasi konsentrasi kurkumin 60, 70, dan 80  $\mu\text{g/mL}$ . Analisa penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 diukur dengan MTS assay dan kadar ROS diperiksa dengan pengukuran (*2'7'dicholofluorescin diacetate*) DCFDA assay. Hasil penghambatan kurkumin 80  $\mu\text{g/mL}$  pada sel MCF-7 adalah  $53.03 \pm 3.17$ . Adapun pengaruh kurkumin terhadap kadar ROS dibaca melalui *microplate reader fluoresen* pada periode waktu 2, 4, dan 24 jam. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kurkumin mampu menurunkan kadar ROS tertinggi pada periode waktu 24 jam pada sel MCF-7 dengan serapan fluoresen DCFDA yaitu  $5.51 \pm 1.26$ . Kurkumin mempunyai sifat anti-oksidan serta dapat digunakan sebagai bahan kemopreventif.

**Kata kunci :** Kurkumin, *Reactive Oxygen Species*; MCF-7 cells

# Analysis of Antioxidant Properties of Curcumin in MCF-7 Cells

Nunung Ainur Rahmah<sup>1</sup>, Harliansyah<sup>2</sup>, Arleni Bustami<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departement of Patologi Anatomi, Faculty of Medicine, University of YARSI Indonesia,

<sup>2</sup>Biokimia Departement of Medical faculty, University of YARSI Indonesia, Indonesia, <sup>3</sup>  
Integrated Laboratory, University of Indonesia.

## Abstract

Curcumin has anti-carcinogenic activity and anti-oxidants. The mechanism of inhibition by curcumin against the initiation of growth of cancer cells has been performed on a variety of cancer cell line, but the cellular and molecular mechanisms of curcumin induces apoptosis is not clear. MCF-7 cells were treated with concentrations of curcumin 60, 70, and 80 mg / mL. Analysis of the inhibition of the growth of MCF-7 cells was measured by MTS assay and ROS levels detected by measurement (2',7'-dicholofluorescin diacetate) DCFDA assay. The result of the inhibition of curcumin 80 mg / mL in MCF-7 cells was  $53.03 \pm 3.17$ . As for the effect of curcumin on the levels of ROS to read through a fluorescent microplate reader at a period of 2, 4, and 24 hours. The results of this study indicate that curcumin can lower ROS levels highest in the 24 hour period in MCF-7 cells with fluorescent DCFDA uptake is  $5.51 \pm 1.26$ . Curcumin has anti-oxidant properties and can be used as a chemopreventive.

**Keyword :** Curcumin, *Reactive Oxygen Species*; MCF-7 cells

## Pendahuluan

Kurkumin [1,7 - bis - (4 - hydroxyl – 3 - methoxyphenyl) - 1,6 - heptadiene - 3,5 - dione] merupakan bahan utama turmerik yang diekstraksi dari akar tumbuhan *Curcuma longa*. Kurkumin telah digunakan selama berabad-abad dalam pengobatan tradisional untuk berbagai kondisi inflamasi dan penyakit lainnya. Penelitian akhir-akhir ini menunjukkan bahwa kurkumin merupakan penghambat pertumbuhan yang potensial secara in vivo dan mempunyai aktivitas anti-proliferasi terhadap sel tumor secara in vitro.<sup>1,2</sup>

Stres oksidatif merupakan keadaan sel yang ditandai oleh adanya produksi *reactive oksigen spesies* (ROS) yang berlebihan dan atau penurunan kapasitas antioksidan yang tersedia. Dalam keadaan normal, sel mampu mempertahankan homeostasis antara pembentukan ROS dan pembuangannya melalui jalur enzimatik atau melalui antioksidan.<sup>3</sup> Bila terjadi ketidakseimbangan antara produksi dan pembuangan ROS, maka akan terjadi stress oksidatif yang secara langsung atau tidak langsung terlibat dalam fase inisiasi, promosi, dan progresi karsinogenesis.<sup>4</sup> ROS dapat merusak protein, lipid, dan DNA yang menyebabkan perubahan struktur dan fungsi organisme sehingga ROS memegang peranan penting dalam patogenesis berbagai penyakit. Selain itu, karsinoma masih merupakan salah satu keganasan pada manusia yang paling resisten terhadap pengobatan dan menyebabkan kematian karena kanker. Potensi anti-oksidan kurkumin telah dilaporkan pada beberapa literatur saintifik.<sup>5,6</sup> Kurkumin secara bermakna dapat melemahkan stimulasi ROS.<sup>7</sup> Kurkumin mempunyai aktivitas anti-oksidan yang kuat dan dapat menjadi sumber anti-oksidan natural yang penting untuk pencegahan penyakit dan memelihara kesehatan.<sup>8</sup>

Pada penelitian ini, kami menguji efek sitotoksik kurkumin dan menemukan konsentrasi efektif kurkumin dalam menghambat viabilitas sel MCF-7. Selanjutnya akan diteliti efek varian waktu kurkumin terhadap penghambatan ROS.

## Material dan metode

**Reagen.** Kurkumin dibeli dari Sigma-Aldrich Corporation dan diencerkan dengan dimetil sulfoksid (DMSO), disimpan pada suhu  $-20^{\circ}\text{C}$ , dan dicairkan dan dalam medium kultur sel. Dimetil Sulfokside dibeli dari Applichem. Trypsin-EDTA dan Penicillin-Streptomycin dibeli dari Biosciences. Eagle's minimum essential medium dibeli dari Gibco-BRL (Carlsband, CA, USA). Human recombinant insulin dibeli dari Sigma (St. Louis, MO, USA) dan fetal bovine serum dibeli dari Biowest. MTS [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] dan reagen pasangan elektron (phenazine methosulfate) PMS dipesan dari promega (Madison, USA). DCFDA-Cellular Reactive Oxygen Species dipesan dari Abcam.

**Cell line dan kultur.** Sel kanker payudara MCF-7 dibeli dari American Type Culture Collection (ATCC: Manassas, VA, USA). Sel ditanam dalam tissue flask dengan media EMEM yang mengandung 0,01 mg/mL human recombinant insulin, 10 % fetal bovine serum, 1 % amfoterisin, dan 1 % Penicillin-Streptomycin yang diinkubasi pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan tekanan  $\text{CO}_2$  5 % atmosfer.

**MTS assay.** Viabilitas sel diperiksa dengan kit MTS assay. Setelah dicernakan (digesti) dengan 0,25 % trypsin,  $5 \times 10^3$ /mL sel diinokulasi ke dalam sumuran kultur 96-well. Sel tersebut dibagi dalam kelompok kontrol dan perlakuan, dan dikultur dalam sumuran kultur 96-well plate selama 48 jam, kemudian ditambahkan kombinasi 20  $\mu\text{L}$  MTS dan 1  $\mu\text{L}$  PMS. Kemudian diinkubasi selama 2 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  dan tekanan  $\text{CO}_2$  5 % atmosfer. Selanjutnya absorbansi diperiksa dengan menggunakan ELISA plate reader pada panjang

gelombang 490 nm. Untuk mengurangi tingkat kesalahan, MTS juga ditambahkan pada sumuran tanpa menggunakan sel (*blank*). Indeks viabilitas sel dihitung dengan cara :

$$(1) \text{ Sitotoksisitas (\%)} = 1 - \frac{\text{rata-rata absorbansi kurkumin}}{\text{rata-rata absorbansi control negatif}} \times 100 \%$$
$$(2) \text{ Viabilitas (\%)} = 100 - \text{sitotoksisitas \%}$$

**DCFDA assay.** Reactive oxygen species (ROS) seluler diperiksa dengan kit DCFDA (2',7'-dicholofluorescein diacetate)-Cellular ROS assay. Untuk pemeriksaan DCFDA 2 jam dan 4 jam dilakukan kultur sel adheren, sedangkan untuk 24 jam dilakukan kultur suspense. Sel diinokulasikan pada ke dalam sumuran kultur 96-well gelap. DCFDA ditambahkan dan diinkubasi selama 30-45 menit. Selanjutnya absorbansi diperiksa dengan menggunakan fluoresen plate reader pada panjang Ex/Em = 485/535 nm. Untuk mengurangi tingkat kesalahan, ditambahkan juga sumuran tanpa menggunakan sel (*blank*). Rata-ratafluoresen dihitung dengan cara :

$$\text{Rata-rata intensitas fluoresen} = \frac{\text{Kelompok perlakuan}}{\text{Kontrol positif}} \times 100 \%$$

**Analisis statistik.** Software SPSS 20.0 digunakan untuk analisis statistik. Data ditampilkan sebagai mean  $\pm$  SD. Penghitungan statistik menggunakan uji t berpasangan dan  $P < 0,05$  mengindikasikan hasil yang bermakna.

## Hasil dan diskusi

Efek kurkumin terhadap penghambatan dan proliferasi sel MCF-7. Kurang efektifnya agen kemopreventif saat ini menuntut penelitian mencari senyawa alternatif untuk memperbaiki regimen terapi atau untuk kemopreventif. Kurkumin merupakan fitokimia polifenol yang mempunyai aktivitas dan farmakologi yang cukup luas. Kurkumin diketahui mempunyai aktivitas sebagai anti-oksidan, anti-inflamasi, anti-mikroba, dan anti-karsinogenik.<sup>9</sup> Kurkumin mempunyai efek kemopreventif pada berbagai hewan coba yang diinduksi karsinogenesis secara kimiawi, termasuk tumor payudara. Kurkumin juga menghambat pertumbuhan *cell line* kanker payudara manusia secara in vitro, termasuk MDA-MB-231, MDA-MB-468, dan MCF-7.<sup>10,11</sup> Sampai saat ini toksisitas kurkumin masih diteliti baik pada percobaan hewan maupun manusia dengan konsentrasi yang bervariasi.

Bukti kurkumin yang memperlihatkan aktivitas sebagai anti-oksidan, anti-radang, anti-mitosis, dan anti-metastatik baik secara in vitro dan hewan coba, menjadikan kurkumin sebagai molekul yang dapat digunakan untuk pencegahan dan pengobatan pada kanker manusia. Kurkumin mempunyai efek anti-proliferasif pada berbagai tipe *cell line* secara in vitro. Pada satu penelitian dilaporkan kurkumin menghambat proliferasi sel MCF-7 secara bermakna pada 48 jam. Konsentrasi penghambatan 50 % ( $IC_{50}$ ) didapatkan pada konsentrasi 53.18  $\mu\text{g/mL}$ .

Data penelitian kami sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa kurkumin digunakan sebagai anti-kanker melalui penghambatan proliferasi pada sel kanker payudara.<sup>11</sup> Pada penelitian ini, efek kurkumin dengan konsentrasi berbeda pada sel MCF-7 diuji. Setelah periode 48 jam, perlakuan kurkumin pada sel MCF-7 menunjukkan efek sitotoksik. Pada pengujian efek kurkumin terhadap penghambatan sel dengan menggunakan uji MTS selama periode 48 jam, kami mengamati adanya penurunan proliferasi sel. Pada konsentrasi 80  $\mu\text{g/mL}$  kurkumin menghambat proliferasi sel MCF-7 secara bermakna.

**Tabel 1. Efek kurkumin terhadap rata-rata penghambatan pertumbuhan sel MCF-7 yang dideteksi dengan MTS**

Variabel	Rerata ± Simpang baku
Kurkumin 60 µg/mL	35.58 ± 1.09
Kurkumin 70 µg/mL	44.53 ± 9.08
Kurkumin 80 µg/mL	53.03 ± 3.17

P < 0.01 vs kelompok lain

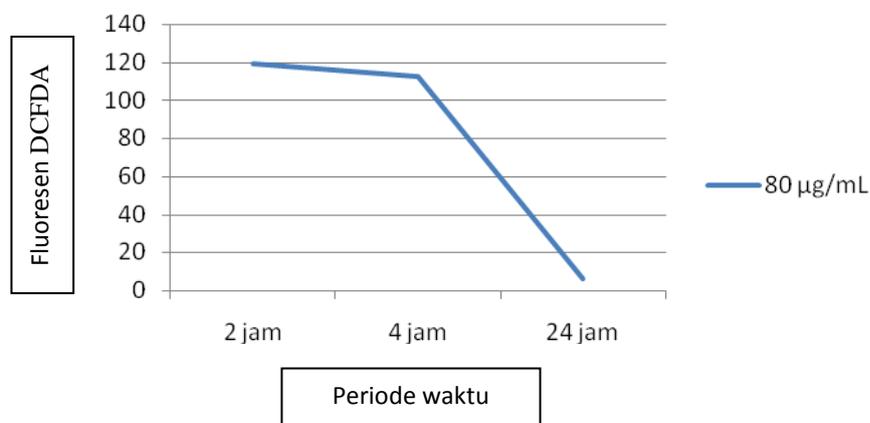
*Deteksi Reactive Oxygen Species (ROS) seluler.* Stres oksidatif dan kerusakan oksidatif terlibat pada patofisiologi berbagai radang kronik dan penyakit degeneratif, khususnya kanker. Pembentukan *reactive oxygen species* (ROS), khususnya O<sup>2-</sup> dan OH memegang peranan penting terhadap perkembangan kanker.<sup>12</sup> Pada penelitian mengenai efek kurkumin pada sel kanker dilaporkan bahwa pemberian kurkumin terhadap MCF-7 dan HepG2 pada konsentrasi 50 µmol/L menyebabkan sel mati terutama karena apoptosis.<sup>11</sup>

Pada penelitian ini dilakukan pemberian kurkumin pada sel MCF-7 dengan konsentrasi 80 µg/mL berdasarkan konsentrasi IC<sub>50</sub> dan pemberian berdasarkan periode waktu. Pemberian kurkumin menurunkan fluoresen DCFDA yang menunjukkan bahwa kurkumin mampu menekan peningkatan ROS pada sel MCF-7.

**Tabel 2. Hasil Uji T berpasangan serapan fluoresen DCFDA**

	Rerata ± s. b	Perbedaan rerata ± s. b	IK95%	p
Serapan fluoresen sesudah 2 jam	103.28 ± 20.28	-4.89 ± 14.73	-41.50 – 31.71	0.623
Serapan fluoresen sesudah 4 jam	108,18 ± 17.37			
Serapan fluoresen sesudah 4 jam	108.18 ± 20.02	102 ± 16.11	62.64 – 142.69	0.008
Serapan fluoresen sesudah 24 jam	5.51 ± 1.26			
Serapan fluoresen sesudah 2 jam	103.28 ± 20.28	102 ± 16.11	62.64 – 142.69	0.013
Serapan fluoresen sesudah 24 jam	5.51 ± 1.26			

Signifikan p < 0.05



**Gambar 1. Kolom respon konsentrasi persentase fluoresen DCF pada sel MCF-7 setelah paparan konsentrasi kurkumin 80 µg/mL pada berbagai periode waktu**

Hasil penelitian kami mengindikasikan bahwa kurkumin mampu menghambat proliferasi dan mampu menurunkan kadar ROS sel MCF-7. Kurkumin mempunyai aktivitas anti-oksidan yang kuat sehingga penting dipakai sebagai pencegahan.

### Daftar Pustaka

1. Lv ZD, Liu XP, Zhao WJ, Dong Q, Li FN, Wang HB, et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. *Intl J Clin Exp Pathol*. 2014;7(6):2818-24.
2. Liu D, Chen Z. The Effect of curcumin on breast cancer cells. *J Breast Can*. 2013;16(2):133-137. doi:10.4048/jbc.2013.16.2.133.
3. Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol*. 2014;24(10):453–62. Tersedia dari: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>
4. Klaunig JE, Kamendulis LM, Hocevar BA. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. *Toxicol Pathol*. 2010;38: 96-109.
5. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Anggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free radical Bio Med*. 2010:1603-16.
6. Wang J, Du XX, Jiang H, Xie JX. Curcumin attenuated 6-hydroxydopamin-induced cytotoxicity by anti-oxidant and nuclear factor kappaB modulation in MES2.5 cells. *Biochem Pharmacol*. 2009;78:178-83.
7. Siddiqui MA, Ahamed M, Ahmad J, Khan MAJ, Musarat J, Al Kedhairy AA, Alrokayan AS. Nickel oxide nanoparticles induce cytotoxicity, oxidative stress and apoptosis in culture human cells that is abrogated by dietary antioxidant curcumin. *Food chem toxicol*. 2012;50:641-7.
8. Borra SK, Gurumuthy P, Mahendra J, Jayamathi KM, Cherian CN, Ram C. Antioxidant and free radical scavenging activity of curcumin determined by using different *in vitro* and *ex vivo* models. *J Med Plant Res*. 2013;7:2680-90.
9. Teiten MH, Dicato M, Diederich M. Curcumin as a regulator of epigenetic events. *Mol Nutr Food Res*. 2013;00:1-11.
10. Sun XD, Liu XE, Huang DS. Curcumin induces apoptosis of triple-negative breast cancer cells by inhibition of EGFR expression. *Mol Med Rep*. 2012;6:1267-70.
11. Koohpar ZK, Entezari M, Movafagh A, Hashemi M. Anticancer activity of curcumin on human breast adenocarcinoma: role of Mcl-1 gene. *Iran J Cancer Preven*. 2015; 8(3):e2331.
12. Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2007;10(6):724-8.

# Peptidoglikan Membran Sel sebagai Target Antibakteri

Julkipli<sup>1</sup>, Kholis Abdurachim Audah<sup>1\*</sup>, Ayu M. Hapsari<sup>1</sup>, Haryanto Wardoyo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Swiss German University, EduTown BSDCity, Tangerang 15339, <sup>2</sup>PT. Novis Natura Navita, Gudang Sentra Bitung B1, Jalan Baitusaadah KM 9 Kadu, Tangerang 15810, Banten

\*Korespondensi Penulis: email: kholis.audah@sgu.ac.id

## Abstrak

Infeksi bakteri resistan antibiotik merupakan salah satu masalah besar dalam bidang kesehatan yang menuntut banyak penelitian dari berbagai multidisiplin ilmu. Secara global, 480.000 orang terinfeksi resistan TB setiap tahunnya dan belum dapat ditemukan solusinya. Hasil penelitian antibakteri resistan pada tahun 2000-2004, *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus* (MRSA) dan bakteri penghasil *Extended Spectrum Beta Lactamases* (ESBL) teridentifikasi di RSUD Dr. Soetomo Surabaya dan RSUP dr. Kariadi Semarang. Beberapa jenis bakteri menjadi resistan disebabkan oleh beberapa faktor. Pada umumnya, antibiotik bekerja dengan menembus membran sel dan mengganggu proses biosintesis peptidoglikan penyusun membran sel bakteri (antimitosis). Namun, mekanisme tersebut terbukti memicu resistansi bakteri. Lambat laun bakteri dapat mempelajari mekanisme dan meningkatkan resistansinya. Oleh karena itu, pendekatan yang tepat untuk mengeliminasi bakteri resistan adalah sangat penting dan seharusnya menjadi prioritas utama dalam bidang kesehatan. Pendekatan yang lebih tepat adalah dengan menggunakan senyawa kimia atau alami yang merusak membran sel secara langsung dari luar sel bakteri, sehingga peluang resistansi menjadi lebih kecil. Antibakteri tipe ini bekerja spesifik berikatan dengan peptidoglikan membran sel, sehingga menyebabkan peningkatan porositas membran sel dan menyebabkan lisis atau kematian sel. Artikel ini berisi pembahasan mengenai mekanisme kerja antibiotik, perkembangan resistansi bakteri dan bagaimana bakteri resistan tersebut dapat menyebar. Pada akhirnya, pemahaman tersebut dapat mendorong perkembangan sintesa antibakteri yang jauh lebih efektif dan aman dalam hal resistansi bakteri.

**Kata kunci:** bakteri resistan, peptidoglikan membran sel, antibakteri

# Peptidoglycan Cell Membrane as Antibacterial Target

Julkipli<sup>1</sup>, Kholis Abdurachim Audah<sup>1\*</sup>, Ayu M. Hapsari<sup>1</sup>, Haryanto Wardoyo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Engineering, Swiss German University, EduTown BSD City, Tangerang 15339, <sup>2</sup>PT. Novis Natura Navita, Gudang Sentra Bitung B1, Jalan Baitusaadah KM 9 Kadu, Tangerang 15810, Banten

\* Correspondence email: kholis.audah@sgu.ac.id

## Abstract

Antibiotic resistant bacterial infections are among of the major health problems that promote many studies from multidisciplinary fields. Globally, 480,000 people is infected by resistant TB every year and it can not be solved. The results of the study of antibacterial resistance in 2000-2004, Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and a bacteria Extended Spectrum Beta lactamases (ESBL) are identified in the Hospital dr. Soetomo and dr. Kariadi Semarang. Some types of bacteria become resistant due to several factors. In general, antibiotics worked through penetrating cell membranes and disrupting the process of peptidoglycan biosynthesis of bacterial cell membrane constituent (antimitotic). However, this mechanism proved to trigger bacterial resistance. The bacteria can learn the mechanisms and increase the resistance gradually. Therefore, the appropriate approaches to eliminate bacterial resistance is very important and should be a priority in the health field. A more appropriate approach is to use chemical or natural compounds that damage the cell membrane directly from the outside of the bacterial cell, so the chances of resistance becoming smaller. This type of work specific antibacterial bind to peptidoglycan cell membranes, resulting in increased porosity of cell membranes and cause cell lysis or death. This article contains a discussion of the mechanism of action of antibiotics, development of resistance in bacteria and how these resistant bacteria can spread. Ultimately, this understanding can encourage the development of antibacterial synthesis much more effective and safe in terms of bacterial resistance.

**Keywords:** resistant bacteria, *peptidoglycan cell membrane*, antibacteria

## Pendahuluan

Mikroba resistan meliputi bakteri, parasit (protozoa dan cacing), virus, dan jamur. Namun, resistansi tertinggi terjadi pada bakteri.<sup>1</sup> Masalah bakteri resistan tidak hanya terjadi di Indonesia tapi juga terjadi di seluruh dunia. Bakteri resistan menjadi masalah yang sangat pelik dan harus segera diatasi bersama-sama.

Resistansi disebabkan oleh insting alami bakteri untuk bertahan hidup dan akibat penggunaan antibiotik, antiseptik dan desinfektan yang kurang tepat (Wardoyo et al., 2016, unpublished data). Antibiotik merupakan obat yang secara umum diresepkan. Namun, 30 - 50% nya ternyata tidak diperlukan atau tidak bekerja optimal. Antibiotik juga digunakan pada hewan ternak untuk mencegah, mengontrol dan mengobati penyakit, dan meningkatkan produksi ternak.<sup>2</sup> Berbagai jenis limbah antiseptik dan desinfektan untuk kebutuhan sanitasi di masyarakat dan rumah sakit dibuang ke lingkungan dan menjadi sumber pemicu resistansi di lingkungan.<sup>3</sup>

Sebelum antibakteri ditemukan, bakteri hadir dan hidup dalam bentuk alami dan tidak mengembangkan resistansinya. Reaksi berlebihan manusia terhadap bakteri dengan menerapkan standar tinggi pada higienitas dan sanitasi menginduksi bakteri untuk bermutasi supaya tetap bisa bertahan hidup. Resistansi bakteri terhadap antibiotik menyebabkan peradaban kesehatan manusia mundur seperti sebelum antibiotik ditemukan.

Asia Tenggara yang meliputi negara-negara berkembang, termasuk Indonesia, memiliki angka kasus resistansi antibiotik tertinggi di dunia, khususnya infeksi yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus methicillin resistan* (MRSA).<sup>1</sup> *S. aureus* merupakan bakteri penyebab infeksi nosokomial yang banyak terjadi di Indonesia. Di negara maju, seperti Inggris, diperkirakan satu dari lima pasien pasca operasi esofagektomi terinfeksi *S. aureus* di *University Hospital of Wales*.<sup>4</sup>

Artikel ini dibuat untuk menjadi salah satu referensi tentang pemahaman bagaimana mekanisme kerja antibiotik, bagaimana penggunaan antibiotik yang tidak tepat justru menyebabkan bakteri resistan dan bagaimana infeksi bakteri resistan tersebut dapat menyebar. Pada akhirnya, pemahaman tersebut dapat mendorong penelitian multidisiplin ilmu untuk dapat mensintesa antibiotik yang jauh lebih efektif dan aman dalam hal resistansi bakteri baru dan mencegah penyebaran bakteri resistan.

### 1. Mekanisme kerja dan resistan antibiotik

Mekanisme umum antibiotik yang menyebabkan kematian sel bakteri berpusat pada penghambatan fungsi selular melalui interaksi primer antara antibiotik dengan target komponen sel bakteri. Antibiotik dapat diklasifikasikan berdasarkan komponen sel atau sistem yang dipengaruhinya. Berdasarkan kemampuannya, antibiotik dapat diklasifikasikan menjadi bakterisida (menyebabkan kematian sel) dan bakteristatik (menghambat pertumbuhan sel). Umumnya mekanisme bakterisida meliputi: penghambatan replikasi DNA, sintesis RNA, sintesis dinding sel, atau sintesis protein (5). Berikut penjelasan lebih detail mengenai mekanisme bakterisida:

#### a. Penghambatan replikasi DNA oleh antibakteri kelas fluoroquinolon

Fluoroquinolon merupakan antibiotik turunan dari asam nalidixic yang disintesis dari chloroquin (quinine). Fluoroquinolon dibedakan menjadi beberapa generasi berdasarkan pada struktur kimia dan perbedaan kualitatif dalam kemampuannya membunuh bakteri, yaitu: generasi pertama (asam nalidixic dan sinoksasin), generasi kedua (norfloksasin, ciprofloksasin, lomefloksasin, ofloksasin, dan levofloksasin),

generasi ketiga (sparfloksasin, gatifloksasin, dan grepafloksasin) dan generasi ke empat (trovafloksasin, moxifloksasin, dan gemifloksasin).<sup>5</sup> Pada saat replikasi DNA, Fluoroquinolon mengganggu kerja enzim DNA gyrase (topoisomerase II) dan topoisomerase IV (topo IV), dengan mengikat enzim tersebut pada saat pembelahan DNA dan mencegah untai DNA tersebut bergabung kembali.<sup>6</sup>

Resistensi antibiotik kelas fluoroquinolon terutama disebabkan oleh mutasi pada gen DNA gyrase, yakni *gyrA* yang menyebabkan penurunan afinitas antibiotik terhadap enzim yang membantu replikasi.<sup>7</sup>

b. Penghambatan sintesis RNA oleh antibakteri kelas rifampisin

Rifampisin menghambat transkripsi RNA dengan berikatan dengan subunit DNA yang secara aktif mentranskripsikan RNA polymerase. Secara umum, rifampisin tergolong sebagai bakterisida untuk bakteri Gram-positif dan bakteiostatik untuk bakteri Gram-negatif. Rifampisin merupakan antibiotik yang pertama kali digunakan untuk pengobatan melawan *Mycobacteria tuberculosis* (penyebab TB) dikarenakan induksi yang efisien dalam membunuh mycobacteria.<sup>8</sup>

Mutasi pada gen *rpo B* menyebabkan perubahan konformasi pada tempat ikatan antara rifampisin dan sub unit  $\beta$ . Perubahan pada tempat ikatan ini menyebabkan rifampisin tidak dapat terikat pada sub unit  $\beta$ .<sup>8</sup>

c. Penghambatan Sintesis dinding membran sel

$\beta$ -laktam dan glikopeptida merupakan kelas antibiotik yang mengganggu biosintesis homeostatik dinding membran sel. Penghambatan sintesis dinding membran sel menyebabkan perubahan bentuk dan ukuran sel, menginduksi respon stress sel, dan berakhir pada lisis sel  $\beta$ -laktam (penisilin, carbapenem, dan sefalosporin) bekerja menghambat ikatan unit peptidoglikan (PG) melalui penghambatan reaksi formasi ikatan peptida yang dikatalisasi oleh enzim transpeptidase.<sup>9</sup> Penghambatan ini tercapai dengan terbentuknya penisilin binding protein (PBP) pada sisi aktif enzim transpeptidase yang menonaktifkan enzim sehingga tidak dapat menghidrolisis ikatan yang terbentuk.

Mekanisme paling umum pada bakteri Gram-positif adalah dengan menurunnya afinitas PBP. Kehadiran PBP2a dari gen *mecA* merupakan awal berkembangnya MRSA. Sebelum PBP2a dikenal, resistansi penisilin dikarenakan aktivitas enzim penisilinase. Mekanisme resistansi utama pada bakteri Gram-negatif disebabkan oleh adanya enzim  $\beta$ -laktamase. Sebagai tambahan, penetrasi dan delesi fungsi porin berperan pada  $\beta$ -laktam tertentu. Delesi fungsi porin yang disertai produksi  $\beta$ -laktamase menyebabkan resistansi pada semua jenis  $\beta$ -laktam suatu hari nanti.<sup>10</sup>

Turunan antibiotik glikopeptida, vancomisin, bekerja menghambat sintesis PG dan aktivitas transglikosilase dan transpeptidase pada aktinobakteri. Umumnya, glikopeptida bertindak sebagai penghambat sterik pada saat pematangan PG dan mengurangi kekuatan mekanis dari sel, meskipun beberapa glikopeptida yang dimodifikasi menunjukkan reaksi kimia langsung dengan enzim transglikosilase.<sup>11</sup>

Mekanisme resistansi antibiotik kelas glikopeptida terkait dengan perubahan struktur substrat enzim yang bergabung dengan asam amino pada prekursor pentapeptida, yaitu penggantian C-terminal D-Ala dengan D-lactat atau D-serin yang menyebabkan afinitas vancomisin berkurang.<sup>12</sup>

#### d. Penghambatan sintesa protein

Kelas antibiotik penghambat sintesa protein merupakan kelas yang paling besar dan dibagi menjadi dua subkelas: penghambatan ribosom sub unit 50S dan 30S.<sup>5</sup> Penghambatan ribosom sub unit 50S meliputi antibiotik kelas macrolid (eritromisin), linkosamid (clindamisin), streptogramin (dalfopristin/ quinuprostin), amfenikol (kloramfenikol), dan oksazolidinon (linezolid). Pada umumnya, penghambat ribosom sub unit 50S bekerja dengan menghambatinisiasi translasi (oxazolidinon) atau translokasi peptidil tRNA yang menghambat raksi peptidiltransferase pada untai peptida awal. Kelompok antibakteri ini kehilangan kemampuan aktivitas antibakterinya ketika elongasi telah melewati panjang kritikal.<sup>13</sup>

Penghambatan ribosom sub unit 30S meliputi famili antibiotik tetrasiklin dan aminosiklitol. Tetrasiklik bekerja menghambat akses aminoasil-tRNA menuju ribosom. Kelas Aminosiklitol terdiri dari famili antibiotik spectinomisin dan aminoglikosid (streptomycin, kanamisin, dan gentamisin), yang berikatan dengan komponen 16SrRNA dari subunit ribosom 30S. Spectinomisin mengganggu stabilitas ikatan peptidil-tRNA ke ribosom dengan menghambat translokasi elongasi yang dipengaruhi katalis, tapi tidak menyebabkan protein *mistranslasi*.<sup>14</sup>

Diantara semua penghambat ribosom, turunan alami dari subkelas aminoglikosid merupakan satu-satunya yang bersifat bakterisida. Ikatan antara aminoglikosid dan ribosom tidak langsung menghentikan proses tranlasi protein. Antibiotik kelas ini memicu protein *mistranslasi* dengan menghasilkan asam amino yang salah pada perpanjangan untai peptide. Respirasi juga berperan penting pada serapan aminoglikosid dan sifat letalnya. Pada bakteri Gram-negatif seperti *E. coli*, setelah adsorpsi molekul antibiotik terjadi melalui interaksi elektrostatis, aminoglikosid mengubah potensial membran. Serapan yang dipengaruhi respirasi bergantung pada aktivitas sitokrom yang berasosiasi dengan membran dan mengatur potensial elektrokimia melalui *quinone pool*.<sup>14</sup>

Resistansi dapat terjadi karena tiga hal, yaitu: penurunan serapan; kurangnya reseptor; menurunnya afinitas ribosomsub unit 30Sterhadap aminoglikosida dan modifikasi enzim; plasmid yang membawa R factor yang mengkode pembentukan enzim, sebagai contoh: asetil transferase, nucleotidyltransferase dan phosphotransferase yang dapat mengubah dan menginaktifkan antibiotik aminoglikosid.<sup>14</sup>

## 2. Mekanisme penyebaran resistansi

Terdapat tiga area utama dalam penyebaran bakteri resistan. Berikut penjelasan secara lebih detail mengenai tiga area utama tersebut:

#### a. Penyebaran antibakteri resistan dari hewan ternak dan konsumsi daging hewan ternak

Intervensi untuk membatasi kemunculan dan penyebaran bakeri resistan pada hewan ternak dapat disesuaikan dengan langkah-langkah berikut: melarang dan membatasi penggunaan antibiotik sebagai pemicu pertumbuhan dan penggunaan non terapi lainnya, meningkatkan keamanan panganpertanian, mengembangkan strategi pengobatan hewan ternak alternatif dan meningkatkan kebiasaan higienis dalam konsumsi daging hewan ternak, mengembangkan program pelatihan untuk dokter hewan, petani, dan pengolah makanan dan perlunya dibangun sistem pengawasan resistan antibiotik terpadu pada hewan ternak.<sup>15</sup>

b. Penyebaran antibakteri resistan pada lingkungan dan masyarakat

Program pelatihan penggunaan antibiotik ditujukan untuk dokter, perusahaan obat dan masyarakat, supaya antibiotik tidak selalu diresepkan atau ditunda pemberiannya. Langkah selanjutnya harus mencakup pedoman resep antibiotik baru, pelaporan aktif antibiotik yang diresepkan dan dikonsumsi, dan pengawasan pelaksanaan program pada resistansi antibiotik. Namun, penerapan langkah-langkah tersebut memerlukan substansi kebijakan pemerintah baik skala nasional maupun internasional.<sup>16</sup>

Fakta lainnya, antibakteri masuk ke lingkungan sebagai limbah darimasyarakat atau rumah sakit yang dibuang melalui saluran air dan masuk ke sungai. Akumulasi antibakteri selanjutnya menseleksi bakteri resistan, mengubah lingkungan menjadi *reservoir* antibiotik resistan raksasa sejalan dengan peningkatan polusi. Langkah strategis untuk mengurangi paparan lingkungan harus diutamakan sebagai peningkatan sistem industri dalam hal sanitasi dan dekontaminasi limbah rumah sakit.<sup>3</sup>

c. Penyebaran antibakteri resistan pada fasilitas kesehatan umum (rumah sakit, puskesmas, dan klinik)

Tingkat pemunculan antibakteri resistan pada fasilitas kesehatan umum sangat berkaitan dengan penggunaan ruang VIP atau unit terbuka (dua atau tiga pasien dalam satu kamar), pengawasan penggunaan antibiotik, kebersihan lingkungan, sterilitas alat rumah sakit, higienitas dan program kontrol infeksi. Sebagai tambahan, langkah pengontrolan seharusnya disesuaikan dengan bakteri yang bersangkutan, identifikasi infeksi baik endemik maupun epidemik.<sup>17</sup>

### 3. Desain antibiotik yang aman dan efektif

Resistansi antibiotik berkembang ketika bakteri mengalami mutasi yang membuat bakteri mampu bertahan melawan antibiotik. Ini merupakan awal munculnya strain patogen yang resistan terhadap antibiotik tertentu, bahkan untuk semua kelas antibiotik. Manusia membutuhkan antibiotik yang mudah diserap tubuh, berpotensi melawan bakteri pada rentang yang luas dan aman untuk tubuh manusia.

Pertimbangan utama dalam mengonsumsi antibiotik adalah seberapa banyak yang dikonsumsi (intake) dan seberapa banyak yang diserap (uptake) oleh tubuh, sehingga dapat dipastikan bahwa senyawa antibiotik tersebut sampai pada bakteri yang ditargetkan. Darah kaya kandungan air dan protein yang memiliki kemampuan untuk mengikat senyawa kimia, maka senyawa antibiotik sejatinya harus larut dalam air dan memiliki sifat pengikatan spesifik untuk mengikat senyawa baik protein lain atau non protein yang dikandung dalam darah. Pertimbangan lainnya adalah dosis penggunaan dan kepekaan organ terhadap senyawa antibiotik.

Ketika senyawa kimia sampai pada daerah terinfeksi, senyawa tersebut harus langsung dapat bereaksi dengan komponen spesifik bakteri penyebab infeksi. Antibiotik harus memiliki target spesifik komponen bakteri yang belum pernah dieksploitasi atau dapat mengeksploitasi komponen bakteri dengan mekanisme yang berbeda, sehingga target dapat dirusak tanpa atau sedikit menimbulkan resistansi.

PG membran sel selalu menjadi target utama, yang mengarah pada penghambatan proses pembelahan (antimitosis). Namun, umumnya antibiotik tidak bekerja langsung pada PG membran sel, melainkan pada biosintesisnya yang pada akhirnya menghasilkan bakteri resistan. Kelas fluoroquinolon yang mengganggu replikasi DNA, kelas Rifampisin yang mengganggu sintesis RNA, kelas  $\beta$ -laktam yang mengganggu sintesis protein.

Menurut Wardoyo (2016, unpublished data), senyawa antibiotik harus menyerang bakteri langsung dari luar -berikatan langsung dengan PG membran sel, sehingga kemungkinan terjadinya resistansi menjadi lebih kecil. Konsep ini diadopsi dari mekanisme alkohol yang dapat membunuh bakteri atau bersifat antiseptik dan tidak pernah menyebabkan resistansi. Senyawa antibiotik baru ini harus larut dalam air dan berikatan spesifik hanya dengan PG membran sel. Proses yang terjadi selanjutnya adalah ikatan antara antibiotik-PG membran sel mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran sel yang ekstrim, sehingga menyebabkan sel bakteri menjadi lisis.

Penggunaan ekstrak tumbuhan juga dapat menjadi alternatif untuk dijadikan antibakteri (Audah et al., 2016, unpublished data). Kandungan *fenolik* dan *flavonoid* yang tinggi pada ekstrak tumbuhan diyakini memiliki kemampuan antibakteri. Mekanisme antibakteri *fenolik* meliputi adsorpsi, dirupsi membran sel bakteri, interaksi dengan enzim dan metal ion deprivasi. Sedangkan mekanisme antibakteri flavonoid meliputi sifat lipofil *flavonoid*, inaktivasi enzim *adhesion* bakteri, dan transport protein membran sel bakteri.<sup>18</sup>

## Kesimpulan

Pendekatan multidisiplin ilmu demi penemuan antibakteri baru (antibiotik, antiseptik dan desinfektan) yang aman dan efektif dalam hal resistansi sangat diharapkan. Terlepas dari sumber antibakteri tersebut, apakah murni senyawa kimia atau senyawa aktif alami dari ekstrak tumbuhan. Beberapa hal yang harus dipastikan adalah antibakteri baru harus memiliki nilai intake dan uptake yang baik, bekerja spesifik, aman untuk manusia, dan yang paling penting adalah tidak menimbulkan resistansi.

Kebijakan pemerintah juga sangat diharapkan dalam hal pengaturan penggunaan antibiotik yang diresepkan oleh dokter baik dari fasilitas umum (puskesmas, rumah sakit daerah, maupun rumah sakit pusat) maupun dokter praktek pribadi. Perlu juga dikembangkan mekanisme skrining awal untuk mendiagnosa keberadaan bakteri resistan pada pasien, sehingga dapat pasien yang terinfeksi bakteri resistan dapat menerima perlakuan khusus. Selain itu, dokter juga berkewajiban untuk memberi pemahaman yang baik mengenai penggunaan antibiotik kepada masyarakat.

## Ucapan terima kasih

Penulis ingin menyampaikan rasa terima kasih untuk PT. N3 (Novis Natura Navita) yang telah memberikan dana penelitian kepada penulis. Penulis juga ingin menyampaikan terima kasih kepada Bobby H. dan Doddy Kustaryono (STKIP Surya) dan semua pihak yang telah membantu kegiatan penelitian penulis baik secara langsung maupun tidak langsung.

## Daftar Pustaka

1. WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: WHO Press; 2014.
2. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States; 2014
3. Pruden A, Larsson DG, Amezcua A, Collignon P, Brandt KK, Graham DW, et al. Management options for reducing the release of antibiotics and antibiotic resistance genes to the environment. *Environ Health Perspect.* 2013;121:878–85.
4. Bowrey DJ, Evans MD, Clark GWB. *Impact of Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Infection on Outcome after Esophagectomy.* *World J Surg.* 2007; 31:326-331

5. Kohanski MA, Dwyer DJ, and Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(6):423–435.
6. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52:385–92.
7. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. 2014; 22(8):438-445
8. Burman WJ, Gallicano K, Peloquin C. Comparative pharmacokinetics and pharmacodynamics of the rifamycin antibacterials. *Clin Pharmacokinet*. 2006;40:327–41.
9. Holtje JV. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62:181–203.
10. Bush K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*. 2012;31(1):43-56
11. Ge M, et al. Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-AlaD-Ala. *Science*. 1999;284:507–11.
12. Courvalin P. Vancomycin resistance in Gram-positive cocci. *Clin. infect. Dis*. 2006; 42(1):S25–34.
13. Tenson dan Mankin. MicroReview: Antibiotics and the ribosome. *Molecular Microbiolog*. 2006; 59(6):1664–77
14. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65:232–60.
15. Roca et al. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbe and New Infect*. 2015; 6: 22–29
16. Spellberg B, Blaser M, Guidos RJ, Boucher HW, Bradley JS, Eisenstein BI, et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin Infect Dis*. 2011;52(Suppl. 5):S397–428.
17. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, De Angelis G, Falcone M, Frank U, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(Suppl. 1):1–55.
18. Baba SA, Malik SA. Determination of total phenolic and flavonoid content, antimicrobial and antioxidant activity of a root extract of *Arisaema jacquemontii* Blume. *J. Taibah Univ. Sci*. 2015; 9(4):449–454.

# Kajian Bioinformatika: Prediksi Struktur dan Epitop Protein E (*envelope*) Virus ZIKA (ZIKV) untuk Pengembangan Vaksin

Tri Panjiasih Susmiarsih

Bagian Biologi Fak. Kedokteran, Universitas YARSI, Jakarta  
susmiarsih@gmail.com

## Abstrak

Virus Zika (ZIKV), termasuk flavivirus, yang ditransmisi ke manusia melalui vektor nyamuk *Aedes aegypti*. Infeksi ZIKV meningkatkan risiko mikrosephalis pada fetus. Protein E (*envelope*) ZIKV terakit atas domain I (*central -barrel-shaped*), domain II (*finger-like domain*) dan domain III (*C-terminal immunoglobulin-like*). Domain protein E yang berperan sebagai epitop untuk respon imun seluler dan humoral pada virus Zika belum banyak diketahui. Analisis imunologi komputasional (*in silico*) dapat digunakan sebagai studi pendahuluan dalam mendisain epitop peptida untuk vaksin ZikV. Prediksi struktur sekunder protein E ZikV (No. *Accession GenBank*: ANK57899.1) menggunakan perangkat lunak PSIPRED dan struktur 3D menggunakan PYMOL. Prediksi antigenisitas protein dengan perangkat VAXIJEN. Identifikasi epitop sel T dengan NetCTL dan PREDIVAC, sedang IEDB and SVMTrip digunakan untuk determinasi epitop sel B. Situs aktivasi protein E diidentifikasi menggunakan Swiss model (PROSITE). Hasil penelusuran bioinformatika *in silico* menunjukkan struktur sekunder protein E (504 asam amino) tersusun atas bentuk  $\alpha$ -heliks (61 residu),  $\beta$ -sheets (213 residu) dan koil (230 residu). Ada empat sikuen asam amino yang berpotensi sebagai epitop sel T CD8+ yang dapat berinteraksi dengan alel-alel MHC kelas I yaitu GLDFSDLYY, FSDLYYLTM, SIQPENLEY dan MAEVRSYCY sedang YRIMLSVHG, FKSLFGGMS, FTKIPAETL, MLELDPPFG merupakan epitop sel T CD4+ yang potensial untuk MHC kelas II. Analisis dengan Bepipred dan SVMTrip mengindikasikan sikuen peptida TGHETDENR (asam amino no. 156-164) sebagai epitop protein E yang mampu menginduksi respon imun sel B. Sikuen asam amino TGHETDENR ini merupakan situs atau tempat yang potensial terjadinya N-glikosilasi pada protein E ZIKV.

**Kata kunci:** epitop, *Immune Epitope Database*, Virus ZIKA

# An overview of bioinformatics tools: structure and epitope prediction of E (Envelope) Protein ZikV to vaccine development

Tri Panjiasih Susmiarsih

Departement of Biology, Medicine Faculty of YARSI University, Jakarta  
susmiarsih@gmail.com

## Abstract

Zika virus (ZIKV), a flavivirus, is thought to be principally transmitted to humans by the mosquito (*Aedes aegypti* vector). ZIKV generally causes an increased risk of developing microcephaly in the fetus. E (envelope) protein ZIKV resembles three distinct domains: a central b-barrel-shaped domain I, an elongated finger-like domain II, and a C-terminal immunoglobulin-like domain III. The domains, that can act as epitope targets of humoral and cellular immune responses in Zika virus (ZIKV) are currently unknown. Computational immunologic analysis (*in silico*) can be used an introductory approach to design an epitope-based peptide vaccine against ZikV. We predicted the secondary structure of the E (envelope) protein of ZikV (No. Accession GenBank: ANK57899.1) using an online server PSIPRED and predicted the 3D structure of E protein using PYMOL. The antigenic prediction of the E protein ZikV determined an online server VAXIJEN. NetCTL and PREDIVAC servers identified T-cell epitope, B-cell epitope prediction was determined using IEDB and SVMTrip. Activated sites of the E protein were identified using Swiss model (PROSITE). *In silico* bioinformatic analysis indicated the secondary structure of E protein (504 residues) from its amino acid sequence describes the  $\alpha$ -helix (61 residues),  $\beta$ -sheets (213 residues) and coil (230 residues). The four potential CD8+ T-cell epitopes along with their interacting MHC class I alleles: GLDFSDLYY, FSDLYYLTM, SIQPENLEY and MAEVRSYCY. Presents four sequences, YRIMLSVHG, FKSLFGGMS, FTKIPAETL, MLELDPPFG could act as potential CD4+ T cell epitopes for MHC class II alleles. Bepipred linear epitope prediction and SVMTrip were used, the peptide sequences TGHETDENR (no. 156 to 164 amino acids) were capable of inducing the desired immune response as B-cell epitopes, the sequences are potential N-glycosylation site of E protein ZIKV.

**Keyword:** epitope; *Immune Epitope Database*, ZIKA virus

## Pendahuluan

Kajian tingkat dasar molekuler hingga tingkat klinis sangat diperlukan untuk kemajuan pengetahuan dan pemahaman berbagai jenis penyakit. Ilmu bioinformatika dapat menjembatani perkembangan pengetahuan analisis tingkat seluler dan molekuler dasar dengan klinik. Pada tingkat klinik, perawatan pada pasien melibatkan diagnosis, prognostic, preventif dan terapi, yang didasari oleh penemuan biologik dari berbagai penelitian. Ilmu bioinformatika dapat menganalisis data biologik dasar, termasuk sekuen DNA, ekspresi RNA, protein dan molekul kecil yang berada di dalam dan sekitar sel *in silico*.<sup>1</sup> Pengetahuan bioinformatika semakin berkembang pesat dan berperan sebagai perangkat dalam mengembangkan dan mengaplikasikan metode yang diperoleh dari analisis molekuler, data genetik dan seluler ke arah metode konseptual klinis seperti metode pengobatan, penyakit dan gejala-gejala yang diderita pasien.<sup>2</sup>

ZIKV merupakan arbovirus (*arthropod-borne virus*) yang masih termasuk keluarga Flavivirus. Genom ZIKV berupa RNA, seperti kebanyakan Flavivirus lainnya, ZIKV ditransmisikan ke manusia melalui gigitan nyamuk *Aedes*. Virus ini menimbulkan bahaya patogen, seperti halnya pada *yellow fever virus* (YFV), *dengue virus* (DENV), *West Nile virus* (WNV), *St. Louis encephalitis virus* (SLEV), *Japanese encephalitis virus* (JEV) atau *tick-borne encephalitis virus* (TBEV) (Gould and Solomon, 2008). Infeksi ZIKV merupakan penyakit infeksi yang mewabah secara global ketiga setelah virus flu H1N1 dan virus Ebola.<sup>3</sup> Secara epidemiologi infeksi ZIKV telah menyebar luas ke daratan Asia, Afrika, Amerika dan sebagian Eropa.

Langkah-langkah pencegahan penularan ZIKV yang mungkin dapat dilakukan dan dianggap efektif antara lain dengan perlindungan individu terhadap gigitan nyamuk dan pengendalian vektor, namun demikian langkah-langkah tersebut ternyata tidak cukup untuk menekan angka kesakitan sehingga diperlukan suatu pencegahan vaksin untuk menghindari penularan dan penyebaran ZIKV menjadi lebih luas karena transmisi ZIKV tidak hanya melalui vector nyamuk namun telah pula dilaporkan adanya transmisi melalui transfusi darah.<sup>4,5</sup> Target epitop yang dapat menimbulkan respon imun seluler dan humoral pada ZIKV selama ini belum diketahui sementara itu infeksi ZIKV telah menjadi pandemik dan dikaitkan dengan beberapa gangguan pada bayi yang dilahirkan.<sup>6,7,8,9</sup> Diharapkan pengembangan vaksin dengan menggunakan protein E ZIKV dapat menginduksi produksi antibodi terhadap semua strain virus. Protein E bertanggung jawab memediasi pengikatan dan fusi membran virus saat proses infeksi.

Pencarian kandidat vaksin ZIKV dapat dilakukan dengan pendekatan bioinformatika. Metode bioinformatika memadukan antara teknologi komputasi dengan biologi molekuler, yang memungkinkan dilakukan suatu simulasi molekuler dengan akurasi hasil yang cukup tinggi. Metode ini telah banyak dikembangkan untuk kepentingan berbagai bidang, salah satunya untuk desain vaksin. Pendekatan komputasi dapat menghemat pengeluaran dan waktu yang dibutuhkan untuk menyaring sejumlah besar epitop dibandingkan dengan teknik eksperimental dan memberi keyakinan tinggi dalam menemukan hasil yang diinginkan.

Pendekatan bioinformatika memiliki beberapa keunggulan diantaranya: lebih cepat, hasilnya memiliki akurasi yang tinggi, biaya dapat ditekan dan simulasi molekuler dapat dilihat lebih jelas. Desain vaksin ZIKV dengan pendekatan bioinformatika dapat dilakukan antara lain dengan penelusuran data protein, prediksi struktur dan penelusuran antigenisitas epitope protein E ZIKV.

## Material dan Metode

### Material

Protein E (*envelope*) ZIKV (No. *Accession GenBank*: ANK57899.1)

### Metode

1. Analisis struktur genom ZIKV dan fungsinya menggunakan database bioinformatika dari situs [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov) menu gene dan PubMed
2. Prediksi struktur sekunder protein E ZikV menggunakan perangkat lunak <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> menu PSIPRED dan struktur 3D menggunakan PYMOL.
3. Prediksi antigenisitas protein dengan perangkat VAXIJEN. Identifikasi epitop sel T dengan NetCTL dan PREDIVAC, sedang IEDB and SVMTrip digunakan untuk determinasi epitop sel B.
4. Situs aktivasi protein E diidentifikasi menggunakan Swiss model (PROSITE).

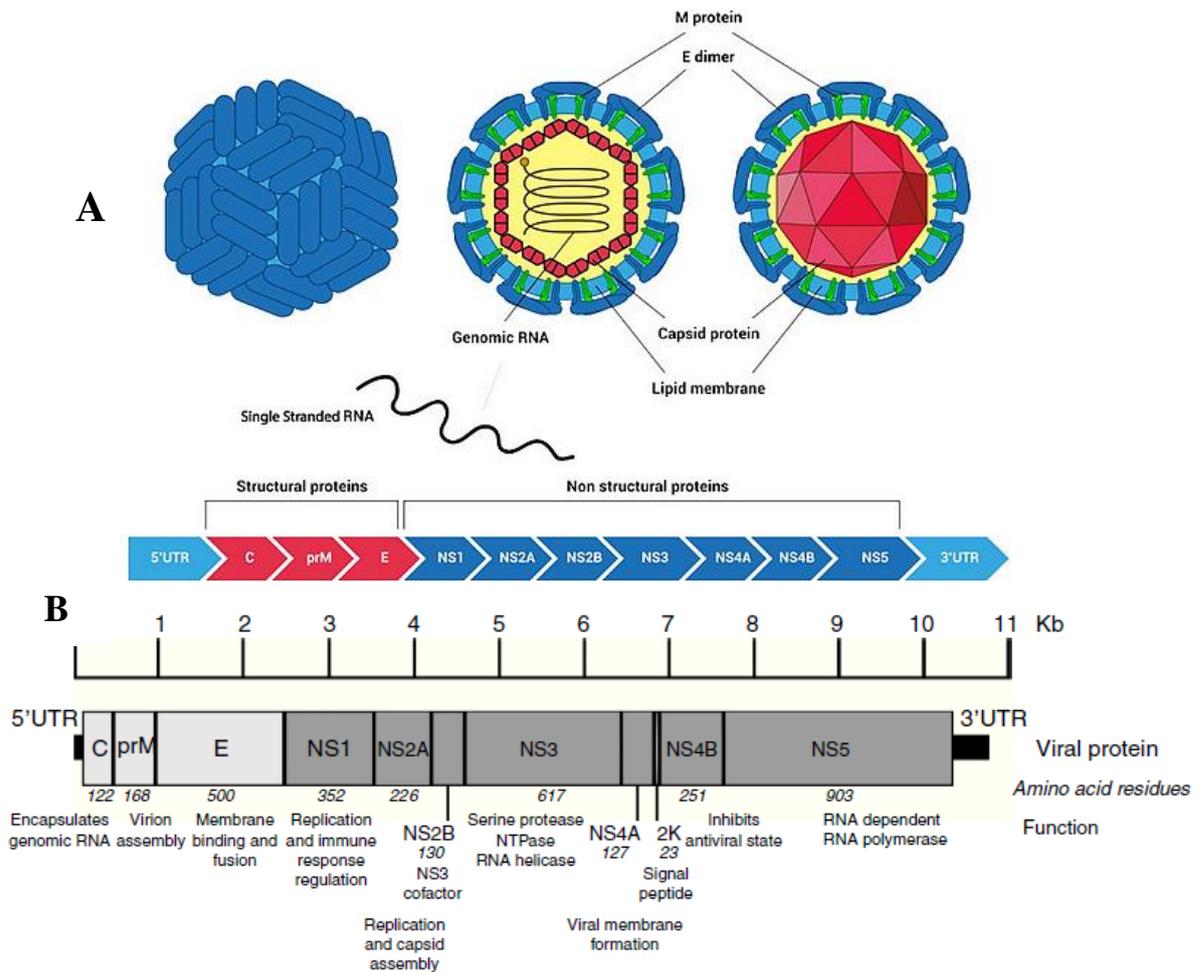
## Hasil Penelusuran dan Diskusi

### Analisis Struktur Genom Virus Zika

Virus Zika (ZIKV), termasuk keluarga flavivirus, yang ditularkan oleh nyamuk *Aedes*, pertama kali diidentifikasi tahun 1947 pada monyet di Uganda, dan kemudian pada manusia di Nigeria. Virus ini terdeteksi di Asia selatan dan timur tahun 1980-an, di Mikronesia tahun 2007 dan Amerika pada tahun 2014 yang ditandai dengan ledakan kasus yang terinfeksi ZIKV. Infeksi ZIKV ditandai dengan munculnya penyakit ringan seperti demam, sakit kepala, ruam, arthralgia, konjungtivitis dan hingga kini virus ini dikaitkan dengan sindroma Guillain-Barre (GBS) dan mikrosefali.

Seperti anggota lain dari Flavivirus, genomik ZIKV (Gambar 1) berupa RNA untai tunggal, panjang 10794 kb dengan 2 *flanking non-coding regions* (5' and 3' NCR) dan satu *open reading frame* yang menyandi poliprotein 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', protein ini menyusun bagian *capsid* (C), *precursor of membrane* (prM), *envelope* (E) dan tujuh *non-structural proteins* (NS) yaitu NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B dan NS5.<sup>10,11</sup>

Dari hasil analisis urutan poliprotein memprediksi kehadiran potensi protein situs N-glikosilasi pada protein prM, E, dan NS1<sup>10,12,13</sup> namun arti fungsional N-glikosilasi belum diketahui secara jelas flavivirus karena pada beberapa flavivirus deglikosilasi masih dapat mempertahankan antigenisitasnya hal ini menunjukkan karbohidrat tidak memainkan peran utama dalam sifat antigenik virus dan tidak mengubah fungsi epitop.<sup>14</sup> Di sisi lain, glikosilasi dapat digunakan untuk replikasi dan pematangan.<sup>15</sup> Selain itu, dalam kasus ZIKV, ada perbedaan antara strain flavivirus dengan penghilangan 12 basa nukleotida pada gugus glikosilasi di posisi 154 dari protein E (E-154).<sup>12,16</sup>



**Gambar 1. Struktur Genom ZIKV. A. Morfologi ZIKV. Virus tersusun atas genom RNA, protein Capsid (C), protein Membran (prM), protein envelope (E) dan protein NS. B. Organisasi genom ZIKV. RNA untai tunggal dengan panjang 10794 kb menyandi protein struktur (C, prM dan E) dan protein non struktur (NS).**

Protein E ( $\approx 53$  kDa) merupakan protein yang sebagian besar menyusun permukaan virus, protein ini terlibat dalam siklus sel virus, memediasi pengikatan dan fusi membran. Protein NS5 protein ( $\approx 103$  kDa) merupakan protein virus yang paling besar dan pada daerah C-terminal nya mempunyai aktivitas RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) sedang daerah N-terminus terlibat pada proses *RNA capping* dan memiliki aktivitas metil transferase.<sup>11</sup> Daerah 3'NCR dari genom ZIKV tersusun atas 428 nucleotida yang terlibat dalam pengenalan faktor seluler, translasi, stabilisasi genom dan pengemasan RNA. Protein E disusun sebagai dimer, dengan tiga dimer domain (Gambar 2) yaitu DI (*central b-barrel-shaped*), DII (*finger-like*) dan DIII (*C-terminal immunoglobulin-Like*). DI bertindak sebagai jembatan antara DII dan DIII. Pada ujung DII terdapat *loop fusion*, yang berinteraksi dengan membran endosomal selama proses fusi. Pada domain DIII terdapat *reseptor binding site* yang memiliki peran penting dalam proses fusi.<sup>17</sup>



**Gambar 2. Daerah Domain Protein E. Domain I tersusun atas asam amino 1-51, 132-192, 280-295 (merah); domain II disusun oleh asam amino urutan 52-130; 193-280 (kuning), domain III disusun oleh asam amino urutan 296-505 (biru). Loop fusion berada pada asam amino urutan 98-109.**

### Prediksi Protein E ZIKV : Struktur Sekunder

Pengetahuan tentang struktur protein berperan penting dalam memahami fungsi protein, merekonstruksi struktur protein<sup>18</sup> dan mempelajari interaksi protein dengan protein dan interaksi antigen dan antibodi.<sup>19</sup> Prediksi struktur protein dengan menggunakan bioinformatik meliputi pencarian sekuen yang serupa, membandingkannya dengan berbagai sekuen, identifikasi dan karakterisasi domain, prediksi struktur sekunder, penanda protein, mengkonstruksi dan memvalidasi model tiga dimensi.<sup>20</sup>

Struktur sekunder merupakan distribusi residu asam amino yang spesifik yang berada di sekeliling hingga ujung, menyusun rantai  $\alpha$ -heliks atau  $\beta$ -strand.<sup>21</sup> Untuk memprediksi struktur sekunder protein dapat dicari melalui situs <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> menu PSIPRED. Situs PSIPRED merupakan situs untuk memprediksi struktur protein berdasarkan sekuen asam aminonya dengan akurasi tinggi dan paling banyak digunakan.

Hasil penelusuran didapatkan urutan asam amino-asam amino protein E ZIKV adalah sebagai berikut:

GenBank: ANK57899.1

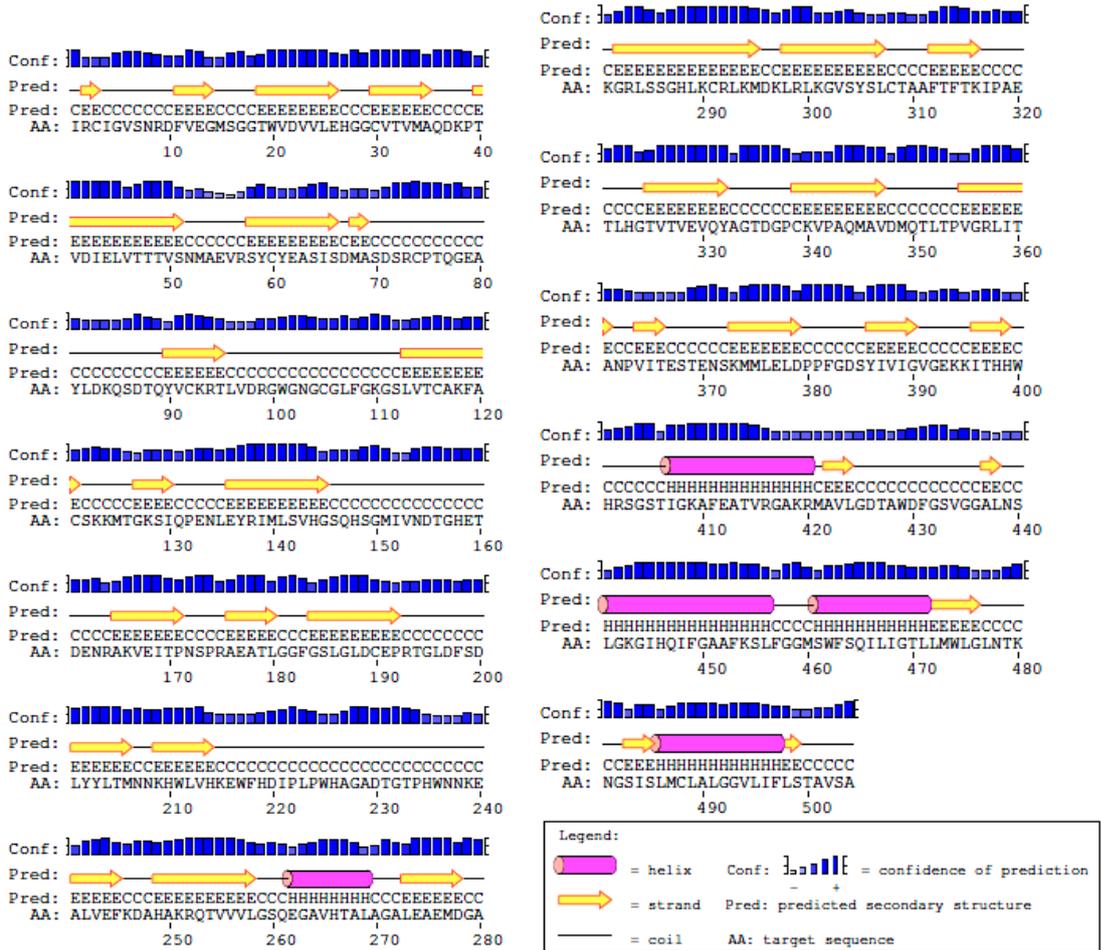
ANK57899.1 envelope protein, partial [Zika virus]

```

IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTNSMAEVRSYCYEASISDMAS
DSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDRTGWNCGFLFGKGSVTCAKFACSKKMTGKSIQPENLEYRIM
LSVHGSQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATLGGFGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNNKH
WLVHKEWFHDIPLPWHAGADTGTPHWNNKEALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALEAEMDGA
KGRLSSGHLKCRCLKMDKLRKLGVSYSLCTAAFTFTKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQ
TLTPVGRITANPVITESTENSKMMLELDPPFGDSYIVIGVGEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKR
MAVLGDTAWDFGSGGALNSLGKGIHQIFGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLMWLGLNTKNGSISLMCLA
LGGVLIFLSTAVSA

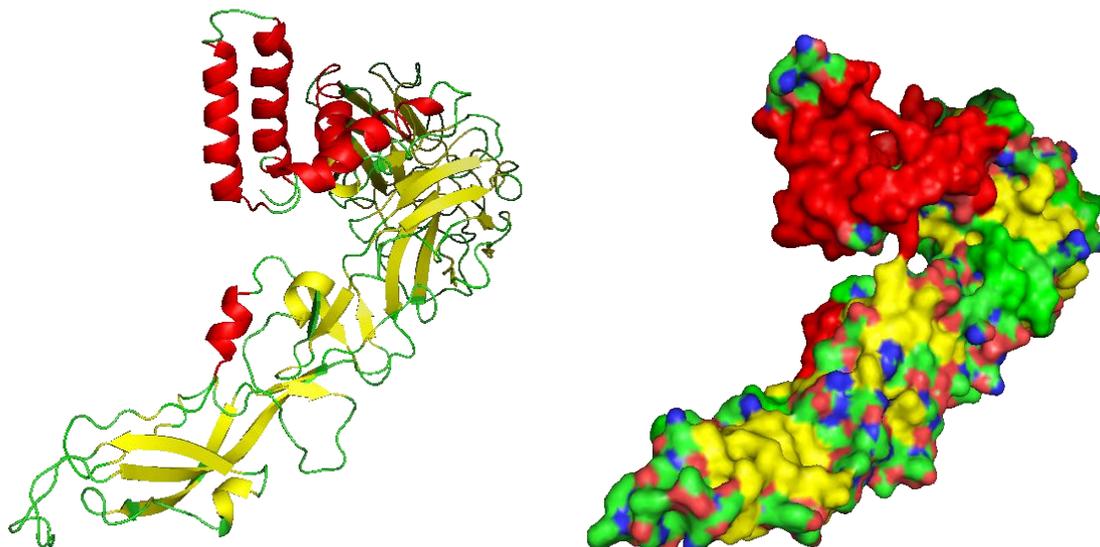
```

Dari hasil penelusuran di atas, kemudian ditelusuri struktur sekunder protein E ZIKV menggunakan situs PSIPRED. Protein E ZIKV (504 asam amino) memiliki struktur sekunder yang atas bentuk  $\alpha$ -heliks (61 residu),  $\beta$ -sheets (213 residu) dan koil (230 residu) (Gambar 3).



**Gambar 3. Struktur sekunder protein E ZIKV.**

Untuk mencari model struktur protein 3 dimensi (3D) dapat ditelusuri melalui situs [www.ncbi.nlm.gov](http://www.ncbi.nlm.gov) menu BLAST atau [www.rcsb.org/pdb/](http://www.rcsb.org/pdb/). Jika protein yang dicari belum mempunyai model struktur 3D maka dapat meminta bantuan ke situs [www.expasy.com](http://www.expasy.com) menu SwissModel dan klik *automated mode*, atau situs [www.pdb.org](http://www.pdb.org). Pembuatan model struktur 3 dimensi harus dimulai dengan menyimpan data model dalam bentuk PDB *file* yang merupakan hasil pencarian dari situs [www.pdb.com](http://www.pdb.com) atau hasil dari pencarian di situs [www.expasy.com](http://www.expasy.com) menu SwissModel sub menu *Automated mode* yang dikirim *server* ke alamat email kita. Kemudian dengan program PYMOL kita dapat merekonstruksi model struktur ZIKV. Hasil rekonstruksi protein E ZIKV dengan PYMOL dapat dilihat pada Gambar 4.



**Gambar 4. Model struktur 3D protein ZIKV. A. Struktur 3D protein berbentuk kartun, rantai heliks (merah), strand (kuning) dan koil (hijau). B. Struktur 3D model surface.**

### Prediksi Daerah Epitop Protein E ZIKV

Pengembangan vaksin zikv didasarkan pada skrining beberapa epitope yang diprediksi paling antigenic yang dapat mengarahkan system kekebalan tubuh untuk melindungi manusia dari infeksi zikv. Perancangan vaksin berbasis peptida dapat menggunakan pendekatan *in silico* bioinformatika, pendekatan ini bertujuan menyaring peptide yang berperan sebagai epitop sel T dengan sifat imunogenik tinggi karena vaksin terhadap epitop sel T lebih menjanjikan untuk memori respon imun yang cukup lama, selain itu bioinformatika dapat mengidentifikasi epitop potensial sel B dan MHC dari protein E glikoprotein ZIKV

Terdapat beberapa cara dan pendekatan untuk memprediksi epitop sel B pada suatu protein. Prediksi epitop secara *in silico* dapat menggunakan beberapa parameter yaitu berdasarkan hidrofobisitas, hidrofilitas, *accessibility* pelarut, fleksibilitas, antigenisitas dan struktur sekunder protein.<sup>22</sup>

Umumnya reaksi epitop dengan antibodi terjadi pada permukaan protein sehingga asam amino penyusun epitop untuk sel B cenderung bersifat hidrofilik. Oleh karena itu, sifat hidrofilik suatu residu asam amino dijadikan kriteria dalam memprediksi epitop sel B pada penelitian ini. Mayoritas epitop yang akan dikenali oleh antibodi adalah dalam bentuk epitop terkonformasi (*discontinuous epitope*), yaitu sekuen asam amino yang tidak berurutan atau terputus dalam struktur primer namun saling berdekatan dalam struktur protein tersier (3D) yang terlipat (*folded*). Epitop ini akan berinteraksi dengan antibodi berdasarkan bentuk atau struktur tersier antigen.<sup>23</sup>

Prediksi daerah epitop protein E ZIKV ditelusuri dengan perangkat VaxiJen dan NetCL. VaxiJen merupakan server untuk memprediksi antigen dan sub unit vaksin. Prinsip VaxiJen didasarkan pada nilai ACC (*auto cross covariance*) yang mendeskripsikan ukuran molekul, hidrofobisitas dan polaritas asam amino, nilai ini merupakan prediktor ikatan MHC-peptida. Prediksi antigenisitas protein dengan perangkat VAXIJEN menunjukkan skor nilai 0.6178.

Dari hasil penelusuran dengan NetCTL terdapat empat sikuen asam amino yang berpotensi sebagai epitop sel T CD8+ yang dapat berinteraksi dengan alel-alel MHC kelas I yaitu GLDFSDLYY, FSDLYYLTM,SIQPENLEY dan MAEVRSYCY. Penelusuran dengan perangkat PREDIVAC menunjukkan peptida YRIMLSVHG, FKSLFGGMS, FTKIPAETL, MLELDPPFG (dengan nilai ikatan sebesar 94-85%) merupakan epitop sel T CD4+ yang potensial untuk MHC kelas II.

Identifikasi epitope sel B menggunakan metode berbasis asam amino. Metode Emini memprediksi aksesibilitas permukaan protein. Penelusuran dengan perangkat IEDB metode Emini menunjukkan aksesibilitas permukaan protein rata-rata adalah 1.000, skor minimum 0.074 dan maksimum 6.347. Peptida yang diprediksi kuat bersifat antigenik berdasar aksesibilitas permukaan adalah TGHETDENRA (urutan asam amino 156-165).

Metode Chaus dan Fasman memprediksi sifat hidrofilik dari epitope protein berbentuk *strand* atau  $\beta$ -*turn*. Nilai rata-rata kecenderungan epitope protein E ZIKV bersifat hidrofilik adalah 0.987 dengan nilai maksimal 1.421 dan minimum 0.691. Set threshold untuk penentuan hidrofilik adalah 1. Daerah residu asam amino yang memiliki sifat hidrofilik adalah MIVNDTGHETDENR (no.151-164).

Analisis dengan Bepipred dan SVMTrip yang didasarkan pada model Hidden Markov mengindikasikan sikuen peptida TGHETDENR (asam amino no. 156-164) sebagai epitop protein E yang mampu menginduksi respon imun sel B.

Analisis dengan perangkat PROSITE menunjukkan sikuen asam amino TGHETDENR ini merupakan situs atau tempat yang potensial terjadinya N-glikosilasi pada protein E ZIKV. Glikosilasi merupakan faktor yang paling penting dalam mendesain vaksin karena glikosilasi protein berfungsi sebagai sinyal pertama untuk aktivasi sel B, komponen protein disajikan kepada sel T-helper, sehingga meningkatkan peralihan antibodi dari IgM ke IgG dan generasi sel memori B.<sup>24</sup>

## Kesimpulan

Bioinformatika dapat digunakan untuk memprediksi epitope virus ZIKA, dalam menstimulir respon imun sel T dan sel B. Pendekatan komputasi (in silico) ini terhadap epitope protein E ZIKV memprediksi residu yang berpotensi sebagai epitop sel T CD8+ adalah GLDFSDLYY, FSDLYYLTM,SIQPENLEY dan MAEVRSYCY sedang YRIMLSVHG, FKSLFGGMS, FTKIPAETL, MLELDPPFG merupakan epitop sel T CD4+. Residu TGHETDENR (asam amino no. 156-164) sebagai epitop yang mampu menginduksi respon imun sel B dan situs potensial terjadinya N-glikosilasi pada protein E ZIKV.

## Daftar Pustaka

1. Altman RB. Translational bioinformatics: linking the molecular world to the clinical world. Clin Pharmacol Ther. 2012 Jun;91(6):994-1000.
2. Altman RB, Miller KS. 2010 translational bioinformatics year in review. J Am Med Assoc. 2011 Jul-Aug;18(4):358-66.
3. Galan-Huerta KA, Rivas-Estilla AM, Martinez-Landeros EA, Arellanos-Soto D, Ramos-Jiménez J. The Zika virus disease: An overview. Medicina Universitaria. 2016;18(71):115-124.

4. Musso D, Nhan T, Robin E, et al. 2014. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014;19.
5. Boadle A. Brazil reports Zika infection from blood transfusions. Reuters. 2016. Tersedia dari <http://www.reuters.com/article/us-healthzika-brazil-blood-idUSKCN0VD22N>.
6. Fauci AS, Morens DM. Zika Virus in the Americas - Yet Another Arbovirus Threat. *N Engl J Med.* 2016;374:601-604.
7. Driggers RW, Ho CY, Korhonen EM, Kuivanen S, Jääskeläinen AJ, Smura T, Rosenberg A, Hill DA, DeBiasi RL, Vezina G, Timofeev J, Rodriguez FJ, Levanov L, Razak J, Iyengar P, Hennenfent A, Kennedy R, Lanciotti R, du Plessis A, Vapalahti O. Zika Virus Infection with Prolonged Maternal Viremia and Fetal Brain Abnormalities. *N Engl J Med.* 2016;374(22):2142-51.
8. Heymann DL, Hodgson A, Sall AA, Freedman DO, Staples JE, Althabe F, Baruah K, Mahmud G, Kandun N, Vasconcelos PF, et al. Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? *Lancet.* 2016;387(10020):719-21.
9. Rubin EJ, Greene MF, Baden LR. Zika Virus and Microcephaly. *N Engl J Med.* 2016;374(10):984-85.
10. Kuno G, Chang GJ. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch. Virol.* 2007;152, 687–696.
11. Lindenbach BD, Rice CM Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res.* 2003;59:23–61.
12. Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparç-Goffart I, de Lamballerie X. Complete coding sequence of zika virus from a French polynesia out break in 2013. *Genome Announc* 2. 2014;500-14.
13. Berthet N, Nakoune E, Kamgang B, Selekon B, Descorps-Declere S, Gessain A. Et al. Molecular characterization of three Zika flaviviruses obtained from sylvatic mosquitoes in the Central African Republic. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2014;14, 862–865.
14. Winkler G, Heinz FX, Kunz C. Studies on the glycosylation of flavivirus E proteins and the role of carbohydrate in antigenic structure. *Virology.* 1987;159, 237–243.
15. Li J, Bhuvanankantham R, Howe J, Ng, M.L. The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafend) plays an important role in replication and maturation processes. *J Gen Virol.* 2006;87, 613–622.
16. Haddow AD, Schuh AJ., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012;6:e1477.
17. Dai L, Song J, Lu X, Cheng-Feng Q, Qi J. Structures of the Zika Virus Envelope Protein and Its Complex with a Flavivirus Broadly Protective Antibody. *Cell Host & Microbe.* 2016;19, 696–704.
18. Dwyer, M.A., Looger, L.L., and Hellinga, H.W. Computational design of a biologically active enzyme. *Science.* 2004;304: 1967–1971.
19. Russell, R.B., Alber, F., Aloy, P., Davis, F.P., Korkin, D., Pochaud, M., Topf, M., and Sali, A. A structural perspective on protein–protein interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2004;14:313–324.
20. Edwards YJ, Cottage A. Bioinformatics methods to predict protein structure and function. A practical approach. *Mol Biotechnol.* 2003;23(2):139-66.
21. Duan M, Huang M, Ma C, Li L, Zhou Y. Position specific residue preference features around the ends of helices and strands and a novel strategy for the prediction of secondary structures. *Protein Science.* 2008;17:1505–1512.

22. Venture S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion body. *Trends Biotechnol.* 2006;24(4):179-185.
23. Fahner B. Inclusion bodies: formation and utilization. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2004;89:93–142.
24. Zepp, F. Principles of vaccine design – lessons from nature. *Vaccine.* 2010;28 (Suppl.3), C14–C24.

# Konsentrasi *Telomeric Repeat Binding Factor 2* (Terf-2) Pada Sellaeosit Individu Usia Muda

Endang Purwaningsih<sup>1</sup>, Tripanjiasih Susmiarsih<sup>1</sup>, Yenni Zulhamidah, <sup>1</sup>Achmad Sofwan<sup>1</sup>, Sri Wuryanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas YARSI, Jakarta

<sup>2</sup>Bagian Ilmu Kesehatan Gizi, Fakultas Kedokteran, Universitas, YARSI, Jakarta

## Abstrak

Untaian DNA diujung kromosom sel eukariotik disebut telomer, yang berfungsi mempertahankan kestabilan kromosom. Keutuhan telomer dipelihara oleh enzim telomerase yaitu *Ribonucleoprotein DNA polymerase*. Aktivitas telomerase dipengaruhi oleh protein shelterin, antara lain protein *Telomeric Repeat Binding Factor 2* (TERF2), *protection of telomeric* (POT1), RAP1, TIN2. Panjang telomer berhubungan dengan usia dan jenis kelamin. Tujuan penelitian adalah mengetahui aktivitas telomerase sel leukosit pada individu usia muda pada jenis kelamin pria dan wanita. Metode penelitian adalah deskriptif, dengan mengukur aktivitas telomerase melalui pengukuran konsentrasi TERF2 pada sel leukosit individu usia 17 -20 tahun. Sampel diambil dari mahasiswa Universitas YARSI, berjumlah 38 orang meliputi 17 laki-laki dan 21 perempuan. Pengukuran kadar TERF2 dengan metode ELISA dengan panjang gelombang 450 nm. Hasil penelitian menunjukkan konsentrasi protein TERF-2 pada sel leukosit sebesar 3,967 µg/ml pada laki-laki dan sebesar 2,776 µg/ml pada perempuan. Tidak terdapat perbedaan bermakna ( $p > 0,05$ ) antara konsentrasi TERF2 laki-laki dan perempuan. Disimpulkan bahwa, konsentrasi TERF-2 individu usia antara kedua jenis kelamin adalah sama

**Kata Kunci:** ELISA, TERF-2, usia muda.

# The concentration of Telomeric Repeat Binding Factor 2 (Terf-2) on leukocytes Cells of Young Age individual

Endang Purwaningsih<sup>1</sup>, Tripanjiasih Susmiarsih<sup>1</sup>, Yenni Zulhamidah<sup>1</sup>, Achmad Sofwan<sup>1</sup>, Sri Wuryanti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, University of YARSI, Jakarta

<sup>2</sup>Department Of Nutritional Health Sciences, Faculty of Medicine, University, YARSI, Jakarta

## Abstract

DNA strands at the threshold of a eukaryotic cell chromosomes called telomeres, which serves to maintain the stability of chromosomes. Integrity of telomeres are maintained by the enzyme telomerase which is ribonucleoprotein DNA polymerase. Telomerase activity is influenced by shelterin proteins, among other telomeric proteins Repeat Binding Factor 2 (TERF2), protection of telomeric (POT1), RAP1, TIN2. Telomere length is related to age and type of gender. The research purposed was to determine the telomerase activity of leukocytes in individuals younger age on male and female gender. The research method is deskriptive, by measuring telomerase activity by measuring the concentration of TERF2 in leukocyte cells individual at the age of 17 -20 years. The samples were taken from students of YARSI University, totaling 38 people includes 17 men and 21 women. TERF2 content measurement by ELISA with a wavelength of 450 nm results showed TERF-2 protein concentration in leukocytes of 3.967 ug / ml in men and amounted to 2.776 ug / ml in women. There are no significant differences ( $p > 0.05$ ) between the concentration TERF2 in men and women. It was concluded that the concentration of TERF-2 in young age individuals between both sexes are equal

**Keywords:** ELISA, TERF-2, young age.

## Pendahuluan

Segmen DNA pada ujung kromosom sel eukariotik dikenal sebagai telomer dan merupakan salah satu faktor untuk terjadinya kanker. Telomer terdiri dari urutan nukleotida yang sangat spesifik, yang pada manusia urutannya adalah TTAGGG yang berulang ratusan bahkan ribuan kali, sehingga rumus umum struktur nukleotida telomer adalah (TTAGGG)<sub>n</sub>. T, A, dan G menunjukkan nukleotida (kumpulan senyawa pembentuk DNA) yang berisi basa timin, adenin, dan guanin. Pada manusia terdapat 2.000 pengulangan pada unit dasarnya. Jumlah pengulangan nukleotidapun berbeda dalam satu organisme pada jenis sel yang berbeda.<sup>1</sup>

Pada saat kromosom bereplikasi selalu terdapat pemendekan pada ujung kromosom turunannya, karena ada gap atau celah di bagian ujung kromosom turunannya yang tidak diisi oleh nukleotida. Hal ini dapat diatasi enzim telomerase dengan cara membuat rantai DNA tambahan yang terdiri dari urutan nukleotida yang berulang (merupakan subunit telomer). DNA tambahan ini dibuat sebelum proses replikasi berlangsung, akibatnya ujung kromosom (telomer) akan memiliki panjang yang tetap sama dengan kromosom inangnya.<sup>2</sup>

Panjang telomer dipelihara oleh enzim telomerase. Telomerase adalah suatu ribonukleotida yang mensintesis ulangan nukleotida pada telomer, untuk menggantikan nukleotida yang hilang pada saat replikasi DNA. Panjang telomer pada individu menunjukkan adanya variasi pada organ-organ yang berbeda. Demikian pula antar spesies yang berbeda, panjang telomernya juga berbeda.<sup>3,4</sup> Panjang telomer berhubungan dengan usia seseorang. Makin meningkatnya usia ada kecenderungan panjang telomer makin memendek. Variasi panjang telomer antara individu-individu mungkin terjadi sejak saat lahir atau setelah lahir dan menunjukkan adanya perbedaan pada individu laki-laki dan perempuan.

Untuk aktivitas telomerase sebagai enzim pemelihara panjang telomer, diperlukan protein – protein yang melindungi telomer yang disebut shelterin. Shelterin terdiri atas enam protein, yaitu *Telomeric Repeat Binding Factor*/TERF ( TERF1/TRF1) dan TERF2(TRF2), *Protection of Telomeres* (POT1), RAP1, TPPI dan *TRF1 Interacting Nuclear Factor 2*(TIN2) (5,6,7). Ekspresi protein-protein tersebut berbeda antara sel-sel individu normal dengan sel-sel kanker, karena ada hubungannya dengan disfungsi telomere. Tujuan penelitian adalah mengetahui ekspresi protein TERF2 pada individu normal usia muda berdasarkan jenis kelamin.

## Metode Penelitian

Jenis penelitian adalah deskriptif dengan rancangan *case control study*. Subyek penelitian adalah mahasiswa/mahasiswi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI berjumlah 38 orang meliputi 17 mahasiswa laki-laki dan 21 mahasiswa perempuan. Usia berkisar antara 17 – 20 tahun. Pengukuran aktivitas telomerase dilakukan secara tidak langsung yaitu mengukur salah satu protein yang berperan dalam regulasi enzim telomerase, yaitu *Telomeric Repeat Binding Factor 2* (TERF-2) sesuai dengan prosedur dalam ELISA Kit TERF-2 (USCN)

## Statistik

Data konsentrasi TERF2 (ng/ml) dari kedua kelompok (laki-laki dan perempuan) selanjutnya diolah secara statistik menggunakan SPSS versi 18.

## Hasil

Data konsentrasi *Telomeric Repeat Binding Factor 2* (TERF-2) adalah berupa data rasio, tersaji dalam Tabel 1.

**Tabel 1. Konsentrasi TERF-2 sampel pada kedua jenis kelamin (ng/ml)**

Ulangan	Konsentrasi TERF2 (ng/ml)	
	Jenis kelamin	
	Laki-laki	Perempuan
1	0,106	0,14
2	5,944	4,194
3	4,881	4,311
4	8,438	7,659
5	8,507	8,096
6	4,934	2,562
7	0,957	1,781
8	2,252	0,502
9	4,01	8,129
10	6,239	4,267
11	0,217	0,542
12	0,250	0,414
13	1,037	2,909
14	6,239	4,061
15	5,876	0,145
16	3,446	0,28
17	4,057	7,216
18		0,261
19		0,147
20		0,247
21		0,48
Mean	3,9670	2,7761
SD	2,7851	2,9221

Dari hasil uji statistik Levene menunjukkan nilai konsentrasi *Telomeric Repeat Binding Factor-2* (TERF-2) individu usia muda antara kedua jenis kelamin diperoleh nilai  $F = 0,729$  sehingga menunjukkan tidak ada perbedaan bermakna dengan nilai kemaknaan  $p > 0,05$ .

## Pembahasan

Protein TERF-2 adalah salah satu protein shelterin yang berperan penting pada aktivitas enzim telomerase. Pada sel-sel germinal dan sel hematopoetik dilaporkan, bahwa ekspresi telomerase cukup tinggi. Penelitian ini mengukur konsentrasi TERF 2 pada sel leukosit dan diperoleh hasil konsentrasi TERF-2 yang rendah dan bervariasi antara 0, 106 – 11,207. Penelitian sebelumnya belum ada yang melaporkan konsentrasi TERF2 pada sel normal pada individu usia muda.

Studi awal yang pernah dilaporkan, bahwa ekspresi protein hTERT dan aktivitas telomerase sangat rendah pada sel-sel limfosit dari darah perifer yang sedang istirahat. Studi yang lebih rinci pada limfosit dari timus, tonsil dan darah menunjukkan mRNA dan protein hTERT menunjukkan konsentrasi yang sama tetapi aktifitasnya spesifik pada masing-masing jaringan<sup>8</sup> sesuai dengan kebutuhan untuk fosforilasi dan translokasi elektron dari hTERT untuk aktivitas telomerase.<sup>9</sup> Ekspresi protein hTERT yang tinggi akan meningkatkan kelangsungan hidup sel limfosit dan melindungi dari proses apoptosis. Penelitian lain melaporkan, bahwa ekspresi TERF2 rentan terhadap apoptosis.<sup>10</sup> Terkait dengan panjang telomer dilaporkan bahwa penurunan panjang telomer terjadi di usia 50 tahun dan penurunan secara signifikan terjadi setelah usia 70 tahun.

Peran telomer dan telomerase pada sel leukosit khususnya limfosit, telah banyak dipelajari dalam diferensiasi dan fungsi limfosit dalam kondisi normal selama beberapa dekade terakhir. Telomer memegang peranan penting pada penuaan limfosit secara *in vivo*. Studi lebih lanjut diperlukan, terutama mengenai analisis longitudinal panjang telomer dan aktivitas telomerase, untuk lebih memahami peran telomer dalam fungsi limfosit selama proses penuaan *in vivo*.<sup>11</sup>

Penelitian lain terkait dengan protein shelterin yang berperan dalam pemeliharaan telomer seperti *Telomeric repeat Binding Factor 1 and 2* (TERF1 dan TERF2), *Protection of telomeres* (POT 1) dan *TRF1 interacting nuclear factor 2* (TIN2) melaporkan bahwa protein-protein tersebut berhubungan dengan kejadian kanker. Dilaporkan, bahwa pada sel kanker payudara protein shelterin berperan sebagai regulator negatif terhadap panjang telomer.<sup>12</sup> Selain itu protein-protein shelterin juga berhubungan dengan mediator stress dan reaksi inflamasi.

Pada sel kanker lambung ekspresi protein TERF1, TERF2 dan POT1 berhubungan dengan panjang telomer. Ekspresi protein shelterin yang tinggi akan mengakibatkan pemendekan telomere yang cukup signifikan karena aktivitas telomerase cukup tinggi. Ekspresi protein shelterin rendah, terjadinya pemendekan telomer tidak bermakna. Selain itu ekspresi TERF1, TERF2 dan POT1 pada mukosa sel kanker lambung lebih tinggi secara signifikan dibandingkan sel mukosa lambung normal dan berbanding terbalik dengan panjang telomere<sup>13,14</sup>.

Penelitian pada sel kanker menunjukkan, bahwa TERF2 dapat menjadi target dalam radio terapi penyakit kanker. Ekspresi TERF 2 yang rendah dapat meningkatkan sensitivitas sel kanker terhadap radioterapi dan menginduksi panjang telomer pada sel A549 dan pemendekan telomer pada sel U2OS. Pada sel A549, turunnya TERF-2 menyebabkan aktivitas telomerase dihambat dan menginduksi pemendekan telomer dan kekurangan TERF-2 gagal melindungi panjang telomer dari pengaruh radiasi.<sup>15</sup>

Terkait dengan jenis kelamin belum ada yang melaporkan ekspresi TERF2 di usia muda. Pada penelitian ini ekspresi TERF2 antara kedua jenis kelamin adalah sama. Belum ada laporan sebelumnya tentang ekspresi TERF2 pada individu usia muda pada kedua jenis kelamin. Penelitian yang sudah dilapokan adalah terkait panjang telomer antara kedua jenis kelamin pada usia muda yang diambil dari sampel darah tepi. Panjang telomer antara laki-laki dan perempuan pada usia muda adalah sama, demikian pula pada bayi baru lahir.<sup>16</sup>

Pengukuran panjang telomer pada bayi yang baru lahir diambil dari sampel darah, arteri umbilikalis, dan sel kulit. Didapatkan bahwa panjang telomer pada bayi lahir dari masing-masing sel atau organ bervariasi, tetapi tidak menunjukkan perbedaan yang nyata antara kedua jenis kelamin.<sup>16</sup> Protein TERF2 adalah salah satu protein yang mempengaruhi aktivitas enzim telomerase, sedangkan enzim telomerase adalah enzim yang berperan dalam

pemeliharaan panjang telomere. Dari hasil penelitian di atas, telah dilaporkan panjang telomer individu di usia muda antara ke dua jenis kelamin adalah sama. Mungkin inilah yang menyebabkan aktivitas telomerase yang berhubungan dengan konsentrasi protein TERF2 juga tidak berbeda pada kedua jenis kelamin.

Namun dalam mempengaruhi pemendekan telomer, gen TERF2 juga bekerja sama dengan gen-gen lain seperti TERF1, POT1 dan TIN2. Hal ini dibuktikan pada penelitian sel kanker lambung. Tingginya atau over ekspresi dari TERF2 dapat memberikan kontribusi pada beberapa tahap karsinogenesis pada kanker lambung, sehingga temuan ini menawarkan wawasan baru dalam mekanisme karsinogenesis kanker lambung.<sup>14</sup>

## Simpulan

Konsentrasi TERF-2 pada sel leukosit individu usia muda pada laki-laki dan perempuan adalah sama.

## Ucapan Terima Kasih

Penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada Direktorat Jendral Dikti melalui dana penelitian Desentralisasi Riset Unggulan Perguruan Tinggi atas bantuan biaya untuk terselenggaranya penelitian ini dan Laboratorium Klinik PRODIA yang telah membantu dalam pengadaan reagen dan memberi kesempatan menggunakan fasilitas untuk melakukan penelitian.

## Daftar pustaka

1. Artandi SE and DePinho RA 2010. Telomeres and Telomerase in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 3(1): 9-18.
2. Zakian VA, 1995. Telomeres; Beginning to Understand the End. *Science*. 1995; 270 (5242): 1601-1607.
3. Cherif H' Tarry JL, Ozanne SE, and Hales CN 2003. Ageing and Telomeres: a study into organ-gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acid Res*. 2003; 31 (5): 1576–1583
4. Theimer CA, Feigon J. Structure and Function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol*. 2006; 16:307-318
5. Yulianto I. Peranan Telemer pada Penuaan dan Keganasan yang dipicu distress, Prosiding Psychoneuroimmunology, Mind-Body Connection: Enhancing Health and Comfort. 2013 : 215– 226. Surabaya. tanggal 28-30 Maret, 2013.
6. Ludlow AT, Ludlow LW, Roth SM. Do Telomeres Adapt to Physiological Stress/ Exploring the Effect of Exercise on Telomere Length and Telomere.-Related Proteins. *Bio Med Res*. 2013; ID 601368, 15 pages.
7. Schrupfova, Vychodilova I, Dvorackova M, Majerska J, Dokladal L, Schorova S et al. Telomere repeatbinding Proteins are functional components of Arabidopsis telomeres and interact with telomerase. *The Plant Journal*. 2014;77:770-781
8. Andrews NP, Fujii H, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomeres and Immunological Diseases of Aging. *Gerontology*. 2010; 56:390-403.
9. Akiyama M, Hideshima T, Shamma MA, Hayashi T, Hamasashi M, Tai Y et al. Effect of Oligonucleotide N3'-P5' thiophosphoramidate (GRN163) Targeting Telomerase RNA in Multiple Myeloma Cells. *Cancer Res*. 2003; 63(19):6187-6194.

10. Bazyka DA, Longanovsky KM, Hyeriko I, Chumak SA, Bomko MO. Gene expression, telomere and cognitive deficit analysis as a function of Chernobyl radiation dose and age: from in utero to adulthood. *Probl Radiac Med Rdiobiol.* 2015; 20:283-310.
11. Wang NP 2008. Telomere and Adaptive Immunity. *Mech Ageing Dev.* 2008;doi:10.1016/j.mad.2007.11.005
12. Butler KS, Hines WC, Heaphy CM, Griffith JK. Coordinate Regulation between expression levels of telomere-binding proteins and telomere length in breast carcinomas. *Cancer Med* 2012. 1(2): 165-175.
13. Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E, Kuniyasu H, Haruma K, Chayama K, Yasui W, Tahara E. Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *Int J Oncol.* 2001; 19(3):507-512.
14. Hu H, Zhang Y, Zou M, Yang S, Liang XO. Expression of TRF1, TRF2, TIN2, TERT, KU70, and BRCA1 proteins is associated with telomere shortening and may contribute to multistage carcinogenesis of gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2010; 136:1407
15. Yang X, Li Z, Yang L et al. Knockdown of Telomeric Repeat binding Factor 2 enhance tumor radiosensitivity regardless of telomerase status. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015; 141(9):1545 – 1552
16. Purwaningsih E , Djannatun Y, Widayanti E, Suciati Y, Zulhamidah Y. Leukocyte Telomere Length in Young Age Individuals Cells by Gender. *World academic and ResearchCongress.Jakarta.* 2015; 9 -10 Desember 2015.

# **Skrining Antibiotik Dari Bakteri Thermo-Halofilik Isolat Pria Laot Sabang (Pls Adan 76)**

Teuku M. Iqbalsyah, Nurdin Saidi, Nova Maulyna, Hira Helwati, Naiwatul Aura, Febriani

Biomolecule Application Research Group, Chemistry Department, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, Syiah Kuala University, Banda Aceh, Indonesia  
Email : t.iqbalsyah@unsyiah.ac.id and febriani@unsyiah.ac.id,

## **Abstrak**

Penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat menyebabkan terjadinya resistensi sehingga antibiotik tidak dapat menghambat atau membunuh bakteri patogen. Oleh karena itu, diperlukan pencarian jenis antibiotik baru dari sumber baru yang dapat menghambat atau membunuh bakteri patogen tersebut. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan bakteri Gram negatif yang berasal dari sumber air panas bawah laut Pria Laot Sabang (isolat PLS A dan 76) yang berpotensi memproduksi antibiotik. Hasil fermentasi isolat PLS A dan 76 menggunakan media TSB mampu menghasilkan antibiotik pada fase pertengahan stasioner dan fase awal stasioner. Dari kedua isolat tersebut, diperoleh isolat PLS A mampu menghasilkan antibiotik lebih baik dibandingkan isolat PLS 76. Hasil yang diperoleh menyarankan bahwa bakteri termo-halofilik isolat PLS A diketahui dapat menghasilkan antibiotik.

**Kata kunci** : antibiotik, isolate PLS, Kirby-Bauer.

## Pendahuluan

Antibiotik merupakan suatu senyawa yang dihasilkan dari suatu organisme yang dapat menghambat atau membunuh pertumbuhan mikroorganisme yang bersifat patogen, seperti *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Candida albicans*.<sup>1</sup> Berbagai kelompok organisme yang diketahui dapat menghasilkan antibiotik adalah tumbuhan dan mikroorganisme. Pada saat ini, kelompok dari mikroorganisme telah banyak diketahui sebagai penghasil antibiotik. Antibiotik yang paling banyak dihasilkan berasal dari genus *Streptomyces sp* yang tergolong bakteri Gram positif. Antibiotik yang dihasilkan adalah streptomisin, neomisin, kloramfenikol dan tetrasiklin.<sup>2</sup> Beberapa bakteri Gram negatif juga diketahui dapat menghasilkan antibiotik, seperti genus *Photobacterium sp* dan *Serratia sp* yang mampu menghasilkan antibiotik karbapenem.<sup>3</sup>

Mikroorganisme, seperti bakteri yang bersifat patogen menjadi tahan terhadap antibiotik karena pemakaian yang terus menerus.<sup>1</sup> Keadaan ini menyebabkan terjadinya resistensi terhadap antibiotik, sehingga dapat menimbulkan efek samping, toksisitas dan superinfeksi.<sup>4</sup> Jika suatu antibiotik tidak dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen lagi, maka antibiotik tersebut harus diganti dengan antibiotik lainnya. Oleh karena itu, perlu dilakukan pencarian jenis antibiotik baru dari sumber mikroorganisme yang baru.

Saat ini, antibiotik telah banyak dihasilkan dari mikroorganisme ekstrimofilik. Mikroorganisme ekstrimofilik merupakan mikroorganisme yang dapat hidup di lingkungan yang ekstrim, seperti gunung berapi, sumber air panas bawah laut, danau alkali, laut mati dan daerah kutub. Beberapa contoh mikroorganisme ekstrimofilik yang menghasilkan antibiotik adalah *Geobacillus toebii* yang memproduksi antibiotik bacteriocin yang hidup pada suhu 60 °C,<sup>5</sup> *Nocardiopsis* strain yang memproduksi antibiotik phenazin yang hidup pada pH 10,<sup>6</sup> dan *Serratia maculans* yang memproduksi antibiotik andrimid yang hidup pada suhu rendah, yaitu 8 °C.<sup>7</sup> Hasil metabolit yang dihasilkan dari mikroorganisme ekstrimofilik, seperti antibiotik bermanfaat dalam bidang industri. Beberapa contoh aplikasi mikroorganisme penghasil antibiotik adalah antibiotik andrimid yang tahan terhadap suhu rendah bermanfaat untuk aplikasi bioteknologi, seperti pengawetan makanan dingin dan industri farmasi.<sup>7</sup> mikroorganisme penghasil antibiotik yang dapat hidup pada lingkungan kadar garam yang tinggi dimanfaatkan dalam aplikasi pengobatan. *Bacillus pumilus* yang memproduksi antibiotik basitrasin yang memiliki kadar garam 2,5 % digunakan pada pengobatan infeksi kulit; mikroorganisme termofilik yang menghasilkan antibiotik yang tahan pada suhu tinggi, seperti antibiotik rifampisin yang dihasilkan dari *Nocardia mediterranei* dimanfaatkan dalam pengobatan infeksi saluran pernafasan.<sup>8</sup>

Indonesia merupakan negara yang dipenuhi oleh sumber-sumber geotermal, seperti jajaran gunung berapi, kawasan sumber air panas dan sumber air panas yang terletak di bawah laut.<sup>9</sup> Lingkungan laut merupakan tempat tinggalnya berbagai jenis mikroorganisme ekstrimofilik yang berpotensi menghasilkan antibiotik. Salah satu daerah laut yang memiliki kawasan geotermal tersebut adalah pulau Weh, dimana pulau ini memiliki sumber air panas bawah laut yang terdapat di daerah Pria Laot Sabang. Sumber air panas tersebut memiliki suhu yang tinggi dan tingkat kadar garam yang tinggi. Kawasan Pria Laot Sabang juga diketahui dapat menghasilkan antibiotik golongan  $\beta$ -Laktam dari isolat PLS 75 dan 80.<sup>10</sup> Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menskrining bakteri Gram negatif yang dapat menghasilkan antibiotik yang berasal dari isolat Pria Laot Sabang lainnya, seperti isolat PLS A dan 76. Antibiotik yang dihasilkan diharapkan dapat bermanfaat dalam bidang industri dan kesehatannya.

## Metode Penelitian

### Regenerasi dan propagasi bakteri Isolat PLS A dan 76

Regenerasi bakteri dilakukan dengan cara menumbuhkan 100  $\mu$ L stok gliserol isolat PLS 76 dan PLS A ke dalam media padat  $\frac{1}{2}$  T dengankomposisiterdiri dari pepton 0,8% (b/v), *yeast extract* 0,4% (b/v), NaCl 0,2% (b/v) yang diperkaya dengan glukosa 0,25% (b/v). Kemudian dilarutkan dengan air laut yang sudah difilter dengan selulosa filter 0,45  $\mu$ m hingga volume 50 mL dalam erlenmeyer 250 mL. Kemudian sel bakteri disebarakan menggunakan *spreader* dan diinkubasi pada suhu 70  $^{\circ}$ C selama 24 jam. Koloni bakteri yang telah tumbuh diinokulasikan ke media cair  $\frac{1}{2}$  T.

Koloni tunggal isolat PLS 76 dan A dipropagasi dengan tujuan untuk membuat starter inokulum yang akan digunakan dalam tahap fermentasi selanjutnya, dimana bakteri dapat beradaptasi dengan lingkungannya sehingga dapat memperpendek masa pertumbuhannya pada fase lag. Propagasi ini dilakukan dengan cara menginokulasikan koloni bakteri yang telah diregenerasi ke dalam erlenmeyer 250 mL yang berisi 50 mL media cair 2,5 % (b/v) *Trypton Soy Broth* (TSB). Kemudian media diinkubasi ke dalam *shaker waterbath* pada suhu 65  $^{\circ}$ C selama 14 jam dengan kecepatan pengadukan 100 rpm. Selanjutnya jumlah sel ditentukan dari densitas optik (OD) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (diketahui bahwa  $OD_{600} = 1$  setara dengan  $5,0 \times 10^6$  sel/mL). Jumlah ideal sel yang harus diinokulasi dalam media fermentasi adalah  $1,0 \times 10^7$  sel/mL.

### Pembuatan Kurva Pertumbuhan

Kurva pertumbuhan dibuat untuk melihat pola pertumbuhan bakteri serta waktu fermentasi yang dibutuhkan untuk masing-masing fase pertumbuhan bakteri. Antibiotik umumnya diproduksi pada fase stasioner. Masing-masing bakteritermo-halofilik isolat PLS A dan 76 yang dihasilkan dipipet sesuai dengan hasil konversi  $OD_{600}$  dan diinokulasi secara aseptis ke dalam dua erlenmeyer 500 mL yang masing-masing berisi 100 mL media cair TSB. Jumlah sel hasil pengukuran  $OD_{600}$  yang didapat dari media cair TSB untuk isolat PLS 76 adalah  $1,4 \times 10^6$  sel/mL dan untuk isolat PLS A adalah  $1,2 \times 10^6$  sel/mL.

Media yang telah diinokulasi bakteri dari media starter diinkubasi ke dalam *shaker waterbath* pada suhu 65 $^{\circ}$ C selama 168 jam dengan kecepatan pengadukan 100 rpm. Kemudian, hasil fermentasi diambil secara aseptis sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung eppendorf steril yang sudah diketahui beratnya setiap 4 jam sekali. Tabung eppendorf tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 7500 x g selama 5 menit sampai diperoleh supernatan dan pelet. Supernatan dituang secara aseptis ke dalam tabung eppendorf steril dan disimpan dalam lemari pendingin yang akan digunakan untuk pengujian zona hambat. Pelet yang dihasilkan dicuci dengan akuades steril, lalu disentrifugasi lagi pada kecepatan 7500 x g selama 5 menit sampai didapatkan supernatan yang jernih. Selanjutnya, supernatan yang sudah jernih dibuang, sel dikeringkan dalam oven pada suhu 70 $^{\circ}$ C selama 4-8 jam. Sel yang telah kering beserta tabung eppendorfnnya ditimbang menggunakan timbangan analitik.

Berat sel kering dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Berat Sel Kering (BSK)} = (\text{Berat sel + eppendorf}) - \text{Berat eppendorf kosong}$$

Profil pertumbuhan sel digambarkan melalui kurva hubungan antara waktu dan Berat Sel Kering (BSK).

### **Skrining Mikroorganisme Penghasil Antibiotik**

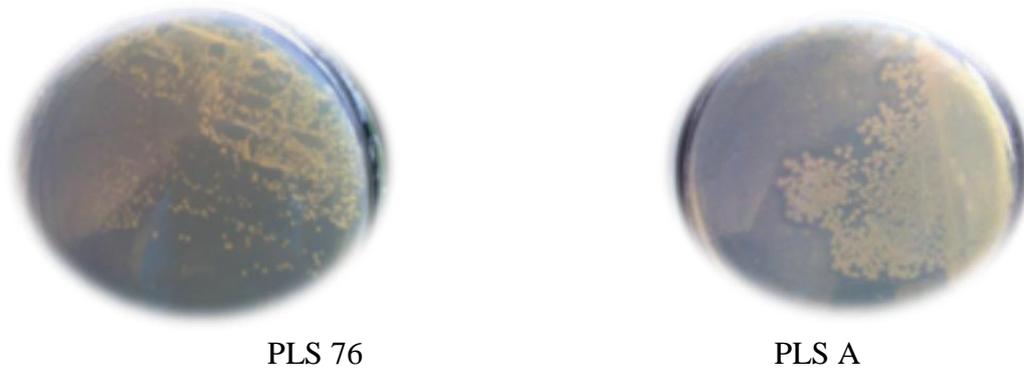
Skrining mikroorganisme dilakukan untuk mengetahui isolat yang paling potensial menghasilkan antibiotik melalui pegujian zona hambat. Pada penentuan uji aktivitas antibiotik dilakukan menggunakan metode difusi cakram. Skrining mikroorganisme dilakukan terhadap dua isolat, yaitu isolat bakteritermohalofilik PLS 76 dan A. Skrining dilakukan di dalam media MHA yang telah berisi bakteri uji *E.coli* dan *S.aureus*. Kemudian, supernatan hasil fermentasi kedua isolat pada fase stasioner diteteskan ke dalam kertas cakram dan diletakkan ke dalam media MHA yang telah berisi bakteri uji. Sebagai kontrol positif digunakan antibiotik Gentamisin. Selanjutnya, media tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona bening yang dihasilkan dari isolat PLS A dan PLS 76 dilakukan pengukuran diameternya menggunakan mistar. Isolat yang menunjukkan zona bening paling besar merupakan penghasil antibiotik yang paling tinggi sehingga digunakan untuk tahapan selanjutnya.

Pembuatan suspensi *E.coli* dan *S.aureus* dilakukan dengan cara menumbuhkan masing-masing sebanyak 100 µL stok kultur bakteri *E.coli* dan *S.aureus* pada media cair ½ LB yang sudah dibuat pada tahap 3.3.1.5 secara terpisah. Media diinkubasi selama 24 jam dengan kecepatan pengadukan 150 rpm. Jumlah sel ditentukan dari densitas optik (OD) menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (diketahui bahwa OD<sub>600</sub> = 1 setara dengan 5,0 x 10<sup>6</sup> sel/mL).

### **Hasil dan Pembahasan**

#### **Regenerasi dan Propagasi Bakteri Termo-halofilik Isolat PLS A dan 76**

Regenerasi bakteri dilakukan untuk meremajakan kembali sel-sel bakteri yang telah disimpan dalam stok gliserol agar bakteri tersebut dapat tumbuh dengan baik pada media kulturnya (Gambar 1). Media kultur yang digunakan adalah media ½ *Termus* (½T) yang diperkaya dengan glukosa. Regenerasi bakteri PLS A dan 76 diinkubasi pada 70 °C selama 24 jam



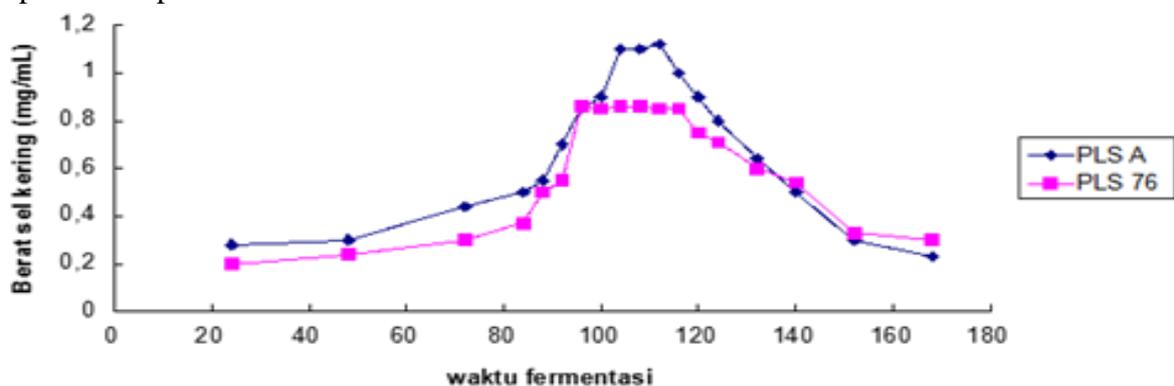
**Gambar 1. Koloni bakteri isolat PLS 76 dan A yang tumbuh di media padat ½T yang diinkubasi pada suhu 70°C selama ±24 jam.**

Selanjutnya, koloni tunggal bakteri yang tumbuh diinokulasikan ke media propagasi. Media propagasi yang digunakan adalah media cair *Trypton Soy Broth* (TSB). Media ini digunakan karena memiliki banyak nutrisi yang dibutuhkan oleh bakteri. Propagasi dilakukan untuk membuat starter inokulum yang akan digunakan dalam tahap fermentasi selanjutnya, sehingga dapat memperpendek fase lag pertumbuhan bakteri. Fase lag merupakan fase awal pada pertumbuhan bakteri dimana bakteri mulai dapat beradaptasi terhadap lingkungannya.

#### **Kurva Pertumbuhan Bakteri Termohalofilik Isolat PLS A dan 76**

Koloni bakteri yang telah diinokulasikan ke dalam media starter TSB dipindahkan ke dalam media produksi yang berisi 2,5 % TSB. Media starter tersebut diinkubasi pada suhu 65 °C dengan kecepatan pengadukan 100 rpm dalam *shaker waterbath*. Kurva pertumbuhan ini dilakukan selama 168 jam dimana setiap 4 jam diambil 2 ml biakan bakteri dari media produksi untuk mendapatkan supernatan dan pelet. Supernatan yang diperoleh disimpan untuk digunakan saat uji zona hambat bakteri. Pelet yang dihasilkan dikeringkan di dalam oven, kemudian ditimbang berat sel keringnya.

Berat Sel Kering (BSK) yang didapatkan dari hasil produksi digunakan untuk mengetahui waktu fermentasi bakteri mengalami fase pertumbuhan, yaitu fase lag, log, stasioner dan kematian. Kurva pertumbuhan sel bakteri PLS 76 dan PLS A pada media TSB dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2. Kurva pertumbuhan sel bakteri PLS A dan PLS 76 hasil fermentasi pada media TSB yang diinkubasi pada suhu 65 °C dengan kecepatan pengadukan 150 rpm dalam *shaker waterbath*.**

Fase lag yang ditunjukkan pada kurva pertumbuhan berlangsung sampai jam ke 80. Hal ini ditunjukkan dari lamanya waktu yang dibutuhkan untuk peningkatan berat sel kering (BSK). Selama fase lag, jumlah sel bakteri akan tetap atau meningkat secara perlahan. Hal ini disebabkan bakteri yang sedang menyesuaikan diri terhadap lingkungannya yang baru sehingga kondisi sel bakterinya kurang stabil. Fase log (eksponensial) pada kurva pertumbuhan terlihat bahwa isolat PLS A berlangsung dari jam ke 88-100 sedangkan isolat PLS 76 berlangsung dari jam ke 80-92. Pada fase ini, bakteri tumbuh dengan cepat, hal ini terjadi karena sel-sel terus membelah dan jumlahnya semakin meningkat. Biasanya pada fase ini, bakteri akan menghasilkan metabolit primer, seperti enzim.

Fase stasioner pada isolat PLS A berlangsung dari jam ke 104-116. Pada isolat PLS 76, fase stasioner berlangsung dari jam ke 96-116. Pada fase ini, kedua isolat tidak mengalami perubahan (tetap) yang terlihat pada berat sel kering (BSK). Pada fase ini, laju pertumbuhan bakteri seimbang dengan laju kematian sehingga jumlah sel bakteri yang hidup cenderung tetap. Pada fase inilah, bakteri akan menghasilkan senyawa metabolit sekundernya, yaitu antibiotik. Ketika bakteri memasuki fase akhir, yaitu fase kematian, berat sel kering bakteri semakin berkurang. Hal ini disebabkan karena jumlah nutrisi yang tersedia telah habis dan banyaknya hasil metabolit yang tidak berguna lagi sehingga mengganggu pertumbuhan bakteri. Fase kematian pada isolat PLS A dan PLS 76 terjadi setelah jam ke 116.

Hasil suatu penelitian yang menggunakan isolat Pria laot Sabang dan isolat Jaboi Sabang, kurva pertumbuhannya dilakukan menggunakan TSB yang diinkubasi pada suhu 70 °C dengan kecepatan 150 rpm dalam *shaker waterbath*.<sup>11</sup> Fase stasioner yang didapatkan berlangsung pada rentang waktu 108-120. Isolat PLS 75 dan 80 mampu menghasilkan antibiotik pada fase stasionernya. Berdasarkan hasil penelitian tersebut, fase stasioner yang diperoleh mirip dengan fase stasioner yang dihasilkan oleh isolat PLS A dan 76. Oleh karena itu, isolat PLS A mampu menghasilkan antibiotik pada fase pertengahan stasioner dan isolat PLS 76 dapat menghasilkan antibiotik pada fase awal stasioner.<sup>11</sup>

### **Aktivitas Antibiotik dari Isolat PLS A dan 76**

Aktivitas antibiotik dilakukan untuk melihat isolat yang paling potensial dalam menghasilkan antibiotik. Hal ini dilakukan dengan melihat uji zona hambat terhadap bakteri uji, yaitu *E.coli* dan *S.aureus*. Uji zona hambat dilakukan menggunakan sampel dari hasil fermentasi pada fase stasioner karena pada fase ini bakteri dapat menghasilkan antibiotik. Hal ini didasarkan pada penelitian yang melakukan uji zona hambat menggunakan sampel pada fase stasioner dan menghasilkan antibiotik. Zona hambat merupakan daerah untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji pada media padat oleh antibiotik. Zona hambat ditandai dengan terbentuknya zona bening pada media uji antibiotik.<sup>10,11</sup>

Pada media TSB, fase stasioner pada isolat PLS A terjadi dari jam 104-116 dan isolat PLS 76 pada jam 96-116. Pada Tabel 1. terlihat bahwa isolat PLS A menunjukkan diameter zona hambat paling besar pada jam ke 112, yaitu sebesar 13 mm pada bakteri *E.coli*. Gentamisin yang digunakan sebagai kontrol positif memiliki diameter zona hambat sebesar 11 mm pada *E.coli* dan 17 mm pada *S.aureus*. Diameter zona hambat yang dihasilkan oleh kontrol positif lebih besar dibandingkan sampel yang mengandung antibiotik. Namun,

perbandingan keduanya tidak berbeda jauh sehingga sampel yang mengandung antibiotik mampu menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli*, sedangkan pada *S.aureus* tidak dapat dihambat pertumbuhannya oleh sampel antibiotik tersebut.

Pada Tabel 1 bakteritermo-halofilik isolat PLS 76 menunjukkan diameter zona hambat paling besar pada jam ke 96, yaitu sebesar 9 mm pada *E.coli*. Gentamisin memiliki diameter zona hambat sebesar 11 mm pada *E.coli* dan 17 mm pada *S.aureus*. Diameter zona hambat pada kontrol positif lebih besar dibandingkan dengan sampel yang mengandung antibiotik. Namun, perbedaan antara keduanya tidak terlalu jauh, sehingga sampel yang mengandung antibiotik tersebut mampu menghambat bakteri uji, baik pada *E.coli* maupun *S.aureus*. Gentamisin digunakan sebagai kontrol positif karena memiliki spektrum yang luas yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Berdasarkan hasil uji zona hambat kedua bakteri, bakteri isolat PLS A memiliki diameter zona hambat paling besar pada *E.coli*. Sampel yang mengandung antibiotik tersebut tidak dipekatkan sehingga konsentrasi dari sampel tersebut tidak diketahui. Oleh karena itu, besar atau kecilnya zona hambat yang dihasilkan hanya dilihat dari pengukuran diameter zona hambat.

**Tabel 1. Diameter zona hambat hasil fermentasi isolat PLS A pada media MHA.**

Waktu Fermentasi	Isolat A	
	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
104	9	-
108	9	-
112	13	-
116	10	-
Gentamisin (Kontrol +)	11	17
Aquades (Kontrol -)	-	-

Diameter zona hambat hasil fermentasi isolat PLS 76 ditunjukkan pada tabel 4.2. Pada jam 96 dan 100 menghasilkan diameter zona hambat sebesar 9 mm dan 8 mm, sedangkan pada jam ke 104, 108, 112 dan 116 tidak menunjukkan adanya zona hambat terhadap *E.coli*. Pada *S.aureus*, pada jam ke 96 dan 100 menghasilkan zona hambat sebesar 9 mm dan 8 mm, pada jam ke 104, 108, 112 dan 116 tidak menghasilkan zona hambat terhadap *S.aureus*.

**Tabel 2. Diameter zona hambat hasil fermentasi isolat PLS 76 pada media MHA**

Waktu Fermentasi	Isolat 76	
	Diameter Zona Hambat (mm)	
	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>
96	9	9
100	8	8
104	-	-
108	-	-
112	-	-
116	8	-

Gentamisin (Kontrol +)	11	17
Aquades (Kontrol -)	-	-

Berdasarkan hasil penelitian yang menggunakan isolat ICBB 1171 dan ICBB 1172 menghasilkan zona hambat sebesar 14 mm dan 12 mm terhadap bakteri *E.coli*. Metode uji daya hambat yang digunakan pada penelitian ini adalah metode difusi pada media LA.<sup>12</sup> Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Fany Sartika (2014) yang menggunakan isolat Pria Laot Sabang menghasilkan zona hambat paling besar pada PLS 80. Diameter zona hambat yang dihasilkan pada jam ke 112 adalah 14 mm dan 9 mm, masing - masing untuk *E.coli* dan *S.aureus*. Sementara itu, pada isolat Jaboi Sabang, diameter zona hambat paling besar terjadi pada jam ke 120 pada bakteri *E.coli*, yaitu 19 mm. Pada bakteri *S.aureus* diameter zona hambat terbesar pada jam ke 112, yaitu 18 mm. Berdasarkan hasil penelitian ini pada isolat PLS A, antibiotik tersebut lebih aktif terhadap bakteri Gram negatif.

Isolat PLS A cenderung lebih aktif terhadap bakteri Gram negatif. Hal ini dikarenakan pada bakteri Gram negatif memiliki dinding sel yang lebih tipis dibandingkan bakteri Gram positif sehingga antibiotik lebih mudah merusak dinding sel tersebut. Dinding sel bakteri yang telah rusak mengakibatkan bakteri tidak akan dapat tumbuh pada media yang mengandung antibiotik.<sup>8</sup>

## Kesimpulan

1. Isolat PLS A dan PLS 76 mampu memproduksi antibiotik pada fase stasionernya dimana pada isolat PLS A menghasilkan antibiotik paling potensial dibandingkan PLS 76.
2. Pada uji aktivitas antibiotik terhadap bakteri uji *E.coli* dan *S.aureus* menunjukkan bahwa isolat PLS A lebih aktif terhadap bakteri *E.coli*. Diameter zona hambat yang dihasilkan sebesar 13 mm terhadap *E.coli*, sedangkan *S.aureus* tidak menunjukkan adanya zona hambat.

## Ucapan Terimakasih

Kami mengucapkan terimakasih atas pendanaan yang diberikan melalui Hibah Fundamental 2016 atas nama Dr. T.M Iqbalsyah, M.Sc dengan nomor kontrak Nomor : 39/UN11.2/PP/SP3/2016.

## Daftar Pustaka

1. Hashemi Shiva, Azadeh N., Mehdi R. Irrational Antibiotic Prescribing: a Local Issue or Global Concern EXCLI Journal. 2013; 384-395, ISSN 1611-2156.
2. Procopio, R. E, de Lima, Silva I., R, Martins, M., K, Azevedo, J., L and Araujo, J. M. Antibiotics Produced by Streptomyces. The Brazillian Journal of Infectious Diseases. 2012; 16 (5): 466-471.
3. Derzelle, S, Duchaud, E, Kunst, F, Danchin, A and Bertin, P. Identification, Characterization, and Regulation of a Cluster of Genes Involved in Carbapenem

- Biosynthesis in *Photorhabdus luminescens*. *Journal of Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68 (8): 3780-3789.
4. Radjasa, OckyKarna, Duhita S.K., Agus S., Rory A.H., Endang Sri L. Antibacteria Activity of Marine Bacteria Associated with sponge Aaptossp.againts Multi Drugs Resistant (MDR) strain. Semarang, *Jurnal Matematika dan SAINS*, 2007; 12(4).
  5. Gamze, Ozdemir, B., dan Haci, H.B. Isolation and Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by *Geobacillus toebii* Strain HBB-247. *Indian Journal Microbiol.* 2012; 52 (1) : 104-108.
  6. Tsai, C.R., Garcia, J.L., Patel, B.K.C., Baresi, L., Mah, R. *Haloanaerobium alcaliphilium* sp. Nov. An anaerobic moderate halophile from the sediments of the sediments of the Great Salt Lake. Utah. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 1995; 45 (2) : 301-30
  7. Sanchez, Leandro A., Manuel G.S., Faustino Sineriz dan Osvaldo Delgado. Andrimid Production at Low Temperature by A Psychrotolerant *Serratia proteamaculans* Strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 2013; 29 (10) : 1773-1781.
  8. Siswandono dan Bambang. *Kimia Medisinal*. Airlangga University Press, Jakarta; 1995.
  9. Pratita Maria Y.E. dan Surya R.P. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik dari Sumber Mata Air Panas di Songgoriti Setelah Dua Hari Inkubasi. *JurnalTeknik POMITS.* 2012; 1(1):1-5.
  10. Iqbalsyah T.M, Saidi, N., Yusniar, Sartika.F., Febriani. A Local Isolate of PLS 80 Capable of Producing A  $\beta$ -Lactam Antibiotic, The 6 th Annual International Conference Syiah Kuala Universitas; 2016.
  11. Ramayanti. Antibiotic Production from Thermophillic Jaboi Sabang Local Isolate : Using TSB Medium. *Skripsi.* Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh; 2008.
  12. Neneng, L. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Antibiotik Inhibitor  $\beta$ -Laktamase Tipe TEM-1 dari Ekosistem Air Hitam. *Tesis.* Universitas Palangka Raya, Palangkaraya; 2008.

# Efek *Sticopus Hermanii* dan Oksigen Hiperbarik terhadap kadarv CRP serum dan Glukosa darah pada Tikus Periodontitis disertai Diabetes

Dian Mulawarmanti<sup>1</sup>, Kristanti Parisihni<sup>1</sup>, Yoifah Rizka Wedarti<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departemen Biologi Oral, <sup>2</sup> Departmen Periodontologi  
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hang Tuah, Surabaya, Indonesia

Korespondensi: Dian Mulawarmanti, c/o: Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry  
Hang Tuah University, Jl. Arif Rahman Hakim No. 150 Surabaya 60111, Indonesia.  
Phone/fax : +62315912191 E-mail: dian.mulawarmanti@hangtuah.ac.id

## Abstrak

Terdapat hubungan derajat keparahan peradangan antara diabetes dan periodntitis. *C-reactive protein* (CRP) dan glukosa darah diketahui merupakan refleksi dari respon metabolit intermediet pada periodontitis dan diabetes. *Stichopus hermanii* (SH) telah terbukti diketahui mempunyai efek antibakteri dan anti inflamasi. Terapi oksigen hiperbarik (TOHB) sudah banyak digunakan sebagai terapi ajuvan untuk memperbaiki berbagai proses penyembuhan luka. Tujuan untuk membuktikan efek kombinasi SH dan TOHB 2,4 ATA 3x 30'interval 5' istirahat terhadap kadar CRP serum dan glukosa darah pada tikus periodontitis disertai diabetes. Metode penelitian dilakukan dengan cara Tiga puluh ekor tikus wistar dengan BB  $\pm$  200 gram dibagi 5 kelompok: kelompok kontrol (K1), periodontitis-diabetes (K2), periodontitis-diabetis+SH (K3), periodontitis-diabetis DM-periodontitis diberi TOHB (K4), dan kelompok periodontitis-diabetes diberi treated SH+TOHB (K5). Tikus diabetes diinduksi streptozotocin dosis tunggal 65 mg/kg BB secara intra peritoneal. *Sticopus Hermanii* gel 3% diaplikasikan pada sulkus gingiva dan diberi TOHB dosis 2,4 ATA 3x30 menit interval 5 menit selama 7 hari. Kadar CRP serum diperiksa Elisa dan glukosa darah dengan metoda kolorimetri. Data dianalisis dengan One Way Anova. Hasil : Kadar glukosa darah pada kelompok K2 (402,80 $\pm$ 93,5) lebih tinggi dibanding kelompok normal K1. Sedang pada semua kelompok terjadi penurunan, yaitu kelompok K3 (121,20 $\pm$ 36,30), K4 (221,00 $\pm$ 16,52) dan K5 (95,60 $\pm$ 7,47). Kadar CRP pada kelompok K4 (221,00 $\pm$ 16,52) lebih tinggi dibanding kelompok K2 (99,66,80 $\pm$ 99,0), tetapi menurun pada kelompok K3 (13,50 $\pm$ 0,83) dan K5 (11,09 $\pm$ 1). Disimpulkan bahwa kombinasi SH dan TOHB 2,4 ATA 3x30' istirahat 5'dapat menurunkan kadar CRP serum dan glukosa darah pada tikus periodontitis disertai diabetes.

**Kata Kunci** : CRP, glukosa darah, diabetes, oksigen hiperbarik, periodontitis.

# The Effect Of *Sticopus Hermanii* and Hyperbaric-Oxygen On Crp And Blood Glucose Periodontitis-Diabetic Rat

Dian Mulawarmanti<sup>1</sup>, Kristanti Parisihni<sup>1</sup>, Yoifah Rizka Wedarti<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Oral Biology, <sup>2</sup> Department of Periodontology  
Faculty of Dentistry, Hang Tuah University, Surabaya, Indonesia

Correspondence : Dian Mulawarmanti, c/o: Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry  
Hang Tuah University, Jl. Arif Rahman Hakim No. 150 Surabaya 60111, Indonesia.  
Phone/fax : +62315912191 E-mail: dian.mulawarmanti@hangtuah.ac.id

## Abstract

There is an inflammation relationship between degree of severity diabetes and periodontitis. C-reactive protein (CRP) and of glucose production are known to reflect the immediate metabolic response in periodontitis with diabetes. *Stichopus hermanii* (SH) has been known to have antibacterial and anti-inflammatory property. Hyperbaric Oxygen Therapy (HBOT) has been used as an adjuvant therapy to improve wound healing. The purpose to examine the combination effect of SH and HBOT 2,4 ATA 3x 30' interval 5' air break on serum CRP and blood glucose level of periodontitis-diabetic rat. The methods was Thirty male Wistar rats were equally divided in 5 groups of : healthy control (K1), periodontitis-diabetic (K2), periodontitis-diabetic treated with SH (K3), periodontitis-diabetic DM-periodontitis treated with HBOT (K4), and periodontitis-diabetic treated with SH and HBOT (K5). Diabetes was induced by single dose 65 mg/kg of BW intraperitoneal. The *Sticopus Hermanii* gel 3% applied topically in sulcus gingiva, HBOT was performed in 2,4 ATA 3x30 minutes interval 5 minute, both done for 7 days. CRP serum were examined by Elisa and blood glucose level by colorimetri method. Data analyzed with One Way Anova. The results of the blood glucose levels raised in K2 group (402,80±93,5) but decreased in all treatment groups K3 (121,20±36,30), K4 (221,00±16,52) and f K5 (95,60±7,47). The CRP levels raised in K2 group (99,66,80±99,0) and K4 group (221,00±16,52) but decreased in treatment groups K3 (13.50±0,83) and K5 (11,09±1.). The Conclusions : The combination SH and HBOT can significantly decrease on serum CRP and blood glucose levels in periodontitis diabetes rat.

**Keywords:** CRP, blood glucose, diabetes, hyperbaric oxygen, periodontitis

## Pendahuluan

Terdapat hubungan yang erat antara derajat keparahan hiperglikemia pada diabetes dengan periodontitis.<sup>1,2</sup> Periodontitis merupakan komplikasi terbesar di rongga mulut penderita Diabetes Melitus (DM) dan meningkat resikonya 3 kali lipat dibandingkan penderita tanpa DM. Sebaliknya Periodontitis dapat meningkatkan keparahan DM.<sup>2,3</sup> Inflamasi berperan penting pada patogenesis periodontitis dan DM.<sup>2,4</sup> Patogenesis periodontitis dan DM keduanya melibatkan aspek sistem imun, aktivitas neutrofil dan sitokin. Respon imun berperan dalam pathogenesis periodontitis kronis termasuk periodontitis dengan DM.<sup>4</sup>

Kadar C-Reactive Protein/CRP meningkat pada kondisi inflamasi termasuk pada periodontitis. CRP merupakan marker inflamasi non spesifik yang dihasilkan oleh sel hepatosit karena *ADresponse to the phase acute of bacterial infection*.<sup>5</sup> Bakteri penyebab periodontitis adalah *P gingivalis*, *Tannerella forsythia* dan *Treponema denticola*. *P. gingivalis* adalah bakteri Gram negatif dimana komponen lipopolisakarida (LPS) pada dinding selnya mampu menginduksi berbagai respon imunologik<sup>4</sup>. Kadar CRP meningkat pada inflamasi karena pengaruh rangsangan sitokin IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ .<sup>6,7,8</sup>

Diabetes dengan kondisi hiperglikemia diketahui akan menginduksi pelepasan sitokin inflamasi seperti Interleukin-6 dan *Tumor Necrotizing Factor  $\alpha$*  (TNF-  $\alpha$ ) pada semua tipe sel<sup>2,3,7</sup> dan enzim perusak jaringan seperti matriksmetalloproteinase. Hiperglikemia dapat mengakibatkan induksi dan sekresi mediator inflamasi pada semua sel. Penelitian pada serum, kadar CRP meningkat pada pasien dengan kerusakan *glucose tolerance test* atau diabetes.<sup>7</sup> Beberapa studi melaporkan bahwa peningkatan CRP mempunyai resiko terhadap timbulnya penyakit diabetes.<sup>8</sup>

Penelitian terapi oksigen hiperbarik/TOHB telah dilakukan terhadap penyakit diabetes pada pengobatan luka pada gangren ekstremitas, glukosa darah, secara molekuler dan seluler seperti kadar ROS, antioksidan, MDA.<sup>9,10,11,12</sup> TOHB pada periodontitis DM dapat menurunkan HIF-1 $\alpha$ , NF-kB, iNOS dan MMP-8.<sup>13</sup> Teripang emas (*Sticopus Hermanii*) telah terbukti salah satu jenis teripang yang mengandung bahan aktif yang mempunyai efek antibakteri, anti inflamasi dan antioksidan.<sup>14,15</sup> Terapi periodontitis bertujuan memperbaiki homeostasis antara jaringan periodontal dan bakteri di rongga mulut menghilangkan plak gigi dengan *scaling* dan *root planning*. Penelitian pada TOHB dapat menurunkan kadar glukosa darah pada penderita DM dan selanjutnya efek terhadap penurunan periodontitis yang berat.<sup>16</sup>

Penggunaan kombinasi TOHB dengan dosis 3 x 30 menit interval 5 menit menghirup udara biasa selama 7 hari berturut-turut dan gel teripang emas 3% diharapkan dapat mengurangi efek samping penggunaan antibiotika, memperbaiki kadar glukosa darah dan CRP pada periodontitis disertai DM. Diharapkan adanya penurunan terhadap CRP dan glukosa darah dapat memperbaiki kondisi DM maupun periodontitis.

## Materi Dan Metode

Jenis penelitian ini *True Eksperimental laboratoris* dengan rancangan penelitian *Factorial Design*. Teknik pengambilan sampel adalah *simple random sampling*. Sampel tikus wistar (*Rattus norvegicus strain wistar*) dengan BB 200  $\pm$  20 gram umur 3-4 bulan dibagi menjadi 5 kelompok, kelompok 1/ normal, kelompok 2/ tikus DM-periodontitis, kelompok 3/ tikus DM-periodontitis + teripang bubuk 3%, kelompok 4/ tikus DM-periodontitis + teripang gel 3% dan kelompok 5/ tikus DM-periodontitis TOHB 2.4 ATA 3x30 menit interval 5 menit selama 7 hari. Sebelum dilakukan induksi STZ, dilakukan induksi nikotinamid 230 mg/kgBB. Model tikus diabetes dengan induksi STZ *single dose* 65 mg/kg BB yang dilarutkan dengan

buffer sitrat 0,1 M pH 4,5 secara peritoneal ditunggu 1 minggu dengan pemberian dekstrosa 10% setiap hari. Tikus DM apabila kadar gula darah acak >230mg/dL. Selama 4 hari dari hari ke 3 setelah induksi STZ hingga hari ke 7 diberikan kanamisin 20 mg dan ampisilin 20 mg yang dicampurkan dalam air minum tikus. Selama itu setiap kelompok tetap diberi makan standard dan minum dalam jumlah sama. Pembuatan gel teripang emas 3% dilakukan dengan cara *freeze dry* yang diperoleh bentuk bubuk kemudian dilarutkan dengan larutan CMC-Na 2%.<sup>19</sup> Pemberian terapi gel teripang emas 3% pada kelompok K2 secara topikal pada sulkus gingiva yang mengalami inflamasi sebanyak 0,1 ml/hari menggunakan *microbrush* selama 7 hari. Pada kelompok K3 diberi THBO. Kelompok K4 diberi kombinasi teripang 3% dan THBO. Pemberian THBO dengan dosis 2.4 ATA selama 3x30 menit interval 5 menit menghirup udara lingkungan selama 7 hari berturut-turut. Akhir penelitian hari ke 52 tikus dikorbankan dan dilakukan pengambilan glukosa darah dan kadar CRP (Helica Biosystems, Inc.; CA, USA) diukur dengan metoda *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) kit. Data dianalisis dengan uji One Way Anova untuk mengevaluasi perbedaan antar kelompok, dilanjutkan dengan post hoc tests. pTest kemaknaan 0.05.

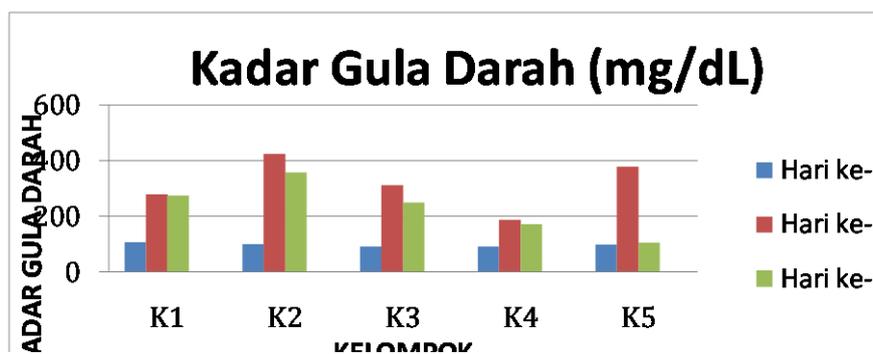
## Hasil

Data dianalisis dengan Anova dengan level signifikansi 95% ( $p < 0.05$ ) menggunakan SPSS

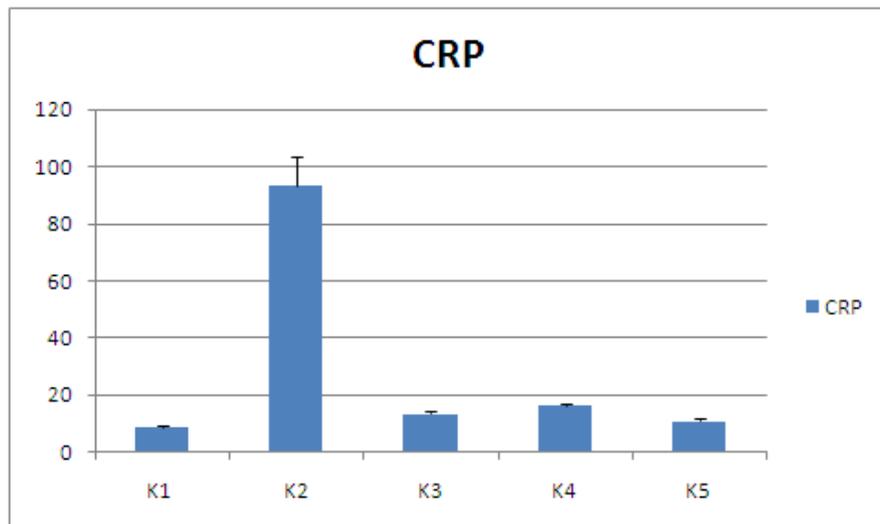
**Tabel 1. Kadar Glukosa darah dan CRP sesudah perlakuan**

GLUKOSA DARAH		CRP		sig
X	SD	X	SD	
K1	90.40	8.62	16.67 <sup>a</sup>	0.448
K2	402,80	93,5	99.65 <sup>b</sup>	7.47
K3	121,20	36,30	13.50 <sup>c</sup>	0.83
K4	221,00	105.20	16,52	0.77
K5	95,60	38.94	12,04	0.99

K1: normal, K2: DM, K3: DM + teripang, K4:DM +HBOT, K5:DM+teripang +HBOT



**Gambar 1. Diagram tiap kelompok kadar glukosa darah**



**Gambar 2. Kadar Rata-Rata CRP (mg/dl) tiap kelompok**

## Pembahasan

Hiperglikemia menghasilkan *Advanced Glycation End Products* yang memicu respon inflamasi dengan menginduksi sitokin proinflamasi TNF- $\alpha$  dan IL-6.<sup>1,2,3,4,5</sup> TNF- $\alpha$  hasil dari resistensi insulin terjadi pada kondisi diabetes.<sup>3,4</sup> Periodontitis adalah penyakit inflamasi kronis pada jaringan periodontal, meski dipicu oleh adanya infeksi bakteri gram negatif tetapi progresivitasnya adalah hasil dari respon host karena adanya inflamasi.<sup>3</sup> Disimpulkan bahwa inflamasi merupakan gambaran sentral dari periodontitis dan diabetes. C-reactive protein adalah marker inflamasi yang meningkat pada kondisi diabetes.

Teripang Emas terdiri dari PUFA (DHA and EPA) dan saponin yang dapat menghambat pembentukan prostaglandin dan sitokin proinflamasi (IL-6, IL-1 and TNF) dan menginduksi anti-inflamasi dan menghambat pertumbuhan bakteri. Pada kondisi inflamasi atau kerusakan jaringan, kadar CRP dapat meningkat sampai 100 kali.<sup>6</sup> Respon host pada infeksi jaringan periodontal melalui sistem imun menghasilkan mediator inflamasi sesudah berinteraksi dengan plak dan AGEs. Meskipun periodontitis pada diabetes merupakan infeksi kronis, elemen fase akut juga terlibat dalam respon imunitas dan menunjukkan inflamasi yang sistemik.<sup>6,7</sup>

Kadar CRP di dalam plasma dihasilkan oleh sel hepatosit yang dirangsang oleh sitokin IL-6, IL-1 and TNF- $\alpha$ . Reaktan fase akut pro-inflamasi, membantu menetralkan patogen yang invansif dan merangsang perbaikan dan regenerasi jaringan. C-reactive protein (CRP), plasminogenactivator-1 (PAI-1), dan fibrinogen adalah reaktan fase akut, tetapi CRP adalah marker yang penting sebab kadarnya yang meningkat adalah dapat sebagai faktor resiko terhadap munculnya penyakit cardiovascular (CVD), juga bahwa CRP juga merupakan biomarker inflamasi sistemik. Peningkatan kadar CRP marker inflamasi subklinis seperti CRP and IL - 6 menunjukkan resiko terjadi progresivitas penyakit kardiovaskuler dan diabetes.<sup>6</sup>

Terapi HBO 2,4 ATA 3x30 menit interval waktu 5 menit selama 7 hari berturut-turut dapat meningkatkan jumlah oksigen terlarut sedemikian rupa, untuk mencapai kondisi di mana kebutuhan praktis oksigen dapat dipenuhi tanpa menggunakan oksigen terikat pada hemoglobin.<sup>9,10</sup> Oksigen terlarut lebih mudah dikonsumsi oleh difusi melalui jaringan langsung daripada oksigen terikat pada hemoglobin. Terapi HBO menghasilkan ROS yang merupakan dasar molekuler untuk sejumlah mekanisme terapi.<sup>13,17,18</sup> Diduga kadar oksigen

yang meningkat di jaringan digunakan untuk menginduksi sintesis enzim endogen seperti SOD, katalase, dan glutathion peroksidase, heme oxygenase, menurunkan NADPH oksidase dan non-enzimatik antioksidan Gluthatione (GSH).<sup>17,18</sup> Peningkatan ROS diimbangi dengan peningkatan antioksidan. Terapi HBO 2,4 ATA dalam 3x30 menit interval 5 menit menghirup udara sekitar selama 7 hari dapat menurunkan kadar TNF- $\alpha$  dan CRP plasma, vasokonstriksi dan hiperoksigenasi, yang memberikan pengobatan yang efektif untuk banyak penyembuhan luka.<sup>10,11,13,18</sup> Kombinasi terapi SH gel dan TOHB menunjukkan penurunan kadar CRP yang signifikan. Hal ini diduga bahwa PUFA yang terdapat di dalam teripang emas secara tidak langsung dapat menurunkan IL-1, TNF- $\alpha$ , meningkatkan sitokin anti-inflamasi IL-10 yang kemudian merangsang penurunan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan HIF-1 pada jaringan periodontal, yang kemudian menghasilkan penurunan marker inflamasi CRP di dalam darah.<sup>6,19</sup>

## Simpulan

Bahwa kombinasi THBO 2,4 ATA 3x30 menit interval 5 menit dan teripang emas 3% berpengaruh terhadap penurunan kadar glukosa darah dan kadar CRP di serum. Korelasi antara penurunan kadar glukosa darah dan CRP bisa berfungsi sebagai penanda prediktif terhadap timbulnya periodontitis dengan diabetes.

## Daftar Pustaka

1. Choi YH, Mc Keown RE, Davis EJM, Liese AD, Song KB and Merchant AT. Serum C-Reactive Protein and Immunoglobulin G Antibodies to Periodontal Pathogens May Be Effect Modifiers of Periodontitis and Hyperglycemia. *Journal of Periodontitis*. September 2014; Vol. 85, No. 9, Pages 1172-1181.
2. Eynan, M, Mullokandov, M, Krinsky, N, Biram, A and Arieli Y. Alteration of blood glucose levels in the rat following exposure to hyperbaric oxygen. *Appl Physiol* 2015; 119: 463-467.
3. Gurav A and Jadhav V. Periodontitis and risk of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes*. 2011; 21-28
4. Gurdol F, Cimit, Y, Öner-ydoan, Körpınar, Yalçınkaya, Koçak. Early and Late Effects of Hyperbaric Oxygen Treatment on Oxidative Stress Parameters in Diabetic Patients. *Physiol. Res*. 2008; 57: 41-47.
5. Marigo, L, Cerreto, R, Giuliani, M, Somma, F, Lajolo, C And Cordaro M. Diabetes mellitus: biochemical, histological and microbiological aspects in periodontal disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2011; 15: 751-758.
6. Mulawarmanti, D. Profil cAMP, NF- $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ , iNOS dan MMP-8 Jaringan Periodonsium Tikus. 2008.
7. Wistar Pada Kondisi Hiperglikemia Yang Dipapar Hiperoksia Hiperbarik. Disertasi Pasca Sarjana Unair. 2008.
8. Mulawarmanti D, Parisihni K, Wedarti YR. Antibacterial Activity of Sea Cucumber Extract to *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Proceeding of Seminar Internasional Dentisphere 2nd*, Surabaya 8-9 November 2013.
9. Mulawarmanti D dan Widyastuti. Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Malondialdehyde Levels in Saliva of Periodontitis Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. *Dental Journal Majalah Kedokteran Gigi*. 2008.

10. Nagatomo F, Gu N, Fujino H, Okiura T, Morimatsu F, Takeda I, Ishihara A. Effects of exposure to hyperbaric oxygen on oxidative stress in rats with type II collagen-induced arthritis. *Clinical and Experimental Medicine*. 2010; 10(1):7-13.
11. Ohlrich EJ, Cullinan MP, and Leichter, JW. Diabetes, Periodontitis, and The subgingival Microbiota. *J Oral Microbiol*. 2010; 2:10.3402.
12. Preshaw, PM, Alba, AL, Herrera D, Jepsen, S , Konstantinidis, A, Makrilakis K & Taylor, R. Periodontitis and diabetes: a two-way relationship *Diabetologia*. 2012; 55:21–3.
13. Rasyid A. Identification of secondary metabolites compounds, antibacterial and antioxidant activities on the methanol extract of sea cucumber *stichopus hermannii*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. 2012; Vol. 4, No. 2; Hlm. 360-368.
14. Simsek K, Oter S, Ay H. Hyperbaric oxygen therapy and its mechanisms of action: implication of several molecular processes along with reactive species. *Journal of Experimental and Integrative Medicine*. 2011; 1(4):205-206.
15. Stanko P, Holla. Bidirectional association between diabetes mellitus and inflammatory periodontal disease. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. Mar 2014; 158(1):35-38.
16. Strackowski, M, Owalska, I, Nikolajuk, A, Krukowska, Gorska, M. 2005. Plasma Interleukin-10 Concentration Is Positively Related To Insulin Sensitivity In Young Healthy Individuals. *Pathophysiology/Complication*.
17. Straka M. Oral manifestations of diabetes mellitus and influences of periodontological treatment on diabetes mellitus. *Bratis lek Listy* . 2011; 1:112 (7):416-420.
18. Trivedi,S, Lal, Mahdi, AA, Mittal, M, Singh, B and Pandey S.Evaluation of Antioxidant Enzymes Activity and Malondialdehyde Levels in Patients With Chronic Periodontitis and Diabetes Mellitus. *Journal of Periodontology*. May 2014; Vol. 85 No. 5; Pages 713-720.
19. Yan L, Liang T and Cheng O. Hyperbaric oxygen therapy in China. Yan et all. *Medical Gas Research*. 2015; 5:3.

# Analisis Variasi Gen Akna Dan Kadar Cd154 Pada Penderita Penyakit Graves

Dwi Anita Suryandari<sup>1</sup>, Luluk Yunaini<sup>1</sup>, Dwi Yanti<sup>2</sup>, Fatimah Eliana<sup>3</sup>, Trisia Amir<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

<sup>2</sup> Program Magister Ilmu Biomedik, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia

<sup>3</sup> Fakultas Kedokteran Universitas YARSI

<sup>4</sup> Fakultas Fisioterapi Universitas Esa Unggul

## Abstrak

Penyakit Graves merupakan suatu kelainan autoimun pada kelenjar tiroid yang ditandai dengan hipertiroidisme, yang terjadi karena reseptor tirotropin (TSHR) pada membran sel folikular tiroid, dikenali sebagai salah satu antigen yang mengakibatkan terjadinya pembentukan antibodi dalam tubuh. Adanya peningkatan kadar sCD154 diduga berperan dalam patogenesis penyakit Graves. Ekspresi CD154 diregulasi dengan sangat ketat pada tahap transkripsi. Elemen regulator gen CD154 memiliki sekuen yang kaya akan basa A/T, oleh karena itu dapat dikenali oleh faktor transkripsi AKNA (*AT-Hook Transcription Factor*). Protein ini memiliki motif *AT hooks binding DNA* yang dapat berperan meregulasi transkripsi dengan mengubah arsitektur DNA, sehingga meningkatkan aksesibilitas promotor terhadap faktor transkripsi. Dengan demikian variasi genetik AKNA bisa dijadikan sebagai prediktor kadar CD154 yang diduga meningkat pada pasien Graves. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui variasi genetik AKNA yang dihubungkan dengan kadar CD154 pada penderita penyakit graves. Pemeriksaan variasi genetik gen AKNA rs3748178 dilakukan melalui teknik PCR-RFLP menggunakan enzim restriksi *EagI* sedangkan pemeriksaan kadar sCD154 dilakukan menggunakan metode ELISA. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan adanya perbedaan kadar sCD154 yang bermakna antar kelompok derajat oftalmopati. Kelompok derajat 4-6 memiliki kadar sCD154 yang paling tinggi secara bermakna. Penderita penyakit Graves dengan genotip GG dan alotip G pada gen AKNA ekson 11 rs3748178 memiliki risiko derajat oftalmopati yang lebih berat. Penderita penyakit Graves dengan kadar sCD154 yang tinggi memiliki derajat oftalmopati yang lebih berat.

**Keywords:** Penyakit Graves, CD154, AKNA.

## Pendahuluan

Penyakit Graves merupakan suatu kelainan autoimun spesifik organ, ditandai dengan produksi antibodi terhadap reseptor TSH (TRAb) yang berikatan dengan reseptor TSH (TSHR) sehingga menyebabkan keadaan hipertiroid.<sup>1</sup> Manifestasi klinis penyakit Graves yang paling serius adalah oftalmopati, yakni inflamasi autoimun kronis yang menyerang jaringan orbita dan retro-orbita.<sup>2</sup> Tanda dan gejala oftalmopati bervariasi, gejala yang paling ringan berupa adanya retraksi kelopak mata, sedangkan yang paling berat adalah gangguan penglihatan karena kerusakan nervus optikus.<sup>3</sup> Keadaan oftalmopati secara signifikan menurunkan kualitas hidup penderita penyakit Graves dan dapat bertahan hingga beberapa tahun setelah diagnosis dan pengobatan penyakit Graves.<sup>4</sup>

Berbagai penelitian menunjukkan overekspresi CD154 adalah penyebab mendasar dari gejala inflamasi pada beberapa kelainan autoimun.<sup>5</sup> Peningkatan kadar sCD154 ditemukan pada beberapa penyakit autoimun seperti lupus eritematosus sistemik,<sup>6,7</sup> artritis reumatoid, sklerosis multipel dan tiroiditis autoimun.<sup>8,10</sup> Hasil suatu penelitian membuktikan bahwa peningkatan kadar sCD154 berperan dalam patogenesis penyakit Graves.<sup>11,12</sup> Peranan CD154 pada beberapa kelainan autoimun telah diketahui, namun hubungannya dengan oftalmopati Graves masih perlu diteliti lebih lanjut.

CD154 (CD40L/gp39/TRAP) merupakan suatu protein transmembran tipe II, berukuran 33 kDa, yang diekspresikan oleh sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi.<sup>13,14</sup> Sel T CD4<sup>+</sup> yang teraktivasi tidak hanya mengekspresikan CD154 dalam bentuk terikat pada membrannya, tapi juga dalam bentuk terlarut (*soluble*, sCD154). CD154 terlarut merupakan protein berukuran 18 kDa yang terbentuk karena aktivitas enzim proteolitik yang memisahkan domain transmembran CD154 dengan domain ekstraselulernya.<sup>15,16</sup> Domain ekstraseluler CD154 memiliki region yang homolog dengan famili TNF- $\alpha$  yang dapat berikatan dengan CD40, sehingga CD154 transmembran maupun terlarut memiliki fungsi biologis yang sama dalam respon imun.<sup>17</sup>

Eksresi CD154 diregulasi dengan sangat ketat pada tahap transkripsi. Elemen regulator gen CD154 memiliki sekuens yang kaya akan basa A/T, oleh karena itu dapat dikenali oleh faktor transkripsi AKNA (*AT-Hook Transcription Factor*). Protein ini memiliki motif *AT hooks binding DNA* yang dapat berperan meregulasi transkripsi dengan mengubah arsitektur DNA, sehingga meningkatkan aksesibilitas promotor terhadap faktor transkripsi. AKNA adalah protein nuklear, memiliki motif *AT hooks binding DNA* yang terdiri dari asam amino RTRGRPADS. Motif *AT hooks* merupakan bagian kecil pada domain protein dengan sekuens yang khas dimana tripeptida GRP adalah bagian pusat dari domain pengikat DNA.<sup>18</sup>

Analisis *Single Nucleotide Polymorphism*(SNP) oleh *Weizmann Institute of Science* menemukan 313 SNP untuk keseluruhan gen AKNA, tapi hanya 11 yang merupakan bagian koding non sinonim.<sup>19,20,21,22</sup> Salah satu SNP yang dinilai cukup memiliki peran biologis adalah rs3748178 yang terletak pada gen AKNA ekson 11, dengan variasi basa G/A pada nukleotida 114189600.<sup>23,24</sup> Perubahan nukleotida CGG menjadi CAG menyebabkan asam amino arginin (R) berubah menjadi glutamin (Q) pada kodon 1119. Perubahan R/Q tersebut terjadi pada motif *AT hooks binding DNA*, tepatnya pada tripeptida inti GRP (kodon 1118-1120), sehingga menjadi GQP yang kurang memiliki muatan positif dan mengurangi afinitas ikatan DNA.<sup>25,26</sup>

Peningkatan kadar sCD154 pada penyakit Graves telah dibuktikan, namun hubungannya dengan keparahan oftalmopati Graves belum diketahui. Inflamasi pada beberapa penyakit autoimun berkorelasi dengan peningkatan jumlah CD154, namun belum diketahui faktor yang meregulasi peningkatan ini. Penelitian lebih lanjut diperlukan untuk

mengetahui variasi genetik AKNA, peran AKNA terhadap regulasi CD154, dan pengaruh keduanya terhadap keadaan oftalmopati pada penderita penyakit Graves. Rumusan pertanyaan adalah bagaimanakah distribusi variasi genetik AKNA ekson 11 rs3748178 pada penderita oftalmopati Graves di Indonesia? apakah terdapat hubungan genotip dan alotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan derajat oftalmopati penderita penyakit Graves? apakah terdapat hubungan kadar sCD154 dengan derajat oftalmopati penderita penyakit Graves?. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui variasi genetik gen AKNA rs3748178 dan kadar sCD154 serta hubungannya dengan derajat oftalmopati pada penderita penyakit Graves. Manfaat penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai peran variasi genetik AKNA ekson 11 rs3748178 terhadap kejadian oftalmopati yang disebabkan penyakit Graves, memberikan informasi mengenai peran CD154 terhadap kejadian oftalmopati yang disebabkan penyakit Graves. Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai informasi awal untuk pengembangan aplikasi skrining pada penderita penyakit Graves untuk memprediksi kejadian oftalmopati dan derajat keparahannya.

## Metodologi

### 1. Tempat, waktu dan subyek penelitian

Penelitian ini dilakukan di Poliklinik Metabolik Endokrin Departemen Ilmu Penyakit Dalam RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta, Laboratorium Biologi Molekular Departemen Biologi Kedokteran FKUI dan Loratorium Terpadu FKUI. Subjek penelitian adalah pasien penyakit Graves yang datang ke Poliklinik Metabolik Endokrin RSUPN dr. Cipto Mangunkusumo Jakarta. Rancangan penelitian ini telah mendapat izin Komisi Etik Penelitian FKUI-RSCM (No. 204/UN2.F1/ETIK/2016). Semua data dan hasil penelitian dijaga kerahasiaannya. Derajat oftalmopati ditentukan berdasarkan klasifikasi NOSPECS yang diagnosis nya dilakukan oleh dokter spesialis penyakit dalam. Derajat 0 bila tidak ada tanda atau gejala. Derajat 1 bila terdapat retraksi pada kelopak mata dan mata tampak melotot sehingga kelopak mata atas masuk ke dalam rongga mata jika memandang ke bawah. Derajat 2 bila terdapat edema atau injeksi pada konjungtiva atau kelopak mata. Derajat 3 bila terdapat proptosis. Derajat 4 bila terdapat gangguan pada otot ekstraokular dan diplopia. Derajat 5 bila terdapat gangguan pada kornea sehingga mata tidak bisa menutup secara sempurna (lagofthalmus). Derajat 6 bila terdapat gangguan penglihatan karena kerusakan nervus optikus. Pada penelitian ini, subjek penelitian dikelompokkan menjadi tiga kelompok. Kelompok derajat oftalmopati 0, kelompok derajat 1-3 dan kelompok derajat 4-6.

Jumlah sampel yang digunakan dihitung berdasarkan rumus proporsidengan jumlah minimum adalah 43 sampel dan pada penelitian ini digunakan 60 sampel. Kriteria inklusi pemeriksaan klinis dan laboratorium menunjukkan keadaan penyakit Graves dan bersedia ikut dalam penelitian dan menandatangani lembar persetujuan sedangkan kriteria eklusi adalah pasien sudah pernah dilakukan pemberian yodium radioaktif, sudah pernah dilakukan tindakan operasi tiroidektomi atau oftalmopati dan pasien dalam keadaan hamil atau menyusui.

### 2. Cara Kerja

Pengumpulan sampel DNA dan serum subjek penelitian yang tersimpan di Laboratorium Biologi Molekular Departemen Biologi Kedokteran FKUI kemudian dikelompokkan berdasarkan derajat oftalmopati

a. Pemeriksaan variasi genetik AKNA dilakukan dengan teknik PCR-RFLP.

Sekuen primer yang digunakan untuk amplifikasi gen AKNA ekson 11 adalah *left/forward primer* 5'-TCC-TCA-TGC-CTC-TGT-TCT-TTG-3' dan *right/reverse primer* 5'-CGC-CCG-GCC-TAT-TCT-TTA-TTA-3'. Primer tersebut menghasilkan amplicon berukuran 438bp. Proses amplifikasi dilakukan menggunakan mesin PCR Thermal Cycler T100. Volume setiap reaksi adalah 25 µl yang terdiri atas 12,5 µl PCR *master mix* (Kapa Biosystem); 0,25 µl *forward primer*; 0,25 µl *reverse primer*; 9,5 µl ddH<sub>2</sub>O dan 2,5 µl DNA genom. Metode PCR meliputi tahap pra-denaturasi selama 5 menit pada suhu 94°C, denaturasi selama 30 detik pada suhu 94°C, *annealing* (penggabungan) selama 30 detik pada suhu 53°C, ekstensi (pemanjangan) selama 30 detik pada suhu 72°C dan ekstensi terakhir selama 5 menit pada suhu 72°C. Reaksi ini berlangsung sebanyak 35 siklus.

Deteksi hasil PCR menggunakan metode elektroforesis dengan gel agarosa 1,6% yang mengandung 0,5 µl etidium bromida dalam larutan dapar *Tris-Acetate-EDTA* (TAE) 1X (0,04 M Tris-asetat, 0,002 M EDTA, pH 8,0). Produk PCR sebanyak 6 µl dimasukkan ke dalam sumur elektroforesis dengan penanda yang digunakan adalah DNA *ladder* 100 bp. Proses elektroforesis dilakukan selama 60 menit pada tegangan 80 volt. Visualisasi pita fragmen DNA hasil elektroforesis diamati dengan iluminator ultraviolet UV Long Life Filter Spectroline dan difoto dengan kamera digital.

- b. Analisis titik polimorfisme gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*).

Analisis polimorfisme gen AKNA dilakukan menggunakan enzim restriksi *EagI* yang memotong sekuen DNA pada rs3748178. Pemotongan sekuen DNA produk PCR dilakukan dengan cara menambahkan 0,5 µl enzim *EagI*; 2 µl larutan dapar; dan 7,5 µl ddH<sub>2</sub>O ke dalam 10 µl produk PCR. Proses inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 4 jam. Fragmen DNA dianalisis dengan elektroforesis pada gel agarosa 2,4% dalam TAE 1X pada tegangan 80 volt selama 60 menit. Visualisasi pita fragmen DNA hasil elektroforesis diamati dengan iluminator ultraviolet UV Long Life Filter Spectroline dan difoto dengan kamera digital. Pemotongan sekuen DNA dengan enzim *EagI* menghasilkan dua fragmen berukuran 264 bp dan 174 bp. Homozigot *wildtype* (GG) dipresentasikan dengan terbentuknya 2 pita DNA berukuran 264 bp dan 174 bp. Homozigot *mutant* (AA) dipresentasikan dengan tidak adanya pemotongan dan hanya terbentuk satu pita DNA berukuran 438 bp. Heterozigot dipresentasikan dengan terbentuknya 3 pita DNA berukuran 438 bp, 264 bp dan 174 bp.

- c. Pemeriksaan kadar sCD154

Pemeriksaan kadar sCD154 dilakukan dengan metode ELISA menggunakan *Human sCD40L Platinum ELISA Kit BMS 239* dari *Affimatrix, eBioscience*. Larutan standar dipersiapkan terlebih dahulu dengan melakukan dilusi bertingkat dari larutan stok. Tujuh larutan standar dibuat bervariasi dengan konsentrasi 0,16 ng/ml; 0,31 ng/ml; 0,63 ng/ml; 1,25 ng/ml; 2,5 ng/ml; 5 ng/ml dan 10 ng/ml. Sebanyak 80 µl *sample diluent*, 20 µl sampel uji (serum) dan 100 µl HRP *conjugate* dicampur dengan merata dan siap untuk dipindahkan ke sumur plat berlapis antibodi monoklonal. Sumur plat yang telah dilapisi dengan antibodi monoklonal spesifik terhadap sCD154 dicuci dengan *wash buffer* sebanyak dua kali (tiap sumur 400 µl), kemudian didiamkan selama 10-15 detik sebelum dibuang. Sumur plat ini harus langsung digunakan setelah dicuci dan ditiriskan. Sebanyak 150 µl campuran *sample diluent*, sampel uji atau larutan standar dan HRP *conjugate* dimasukkan ke dalam sumur plat sesuai labelnya. Sumur plat ditutup dengan *adhesive film*, kemudian diinkubasi pada

suhu ruang (18°-25°C) selama dua jam di atas mesin *shaker* dengan kecepatan 400 rpm. *Adhesive film* dilepas setelah dua jam, isi pada sumur plat dibuang, kemudian plat dicuci dengan wash buffer sebanyak tiga kali (masing-masing 400 µl). Sebanyak 100 µl TMB *substrate solution* ditambahkan pada setiap sumur, kemudian diinkubasi selama 10 menit pada suhu ruang (18°-25°C). Larutan *stop solution* segera ditambahkan pada setiap sumur, bila sumur larutan standar dengan konsentrasi 10 ng/ml telah menunjukkan warna biru tua. Perubahan warna dibaca absorbansinya dengan ELISA *Reader* pada panjang gelombang 450 nm. Konsentrasi sCD154 ditentukan dengan membandingkan nilai *Optical Density* (OD) sampel uji dengan kurva standar kemudian hasil konsentrasi tersebut dikalikan lima sebagai faktor pengenceran.

3. Analisis statistik pada penelitian ini dilakukan dengan perangkat lunak *Statistical Product and Service Solution* (SPSS) versi 22.

Data kategorik berupa variasi genetik dan derajat oftalmopati disajikan dalam bentuk jumlah atau frekuensi dan persentase tiap kategori (proporsi). Data numerik berupa hasil pemeriksaan kadar sCD154 disajikan dalam rerata dan simpang baku bila berdistribusi normal dan disajikan dalam median serta nilai minimum maksimum bila tidak berdistribusi normal. Hubungan antara variasi genotip dan alotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan derajat oftalmopati pada penderita penyakit Graves dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis.

4. Hasil Penelitian dan Diskusi

- a. Karakteristik Subjek Penelitian

Karakteristik subjek penelitian menunjukkan jumlah penderita oftalmopati Graves yang dikelompokkan ke dalam derajat 4-6 adalah sebanyak 14 orang (24%), derajat 1-3 dan derajat 0 masing-masing sejumlah 23 orang (38%). Penderita oftalmopati Graves lebih banyak ditemukan pada perempuan dengan perbandingan 5:1. Frekuensi genotip dan alotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 pada penderita oftalmopati Graves yang paling banyak ditemukan adalah genotip GG sebanyak 45 (75%) dan alotip G sebanyak 102 (85%). Rerata kadar sCD154 yang paling tinggi ditemukan pada kelompok derajat 4-6 (8,06 ng/ml) dan paling rendah ditemukan pada kelompok derajat 0 (0,59 ng/ml). Penderita oftalmopati Graves dengan derajat 4-6 berjumlah paling sedikit yakni 14 orang, sedangkan penderita oftalmopati Graves derajat 0 dan 1-3 masing-masing berjumlah 23 orang.

Beberapa penelitian telah membuktikan bahwa dari keseluruhan penderita oftalmopati Graves, hanya 5-7% yang mengalami keparahan hingga derajat yang berat, yakni derajat 6 pada klasifikasi NOSPECS.<sup>27</sup> Merokok dan pengobatan hipertiroid dengan yodium radioaktif telah terbukti berhubungan dengan memburuknya derajat keparahan oftalmopati. Para perokok memiliki respon terapeutik yang kurang baik terhadap radiasi orbita dan kortikosteroid. Terapi yodium radioaktif meningkatkan kadar TRAb yang berasosiasi dengan prognosis buruk pada oftalmopati Graves.<sup>28</sup> Pada penelitian ini, merokok dan terapi yodium radioaktif tidak termasuk variabel yang diteliti. Hal ini disebabkan kesulitan mencari subjek penelitian dengan jumlah memadai untuk masing-masing variabel pada tiap kelompok, sehingga tidak terjadi bias dalam interpretasi data.

**Tabel 1. Karakteristik subjek penelitian**

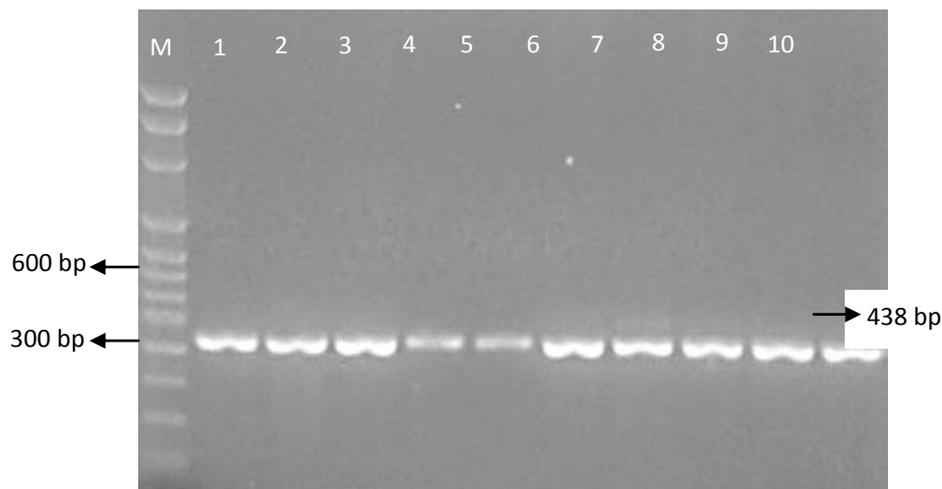
Variabel	Derajat 0	Derajat 1-3	Derajat 4-6	Total
<b>Jenis kelamin, n(%)</b>				
Perempuan	16 (70)	21 (91)	13 (93)	50 (84)
Laki-laki	7 (30)	2 (9)	1 (7)	10 (16)
<b>Genotip gen AKNA ekson 11 rs3748178, n(%)</b>				
GG	11 (48)	21 (91)	13 (93)	45 (75)
GA	9 (40)	2 (9)	1 (7)	12 (20)
AA	3 (22)	0 (0)	0 (0)	3 (5)
<b>Alotip gen AKNA ekson 11 rs3748178, n(%)</b>				
G	31 (67)	44 (96)	27 (96)	102 (85)
A	15 (33)	2 (4)	1 (4)	18 (15)
<b>Kadar sCD154 (ng/ml)</b>				
Rerata	0,59	5,61	8,06	4,26
Median	0,38	4,70	6,80	1,95
Standar deviasi	0,52	3,82	5,94	4,78
Minimum	0,03	0,15	0,30	0,03
Maximum	1,73	12,72	23,73	23,73

Jenis kelamin perempuan merupakan salah satu faktor risiko pada oftalmopati Graves. Proporsi pasien oftalmopati Graves pada penelitian ini sebagian besar berjenis kelamin perempuan (84%). Keadaan ini sesuai dengan data epidemiologi bahwa prevalensi pasien oftalmopati Graves adalah sebagian besar perempuan dengan perbandingan 5:1.<sup>6</sup> Jenis kelamin perempuan sebagai faktor risiko berhubungan erat dengan peran kromosom X dan hormon sex, terutama estrogen. Beberapa penelitian telah membuktikan adanya inaktivasi acak kromosom X pada penyakit autoimun. Kromosom X memiliki miRNA yang tidak terdapat pada kromosom Y dan berperan pada disregulasi sistem imun. Hormon estrogen menunjang keberadaan sel T autoreaktif yang dapat menyebabkan autoimunitas.

#### b. Analisis Molekuler

##### 1. Amplifikasi Fragmen DNA Target dengan Teknik PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Amplifikasi DNA target dari gen AKNA ekson 11 rs3748178 dilakukan dengan teknik PCR. Proses PCR dengan sepasang primer spesifik dilakukan pada suhu *annealing* 53°C dan menghasilkan pita tunggal berukuran 438 bp (Gambar 2.)

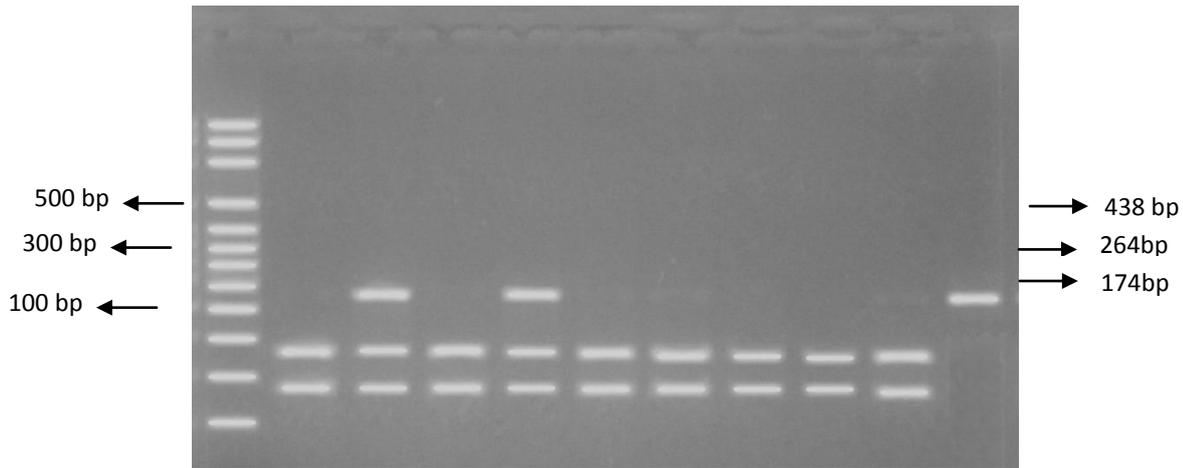


**Gambar 2. Hasil Elektroforesis DNA target yang diamplifikasi dengan metode PCR.**

Hasil PCR gen AKNA menggunakan primer spesifik yang ditandai dengan munculnya pita tunggal dengan ukuran 438 bp. M= marker/DNA penanda. Sumur 1-10= DNA sampel.

2. Analisis Titik Polimorfisme Gen AKNA Ekson 11 rs3748178 dengan Teknik RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

Produk PCR berupa DNA yang telah teramplifikasi pada daerah ekson 11 gen AKNA yang mengandung situs polimorfik pada rs3748178, selanjutnya dipotong menggunakan enzim restriksi *EagI* dengan teknik RFLP. Hal ini bertujuan untuk mengidentifikasi variasi genetik pada sampel dengan melihat nukleotida yang mengalami mutasi. Produk PCR yang terpotong menjadi dua fragmen menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki alel *wildtype* (G), sedangkan produk PCR yang tidak terpotong menunjukkan bahwa sampel tersebut memiliki alel *mutant* (A). Pemotongan sekuen DNA dengan enzim *EagI* menghasilkan dua fragmen berukuran 264 bp dan 174 bp. Homozigot *wildtype* (GG) dipresentasikan dengan terbentuknya 2 pita DNA berukuran 264 bp dan 174 bp. Homozigot *mutant* (AA) dipresentasikan dengan tidak adanya pemotongan dan hanya terbentuk satu pita DNA berukuran 438 bp. Heterozigot dipresentasikan dengan terbentuknya 3 pita DNA berukuran 438 bp, 264 bp dan 174 bp.



**Gambar 3. Hasil RFLP produk PCR gen AKNA yang dipotong dengan enzim *EagI*.**

M= marker/DNA penanda. Sumur 1,3,5-9= homozigot *wild type* (GG) menghasilkan dua pita ukuran 264 bp dan 174 bp. Sumur 10= homozigot *mutant* (AA) menghasilkan satu pita ukuran 438 bp. Sumur 2 dan 4= heterozigot (GA) menghasilkan tiga pita berukuran 438 bp, 264 bp dan 174 bp.

c. Hubungan Genotip Gen AKNA Ekson 11 rs3748178 dengan Derajat Oftalmopati Penderita Penyakit Graves

Hubungan frekuensi genotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan kelompok derajat oftalmopati Graves tidak dapat diuji dengan *chi square* 3x3 karena tidak memenuhi syarat uji *chi square*. Hal tersebut ditandai dengan adanya sel yang memiliki nilai 0 dan lebih dari 20% sel mempunyai nilai *expected* kurang dari lima. Penggabungan sel dilakukan untuk data genotip GA dan AA yang dibandingkan dengan genotip GG. Analisis dilakukan dengan uji *chi-square* 2x2 yang membandingkan proporsi genotip pada kelompok derajat oftalmopati, kemudian dilihat nilai *odd ratio* (OR).

**Tabel 2. Hubungan genotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan derajat oftalmopati penderita penyakit Graves**

		Derajat oftalmopati			OR (IK95%)	p*
		Derajat 0 n (%)	Derajat 1-3 n (%)	Derajat 4-6 n (%)		
Genotip	GG	11 (24)	21 (47)	13 (29)	14,182 (1,583- 127,013)	0,011
	GA dan AA	12 (80)	2 (13)	1 (7)		
	Total	23 (38)	23 (38)	14 (24)		

\*Uji *chi-square*

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara genotip GG dengan genotip GA dan AA gen AKNA ekson 11 rs3748178 pada kelompok derajat oftalmopati 1-3 dan 4-6 dibandingkan dengan derajat 0. Proporsi penderita bergenotip GG dengan derajat oftalmopati yang berat lebih banyak secara bermakna. Perbedaan proporsi genotip GG dengan genotip GA dan AA pada kelompok derajat 1-

3 dibandingkan dengan derajat 4-6 tidak bermakna. Genotip GG berisiko 14 kali lebih besar untuk mengalami oftalmopati derajat 4-6 (Tabel 2).

d. Hubungan Alotip Gen AKNA Ekson 11 rs3748178 dengan Derajat Oftalmopati Penderita Penyakit Graves

Analisis hubungan frekuensi alotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan kelompok derajat oftalmopati Graves dilakukan dengan uji *chi square* 2x2, kemudian dilihat nilai *odd ratio* (OR). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara alotip G dengan A gen AKNA ekson 11 rs3748178 pada kelompok derajat oftalmopati 1-3 dan 4-6 dibandingkan dengan derajat 0. Proporsi penderita yang memiliki alotip G dengan derajat oftalmopati yang berat lebih banyak secara bermakna. Perbedaan proporsi alotip G dengan A pada kelompok derajat 1-3 dibandingkan dengan derajat 4-6 tidak bermakna. Pasien dengan alotip G berisiko 13 kali lebih besar untuk mengalami oftalmopati derajat 4-6 (Tabel 3).

**Tabel 3. Hubungan alotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan derajat oftalmopati penderita penyakit Graves**

		Derajat oftalmopati			OR (IK 95%)	p*
		Derajat 0 n (%)	Derajat 1-3 n (%)	Derajat 4- 6 n (%)		
Alotip	G	31 (30)	44 (43)	27 (27)	13,065	0,003
	A	15 (83)	2 (11)	1 (6)	(1,618-	
	Total	46 (38)	46 (38)	28 (24)	105,516)	

\*Uji *chi-square*

Variasi genotip gen AKNA dapat diketahui dengan melihat adanya polimorfisme pada gen tersebut. Polimorfisme gen AKNA ekson 11 terletak pada bagian struktural yang mengkode motif *AT-hook* dari faktor transkripsi AKNA. Motif ini akan berikatan dengan elemen regulator gen CD154, mengubah arsitektur DNA dan menyebabkan terjadinya upregulasi transkripsi gen CD154. Molekul CD40 sebagai reseptor CD154 juga memiliki elemen ikatan *AT-hooks* pada bagian promoternya. Penelitian Shiddiqi sebelumnya telah membuktikan bahwa faktor transkripsi AKNA dapat berikatan langsung dengan elemen regulator gen CD154 dan CD40 serta meregulasi ekspresi ligan dan reseptornya tersebut.<sup>19</sup> Ikatan CD154-CD40 telah terbukti menyebabkan produksi sitokin proinflamasi, meningkatkan sintesis hialuronan dan prostaglandin, serta memicu proliferasi fibroblas orbita. Peristiwa tersebut berperan terhadap remodeling jaringan dan respon inflamasi lokal pada fibroblas orbita.<sup>14</sup> Beberapa hasil penelitian tersebut menguatkan dugaan bahwa gen AKNA adalah salah satu kandidat gen yang berperan pada kejadian oftalmopati Graves.

Salah satu SNP gen AKNA yang dinilai cukup memiliki peran biologis adalah rs3748178 yang terletak pada ekson 11, dengan variasi basa G/A pada nukleotida 114189600.<sup>24</sup> Perubahan nukleotida CGG menjadi CAG menyebabkan asam amino arginin (R) berubah menjadi glutamin (Q) pada kodon 1119. Perubahan R/Q tersebut terjadi pada motif *AT hooks binding DNA*, tepatnya pada tripeptida inti GRP (kodon 1118-1120), sehingga menjadi GQP yang kurang memiliki muatan positif dan mengurangi afinitas ikatan DNA.<sup>25,26</sup>

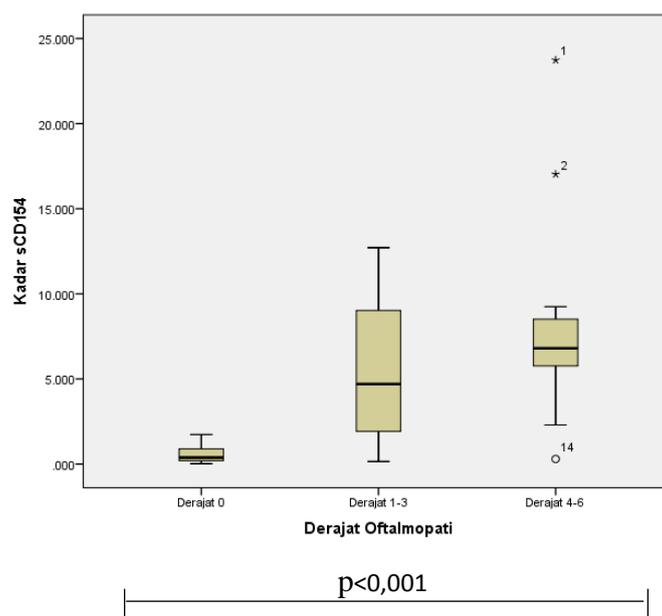
Variasi genetik gen AKNA rs3748178 dapat bertindak sebagai SNP protektif. Genotip AA yang mengkode asam amino glutamin memiliki risiko keparahan oftalmopati Graves lebih ringan. Hal tersebut terbukti pada penelitian ini bahwa genotip AA tidak terdapat pada kelompok derajat oftalmopati 4-6 maupun derajat 1-3. Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara genotip GG dengan GA dan AA gen AKNA ekson 11 rs3748178 pada kelompok derajat oftalmopati 1-3 dan 4-6 dibandingkan dengan derajat 0 ( $p=0,011$ ). Proporsi penderita bergenotip GG dengan derajat oftalmopati yang berat lebih banyak secara bermakna. Genotip GG berisiko 14 kali lebih besar untuk mengalami oftalmopati derajat 4-6.

Jumlah penderita oftalmopati Graves dengan genotip GG lebih banyak pada kelompok derajat 1-3 dibandingkan dengan kelompok derajat 4-6. Hal ini disebabkan jumlah sampel yang tidak seimbang, sampel pada kelompok derajat 1-3 lebih banyak hampir dua kali lipat. Jika mengacu kepada persentase genotip GG pada ketiga kelompok derajat oftalmopati, terlihat bahwa genotip GG memiliki persentase paling tinggi (92,9%) pada kelompok derajat 4-6.

Penelitian tentang faktor genetik yang memiliki peran terhadap kejadian oftalmopati Graves masih terus berkembang dan sampai saat ini belum ditemukan polimorfisme suatu gen yang dinyatakan sebagai faktor kerentanan. Studi meta analisis HLA-DR3, HLA-DR4 dan HLA-DR7 tidak dapat membuktikan asosiasi yang signifikan dengan oftalmopati Graves. Polimorfisme beberapa gen yang telah terbukti berasosiasi dengan penyakit Graves, seperti CTLA-4, CD40, PTPN22, dan IL-13 tidak menunjukkan asosiasi yang signifikan terhadap kejadian oftalmopati Graves.<sup>7</sup> Hasil penelitian ini dapat memberikan informasi polimorfisme suatu gen target baru yang berhubungan dengan kejadian oftalmopati.

e. Hubungan Kadar sCD154 dalam Serum dengan Derajat Oftalmopati Penderita Penyakit Graves

Hasil uji normalitas pada masing-masing kelompok menunjukkan hanya kadar sCD154 pada kelompok derajat 1-3 yang berdistribusi normal ( $p= 0,200$ ), sedangkan kadar sCD154 pada kelompok lainnya tidak berdistribusi normal ( $p<0,05$ ). Analisis statistik non parametrik dipilih untuk menguji adanya hubungan kadar sCD154 dengan derajat oftalmopati menggunakan uji Kruskal-Wallis yang menunjukkan adanya perbedaan kadar sCD154 yang bermakna antar kelompok derajat oftalmopati. Kelompok derajat 4-6 memiliki kadar sCD154 yang paling tinggi secara bermakna (Gambar 4)

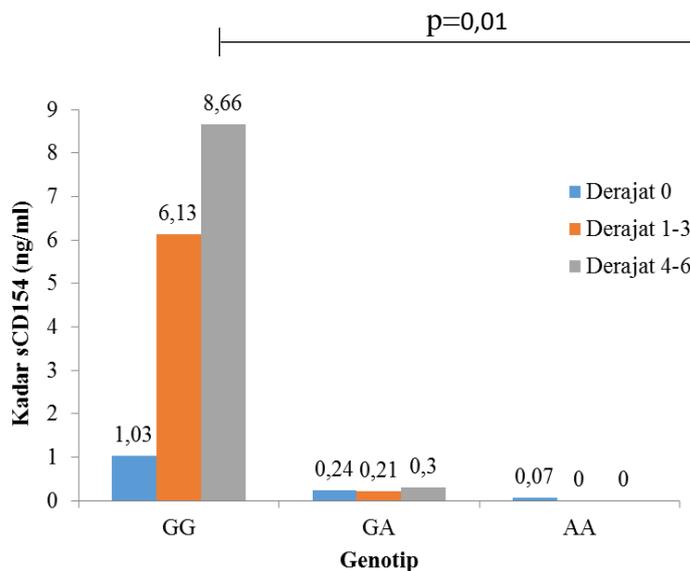


**Gambar 4. Perbandingan nilai median kadar sCD154 antar kelompok derajat oftalmopati Graves dengan uji Kruskal-Wallis.**

Nilai median (minimum-maksimum) kelompok derajat 0= 0,38 (0,02-1,73) ng/ml; kelompok derajat 1-3= 4,70 (0,15-12,71) ng/ml; kelompok derajat 4-6= 6,80 (0,30-23,73) ng/ml.

f. Hubungan Genotip Gen AKNA Ekson 11 rs3748178 dengan Kadar sCD154 dalam Serum Penderita Penyakit Graves

Analisis statistik dengan anava dua jalur dilakukan untuk menguji adanya hubungan antara genotip gen AKNA ekson 11 rs3748178 dengan kadar sCD154 pada penderita oftalmopati Graves. Hasil uji statistik menunjukkan adanya perbedaan kadar sCD154 yang bermakna antara genotip GG, GA dan AA pada gen AKNA ekson 11 rs3748178. Penderita oftalmopati Graves dengan genotip GG pada kelompok derajat 4-6 memiliki kadar sCD154 yang paling tinggi (Gambar 4.4). Hasil uji statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan antara alotip G dengan A gen AKNA ekson 11 rs3748178 pada kelompok derajat oftalmopati 1-3 dan 4-6 dibandingkan dengan derajat 0 ( $p=0,003$ ). Proporsi penderita yang memiliki alotip G dengan derajat oftalmopati yang berat lebih banyak secara bermakna. Pada kelompok derajat 4-6 hanya terdapat satu alotip A. Hal ini menandakan bahwa alel G berhubungan dengan derajat oftalmopati yang lebih berat, sedangkan alel A dapat bertindak sebagai alel protektif pada oftalmopati Graves. Pasien dengan alotip G berisiko 13 kali lebih besar untuk mengalami oftalmopati derajat 4-6.



**Gambar 5. Perbandingan nilai rerata kadar sCD154 antara genotip GG, GA dan AA gen AKNA ekson 11 rs3748178 pada kelompok derajat oftalmopati Graves dengan uji anava dua jalur.**

Rerata kadar sCD154 pada genotip GG= 5,61 ng/ml; genotip GA= 0,23 ng/ml; genotip AA= 0,07 ng/ml.

Gen AKNA mengkode faktor transkripsi AKNA yang berperan meregulasi transkripsi gen CD154 melalui ikatan motif *AT hook* dengan elemen regulator gen CD154. Protein CD154 berperan penting pada respon autoimunitas dan juga peristiwa remodeling jaringan pada fibroblas orbita penderita oftalmopati Graves.<sup>10,11,12,13,14</sup> Penderita oftalmopati Graves yang memiliki alel G maupun alel A dapat mengekspresikan CD154, namun dengan kuantitas yang berbeda. Alel A menyebabkan asam amino arginin berubah menjadi glutamin pada tripeptida inti motif *AT hooks binding DNA*, sehingga kurang memiliki muatan positif dan mengurangi afinitas ikatan DNA.<sup>21,26</sup> Hal ini memungkinkan berkurangnya jumlah protein CD154 yang dihasilkan. Overekspresi CD154 telah terbukti berhubungan dengan reaksi inflamasi pada berbagai penyakit autoimun<sup>5-12</sup> dan dapat meningkatkan produksi hialuronan oleh fibroblas orbita.<sup>33</sup> Kedua hal ini dapat memperburuk prognosis oftalmopati Graves.

Hasil penelitian mengungkap bahwa sebagian besar populasi Indonesia memiliki alotip G. Hal ini dapat menjadi informasi agar penderita penyakit Graves di Indonesia menghindari faktor lingkungan yang berisiko mencetuskan oftalmopati Graves, seperti merokok dan terapi yodium radioaktif karena secara genetik populasi Indonesia berpotensi menderita oftalmopati dengan derajat yang berat.

g. Hubungan Kadar sCD154 dalam Serum dengan Derajat Oftalmopati Penderita Penyakit Graves

Kadar sCD154 dalam serum penderita penyakit Graves diukur dengan teknik ELISA. ELISA merupakan uji serologis yang digunakan untuk menganalisis adanya interaksi antigen dengan antibodi di dalam suatu sampel dengan menggunakan enzim

sebagai pelapor. Jenis ELISA yang digunakan pada penelitian ini adalah *sandwich* ELISA yang memanfaatkan konjugat antibodi-enzim yang digunakan untuk mendeteksi antigen pada sampel. Hasil penelitian menunjukkan bahwa kadar sCD154 berbanding lurus dengan derajat keparahan oftalmopati Graves. Kelompok derajat 4-6 memiliki kadar oftalmopati yang paling tinggi secara bermakna ( $p < 0,001$ ). Selisih median kadar sCD154 pada kelompok derajat 4-6 dengan derajat 1-3 dan derajat 0 adalah sebesar 2,1 ng/ml dan 6,42 ng/ml. Hal ini menandakan bahwa tingginya kadar sCD154 dapat memengaruhi risiko kejadian oftalmopati dengan derajat yang berat. Penelitian yang dilakukan Mysliwiec *et al* di Polandia menunjukkan terjadi peningkatan kadar sCD154 dalam serum penderita penyakit Graves yang mengalami oftalmopati sebesar 4,0 ng/ml dibandingkan dengan penderita tanpa gejala oftalmopati. Kadar sCD154 dalam serum dengan kejadian oftalmopati pada penelitian tersebut dilaporkan memiliki hubungan yang bermakna.<sup>35</sup> CD154 terlarut terbentuk karena aktivitas enzim proteolitik yang memisahkan domain transmembran CD154 dengan domain ekstraselulernya.<sup>15,16</sup> Enzim *matrix metalloproteinase* (MMP) memisahkan domain ekstraseluler dari protein transmembran CD154.

Fungsi biologis sCD154 sama dengan protein CD154, karena memiliki domain yang homolog dengan famili TNF- $\alpha$  yang dapat berikatan dengan CD40. Molekul sCD154 terbentuk sesaat setelah CD154 terekspresi pada permukaan sel T yang teraktivasi. Hal ini menunjukkan bahwa tingginya kadar sCD154 dalam serum mengindikasikan peningkatan ekspresi CD154 pada bagian transmembran.<sup>19,31</sup> Molekul sCD154 akan berikatan dengan CD40 yang terekspresi pada permukaan fibroblas orbita. Ikatan ligan dengan reseptornya ini dapat menginduksi ekspresi molekul adhesi, sitokin proinflamasi dan prostaglandin E<sub>2</sub> yang berperan dalam remodeling jaringan pada oftalmopati Graves. Ikatan ini juga menghambat ekspresi *matrix metalloproteinase*, seperti MMP-1 dan MMP-3, yang berperan membentuk CD40 dalam bentuk terlarut (sCD40). Adanya inhibisi ini menyebabkan sCD154 lebih banyak berikatan dengan CD40 pada permukaan sel fibroblas orbita dibandingkan dengan CD40 terlarut. Transduksi sinyal yang terjadi setelah adanya ikatan sCD154 dengan CD40 menginduksi proliferasi sel fibroblas orbita dan fibrogenesis.<sup>14</sup> Penelitian Wang dan Smith menunjukkan bahwa fibroblas orbita mengalami peningkatan produksi hialuronan yang signifikan ketika diinkubasi dengan CD154. Hialuronan yang bersifat sangat hidrofil menyebabkan retensi air dan ekspansi volume jaringan orbita.<sup>34</sup>

Molekul CD40 juga diekspresikan secara konstitutif pada permukaan sel B. Ikatan CD154-CD40 berperan pada proses diferensiasi sel B dan induksi sel tersebut untuk memproduksi antibodi terhadap antigen tertentu. Pada penyakit Graves, sel B memproduksi autoantibodi terhadap reseptor TSH yang dikenal dengan *thyrotropin receptor antibody* (TRAb) yang memiliki dua isoform, yakni *thyroid-stimulating antibody* (TSAb) dan *thyroid stimulation blocking antibody* (TBAbs).<sup>10</sup> Peran CD154 pada pembentukan autoantibodi ini diduga juga memengaruhi hubungannya dengan derajat oftalmopati, selain melalui mekanisme aktivasi fibroblas orbita oleh sel T. Pada penelitian ini peningkatan kadar TRAb pada kelompok derajat oftalmopati tidak diukur, namun beberapa penelitian lain telah menunjukkan signifikansi hubungannya. Penelitian Eliana membuktikan adanya peningkatan kadar TRAb pada penderita oftalmopati Graves dengan derajat berat.<sup>36</sup> Ekspresi protein CD154 diatur dengan sangat ketat melalui beberapa mekanisme, yakni regulasi transkripsi, stabilitas mRNA, stabilitas protein monomer dan trimer, ekspresi pada permukaan sel dan sekresi bentuk

terlarut serta degradasi proteolitik. Pengaturan yang telah diketahui paling berperan adalah regulasi transkripsi, salah satunya oleh faktor transkripsi AKNA.<sup>18</sup> Faktor transkripsi adalah protein yang berikatan dengan sekuen DNA spesifik untuk memulai proses transkripsi, oleh karena itu sangat berperan mengatur laju transkripsi suatu gen. Faktor transkripsi dapat berikatan secara langsung dengan DNA yang bermuatan negatif melalui domain pengikat DNA.<sup>27</sup> Afinitas ikatan faktor transkripsi dengan sekuen DNA dapat mempengaruhi laju transkripsi, sehingga mempengaruhi jumlah protein yang dihasilkan. Afinitas yang lebih kuat akan menghasilkan kadar CD154 yang lebih tinggi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa penderita oftalmopati Graves derajat 4-6 dengan genotip GG pada gen AKNA ekson 11 rs3748178 memiliki rerata kadar sCD154 paling tinggi secara bermakna ( $p=0,01$ ). Genotip GG membentuk asam amino arginin pada inti motif *AT-hook* faktor transkripsi AKNA. Asam amino arginin memiliki muatan positif yang lebih banyak sehingga memperkuat afinitas ikatan dengan elemen regulator pada promotor gen CD154.<sup>39,40</sup> Hasil penelitian ini sejalan dengan penelitian Siddiq yang membuktikan bahwa faktor transkripsi AKNA dapat berikatan dengan promotor gen CD154 yang kaya akan basa A/T dan meningkatkan ekspresi CD154.<sup>19</sup>

## Kesimpulan

1. Penderita penyakit Graves dengan genotip GG pada gen AKNA ekson 11 rs3748178 memiliki risiko derajat oftalmopati yang lebih berat.
2. Penderita penyakit Graves dengan alotip G pada gen AKNA ekson 11 rs3748178 memiliki risiko derajat oftalmopati yang lebih berat.
3. Penderita penyakit Graves dengan kadar sCD154 yang tinggi memiliki derajat oftalmopati yang lebih berat.
4. Penderita penyakit Graves dengan genotip GG pada gen AKNA ekson 11 rs3748178 memiliki kadar sCD154 yang lebih tinggi

## Saran

1. Penelitian terhadap faktor genetik dan faktor imunologis lainnya yang berperan pada etiologi oftalmopati Graves perlu dilakukan. Hal ini karena oftalmopati Graves adalah penyakit multifaktorial dengan mekanisme patologi yang rumit.
2. Hubungan CD154 terhadap kejadian oftalmopati Graves pada penelitian ini hanya diukur berdasarkan kadar CD154 terlarut dalam serum tersimpan yang dihubungkan dengan manifestasi klinis pada mata penderita. Penelitian yang dilengkapi dengan penggunaan kultur sel fibroblas orbita dan kadar CD40 sebagai reseptor CD154, akan memperkuat hasil penelitian dan memperjelas mekanisme peranan CD154 terhadap derajat keparahan oftalmopati Graves.

## Daftar Pustaka

1. Rapoport B, Chazenbalk GD, Jaume JC, McLachlan SM. The thyrotropin (TSH) receptor: Interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr Rev.* 1998;19(6):673-716.
2. Hassan GS, Rana M, Léveillé C, Nadiri A, Jundi M, Polyak M, et al. Implication of CD154/CD40 interaction in healthy and autoimmune responses. *Immunology.* 2009;(10):285-99.
3. Kato K, Santana-Sahagún E, Rassenti LZ, Weisman MH, Tamura N, Kobayashi S, et al. The soluble CD40 ligand sCD154 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1999;104(7):947-55.
4. Vakkalanka RK, Woo C, Kirou K, Koshy M, Berger D, Crow MK. Elevated levels and functional capacity of soluble CD40 ligand in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum.* 1999;42(5):871-81.
5. MacDonald KP, Nishioka Y, Lipsky PE, Thomas R. Functional CD40 ligand is expressed by T cells in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2404-14.
6. Gerritse K, Laman JD, Noelle RJ, Aruffo A, Ledbetter JA, Boersma WJA, et al. CD40-CD40 ligand interactions in experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93(6):2499-504.
7. Faure GC, Bene MC, Leclere J. Coexpression of CD40 and class II antigen HLA-DR in Graves' disease thyroid epithelial cells. *J Clin Invest.* 1997;84(2):212-5.
8. Yamamoto K, Itoh M, Okamura T, Kimura M, Yokoyama A, Yoshino Y, et al. Relative levels of the inflammatory cytokine TNF $\alpha$  and the soluble CD40 ligand profile in serum correlate with the thyrotoxic activity of Graves' disease. *Thyroid.* 2012;22(5):516-21.
9. Qi Y, Li X, Ma X, Xu L, Zhang X, Jiang X, et al. The role of osteopontin in the induction of the CD40 ligand in Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2014;80(1):128-34.
10. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.
11. Schönbeck U, Libby P. The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci.* 2001;58(1):4-43.
12. Graf D, Muller S, Korthauer U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA. A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol.* 1995;25(6):1749-54.
13. Pietravalle F, Lecoanet-Henchoz S, Blasey H. Human native soluble CD40L is a biologically active trimer, processed inside microsomes. *J Biol Chem.* 1996;271(19):5965-7.
14. Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM. CD154 and its receptors in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol.* 2009;30(4):165-72.
15. Cron RQ. CD154 transcriptional regulation in primary human CD4 T cells. *Immunol Res.* 2003;27(2-3):185-202.
16. Schubert LA, King G, Cron RQ, Lewis DB, Aruffo A, Hollenbaugh D. The human gp39 promoter. *J Biol Chem.* 1995;270(15):29624-7.
17. Friedmann M, Holth LT, Zoghbi HY, Reeves R. Organization, inducible-expression and chromosome localization of the human HMG-I(Y) nonhistone protein gene. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(18):4259-67.
18. Reeves R, Nissen MS. The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. *J Biol Chem.* 1990;265(15):8573-82.
19. Siddiqi A, Sims-Mourtada JC, Guzman-Rojas L, Rangel R, Guret C, Madrid-Marina V, et al. Regulation of CD40 and CD40 ligand by the AT-hook transcription factor AKNA. *Nature.* 2001;410(6826):383-7.

20. Perales G, Burguete-García AI, Dimas J, Bahena-Roman M, Bermudez-Morales V, Moreno H, et al. A polymorphism in the AT-hook motif of the transcriptional regulator AKNA is a risk factor for cervical cancer. *Biomarkers*. 2010;15(5):470-4.
21. Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, et al. Complete sequencing and characterization of 21,243 fulllength human cDNAs. *Nat Genet*. 2004;36(1):40-5.
22. Huth JR, Bewley CA, Nissen MS, Evans JNS, Reeves R, Gronenborn AM, et al. The solution structure of an HMG-I(Y)-DNA complex defines a new architectural minor groove binding motif. *Nat Struct Biol*. 1997;4(8):657-65.
23. Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 1998;26(19):4413-21.
24. Clark D, Pazdernik N. *Molecular Biology*. 2nd Ed. USA: Elsevier; 2013.
25. Dolman PJ. Evaluating graves orbitopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(3):229–48.
26. Orgiazzi J, Ludgate M. Pathogenesis. In: Wiersinga WM, Kahaly GJ, editors. *Graves' orbitopathy—a multidisciplinary approach—questions and answers*. 2nd Ed. Basel: Karger; 2010. p. 40–56
27. Bodh SA, Kamal S, Goel R, Kumar S, Bansal S, Singh M. Thyroid associated ophthalmopathy. *Del J Ophthalmol*. 2012;22(4):249-55.
28. Lazarus JH. Epidemiology of Graves' orbitopathy (GO) and relationship with thyroid disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;26(3):273-9.
29. Wiersinga WM. Autoimmunity in Graves' ophthalmopathy: The result of an unfortunate marriage between TSH receptors and IGF-1 receptors? *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96:2386–94.
30. Starkey KJ, Janezic A, Jones G, Jordan N, Baker G, Ludgate M. Adipose thyrotrophin receptor expression is elevated in Graves' and thyroid eye diseases ex vivo and indicates adipogenesis in progress in vivo. *J Mol Endocrinol*. 2003;30:369-80.
31. Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology: The immune system in health and disease*. 5th Ed. New York: Garland Science; 2001.
32. Pritchard J, Horst N, Cruikshank W, Smith TJ. Igs from patients with Graves' disease induce the expression of T cell chemoattractants in their fibroblasts. *J Immunol*. 2002;168(2):942-50.
33. Pritchard J, Han R, Horst N, Cruikshank WW, Smith TJ. Immunoglobulin activation of T cell chemoattractant expression in fibroblasts from patients with Graves' disease is mediated through the insulin-like growth factor I receptor pathway. *J Immunol*. 2003;170(12):6348-54.
34. Wang Y, Smith TJ. Current concepts in the molecular pathogenesis of thyroid-associated ophthalmopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014;55:1735–48.
35. Myśliwiec J, Waligórski D, Nikołąjuk A, Górka M. Soluble CD40 and its ligand CD154 in patients with Graves' ophthalmopathy during combined therapy with corticosteroids and teloradiotherapy. *Adv Med Sci*. 2007; 52:104-8.
36. Eliana F. Peran gen cytotoxic T lymphocyte associated molecule-4 (CTL-4), gen tiroglobulin, gen thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) dan sel T regulator sebagai faktor risiko kambuh pada pasien penyakit Graves. Disertasi. Universitas Indonesia. 2015.

# Gambaran Garis Lipat Tangan Pada Siswa Retardasi Mental Di SLB Dian Grahita & SLB Cempaka Putih, Jakarta

Etty Widayanti<sup>1</sup>, Titiek Djannatun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bagian Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta

<sup>2</sup>Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas YARSI, Jakarta  
etty.widayanti@yarsi.ac.id

## Abstrak

Penelitian pola garis lipatan telapak tangan pada anak retardasi mental telah dilakukan pada 50 siswa di SLB tipe C Dian Grahita dan SLB tipe C Cempaka Putih. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbandingan pola garis lipatan telapak tangan pada anak sindrom Down dan retardasi mental non sindrom Down pada kedua sekolah tersebut. Data yang diperoleh dihitung persentasenya pada masing-masing pola garis telapak tangan. Penelitian ini menunjukkan bahwa pola garis lipatan tangan normal lebih banyak dijumpai dibandingkan pola garis lipatan tangan yang lain. Perlu kiranya menambah jumlah sampel dan meneliti jenis kelainan retardasi mental pada siswa non sindrom Down.

**Kata kunci:** Pola garis lipatan tangan, sindrom Down, SLB tipe C

# The Palmar Crease Patterns Of Mental Retardation Students At SLB Dian Grahita & SLB Cempaka Putih, Jakarta

Etty Widayanti<sup>1</sup>, Titiek Djannatun<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departement of Anatomi, Medical Faculty of YARSI Univercity, Jakarta

<sup>2</sup>Departement of Microbiology, Medical Faculty of YARSI Univercity, Jakarta  
etty.widayanti@yarsi.ac.id

## Abstract

Research of palmar crease patterns in children with mental retardation have been done on 50 students in SLB type C Dian Grahita and SLB type C CempakaPutih. The purpose of this study to compare the pattern of palmar crease on Down syndrome and mental retardation non Down syndrome students in both schools. Data obtained percentages are calculated on each line pattern palms. This study shows that normal hand crease line pattern is more common than the crease line pattern other hand. It would need to increase the number of samples and examine the types of abnormalities mental retardation in non-Down syndrome students.

**Keywords:** palmar crease, Down syndrome, SLB type C

## Pendahuluan

Ada keterkaitan antara kelainan genetic dan pola garis lipatan tangan. Hubungan antara gangguan tubuh dan pola garis lipatan tangan (palmar crease) ini menyebabkan dermatoglifi dapat dijadikan sebagai alat bantu diagnosis beberapa penyakit yang diturunkan secara hereditas. Penelitian tentang dermatoglifi dan gangguan mental telah terbukti memiliki keterkaitan, seperti pada kasus sindrom Down, skizofrenia, dan epilepsi. Penderita sindrom Down memiliki gambaran dermatoglifi yang khas dan berbeda dari orang normal.<sup>1,2</sup> Dermatoglifi menunjukkan kelainan pola, bentuk, ukuran, dan kompleksitas yang khas pada individu yang memiliki kelainan kromosom, sehingga dermatoglifi dapat dipakai sebagai alat bantu diagnosis.<sup>3</sup> Garis lipatan telapak tangan dapat dikelompokkan menjadi normal, garis Simian, dan garis Sidney. Garis Simian adalah garis lipatan tangan transversal yang terbentuk karena gabungan garis lipatan tangan proksimal dan distal. Lipatan tunggal memanjang di telapak tangan, yang dibentuk oleh gabungan dua lipatan palmar melintang, dinamakan demikian karena lipatan tersebut menyerupai lipatan tangan pada simians non-manusia (primata). Garis Sidney merupakan garis lipatan tangan proksimal yang memanjang mencapai garis ulnar tangan.<sup>4,5</sup>

Garis lipatan tangan (palmar) mudah dianalisa karena pengambilannya tidak menyakitkan dan tidak membutuhkan biaya tinggi.<sup>6</sup> Garis Simian adalah salah satu kelainan lipatan palmar yang mendapat perhatian medis karena sangat terkait dengan kelainan beberapa kromosom manusia.<sup>4</sup> Analisis dermatoglifi pada garis lipatan tangan normal ditemukan 66,7% pasien leukemia akut dan 88,3% pada orang normal. Frekuensi garis Simian ditemukan sebanyak 18,5% pada pasien leukemia akut dan 4,2% orang normal.<sup>5</sup>

Anak retardasi mental memiliki keterbatasan kecerdasan yang mengakibatkan dirinya sukar untuk mengikuti program pendidikan di sekolah biasa secara klasikal.<sup>7</sup> Anak dengan gangguan mental umumnya mengenyam pendidikan di sekolah luar biasa (SLB) tipe C. Dua SLB tipe C yaitu Dian Grahita dan Cempaka Putih memiliki siswa retardasi mental dengan beberapa diagnosis. Fenotip Sindrom Down pada siswa di kedua sekolah ini paling mudah dikenali di antara jenis retardasi mental yang lain.

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui perbandingan pola garis lipatan telapak tangan pada anak sindrom Down dan retardasi mental non sindrom Down pada siswa sekolah luar biasa (SLB) tipe C.

## Metodologi

Penelitian ini merupakan penelitian deskriptif memakai desain potong lintang. Pengambilan data dilakukan terhadap 31 siswa SLB tipe C Dian Grahita dan 19 siswa SLB tipe C Cempaka Putih, Jakarta Pusat yang berusia 6-18 tahun. Tangan subjek penelitian ditempelkan tinta, kemudian diminta mencetak pola garis lipatan telapak tangan di atas kertas. Hasil pola garis lipatan telapak tangan diamati dan dianalisa. Siswa yang memiliki cacat pada satu atau kedua telapak tangannya dieksklusi. Data dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan cara penjabaran data dalam bentuk tabel.

## Hasil dan pembahasan

Distribusi siswa laki-laki dan perempuan ada 31 siswa SLB tipe C Dian Grahita dan 19 siswa SLB tipe C Cempaka Putih (Tabel 1). Jumlah sampel siswa laki-laki sampel lebih mendominasi dibandingkan jumlah siswa perempuan, baik pada SLB Dian Grahita maupun

SLB Cempaka Putih. Sulitnya mendapatkan sampel dari siswa merupakan salah satu kendala dalam penelitian ini, mengingat adanya keterbatasan intelektual pada penderita sehingga ikut mempengaruhi jumlah sampel dan distribusi jenis kelamin yang diperoleh. Gangguan atau kelainan pada anak retardasi mental menyebabkan disfungsi intelektual dan adaptasi tingkah laku.<sup>8</sup>

**Tabel 1. Distribusi Jenis Kelamin**

Kelompok	Jenis kelamin			
	Laki-laki		Perempuan	
	n	%	n	%
SLB Dian Grahita	23	74,19	8	25,81
SLB Cempaka Putih	11	57,90	8	42,10

**Tabel 2. Distribusi Diagnosis Siswa**

Kelompok	Jenis Retardasi Mental			
	Sindrom Down		Non Sindrom Down	
	n	%	n	%
SLB Dian Grahita	20	64,52	11	35,48
SLB Cempaka Putih	3	15,79	16	84,21

Kelainan sindrom Down sangat khas dan nampak jelas dapat dibedakan fenotipnya dibandingkan jenis retardasi mental yang lain sehingga lebih mudah untuk diamati. Anak Sindrom nampak sering membuka mulutnya dan sering bernapas lewat mulut.<sup>9</sup> Fenotip yang khas lainnya adalah hidung nampak lebar, jembatan hidung datar, dan adanya lipatan epikantus pada kelopak mata.<sup>10</sup> Tabel 2 menunjukkan bahwa siswa Sindrom Down pada SLB Dian Grahita memiliki prosentase yang lebih tinggi dibandingkan SLB Cempaka Putih.

**Tabel 3. Distribusi jenis pola lipatan tangan**

	Tangan Kanan				Tangan Kiri					
	L		P		L		P			
	n	%	n	%	n	%	n	%		
SLB Dian Grahita										
- Normal	10	20	5	10	15	11	22	5	10	16
- Simian	8	16	1	2	9	4	8	1	2	6
- Sidney	0	0	0	0	0	2	4	0	0	2
- Tidak teridentifikasi	5	10	2	4	7	5	10	2	7	7
SLB Cempaka Putih										
- Normal	7	14	6	12	13	7	14	7	14	14
- Simian	3	6	2	4	5	2	4	1	2	3
- Sidney	0	0	0	0	0	1	2	0	0	1
- Tidak teridentifikasi	1	2	0	0	1	1	2	0	0	1

Data pada Tabel 3 terlihat adanya dominansi pola garis lipatan normal tangan kanan dan kiri baik pada SLB Dian Grahita maupun SLB Cempaka Putih. Kelainan pola Simian merupakan kelainan yang lebih banyak dijumpai dibandingkan dengan pola Sidney. Pola Simian siswa di kedua sekolah tampak dijumpai lebih banyak pada laki-laki dibandingkan perempuan. Penelitian Malla *et al* (2010) menunjukkan bahwa laki-laki memiliki pola garis

Simian lebih banyak dijumpai pada tangan kanan (76%) dibandingkan tangan kiri (24%).<sup>11</sup> Perempuan menunjukkan pola sebaliknya pada perempuan pola Simian lebih banyak ditemukan di tangan kiri (71%) dibandingkan tangan kanan (29%). Perbedaan hasil penelitian tersebut dapat disebabkan jumlah sampel yang sedikit dan probabilitas jenis kelamin siswa yang tidak seimbang.

**Tabel 4. Distribusi Jenis Pola Lipat Telapak Tangan Pada Siswa Laki-laki dan Perempuan**

	Kelompok I			Kelompok II			Kelompok III			Kelompok IV			Kelompok V			Kelompok VI			Kelompok VII		
	L n (%)	P n (%)	Σ	L n (%)	P n (%)	Σ	L n (%)	P n (%)	Σ	L n (%)	P n (%)	Σ	L n (%)	P n (%)	Σ	L n (%)	P n (%)	Σ	L n (%)	P n (%)	Σ
SLB Dian Grahita	6 (12)	7(14)	13	0 (0)	0 (0)	0	3 (6)	0	3	4 (8)	2 (4)	6	1(2)	1 (2)	2	0 (0)	0 (0)		6 (12)	1 (2)	7
SLB Cempaka Putih	6 (12)	6 (12)	12	0 (0)	0 (0)	0	1 (2)	1 (2)	2	2 (4)	1 (2)	3	1 (2)	0 (0)	1	0 (0)	0 (0)	0	1 (2)	0 (0)	1

**Keterangan**

- I : Kelompok pola garis lipatan tangan normal pada kanan dan normal pada kiri
- II : Kelompok pola garis lipatan tangan normal pada kanan dan Simian pada kiri
- III : Kelompok pola garis lipatan tangan Simian pada kanan dan normal pada kiri
- IV : Kelompok pola garis lipatan tangan Simian pada kanan dan Simian pada kiri
- V : Kelompok pola garis lipatan tangan normal pada kanan dan Sidney pada kiri
- VI : Kelompok pola garis lipatan tangan Sidney pada kanan dan normal pada kiri
- VII : Kelompok pola garis lipatan tangan yang tidak teridentifikasi
- L : Kelompok retardasi mental laki-laki
- P : Kelompok retardasi mental perempuan

Tabel 4 menunjukkan prosentase siswa laki-laki dan perempuan pada kedua SLB memiliki nilai yang kurang lebih sama dan paling mendominasi dalam fenotip garis lipatan tangan normal. Posisi berikutnya diikuti oleh kelompok pola garis lipatan tangan Simian pada kedua tangan yang didominasi oleh siswa laki-laki. Tidaklah mengherankan jika data pada Tabel 4 ditemukan pola garis palmar yang berbeda pada laki-laki dan perempuan. Gahloe *et al* (2015) menyatakan bahwa jenis kelamin dapat mempengaruhi ekspresi pola lipatan tangan (palmar).<sup>6</sup>

**Tabel 5. Distribusi jenis pola lipat telapak tangan pada siswa sindrom Down dan non sindrom Down**

	Kelompok I			Kelompok II			Kelompok III			Kelompok IV			Kelompok V			Kelompok VI			Kelompok VII		
	A n (%)	B n (%)	Σ	A n (%)	B n (%)	Σ	A n (%)	B n (%)	Σ	A n (%)	B n (%)	Σ	A n (%)	B n (%)	Σ	A n (%)	B n (%)	Σ	A n (%)	B n (%)	Σ
<b>SLB Dian Grahita</b>	8 (16)	5 (10)	13	0 (0)	0 (0)	0	3 (6)	0 (0)	3	5 (10)	1 (2)	6	2 (4)	0 (0)	2	0 (0)	0 (0)	0	6 (12)	1 (2)	7
<b>SLB Cempaka Putih</b>	0 (0)	12 (24)	12	0 (0)	0 (0)	0	1 (2)	1 (2)	2	1 (2)	2 (4)	3	0 (0)	1 (2)	1	0 (0)	0 (0)	0	0 (0)	1 (2)	1

**Keterangan**

- I : Kelompok pola garis lipat tangan normal pada kanan dan normal pada kiri
- II : Kelompok pola garis lipat tangan normal pada kanan dan Simian pada kiri
- III : Kelompok pola garis lipat tangan Simian pada kanan dan normal pada kiri
- IV : Kelompok pola garis lipat tangan Simian pada kanan dan Simian pada kiri
- V : Kelompok pola garis lipat tangan normal pada kanan dan Sidney pada kiri
- VI : Kelompok pola garis lipat tangan Sidney pada kanan dan normal pada kiri
- VII : Kelompok pola garis lipat tangan yang tidak teridentifikasi
- A : Kelompok retardasi mental Sindrom Down
- B : Kelompok retardasi mental non Sindrom Down

Pola garis lipat tangan normal cukup mendominasi baik pada SLB Dian Grahita maupun SLB Cempaka Putih, namun memiliki pola yang terbalik pada distribusi jenis diagnosis (Tabel 5). Pola garis normal pada SLB Dian Grahita banyak ditemui pada kelompok sindrom Down (16%), sedangkan SLB Cempaka Putih justru pada jenis retardasi non Sindrom Down (24%). Pola distribusi pola garis lipat tangan Simian pada kedua tangan terbalik pada kedua SLB ini. Siswa sindrom Down banyak dijumpai pada SLB Dian Grahita (10%), sedangkan kelompok retardasi mental non sindrom lebih banyak pada populasi SLB Cempaka Putih (4%). Siswa pada kedua sekolah sama-sama tidak dijumpai pola garis lipat tangan normal (kanan) dan Simian (kiri). Hal yang sama juga dijumpai pada kelompok pola garis lipat tangan Sidney pada kanan dan normal pada kiri.

Penderita sindrom Down (trisomi 21) biasanya memiliki fenotip yang khas pada pola telapak tangannya, menunjukkan pola Simian sebanyak 63% (Sunilkumar, 2015). Populasi kelompok garis Simian pada penelitian ini tidak terlalu tinggi kemungkinan disebabkan karena jumlah siswa retardasi mental yang dapat diambil datanya tidak banyak. Hal tersebut terkait dengan kesulitan saat pengambilan data, karena ketidakstabilan emosi siswa. Kemunculan pola Simian yang cukup tinggi tidak hanya ditemukan pada populasi sindrom Down, juga pada pasien leukimia akut. Rathee *et al* (2014) menunjukkan bahwa frekuensi garis Simian ditemukan sebanyak 18,5% pada pasien Leukimia akut, sedangkan 4,2% pola ini ditemukan pada orang normal. Pola ini memang lebih banyak ditemukan pada populasi penduduk etnis Asia dan Amerika dibandingkan etnis lainnya.<sup>12</sup>

## Kesimpulan dan Saran

Penelitian ini menunjukkan bahwa pola garis lipatan tangan normal lebih banyak dijumpai dibandingkan pola garis lipatan tangan yang lain. Perlu kiranya menambah jumlah sampel dan meneliti jenis kelainan retardasi mental pada siswa non sindrom Down.

## Ucapan Terima Kasih

Penelitian ini didanai oleh Hibah Desentralisasi Hibah Bersaing Tahun 2015.

## Daftar Pustaka

1. Rosida L and Panghiyangan R 2006. Gambar dermatoglyphic pada penderita sindrom Down di Banjarmasin dan Martapura Kalimantan Selatan. *Jurnal Anatomi Indonesia* 1(2): 71-78.
2. Tafazoli M, Dezfooli SR, Kazemi T, Shahri HM and Shahri NM 2013. Comparison of dermatoglyphic patterns between healthy and hypertensive people. *Asian J. Med. Sci.* 5(2): 19-2
3. Sufitni 2007. Pola sidik jari pada kelompok retardasi mental dan kelompok normal. *Majalah Kedokteran Nusantara* 40(3): 180-191.
4. Sharma, D.K. & Sharma, V. 2011. Prevalences of Simian, Sydney and Suwon Creases and their association with each other, body sides, handedness, sex and anomalies/diseases/syndromes in a population of Central India. *Int. J. Morphol* 29(3): 1069-1075
5. Rathee R., Kamal N., Kumar A., Vashist M., and Yadav R. 2014. Dermatoglyphic Patterns of Acute Leukemia Patients. *Int. Res. J. Biological Sci.* 3(6): 90-93.
6. Gahlot, NK., Gahlot R & Pahuja K. 2015. Pridominance of Simian and Sydney Lines in Mental Retarded. *International Journal of Analytical, Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 4(8): 7-12.
7. Sholikah. 2015. Pengaruh Terapi Musik Klasik terhadap Perkembangan Kognitif Anak yang Mengalami Retardasi Mental di SDLB Negeri Banjar Mendalan, Lamongan. *SURYA* 7(1): 1-8.
8. Krishnasubha, S., Lakshmikalpana, V., Ramesh, M., and Sudhakar, G. 2010. A Case: Control Study on Risk Factors of Mental Retardation from an Urban Area of North Coastal Andhra Pradesh. *J Life Sci*, 2(2): 93-98.
9. Al Sarheed, M. 2015. A comparative study of oral health amongst trisomy 21 children living in Riyadh, Saudi Arabia: Part 1 caries, malocclusion, trauma. *The Saudi Dental Journal* 27: 220–223.

10. Starbuck, J., Reeves, R.H., and Richtsmeier, J. 2011. Morphological Integration of Soft-Tissue Facial Morphology in Down Syndrome and Siblings. *American Journal of Physical Anthropology*: 1-9.
11. Malla T., Malla K.K., Gauchan E., Brijesh S., and Sharma R. 2010. Incidence of Simian Crease in Normal Nepalese Children. *Kathmandu Univ Med J* 9(32):410-414.
12. Sunilkumar, M. N. 2015. Unilateral simian crease in a 3 years old child; A case report. *International Archives of Integrated Medicine* 2(4): 195-198.

# Rekayasa Biokimiawi dan Rekayasa Genetika dalam Produksi Antibiotik-Makrolida Baru

Umar Anggara Jenie

Departemen Kimia Farmasi, Fakultas Farmasi UGM

## Abstrak

Antibiotik makrolida merupakan jenis antibiotik yang banyak digunakan dalam praktek klinik. Eritromisin, klaritromisin dan azitromisin adalah dua contoh antibiotik makrolida yang sering digunakan. Pengembangan jenis makrolida ini dapat dilakukan dengan teknik rekayasa biokimiawi maupun rekayasa genetika. Omura *et al.*, telah mengembangkan suatu metode rekayasa biokimiawi yang dikenal dengan teknik biosintesis hibrida. Dalam penelitian yang dilakukan oleh kelompok Penelitian Eritromisin UGM, telah dilakukan modifikasi struktur eritromisin dengan menggunakan teknik biosintesis hibrida. Dalam modifikasi ini gula-gula antibiotik eritromisin: kladinosa dan desosamina diganti dengan gula-gula antibiotika dari spiramisin: forosamina, mikarosil-mikaminosa, sehingga terjadi antibiotika hibrida: MFE, MME dan MMFE. Rekayasa genetika merupakan teknik yang banyak dikembangkan oleh *Big-pharma* dunia untuk memodifikasi struktur molekul eritromisin. Dengan semakin tersingkapnya mekanisme proses biosintesis eritromisin dalam mikroba penghasil, pada level genetika, maka telah banyak dilakukan *deleting* (penghapusan) atau *precursor uploading* baru pada gena penyandi biosintesis eritromisin sehingga diproduksi turunan-turunan eritromisin baru.

**Kata-kunci:** antibiotik-makrolida, teknik biosintesis hibrida, rekayasa genetika

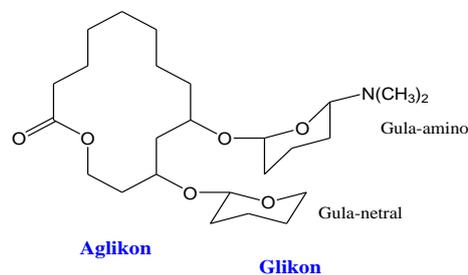
## Pendahuluan

Antibiotik jenis makrolida, pertama kali ditemukan oleh Brockmann dan Henkel pada tahun 1950<sup>1</sup>, diisolasi dari mikroba spesies *Streptomyces felleus*. Antibiotik makrolida ini dinamakan pikromisin (*pikromycin*), karena rasanya yang pahit. Struktur kimia pikromisin, dan antibiotik sejenis lainnya yang kemudian muncul, memperlihatkan fitur yang menarik, yaitu terdiri dari cincin lakton-makrosiklik. Woodward menamakan struktur lakton-makrosiklik tersebut sebagai makrolida, untuk menggambarkan jenis antibiotika ini.<sup>2</sup>

Cincin lakton-makrosiklik dari pikromisin dan antibiotik makrolida sejenisnya, mengikat dua jenis gula, yaitu gula-deoksi netral dan gula-deoksi amino. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa antibiotika makrolida adalah jenis antibiotika, yang struktur-kimianya terdiri dari cincin lakton makrosiklik yang besar, dengan mengikat satu atau lebih gula deoksi (gula netral atau gula-amino). Cincin makrolakton biasanya merupakan cincin bersegi-12, 14, 15, atau 16.

Beberapa makrolida mempunyai aktivitas sebagai antibiotika atau antifungi, dan banyak digunakan sebagai sediaan farmasi

### STRUKTUR ANTIBIOTIK MAKROLIDA



**Gambar 1. Struktur umum antibiotika-makrolida, terdiri dari bagian: Aglikon, yang umumnya merupakan cincin makro-lakton (segi-12, -14, -16), dan Glikon, yang terdiri dari gula-netral dan gula-amina.**

Hampir semua antibiotik makrolida alamiah (*natural macrolide antibiotics*) dihasilkan oleh mikroba, *ordo* (bangsa) Actinomycetales, dari *genus* (marga) *Actinomyces*, *Norcadia* dan *Streptomyces*. Namun beberapa spesies mikroba dari marga *Micromonospora* dikenal pula menghasilkan antibiotik makrolida seperti megalomisin, sinamisin. Eritromisin, dihasilkan oleh mikroba *species* (jenis) *Saccharopolyspora erythraea* (dulu dikenal sebagai *Streptomyces erythraeus*, sebelum dilakukan retaksonomi 1989). Eritromisin juga dihasilkan oleh beberapa mikroba lain, seperti *S. griseoplanus*, *Arthrobacter* sp.

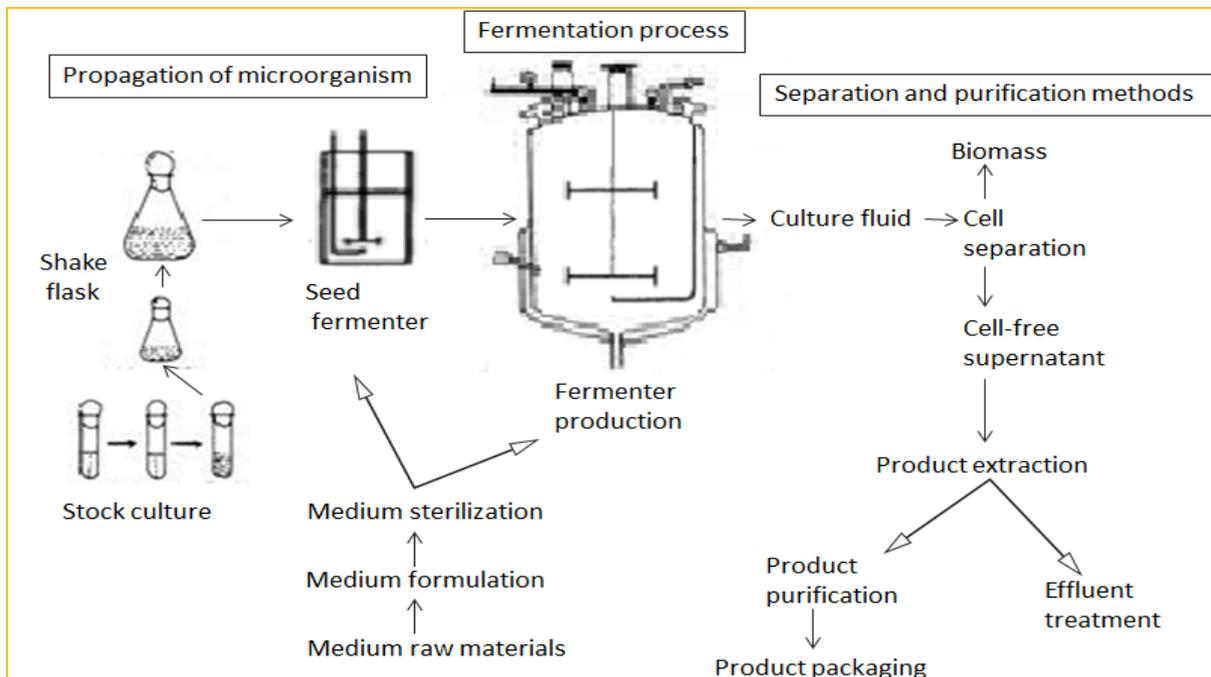
Produksi Antibiotik Makrolida umumnya dilakukan dengan Teknik Fermentasi. Beberapa teknik fermentasi telah dikembangkan oleh berbagai Industri Farmasi baik secara sendiri maupun bekerjasama dengan universitas. Sedangkan pengembangan selanjutnya dilakukan dengan berbagai metode kimiawi dan biokimiawi/biomolekuler.

Berbagai cara atau teknik pengembangan antibiotik-makrolida antara lain dengan:

1. Teknik Sintesis, umumnya adalah Teknik Semi-Sintesis Stereospesifik.
2. Teknik Rekayasa Biokimiawi ( a.l. Biosintesis Hibrida)
3. Rekayasa Genetika

## Produksi Antibiotik Makrolida

Hampir semua antibiotik diproduksi dengan menggunakan teknik fermentasi terhadap mikroba penghasil. Tahapan pada teknik fermentasi produksi antibiotik adalah: (1) Pembuatan Inokulum, propagasi mikroba penghasil; (2) Persiapan fermentasi, (prefermenter); (3) Fermentasi dalam fermentor; (4) Separasi biomassa dan supernatan; (5) Ekstraksi antibiotik dari supernatan; dan (6) Purifikasi antibiotik; (7) Elusidasi struktur Antibiotik; dan (8) Uji Farmakologi antibiotik.



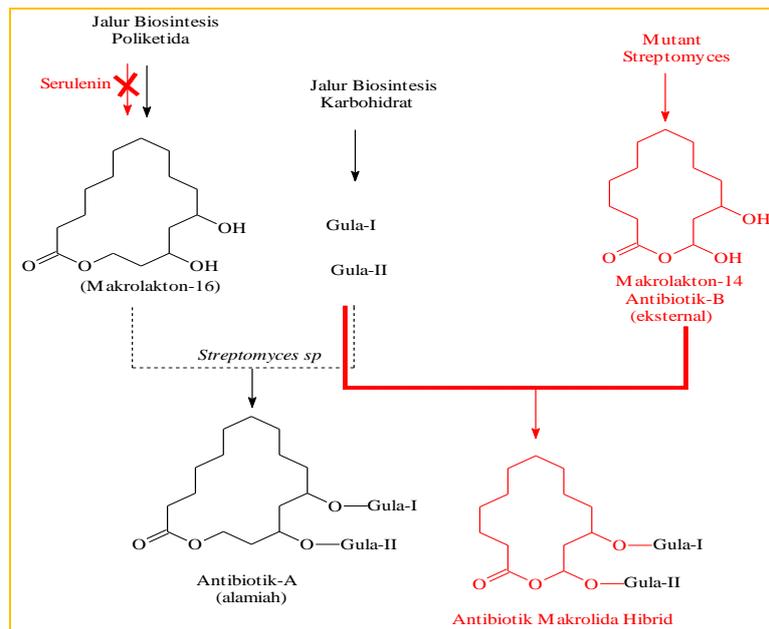
Gambar 2. Skema Produksi Antibiotik dengan teknologi Fermentasi

## Pengembangan Antibiotik Makrolida

### Teknik Rekayasa Biokimiawi

Salah satu jenis teknik rekayasa biokimiawi adalah Teknik Biosintesis Hibrida. Teknik ini dikembangkan oleh Satoshi Omura *et. Al*, untuk mengkonstruksi molekul baru antibiotik hibrida.<sup>3</sup> Antibiotik hibrida, merupakan antibiotik makrolida, yang struktur kimianya merupakan penggabungan (hibrid) dari dua antibiotik alamiah.

Gambar 9 menunjukkan contoh umum terjadinya antibiotik hibrida. Struktur kimia antibiotik hibrida terdiri dari bagian glikon yang berasal dari antibiotik-A sedang bagian aglikonnya berasal dari antibiotik-B. Untuk melakukan teknik biosintesis hibrida, maka struktur kimia dari kedua antibiotika tersebut harus sudah diketahui secara pasti. Begitu pula lintasan biosintesis (*biosynthetic pathway*) dari kedua antibiotik itu sudah diketahui pula secara pasti.



**Gambar 3. Teknik Biosintesis Hibrida**

Gambar 3 memperlihatkan skema teknik biosintesis hibrida. Fermentasi mikroba-alamiah *Streptomyces sp* akan menghasilkan antibiotik-makrolida-A. Biosintesis antibiotika-A dalam mikroba terdiri dari dua jalur. Jalur pertama adalah biosintesis untuk membuat cincin makrolida, jalur ini dikenal dengan nama jalur poliketida. Sedang jalur kedua adalah jalur biosintesis untuk membuat gula-gula antibiotika, jalur ini dikenal dengan jalur karbohidrat.

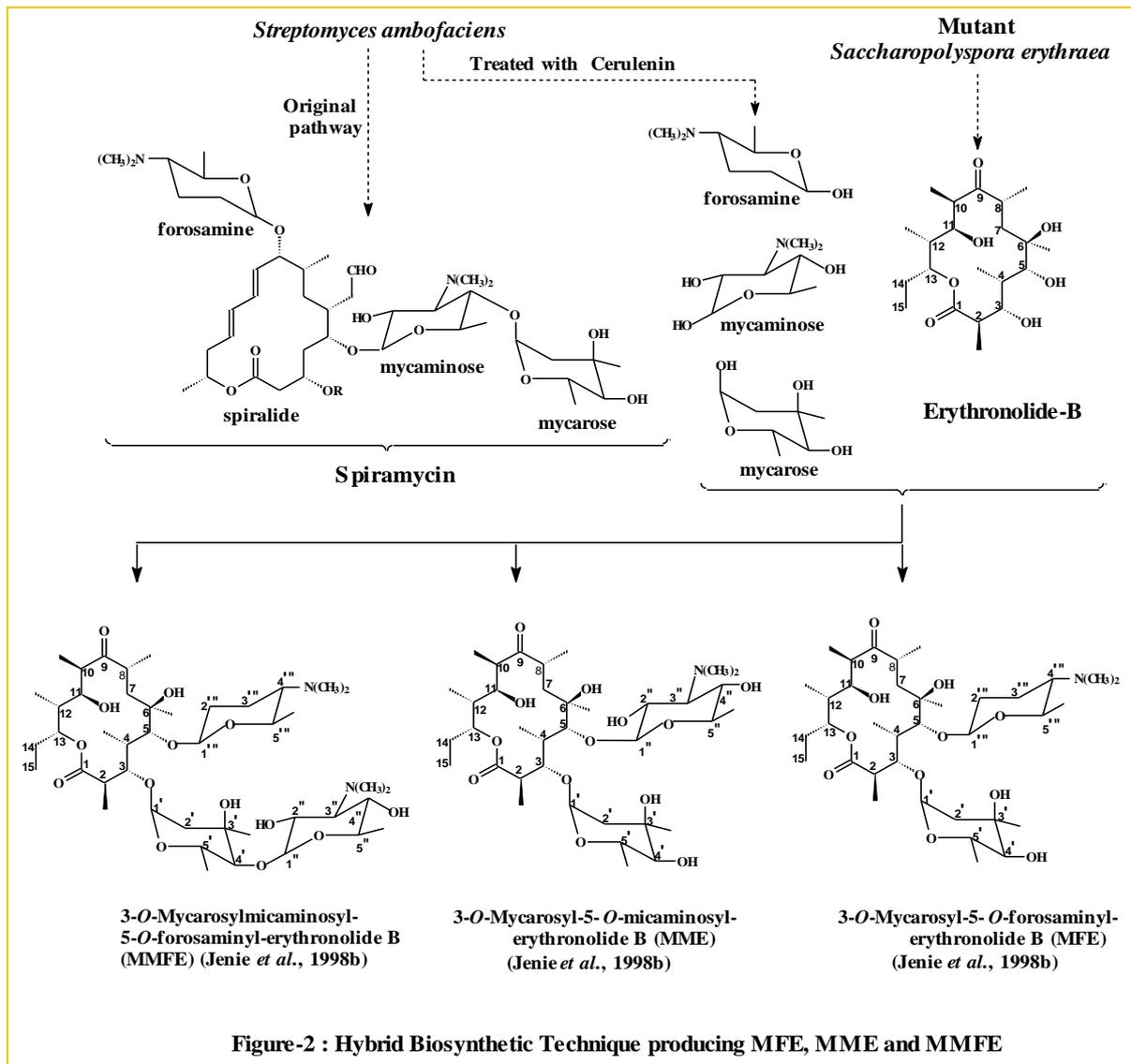
Apabila dalam proses fermentasi *Streptomyces sp* ditambahkan antimetabolit: serulenin, maka serulenin ini akan “mematikan” jalur biosintesis poliketida, sehingga cincin makrolakton tidak terbentuk. Namun jalur biosintesis karbohidrat tidak terganggu oleh adanya serulenin, sehingga gula-gula antibiotika tetap terbentuk. Apabila dalam proses ini, kemudian ditambahkan senyawa makrolida lain dari luar, maka senyawa makrolida eksternal ini akan mengikat gula-gula antibiotika, sehingga terbentuklah antibiotik-makrolida hibrida (lihat Gambar-III).<sup>3</sup>

Kelompok Penelitian Eritromisin (KPE), PAU-Bioteknologi-UGM telah melakukan riset pembuatan antibiotika hibrida, dengan menggunakan metode dari Omura.<sup>4,5</sup> Antibiotika hibrida yang dibuat adalah dengan mengubah gula-amino maupun gula-netral dari eritromisin dengan gula-amino dan gula-netral dari spiramisin. Tujuannya utamanya adalah agar terbentuk antibiotika makrolida baru, dengan cincin makrolakton eritronolida, namun dengan gula-gula antibiotika yang lebih *crowded*, yang berasal dari gula-gula antibiotik spiramisin. Dengan adanya gula yang lebih meruah ini (terdiri dari disakarida) maka diharapkan antibiotik baru ini akan lebih tahan terhadap asam, dengan kata lain, substitusi internal nukleofilik antara gugus hidroksi (OH) pada C6 terhadap gugus karbonil C9 akan lebih sulit terjadi.

Teknik biosintesis hibrida dilakukan dengan pertama-tama melakukan fermentasi *Streptomyces ambofaciens* (penghasil spiramisin). Kedalam proses fermentasi ini ditambahkan suatu antimetabolit, yi serulenin. Serulenin ini akan mencegah terjadinya biosintesis makrolakton (spiralida), yaitu dengan cara mengikat *condensing enzyme* (seperti sintase  $\beta$ -keto-ACP) sehingga kondensasi tipe Claisen, yang merupakan awal dari biosintesis makrolakton tidak terjadi. Namun gula-gula antibiotik dari spiramisin yaitu: forosamina, mikarosa dan mikaminosil tetap terjadi. Kedalam proses fermentasi ini kemudian

dimaksudkan mutan *Saccharopolyspora erythraea* yang hanya menghasilkan cincin makrolakton eritronolida-B saja.

Eritronolid-B ini akan mengikat gula-gula antibiotika: forosamina, mikarosa dan mikaminosa, sehingga akan terbentuk antibiotik makrolid-hibrida. Penelitian menghasilkan tiga macam antibiotika hibrida yaitu: (1) Mikarosil-forosaminil eritronolida-B (MFE), (2) Mikarosil-mikaminosil eritronolid-B (MME) dan (3) Mikarosil-mikaminosil-forosaminil eritronolida B (MMFE)(lihat Gambar 4).



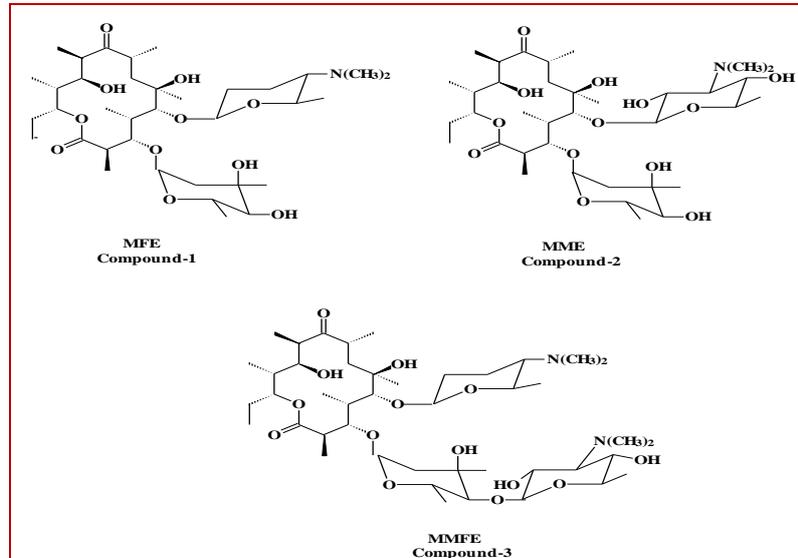
Gambar 4. Biosintesis Hibrida, membentuk MMFE, MFE dan MME<sup>5</sup>

### Molecular Docking.

Produk yang dihasilkan sangat kecil, sehingga hanya cukup untuk dilakukan elusidasi struktur. Penentuan aktivitas biologiknya dilakukan dengan menggunakan metoda **Molecular Docking**. *Molecular docking* dilakukan terhadap rRNA 23S *Deinococcus radiodurans*.<sup>6,7</sup>

Hasilnya menunjukkan bahwa: (1) MFE dan MMFE terikat pada celah yang sama dengan eritromisin-A pada rRNA 23S *D. radiodurans*; dan diprediksi memiliki mekanisme

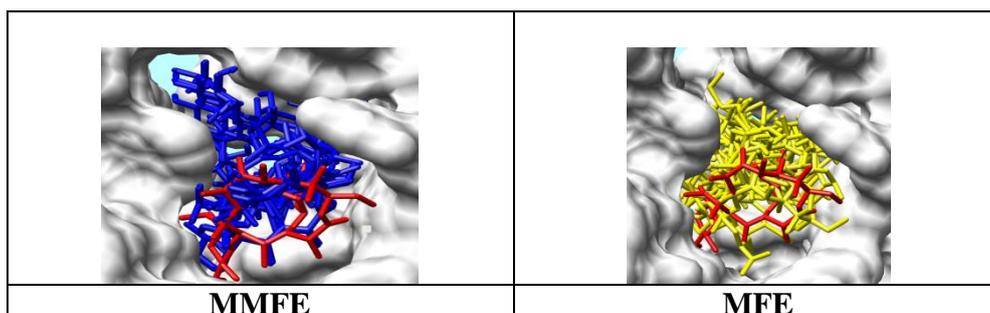
aksi antibiotik yang sama. (2) Keberadaan dimer mikarosil-mikaminosa menyebabkan interaksi molekul MMFE pada *peptide exit tunnel* rRNA 23S lebih stabil dibanding eritromisin-A. (3) Antibiotik baru MMFE diprediksi memiliki potensi antibiotik terhadap *D. radiodurans* lebih baik dari eritromisin-A. (4) Antibiotik baru MFE diprediksi memiliki aktivitas yang sama dengan eritromisin-A.<sup>6,7</sup>



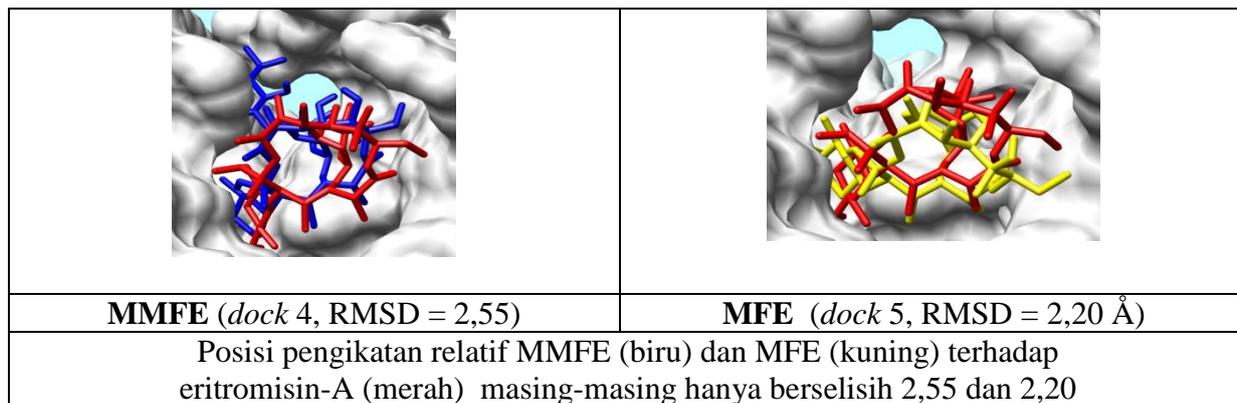
Gambar 5. Antibiotik Hibrid Makrolida: MFE, MME dan MMFE<sup>4,5</sup>

Tabel 1. Data <sup>1</sup>H-NMR (500MHz) dari MFE, MME dan MMFE (*condesed*)

Senyawa	Geser kimiawi (□) ppm	Integrasi	Proton	Gugus
<b>1</b> MFE	2.08	1H	H-12	<i>Eritronolida B</i>
	2.09	6H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Forosamina</i>
	3.30	1H	H-5'	<i>Mikarosa</i>
<b>2</b> MME	2.07	1H	H-12	<i>Eritronolida B</i>
	2.26	6H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Mikaminosa</i>
	3.30	1H	H-5'	<i>Mikarosa</i>
<b>3</b> MMFE	2.18	1H	H-12	<i>Eritronolida B</i>
	1.89	6H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Forosamina</i>
	2.15	6H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>Mikaminosa</i>
	2.80	1H	H-5'	<i>Mikarosa</i>



Gambar 6. Docking MMFE (biru) dan MFE (kuning) berada pada celah yang sama dengan Eritromisin-A (merah, standard, X-ray)



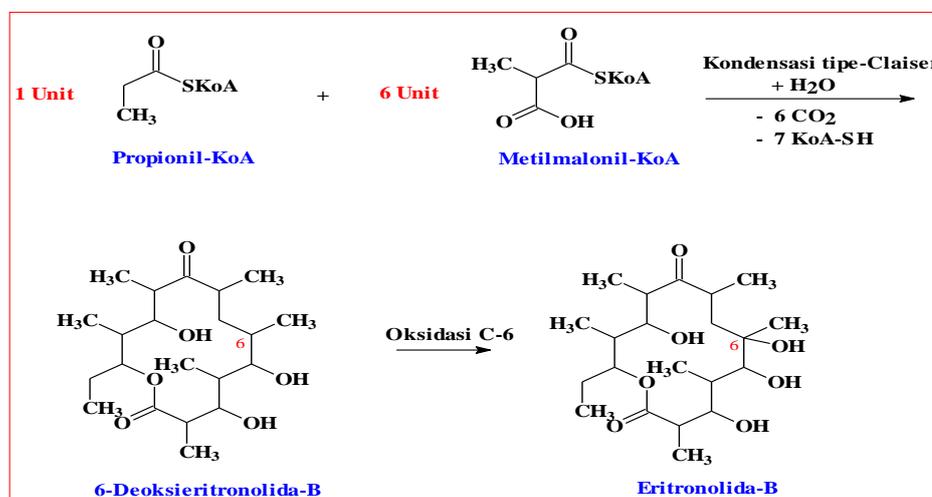
**Gambar 7. Posisi relatif MFE (*dock 8*) dan MMFE (*dock 4*)<sup>6,7</sup>**

### Teknologi Rekayasa Genetika

Pengembangan antibiotik-makrolida dengan teknik rekayasa genetika ini, telah banyak dilakukan oleh beberapa *big pharma* di negara-negara maju, seperti Abbot Laboratory, yang bekerja sama dengan universitas. Untuk melakukan pengembangan dengan teknik rekayasa genetika ini, diperlukan pemahaman yang mendalam tentang proses biosintesis dari makrolida yang akan dikembangkan, sampai proses pada tingkat gena.

Sebagai contoh, pengembangan antibiotik eritromisin dengan rekayasa genetika difokuskan pada perubahan pada cincin lakton makrosikliknya, yaitu pada aglikon eritronolida.<sup>9</sup> Biosintesis eritromisin berlangsung di dalam mikroba penghasilnya, a.l.: *Saccharopolyspora erythraea*. Proses biosintesis eritromisin-A berlangsung melalui mekanisme *acylpoly malonate pathway* (jalur asilpolimalonat), dan terjadi di dalam sistem kompleks multienzim yang disebut FAS (*Fatty Acid-like Synthase*). Jalur biosintesis eritromisin diawali dengan reaksi kondensasi tipe Claisen antara 1 unit propionil koenzim-A (sebagai *starter unit*) dengan 6 unit metilmalonil koenzim-A (sebagai *extender units* atau unit pengembang).

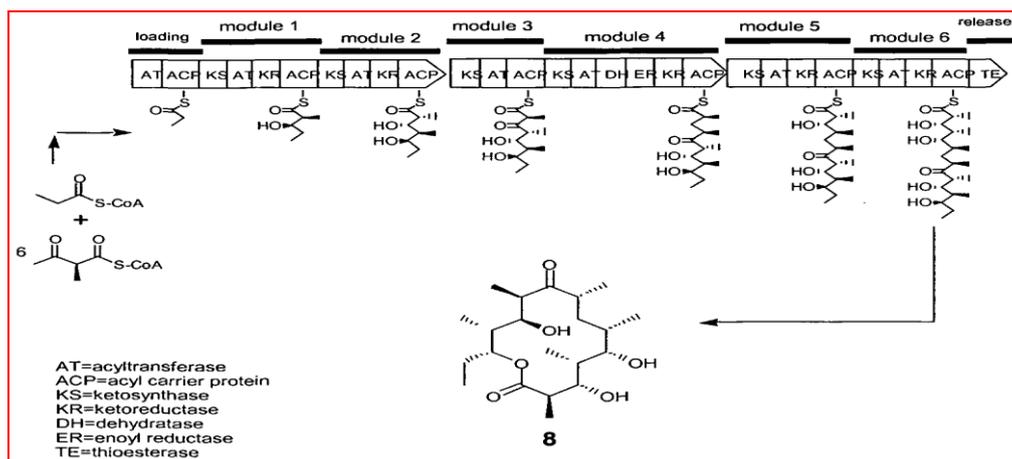
Biosintesis eritromisin-A berlangsung dalam dua Tahap. Tahap-I adalah pembentukan *intermediat* eritronolida-B di dalam sistem kompleks multi enzim, FAS; dan Tahap-II adalah konstruksi molekul eritromisin-A dari eritronolida-B, yang berlangsung di luar sistem multi enzim FAS



**Gambar 8. Reaksi Biosintesis Eritromisin Tahap-I: Pembentukan Eritronolida-B**

Pada Gambar-VIII menunjukkan reaksi pembentukan eritronolida-B dari *starting materials*, 1 unit propionil koenzim-A dengan 6 unit metilmalonil koenzim-A, berlangsung pada permukaan *Fatty acid-like Synthase* (FAS). Reaksi biosintesis ini terjadi di dalam sel mikroba (*intracellular*) dan berlangsung dalam 6 tahap, dan tiap tahapnya dikatalisis oleh beberapa enzim-enzim yang berbeda. Enzim-enzim utama tersebut adalah: *acyltransferase* (AT), *acyl carrier protein* (ACP), *ketosynthase* (KS), *ketoreductase* (KR), *dehydratase* (DH), *enoyl reductase* (ER), *thioesterase* (TE).<sup>9,10</sup>

Seperti telah dijelaskan diatas, reaksi pembentukan eritronolida-B berlangsung dalam 6 tahap, dan dikatalisis oleh enzim-enzim utama tersebut. Enzim-enzim utama itu terkumpul dalam 6 modul, yang setiap modulnya mengkatalisis tiap tahap reaksi. Jadi ada 6 modul yang tiap modulnya mengkatalisis satu tahap reaksi. Modul-1 berisi enzim: KS, AT, KR, ACP, modul-2: KS, AT, KR, ACP, modul-3: KS, AT, ACP, modul-4: KS, AT, DH, ER, KR, ACP, modul-5: KS, AT, KR, ACP, dan modul-6: KS, AT, KR, ACP.



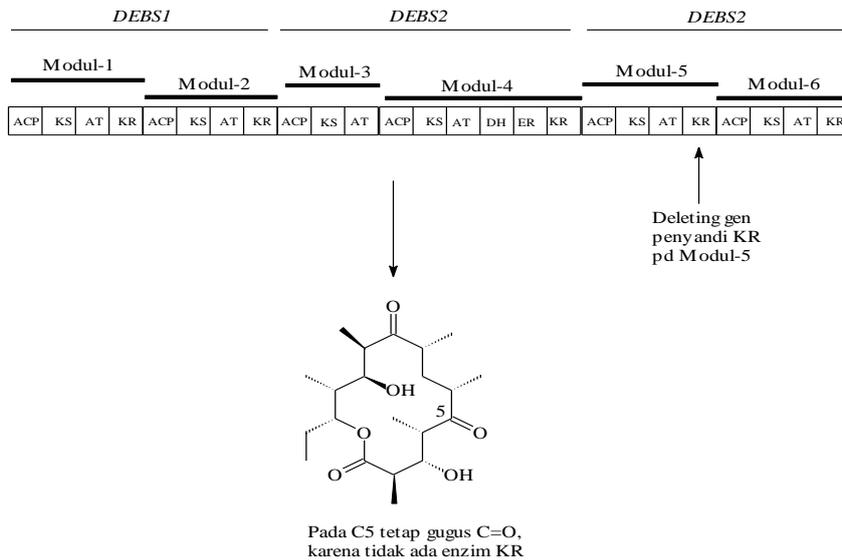
**Gambar 9. Biosintesis Eritronolida-B pada tingkat genetik<sup>9,10</sup>**

Modul-modul enzim ini disandi oleh gen yang dikenal sebagai gen DEBS yang BM-nya hampir sama. Modul-1 dan modul-2 disandi oleh DEBS1 (371.9 kDa, modul-3 dan modul-4 oleh DEBS2 (375.4 kD), sedang modul-5 dan modul-6 oleh DEBS2 (332.2 kDa).

### Modifikasi Struktur Makrolida

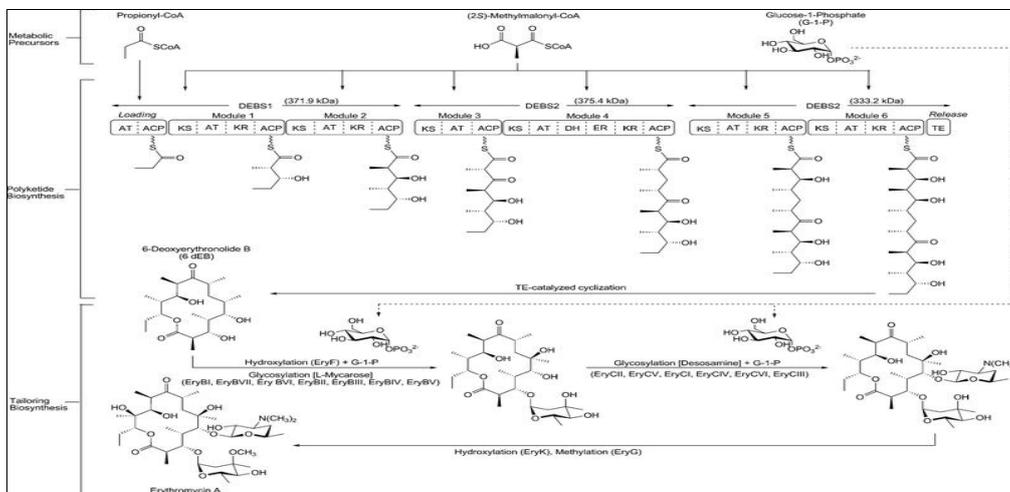
Modifikasi struktur makrolida dapat dilakukan dengan menggunakan pendekatan rekayasa genetika. Apabila salah satu gen yang menjadi enzim tertentu, misal gen yang bertanggung jawab pada pembentukan KR (*ketoreductase*) dalam modul-5 dihapus (*deleting*), maka proses reduksi gugus  $\alpha$ -keto tidak terjadi sehingga akan menghasilkan struktur makrolida yang berbeda.

Begitupula apabila insersi (*insertion*) gen asing dilakukan pada sistem gena DEBS1 misalnya, maka makrolida yang terjadi juga akan mempunyai stuktur kimia yang berbeda, tergantung dari jenis gen yang diinsersikan. Gambar 11 menunjukkan contoh modifikasi struktur makrolida secara genetika. Modifikasi struktur eritromisin dapat dilakukan dengan teknik rekayasa genetika, berbasis pada gambaran lengkap biosintesis eritromisin pada tingkat gena diatas.



Deleting gen penyandi KR pd Modul-5

**Gambar 10. Deleting gen penyandi KR pada modul 5, menghasilkan struktur Makrolida yang berbeda**



**Gambar 11. Biosintesis Eritromisin pada Level Gena**

### Catatan Penutup

1. Pengembangan antibiotik-makrolida, juga bahan baku obat lainnya, dapat dilakukan dengan berbagai teknik atau cara, baik kimiawi, biokimiawi maupun pendekatan genetikawi.
2. Sumberdaya manusia Indonesia, utamanya para sarjana farmasi, umumnya telah menguasai teknik-teknik untuk modifikasi struktur molekul dari suatu obat, berbasiskan pada pertimbangan-ilmiah yang terdapat pada khazanah ilmu kimia medisinal/farmakokimia.
3. Sudah saatnya dimulai untuk secara lebih serius mengembangkan bahan baku aktif obat; dan untuk itu diperlukan dukungan politik yang kuat dari Pemerintah, sehingga ketergantungan pada bahan baku impor dapat dikurangi secara signifikan.

## Ucapan Terimakasih

Perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu kami dalam penelitian eritromisin yang saya lakukan, utamanya kepada sejawat dalam Kelompok Penelitian Eritromisin, PAU-Bioteknologi-UGM: (1) Retno Sunarminingsih Sudibyo, (2) Arry Yanuar, (3) Winarto Haryadi (4) Retno Wulandari, dan (5) Retno Arianingrum

## Daftar Pustaka

1. Omura, S. and Tanaka, H. Production and Antimicrobial Activity of Macrolides, in Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice, Omura (Ed) , Academic Press, Inc, Orlando-Tokyo. 1984; p. 3-29.
2. Woodward, RB. *Angew. Chem.* 1957; 69, p.50
3. Omura, S. and Tanaka, H. Biochemistry, Regulation, and Genetics of Macrolide Production, in Macrolide Antibiotics. Chemistry, Biology and Practice, Omura (Ed) , Academic Press, Inc, Orlando-Tokyo. 1984; p. 222-225. (see also N. Sadanake, Y. Tanaka, and S. Omura, 1982, *J. Antibiot.*, 35, 68).
4. Jenie, UA, RS Sudibyo, and A. Yanuar. Development of New Erythromycin Derivatives Using Hybrid Biosynthetic Technique, *Indonesian Journal of Pharmacy.* 1998a; 9(2), p. 50-62.
5. Jenie, UA, RS Sudibyo, and R. Wulandari. Elusidasi Struktur Tiga Antibiotik Hibrid Turunan baru Eritromisin: MFE, MME dan MMFE, *Majalah Farmasi Indonesia.* 1998b; 9(3), h. 103-109.
6. Haryadi W., UA Jenie, RS Sudibyo, HD Pranowo and FR Wibowo. Molecular Docking of 3-*O*-Micarocylmicaminocyl-5-*O*-forosaminylerythronolide-B (MMFE) to rRNA 23S *Deinococcus radiodurans* and the Prediction of its Antibiotic Potency, Proceeding of the 2009 International Conference on Chemical, Biological and Environmental Engineering, Singapore, 9-11 October 2009, World Scientific Publishing Co, Pte. Ltd, Singapore, p. 153-155.
7. Haryadi, W. Pemodelan Interaksi Antibiotik Baru Turunan Eritromisin (D<sup>6</sup>-Anhydroeritromisin-A, MFE dan MMFE) Terhadap rRNA 23S *Deinococcus radiodurans*, Serta Prediksi Potensi Antibiotiknya, Disertasi Doktor, Sekolah Pascasarjana UGM. 2010.
8. Jenie, UA, RS Sudibyo, A. Yanuar, R. Wulandari and W. Haryadi. Development of New Erythromycin Derivatives Using Hybrid Biosynthetic and Semisynthetic Techniques. Proceeding of the 2<sup>nd</sup> Indonesian Biotechnology Conference (IBC) : Advancing Biotechnology in the 21st Century, Yogyakarta 23-26 October 2001. Published by the IBC, p. 14-25.
9. Donadio, S., MJ Staver, JB Mcalpine, SJ Swanson, and L. Katz. Modular Organization of Genes Required for Complex Polyketide Biosynthesis, *Science*, Vol 252, Research Articles. 3 May 1991; 675-679.
10. Hutchinson, R, JM Weber, and CK Wierman. Genetic Analysis of Erythromycin Producing *Streptomyces erythreus*, *Journal of Bacteriology.* Oktober 1985; p. 425-433

# PETUNJUK UMUM

...

## Penulis Artikel

Artikel diketik **1 spasi pada kertas A4**, dengan **jarak dari tepi kiri 3 cm serta atas, kanan, dan bawah 2 cm**. Jumlah halaman **maksimal 10 lembar**, jenis huruf **Calibri ukuran 11**. Setiap halaman **di beri nomor secara berurutan** dimulai dari halaman judul sampai halaman terakhir.

## Halaman judul

Halaman judul berisi judul artikel dalam **bahasa Indonesia dan Inggris font 14 Calibri dengan Kapital setiap awal kata**, nama penulis ditulis lengkap dan berurutan, lembaga afiliasi penulis. Judul artikel singkat dan jelas.

## Abstrak dan Kata Kunci

Abstrak untuk setiap artikel ditulis dalam bahasa Indonesia dan Inggris. Bentuk abstrak tidak terstruktur dengan jumlah **maksimal 250 kata**. Abstrak ditulis ringkas dan jelas sesuai dengan format *introduction, methods, results and discussion (IMRAD)* dalam bentuk **narasi**. Pilih **3–5 buah kata kunci** yang dapat membantu penyusunan indeks dan urutannya berdasarkan abjad.

## Tabel

Tabel disusun sistematis pada naskah. Setiap tabel harus diberi **judul singkat di bagian atas, rata tengah cetak tebal font 10 Calibri**. **Isi tabel font 10 Calibri spasi 1**. Tempatkan **penjelasan dan singkatan pada keterangan tabel font 8**, bukan pada judul tabel. Jumlah tabel **maksimal 5 buah**.

## Foto/Gambar

Foto dan gambar disusun pada naskah. Foto orang yang mungkin dapat dikenali harus disertai izin tertulis. Gambar yang pernah dipublikasikan harus diberi acuan. Foto/gambar harus diberi nomor urut sesuai dengan pemunculan dalam teks, **judul singkat di bagian bawah, rata tengah cetak tebal font 10 Calibri**. Jumlah tabel dan foto/gambar **maksimal 5 buah**.

## Metode Statistik

Jelaskan metode statistik yang digunakan secara rinci pada bagian metode.

## Ucapan Terima Kasih

Bila diperlukan ucapan terima kasih dapat diberikan kepada kontributor penelitian tanpa menuliskan gelar.

## Daftar Pustaka

Rujukan ditulis sesuai aturan penulisan **Vancouver**, dengan pemunculan dalam artikel. Jumlah rujukan **minimal 7 maksimal 20 buah** dari **terbitan 10 tahun terakhir**, dianjurkan merujuk artikel dari Jurnal Kedokteran (JUKE). **Rujukan dari jurnal sebanyak 80%**, sisanya berasal dari buku ajar, monograf, prosiding, skripsi, tesis, dan disertasi.

Contoh cara menuliskan rujukan:

### Artikel Jurnal Cetak

Haas AN, de Castro GD, Moreno T, Susin C, Albandar JM, Oppermann RV, et al. Azithromycin as a adjunctive treatment of aggressive periodontitis: 12-months randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2008; 35(8):696-704.

### Artikel Jurnal Online

Tasdemir T, Yesilyurt C, Ceyhanli KT, Celik D, Er K. Evaluation of apical filling after root canal filling by 2 different techniques. *J Can Dent Assoc* [internet]. 2009 [disitasi 2009 Jun 14]; 75(3):1-5. Tersedia dari: <http://www.cda-adc.ca/>

### Artikel Website Dengan Pengarang

Fehrenbach MJ. Dental hygiene education [internet]. USA: Fehrenbach and Associates; 2000 [diperbarui 2009 Mei 2; disitasi 2009 Jun 15]. Tersedia dari: <http://www.dhed.net/>

### Artikel Website Tanpa Pengarang

American Dental Hygienists' Association [internet]. Chicago: American Dental Hygienists' Association; 2009 [disitasi 2009 Mei 30]. Tersedia dari: <http://www.adha.org/>

### Volume dengan Suplemen

Van Spornsen FJ, Huijbregts SC, Bosch AM, Leuzzi V. Cognitive, neurophysiological, neurological and psychosocial outcomes in early-treated PKU-patients: a start toward

standardizer outcome measurement across development. *Mol Genet Metab.* 2011; 104(Suppl 1):S45–51.

#### **Edisi dengan Suplemen**

Dietz CA, Nyberg CR. Genital, oral, and anal human papillomavirus infection in men who have sex with men. *J Am Osteopath Assoc.* 2011; 111(3 Suppl 2):S19–25.

#### **Buku dan Monograf Lain Penulis Perorangan**

Mason J. Concepts in dental public health. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

#### **Editor (Penyuting) sebagai Penulis Perorangan**

Ireland R, editor. Clinical textbook of dental hygiene and therapy. Oxford: Blackwell Munksgaard; 2006.

#### **Buku Penulis/Editor Lebih dari 6**

Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, et al., editors. Harrison's principles of internal medicine. Edisi ke-17. New York: McGraw Hill; 2008.

#### **Organisasi sebagai Penulis**

Canadian Dental Hygienists Association. Dental hygiene: definition and scope. Ottawa: Canadian Dental Hygienists Association; 1995.

#### **Bab dalam Buku**

Alexander RG. Considerations in creating a beautiful smile. Dalam: Romano R, editor. The art of the smile. London: Quintessence Publishing; 2005. hlm. 187-210.

#### **Prosiding/Konferensi**

Nicolai T. Homeopathy. Proceedings of the Workshop Alternative Medicines; 2011 Nov 30; Brussels. Belgium: ENVI; 2011

#### **Makalah dalam Konferensi**

Trilly P, Lu K, Mu X. Predicting modality from text queries for medical image retrieval. Dalam: Cao Y, Kalpathy-Cramer J, Unay D, editors. MMAR'11: proceeding of the 2011 international ACM workshop on medical multimedia analysis and retrieval; 2011 Nov 28-Des 01; Arizona, USA. New York: ACM. hlm. 7–12

#### **Disertasi**

Suprpto. Penjatuhan pidana mati terhadap pelaku tindak pidana narkotika dan psikotropika di Indonesia dalam perspektif hak asasi manusia berdasarkan UUD 1945 [disertasi]. Bandung: Universitas Padjadjaran; 2011.

#### **Cara Pengiriman Artikel**

Penulis mengirim artikel ke alamat email: [semnaspbbmixxlampung@gmail.com](mailto:semnaspbbmixxlampung@gmail.com)

Pemakalah berhak memilih apakah tulisannya ingin diterbitkan dalam **Jurnal JK Unila** atau **buku prosiding semnas XX PBBMI**

## **JK UNILA**

#### **Redaksi Jurnal JK Unila**

Fakultas Kedokteran Universitas Lampung  
Jalan Prof. Soemantri Brojonegoro No. 1,  
Bandar Lampung, Indonesia. 35145.

...

Telp/Fax (0721) 7691197

Home Page: <http://jurnal.fk.unila.ac.id>