

Infection, Immunology and Infertility Series

Book Three:
**Metode Pengukuran Respon Imun
dan Aplikasi dalam Infertilitas**

Part Five:

Metode Pengukuran yang Diperlukan
untuk Menilai Respon Immunologis

Part Six:

Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa

Muhammad Anas

Book Three: Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas

Penulis : Muhammad Anas

Editor : Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM, SpMK(K), dr. Hidayat Suyuti, PhD., SpM
Prof. Dr. dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTMH. M. Sc, SpParK,
Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES

Tata Letak : Nurhidayatullah.R

Design cover : Syariffudin



Hak Cipta Penerbit UMSurabaya Publishing

Jl Sutorejo No 59 Surabaya 60113

Telp : (031) 3811966, 3811967

Faks : (031) 3813096

Website : <http://www.p3i.um-surabaya.ac.id>

Email : p3iurabaya@gmail.com

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini dalam bentuk apapun, baik secara elektronik maupun mekanis, termasuk memfotokopi, merekam, atau dengan menggunakan sistem penyimpanan lainnya, tanpa izin tertulis dari penerbit.

UNDANG- UNDANG NOMOR 28 TAHUN 2014 TENTANG HAK CIPTA

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak/atau tanpa ijin pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi pencipta yang meliputi Penerjemah dan Pengadaptasian Ciptaan untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah)
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan atau tanpa ijin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta yang meliputi Penerbitan, Penggandaan dalam segala bentuknya, dan pendistribusian Ciptaan untuk Penggunaan Secara Komersial, dipidana dengan pidana penjara paling lama 4 (empat) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 1.000.000.000,00 (satu miliar rupiah)
3. Setiap Orang yang memenuhi unsur sebagaimana dimaksud pada poin kedua diatas yang dilakukan dalam bentuk Pembajakan, dipidana dengan pidana penjara paling lama 10 (sepuluh) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp 4.000.000.000,00 (empat miliar rupiah)

UM Surabaya Publishing

Surabaya : UM Surabaya Publishing, 2019

Ukuran Buku : 210 x 297 mm, iv + 196 halaman

ISBN : 978-612-5786-67-9



Infection, Immunology and Infertility Series

Book One Infertilitas dan Immunologi Vaginitis

Part 1: Overview Infertilitas

Part 2 Vulvovaginitis: Etiopathogenesis dan Tinjauan Immunologi Infeksi

Book Two Infeksi Spermatozoa dan Karakteristik *Staphylococcus aureus*

Part 3: Peranan Infeksi pada Spermatozoa Terhadap Fertilitas

Part 4: Karakterisasi Molekuler faktor Virulensi dan peranannya pada patogenesis infeksi *Staphylococcus aureus*

Book Three Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas

Part 5: Metode Pengukuran yang Diperlukan untuk Menilai Respon Immunologis.

Part 6: Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa







kata Pengantar Rektor UM Surabaya

Alhamdulillah, kita panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT berkat karunia Nya telah diterbitkan buku baru berupa buku seri untuk disiplin ilmu kedokteran khususnya dalam bidang obstetri dan ginekologi yang berisi tentang *infection, immunology, and infertility series* ilmu dan teknologi. Buku ini menjelaskan tentang cara pengukuran respon imun dan autoimunitas pada pasangan wanita yang terinfeksi *S. aureus* terhadap fertilitas spermatozoa.

Sebelum bergabung menjadi dosen tetap di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya, saya mengenal Anas sejak menjadi mahasiswa, tetapi lebih sering berkomunikasi setelah kami berdua menjadi direktur Rumah Sakit Muhammadiyah di tempat yang berbeda, dari sinilah saya mengenal jauh lebih dekat dengan beliau. Meski pada kesehariannya berkecukupan di bidang management rumah sakit dan praktek sebagai spesialis kebidanan dan kandungan, tetapi beliau juga haus untuk meningkatkan wawasan keilmuannya terutama yang sesuai bidang yang digelutinya, beberapa kali beliau mencoba melakukan penelitian yang terkait masalah infertility, yang pada akhirnya setelah mengikuti beberapa saran dari sejawat lainnya, dr. Anas melanjutkan studi S3 nya di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang tentunya hal tersebut juga semakin mengasah kemampuan keilmuannya, dr. Anas dan juga kemampuan menulisnya yang dibuktikan dengan diterbitkannya buku kedokteran karya beliau ke-3 dengan judul Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas yang akan menjadi kontribusinya di dunia ilmu kedokteran.

Harapannya buku dapat menjadi salah satu referensi dan rujukan penelitian selanjutnya. Selain itu, dapat membantu para dosen dan mahasiswa kedokteran, keperawatan dan kebidanan untuk memperkaya dan meningkatkan wawasan keilmuannya yang terkait dengan infeksi, imunologi, dan infertiliti dengan problematiknya.

Surabaya, Juli 2019
Rektor UM *Surabaya*

Dr. dr. Sukadiono, MM





kata Pengantar Dekan UM Surabaya

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamu'alaikum wr. wb.

Alhamdulillah, Segala puji dan syukur kita panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan karunia-Nya, sehingga Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG dapat menyelesaikan penulisan buku ke-3 Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas. Kami selaku pihak Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya dan seluruh civitas akademika menyambut dengan gembira atas terbitnya Buku Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas karya ke-3 Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG

Apresiasi yang besar dan ucapan terima kasih kami berikan kepada Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG selaku Peneliti dan Akademisi yang ditengah kesibukannya sebagai Dokter dalam melayani masyarakat dapat merampungkan suatu karya yang tidak hanya berguna bagi kemajuan ilmu Kedokteran namun juga membangun kemaslahatan bagi umat.

Sebagai ilmu yang senantiasa berkembang, Infertilitas dan Imunologi memiliki banyak bahan kajian yang secara keilmuan masih banyak belum tergali. Masing-masing memiliki kompleksitas dan kekhasan tersendiri. Seiring perkembangan zaman, dengan berkembangnya kemutakhiran teknologi, keduanya pun berkembang dengan pesat baik dari segi keilmuan maupun terapannya di Masyarakat. Menghubungkan keduanya, khususnya di bidang Ilmu Kebidanan dan Penyakit Kandungan, menjadi suatu tantangan tersendiri.

Melalui buku ke-3 ini penulis mencoba mengkaji dua hal tersebut melalui disiplin ilmu yang menjadi latar belakang profesional penulis. Hasilnya pun sungguh membuka wacana dan menginspirasi kita semua, terutama bagi Akademisi dan juga Mahasiswa. Pesan untuk senantiasa memiliki semangat untuk meneliti dan menulis, terutama dalam bidang Ilmu Kedokteran, tertuang melalui karya Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG ini.

Penerbitan buku ini tentu melalui proses yang panjang . Semoga dengan terbitnya buku ini memberi kebaikan bagi kemajuan Ilmu Kedokteran dan tentunya bagi umat sehingga menjadi amal yang tidak pernah habis bagi penulis.

Wassalamu'alaikum wr wb

Surabaya, Juli 2019
Dekan FK Universitas Muhammadiyah Surabaya

dr. H.M.Jusuf Wibisono, Sp.P(K) FCCP

kata Pengantar

Bismillahirrahmanirrahim
Assalamu'alaikum wr wb.

Puji syukur saya panjatkan kehadiran Allah SWT, yang telah memberikan kekuatan kepada saya sehingga buku *Infection, Immunology and Infertility Series* yang terdiri dari tiga buku dan tiap buku terdapat dua judul yang akan diterbitkan, mulai dari *Book one* berisi *part one* dan *part two*; *Book two* berisi *part three* dan *part four*; serta *Book three* berisi *part five* dan *part six*. Shalawat serta salam saya persembahkan ke haribaan nabi dan rasul Muhammad SAW.

Pada *Book Three* berisi *Part Five* dan *Part Six*; ini memuat dua judul yaitu Metode Pengukuran yang Diperlukan untuk Menilai Respon Immunologis. Dan Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *S. aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa, yang menjelaskan tentang cara pengukuran respon imun dan autoimun akibat infeksi *S. aureus* pada pasangan wanita terhadap fertilitas spermatozoa.

Rangkaian buku ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya, H. Mu'asan (alm) dan Hj Siti Fatimah (alm). Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kebaikan di akhirat.

Saya sampaikan terima kasih yang banyak kepada istriku tercinta Ummu Hanifah, SE atas kelonggaran waktu yang disediakan sehingga naskah ini terselesaikan. Kepada putra putri kami, Rudin, Ilham, Jamil, Ghazi dan 'Aisyah yang senantiasa memberikan semangat yang selalu terbaharui.

Saya sampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada Prof. Dr. dr. Sumarno Reto Prawiro, DMM, SpMK (K) yang senantiasa mengarahkan penulisan naskah buku ini. Juga saya sampaikan terima kasih banyak kepada dr. Hidayat Suyuti, PhD., SpM, Dr. dr. Siti Candra Windubaktiani, SpOG(K)(alm) dan Prof. Dr. dr. Teguh

Wahju Sardjono, DTMH., M.Sc, SpParK yang senantiasa memberikan evaluasi dan koreksi terhadap naskah yang saya susun.

Kepada semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, saya sampaikan banyak terima kasih atas bantuannya sehingga buku ini dapat diterbitkan.

Saran perbaikan senantiasa saya harapkan demi lebih sempurnanya naskah buku ini di masa mendatang.

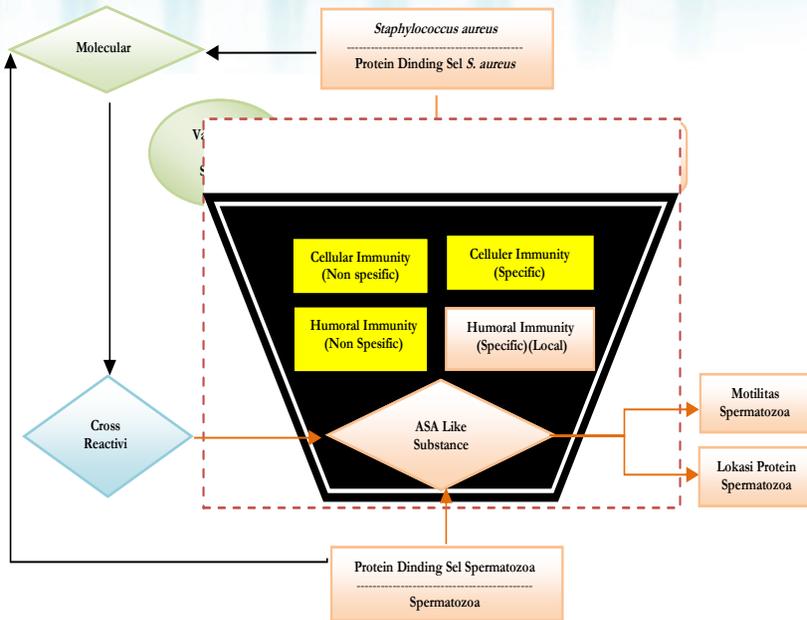
Billahi taufik wal hidayah. Wassalamu'alaikum wr wb.

Surabaya, Juli 2019
Penulis,

Muhammad Anas



Kerangka Konsep



Vaginitis non spesifik / vagnosisi bakterial merupakan penyakit kelamin wanita yang disebabkan oleh polimikrobal dengan dominasi *Lactobacillus spp* yang berkurang. *Staphylococcus spp* merupakan sebagian diantara mikroba yang ikut berperan pada vaginosis bakterial. Khususnya *Staphylococcus aureus* yang paling patogen pada manusia diantara *Staphlococcus spp*.

Pasangan suami istri bila melakukan hubungan badan maka istrinya akan terpapar dengan spermatozoa yang merupakan benda asing. Pada tubuh istri akan terjadi reaksi imunologi karena paparan benda asing dari suaminya yang meliputi reaksi imun bawaan dan reaksi imun adaptif yang berupa reaksi imun seluler maupun reaksi imun humoral. Pada reaksi imun humoral adaptif akan terbentuk antibodi terhadap spermatozoa yang biasa disebut antibodi antisperma / *antisperm antibody (ASA)*. Antibodi antispermatozoa selalu akan terbentuk setiap kali terjadi paparan spermatozoa suami pada istri. Sehingga jumlahnya semakin lama

akan semakin banyak. Pada level tertentu maka antibodi antisperma ini akan menghalangi proses fertilisasi dengan adanya reaksi antara antibodi antisperma dengan spermatozoa dan terjadi reaksi aglutinasi sehingga fungsi dari spermatozoa terganggu khususnya motilitasnya. Karena adanya hambatan motilitas spermatozoa tersebut maka pasangan tersebut menjadi infertil. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab infeksi vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial pada wanita. Dinding sel *Staphylococcus aureus* memiliki kesamaan molekul proteinnya dengan dinding sel spermatozoa yang dikenal sebagai *molecular mimicry*. Sehingga wanita yang menderita vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial yang salah satu penyebabnya adalah *Staphylococcus aureus* dapat memicu timbulnya substrat yang menyerupai antibodi antisperma (*ASA like substance*). Oleh karenanya wanita dengan infeksi vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial akan memperbesar kemungkinan untuk menjadi infertil akibat reaksi silang (*cross reactivity*) yang ditimbulkan oleh adanya kesamaan molekul dinding sel antara spermatozoa dengan *Staphylococcus aureus*.

Vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial merupakan penyakit kelamin wanita yang disebabkan oleh polimikrobal dengan dominasi *Lactobacillus* spp yang berkurang. Dengan adanya infeksi pada alat kelamin wanita khususnya di daerah vagina dan servik uteri maka penjamu akan merespon keberadaan bakteri pada daerah tersebut dengan respon imun bawaan maupun respon imun adaptif. Respon imun bawaan meliputi barier epitel, mukus, peptida antimikroba, komplemen dan sel imun seperti netrofil, makrofag dan sel NK. Respon imun adaptif merupakan kelanjutan dari respon imun bawaan melalui APC seperti sel epitel, sel dendrit dan makrofag, serta adanya MHC baik kelas I maupun kelas II. Dengan efektor berupa sel Th1, sel Th2, sel Th17 maupun sel Treg serta sel B atau sel plasma yang memproduksi imunoglobulin / antibodi sirkulasi maupun sekretori. Respon imun yang akan diteliti pada penelitian ini adalah respon imun adaptif humoral lokal yang berupa s-IgA yang disekresikan pada lumen

servik uteri terhadap bakteri yang terdeteksi pada infeksi vagina wanita pasangan infertil. Serta dilakukan tes kepekaan antibiotika terhadap bakteri yang terdeteksi pada infeksi vagina wanita pasangan infertil tersebut. Variabel yang akan diteliti diberikan ditandai dengan kotak berwarna putih.

Ringkasan Book One Part One

Overview Infertilitas

Pasangan Infertil adalah pasangan yang telah kawin dan hidup harmonis serta telah berusaha selama satu tahun tanpa menggunakan kontrasepsi tetapi belum hamil. Pasangan Infertil dibedakan menjadi 2 macam yaitu infertil primer dan infertil sekunder. Angka prevalensi pasangan infertil di dunia bervariasi antara 10 - 40%. Di Indonesia 17%, Jawa Timur 26%, Surabaya 25% dan Malang 18%. Besaran angka infertil primer dan sekunder tergantung kondisi daerah masing - masing sesuai dengan faktor penyebab yang menyertainya.

Faktor penyebab infertilitas dibedakan menjadi faktor penyebab pria dan wanita. Faktor penyebab dari pihak pria berkontribusi kurang lebih 40 %, selebihnya dari faktor wanita. Kelainan dari pihak pria terbanyak varikokel kemudian kelainan pada analisis spermanya, sedangkan dari pihak istri terbanyak kelainan tuba falopii dan peritoneum. Penyebab idiopatik kurang lebih 10-30%, diduga banyak berkaitan dengan kelainan imunologis dan berkaitan dengan infeksi sebelumnya. Faktor penyebab infertilitas dapat dicegah bila penyebabnya berasal dari luar khususnya infeksi. Pencegahan infeksi dapat dilakukan dengan cara mencegah seks pranikah, penanganan abortus dan persalinan secara aseptis.

Pemeriksaan dan pengobatan pasangan infertil berkembang pesat karena perkembangan teknologi kedokteran. Intervensi yang dilakukan pada pasangan infertil mulai pengobatan medisinal sampai dengan pemakaian teknologi reproduksi berbantu. Prognosisnya sangat bergantung pada usia pasangan wanita dan faktor - faktor lain yang mengikuti seperti gaya hidup, kondisi lingkungan, kondisi sosiokultural dan juga pemakaian obat-obatan tertentu.

Kata Kunci: pasangan infertil, faktor penyebab, idiopatik, infeksi, pemeriksaan, pengobatan, prognosis

Ringkasan Book One Part Two

Vulvovaginitis : Etiopatogenesis dan Tinjauan Imunologi Infeksi

Populasi flora normal yang dominan di vagina adalah *Lactobacilli spp.* Ketika jumlah *Lactobacilli spp* berkurang, maka populasi *Gardnerella vaginalis* dan bakteri anaerob lain (*Mobiluncus species*, *Mycoplasma hominis*, dan *peptostreptococcus species*) akan meningkat. Kondisi tersebut menyebabkan naiknya pH vagina dan menimbulkan vaginosis bakterial. Jadi etiologi vaginosis bakterial adalah multi mikroba dengan *Gardnerella vaginalis* yang hampir selalu muncul. *Staphylococcus aureus* termasuk salah satu bakteri yang ikut berperan serta pada terjadinya vaginosis bakterial, dengan kontribusi sebesar 3,05% (4,36% dari 70%).

Faktor risiko vaginosis bakterial meliputi : umur, aktifitas seksual, status hormonal, higiene yang jelek, status imunologi, penyakit kulit yang mendasari, kehamilan, penggunaan IUD, pemakaian douche, pakaian ketat, pemakaian sabun dan deterjen berparfum, spray kewanitaan, obat kontrasepsi, pengobatan pada vagina, antibiotik, STD serta stres. pH vagina yang normal sekitar 3,8-4,2. Pada pH ini pertumbuhan organisme patogen terhambat. Gangguan pH vagina dapat mempengaruhi keseimbangan flora normal vagina, dan berakibat pertumbuhan yang pesat dari organisme patogen. Patogenesis vaginosis bakterial melibatkan perubahan lingkungan vagina yang mengakibatkan perubahan komposisi flora normal vagina sehingga mikroba patogen tumbuh melalui *docking*, *anchoring*, proliferasi dan invasi maka terjadilah infeksi.

Respon imun saluran reproduksi wanita meliputi respon imun bawaan dan respon imun adaptif baik respon imun seluler maupun respon imun humoral. Pada respon imun bawaan melibatkan epitel mukosa vagina, flora normal, mukus, sitokin, protein antimikroba, sel dendritik, granulosit, makrofag dan sel NK.

Respon imun adaptif humoral dimediasi oleh sel B yang berdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan imunoglobulin meliputi IgM, IgG dan yang terutama pada saluran genital wanita adalah sIgA. Sedangkan respon imun adaptif seluler terdiri dari sel T CD4+ maupun sel T CD8+.

Kata Kunci: vaginitis non spesifik, flora normal, pH, faktor resiko, patogenesis, respon imun bawaan, respon imun adaptif, seluler, humoral.

Ringkasan Book Two Part Three

Peranan Infeksi pada Genitalia Pria Terhadap Fertilitas

Proses pembentukan antibodi antisperma (ASA) diperantarai oleh obstruksi kronis pada saluran genitalia pria yang menyebabkan peningkatan tekanan intraluminal sehingga terjadi distensi epididimis dan pembentukan granuloma spermatozoa. Spermatozoa yang terhambat dihancurkan oleh makrofag intraluminal dan produk degradasinya diserap epitel epididimis dan memicu reaksi imun seluler maupun humoral. Produksi ASA terjadi secara bertahap dan lambat. Mekanisme imunotoleransi seluler juga terlibat pada produksi ASA dengan berkurangnya konsentrasi limfosit T supresor dalam semen pria.

Infeksi genitalia pria memicu pembentukan ASA melalui beberapa cara sebagai berikut : 1) Obstruksi MRT karena perubahan yang terjadi selama inflamasi dan pasca inflamasi, 2) Robeknya sawar darah testis (SDT) karena peradangan lokal, 3) Penurunan faktor imunomodulator baik seluler maupun humoral dalam semen yang biasanya dapat mencegah autoimunisasi spermatozoa, dan 4) Reaksi silang antara antigen mikroorganisma yang bertanggung jawab pada infeksi MRT dengan antigen spermatozoa. Penelitian khusus tentang pembentukan sIgA terhadap infeksi *S. aureus* pada saluran reproduksi pria belum didapatkan. Penelitian yang ada berkaitan dengan *S. aureus* hanya sebatas bakteriosepmia dan kenaikan lekosit semen.

Keberadaan ASA pada saluran genitalia pria akan menyebabkan gangguan migrasi spermatozoa, menghambat proses fertilisasi pada berbagai tahap, dan menunjukkan efek negatif pada perkembangan embrio sejak awal. Antibodi antisperma dapat mempengaruhi mekanisme transportasi spermatozoa dalam saluran genitalia wanita, mengubah kapasitas spermatozoa atau reaksi akrosom, mengganggu pembuahan sel telur, atau memiliki efek pasca fertilisasi pada zigot dan embrio preimplantasi. Sehingga kehamilan tidak terjadi atau terjadi

gangguan pertumbuhan embrio sejak awal yang mengakibatkan keguguran, sebagai hasil akhir terjadinya infertilitas.

Kata Kunci: infeksi, genitalia, pria, fertilitas, antibodi antisperma, sawar darah testis, imunomodulator, *Staphylococcus aureus*, transportasi, kapasitas, kehamilan, zigot, embrio, keguguran

Ringkasan Book Two Part Four

Karakterisasi Molekuler faktor virulensi dan peranannya pada patogenesis infeksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan flora normal pada hidung, kulit dan selaput mukosa manusia. Ia termasuk kuman gram(+) membentuk koloni warna kuning emas, tidak bergerak, *facultative anaerobe*, memfermentasi glukosa dan manitol, katalase dan kogulase (+). Dinding *S. aureus* terbentuk dari peptidoglikan, *teichoic acid* dan *lipoteichoic acid*. *Teichoic acid* terikat kovalen dengan peptidoglikan, sedangkan *lipoteichoic acid* menancap pada membran sitoplasma. Protein permukaan, lipoprotein, diangkut lewat membran bakteri, ditempatkan pada dinding sel bakteri. *S. aureus* umumnya dianggap sebagai patogen ekstraseluler, tetapi dapat diinternalisasi.

Faktor virulensi *Staphylococcus aureus* meliputi : a) Komponen struktur seperti kapsul, peptidoglikan dan protein permukaan; b) Komponen yang disekresi ada 2 macam : b.1) toksin seperti eksotoksin, leukocidin Panton Valentin, hemolisin, toksin eksfoliatif dan sitotoksin; b.2) enzim seperti katalase, koagulase, hyaluronidase, fibrinolysin, lipase, nuclease, penicillinase, phosphatase dan protease; c) Regulasi genetik.

Patogenesis *S. aureus* untuk dapat menimbulkan penyakit pada pejamu melalui 2 cara : 1) Invasi, meliputi kolonisasi, invasin dan mengatasi pertahanan sel pejamu, dan 2) Toksikogenesis, racun yang diproduksi oleh *S. aureus*. Spesifisitas kolonisasi dan perlekatan bakteri ke sel pejamu dipengaruhi oleh : 1. *tissue tropism*, 2. *species specificity* dan 3. *genetic specificity within a species*. Patogenesis *S. aureus* yang dianggap bisa berperilaku seperti bakteri intraseluler meliputi : 1. Internalisasi yaitu proses masuknya bakteri ke sitoplasma pejamu, 2. persistensi dan pertumbuhan intraseluler yaitu ketahanan bakteri terhadap pencernaan pejamu di dalam sitoplasma sel pejamu, 3.

menghindari phagosom yaitu proses bakteri menjauhi atau melepaskan diri dari phagosom, 4. menginduksi kematian sel hospes melalui apoptosis atau pironekrosis maupun nekrosis, 5. mengatasi autophagi yaitu bakteri menghindari proses pembersihan yang dilakukan oleh pejamu dan 6. kompetisi besi dengan jalan menghasilkan enzim tertentu yang dapat merebut zat besi dari pejamu.

Kata Kunci : karakterisasi molekuler, faktor virulensi, patogenesis, *Staphylococcus aureus*, internalisasi, persistensi, phagosom, apoptosis, autophagi



Metode Pemeriksaan yang diperlukan untuk menilai Respon Imun Infertilitas

Muhammad Anas

Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya

ABSTRAK

Bahan pemeriksaan yang dibutuhkan untuk menilai respon imun infertilitas berupa protein atau antibodi. Sumber bahan pemeriksaan tersebut dapat berasal dari pasangan infertil pria maupun wanita. Pada pasangan pria bahan pemeriksaan bisa diambil dari spermatozoa. Bahan pemeriksaan yang didapat pada pasangan wanita dapat diperoleh dari serum darah tepi maupun sekret yang dikeluarkan oleh saluran genitalia wanita.

Metode pemeriksaan yang digunakan untuk menilai respon imun infertilitas dari bahan yang membangkitkannya ataupun produk yang dihasilkannya banyak macamnya. Pemilihan metode tersebut bergantung pada hasil akhir yang kita harapkan, baik berupa protein atau imunoglobulin atau antibodi. Protein dapat diketahui sifatnya seperti berat molekul, kadar protein, titik isoelektrik, kelarutan, aktifitas biologi, struktur bangun, urutan asam amino, urutan basa nukleotidanya. Imunoglobulin atau antibodi dapat diamati kelas, subkelas, berat molekul, titik isoelektrik, kadar, kelarutan, juga kestabilannya. Metode pemeriksaan tersebut meliputi imunopresipitasi, elisa, kromatografi, spektrometri massa, kristalografi x-ray, elektroforesis 1D / 2D, sds-page, western blot, dot blot, Tes Lowry atau Bradford, Uji ultracentrifugation dispersity sedimentation, spektroskopi NMR, imunohistokimia, metode surface plasmon resonance, fluorescence resonance energy transfer.

Kata Kunci : protein, antibodi, metode pemeriksaan.

Measurement Method used to evaluate Immune Infertility Responses

Muhammad Anas
Medical Faculty of UM Surabaya

ABSTRACT

Protein and or antibody is material used to evaluate immune infertility respons. Source material is taken from male or female couple. Spermatozoa is material taken from male partner. From female partner, we need blood serum and any secret that secreted from female genitalia tract.

Many measurement method used to evaluate immune respons to infertility. Chosen method depend on expected final result. The target is protein or immunoglobulin or antibody. Protein can be known by it's property i.e. molcul weight, density, isoelectric point, solubility, biological activity, stucture, amino acid sequens, nucleotide sequens. From immunoglobulin or antibody, we can study class and subclass immunoglobulin, molecular weight, isoelectric point, density, solubility and heat stability. Measurement method consist of immunoprecipitasion, elisa, chromatography, spectrophotometry massa, crystalography x-ray, 1D/2D electrophoresis, sds-page, western blot, dot blot, Lowry or Bradford test, ultracentrifugation dispersity sedimentation assay, nuclear magnetic resonance spectroscopy, immunohistochemistry, surface plasmon resonance method, and fluorescence resonance energy transfer.

Key word : source, protein, antibody, measurement method.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Kata Pengantar	ii
Kerangka Konsep	iv
Ringkasan Book One	vi
Ringkasan Book Two	vii
Ringkasan Book Three	viii
Ringkasan Book Four	ix
Abstrak	x
Abstact	xi
Daftar Isi	xii
Daftar Tabel	xv
Daftar Gambar	xvi
Daftar Singakatan dan Istilah	xvii
Glosari	xix
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan	2
1.3. Tujuan	2
1.4. Manfaat	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1. Protein	3
2.1.1. Struktur Dasar Protein	3
2.1.2. Tingkatan Struktur Protein	4
2.1.3. Asal Bahan Pemeriksaan Protein	4
2.2. Antibodi	5
2.2.1. Antibodi Natural	5
2.2.1.1. Struktur, Kelas dan Sifat Fisikokimia	5
2.2.1.2. Macam Antibodi menurut Reseptornya	6
2.2.1.2.1. Antibodi Poliklonal	6
2.2.1.2.2. Antibodi Monoklonal	6
2.2.2. Antibodi Rekombinan	7
2.2.2.1. Struktur Antibodi Rekombinan	7

2.2.2.2. Fragmen Antibodi Rekombinan	7
2.2.3. Asal Bahan Pemeriksaan Antibodi	8
2.3. Isolasi dan Pemurnian Protein	8
2.3.1. Preparasi Protein	8
2.3.2. Ekstraksi Protein	8
2.3.3. Presipitasi Protein	10
2.3.3.1. Presipitasi Ammonium Sulfat	11
2.3.3.2. Presipitasi Asam Kaprilat	12
2.3.4. Pemurnian Protein	12
2.3.5. Penyimpanan Sampel Biologi	15
2.3.5.1. Rekomendasi Umum	15
2.3.5.2. Kondisi Umum Penyimpanan Protein yang Dimurnikan	15
2.4. Pemurnian Antibodi	16
2.4.1. Sumber dan Kontaminan Sampel	16
2.4.2. Ekstraksi Antibodi Rekombinan dan Fragmen Antibodi	16
2.5. Persiapan Sampel sebelum Pemurnian	17
2.5.1. Sentrifugasi dan Penyaringan Sampel	17
2.5.2. Presipitasi Antibodi	18
2.5.2.1. Teknik Immunopresipitasi	18
2.5.2.2. Kondisi Sel Lisis	19
2.5.2.3. Pilihan Antibodi	19
2.5.2.4. Resolubilisasi Presipitat Antibodi	20
2.5.2.5. Desalting dan Bufer Penukar	20
2.5.3. Strategi Pemurnian Multistep	21
2.6. Karakterisasi Protein	21
2.6.1. Karakterisasi Protein atas dasar Komposisi Asam Amino	22
2.6.2. Karakterisasi Protein atas dasar Berat Molekul	22
2.6.3. Karakterisasi Protein atas dasar Titik Isoelektrik	23
2.6.4. Karakterisasi Protein atas dasar Kelarutan	24

2.6.5. Karakterisasi Protein atas dasar Struktur Subunit yang Menyusun	25
2.6.6. Karakterisasi Protein atas dasar Aktifitas Biologi	26
2.6.7. Karakterisasi Protein atas dasar Modifikasi Paska Translasi	28
BAB III PEMBAHASAN	30
3.1. Isolasi, Purifikasi dan Identifikasi Protein	30
3.2. Test Antibodi Antisperma	32
3.2.1. Pria	32
3.2.1.1. Makro / Mikro agglutinasi dan Imobilisasi	32
3.2.1.2. <i>Enzim Linked Immunosorbent Assay dan Immunofluorescence</i>	33
3.2.1.3. <i>Mixed Antiglobulin Reaction Test</i>	33
3.2.1.4. <i>Immunobead Test</i>	33
3.2.2. Pengujian Lendir Servik Wanita	34
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	35
4.1. Kesimpulan	35
4.2. Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36

DAFTAR TABEL

Tabel 2.2.1	Sifat Fisikokimia Imunoglobulin Manusia	6
Tabel 2.2.2	Karakteristik IgG dan IgM Natural	6
Tabel 2.3.1	Substrat untuk preparasi sampel (Bufer)	8
Tabel 2.3.2	Proses Ekstraksi Sampel	9
Tabel 2.3.3	Metode Presipitasi Protein	11
Tabel 2.3.3.1	Amonium Sulfat yang dibutuhkan untuk derajat saturasi pada suhu 20°C	12
Tabel 2.3.4	Tingkat pemurnian protein terhadap pemanfaatan protein	13
Tabel 2.3.4.1	Sifat Protein dan pengaruh proses pemurnian	14
Tabel 2.4.1	Sumber Kontaminan Antibodi Natural dan Rekombinan	16
Tabel 2.5.1	Seleksi Ukuran Pori Filter	18
Tabel 2.5.2.2.1	Bufer Lisis	19
Tabel 2.5.2.2.2	Deterjen ionik dan non-ionik	1
Tabel 2.5.2.4	Agen Denaturasi	20

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.1	Struktur Dasar Asam Amino	3
Gambar 2.1.2	Tingkatan Struktur Protein	4
Gambar 2.2.1.1	Struktur Dasar Antibodi dan 5 Kelas Antibodi	5
Gambar 2.2.2.1	Modifikasi Antibodi Natural dan Rekombinan	7
Gambar 2.3.2	Hasil akhir bahan dari pemurnian banyak tingkat	9
Gambar 2.3.3	Tiga cara pemakaian Presipitasi	12
Gambar 2.3.4	Preparasi dan Strategi Tiga Fase Pemurnian	13
Gambar 2.3.4.1	Kombinasi logis langkah kromatografi	15
Gambar 2.5.1	Tiga cara presipitasi fraksional untuk menghilangkan kotoran besar	19
Gambar 2.6.4	pH (x-axis) menunjukkan insulin dan muatan total (y-axis) seperti yang ditunjukkan pada the online tool Proteine	25
Gambar 3.1	Outline aplikasi pendekatan molekuler pada sel sperma yang berguna pada identifikasi antigen sperma yang terlibat pada fertilisasi	31

Daftar Singkatan Istilah

<i>AC</i>	: <i>Affinity Chromatography</i>
<i>ASA</i>	: <i>antisperm antibody</i>
<i>cAMP</i>	: <i>Cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>
<i>CD59</i>	: <i>Cluster Differentiatin 59</i>
<i>DNA</i>	: <i>Deoxyribo Nucleaic Acid</i>
<i>DNase I</i>	: <i>Deoxyribo Nuclease I</i>
<i>DRM</i>	: <i>detergent resistant membrane</i>
<i>EDTA</i>	: <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>ELISA</i>	: <i>Enzim Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>F(ab)₂</i>	: <i>(antigen binding)₂ fragment</i>
<i>Fab</i>	: <i>antigen binding fragment</i>
<i>Fc</i>	: <i>crystallizable fragment</i>
<i>FRET</i>	: <i>Fluorescence resonance energy transfer</i>
<i>Fv</i>	: <i>variable fragment</i>
<i>GAT</i>	: <i>gelatin agglutination test</i>
<i>GF</i>	: <i>Gel Filtration Chromatography</i>
<i>GPI</i>	: <i>glycosyl phosphatidyl inositol</i>
<i>H2L2</i>	: <i>2 heavy chains (H), and 2 light chains (L)</i>
<i>HIC</i>	: <i>Hidrofobic Ion Chromatography</i>
<i>HPLC</i>	: <i>High performance liquid chromatography</i>
<i>IBT</i>	: <i>Immunobead Test</i>
<i>IEF</i>	: <i>Isoelectric focusing</i>
<i>IEX</i>	: <i>Ion Exchange Chromatography</i>

<i>LC-MS/MS</i>	: <i>Liquid chromatography tandem spektrometry</i>
<i>mAbs</i>	: <i>monoklonal antibody</i>
<i>MALDI-TOF</i>	: <i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight spectrometry</i>
<i>MAR Test</i>	: <i>Mixed Antiglobulin Reaction Test</i>
<i>MgCl₂</i>	: <i>Magnesium Chloride</i>
<i>Mr</i>	: <i>Mobilitas rate</i>
<i>MS/MS</i>	: <i>tandem spektrometry massa</i>
<i>NMR</i>	: <i>nuclear magnetic resonance</i>
<i>PCT</i>	: <i>Post coital test</i>
<i>PH20</i>	: <i>Hyaluronidase</i>
<i>PI-PLC</i>	: <i>GPI-spesifik fosfolipase C</i>
<i>PMSF</i>	: <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<i>PVDF</i>	: <i>fluorida polyvinylidene</i>
<i>PVT</i>	: <i>Polyvinylpyrrolidone</i>
<i>RIPA</i>	: <i>Radio-Immunoprecipitation Assay</i>
<i>RNase A</i>	: <i>Ribonuclease A</i>
<i>RPC</i>	: <i>Reverse Phase Chromatography</i>
<i>scFv</i>	: <i>single-chain variable fragment</i>
<i>SCMC</i>	: <i>Sperm cervical mucus contact</i>
<i>SDS-PAGE</i>	: <i>Sodium Dodecyl PolyAcrylamide Gel</i>
<i>SEC</i>	: <i>size exclusion chromatography</i>
<i>SIF</i>	: <i>sperm immobilization factor</i>
<i>SIT</i>	: <i>sperm immobilization test</i>
<i>SPR</i>	: <i>surface plasmon resonance</i>



STD : *sexual transmitted diseases*
TESP5 : *testicular serine protease*
TSAT : *Tube slide agglutination test*
TX-100 : *Triton X-100*
UDS : *ultracentrifugation dispersity sedimentation*

Glosari

- Elektroforesis** : Metoda pemisahan molekul yang menggunakan medan listrik sebagai penggerak molekul dan matriks penyangga berpori. Proses pemisahan dapat berlangsung dalam kondisi natural maupun terdisosiasi.
- SDS-PAGE** : Elektroforesis yang menggunakan matriks gel poliakrilamid dan media denaturasi sodum dodesil.
- Isoelectric focusing* : Pemisahan protein berdasarkan titik isoelektrik.
- Western Blotting (imunoblotting)* : Proses transfer protein dari gel ke membran untuk imunodeteksi seperti berat molekul, reaksi silang atau modifikasi protein.
- Dot Blotting* : Salah satu bentuk western blotting yang tidak memerlukan elektroforesis.
- Imunohistokimia** : Teknik penentuan lokasi antigen dalam jaringan atau sel menggunakan reaksi antigen antibodi
- Imunopresipitasi** : Metode imunologi dengan menggunakan reaksi antien antibodi dengan mengamati endapan yang dihasilkan oleh reaksi tersebut.
- Elisa** : Metoda imunologi yang sensitif dengan menggunakan reaksi antigen dan antibodi yang diberi label enzim untuk mempermudah monitor dengan perubahan warna.
- Imunofluoresen** : Metode imunologi untuk mendeteksi antibodi dari berbagai kelas imunoglobulin dalam serum, cairan ludah, cairan otak dengan cara mereaksikan antibodi yang

- dilabel dengan *FITC* (*fluorescence isothiocyanat*).
- Kromatografi : Metoda pemisahan campuran larutan protein melalui kolom yang berisi matrik padat yang berpori. Macam kromatografi diantaranya kromatografi pertukaran ion, kromatografi filtrasi gel, kromatografi afinitas dan kromatografi hidrofobitas.
- Spektrometri massa : Modalitas yang digunakan untuk mengetahui massa penyusun dan berat molekulnya serta sekuen asam amino dari protein yang sudah dipurifikasi dengan cara pengionan. Misalnya *LC-MSMS*, *MALDI-TOF*.
- Kristalografi x-ray : Teknik yang digunakan untuk mengetahui struktur 3 dimensi dari molekul.
- Spektroskopi NMR : Teknik yang digunakan untuk mengetahui struktur 3 dimensi dari molekul kecil dan dapat digunakan dalam fasa cair.
- Fluorescence resonance energy transfer (FRET)* : Teknik yang digunakan untuk mengamati interaksi molekul dengan menandai molekul-molekul yang dievaluasi dengan fluorokrom.
- Metode surface plasmon resonance (SPR)* : Teknik yang digunakan untuk mengamati perilaku ikatan protein dengan molekul lain dengan mengamati refleksi sinar yang dilepaskan oleh interfas antara biosensor karena perubahan ikatan pada fasa cair.

I

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Pengaruh infeksi pada saluran reproduksi baik pria maupun wanita akan berkontribusi terhadap terjadinya infertilitas di kemudian hari. Kejadian ini berkaitan dengan terbentuknya *antisperm antibody (ASA)* yang akan mengganggu pengangkutan spermatozoa menuju tempat keberadaan oosit. Dengan tidak sampainya spermatozoa di tempat oosit berada yaitu di tuba fallopii bagian distal maka pembuahan oosit tidak terlaksana sehingga kehamilan tidak akan terjadi.

Staphylococcus aureus (S. aureus) merupakan salah satu kuman penyebab vulvovaginitis. Vulvovaginitis adalah kondisi ginekologis yang paling sering dijumpai para praktisi di pelayanan primer pada wanita (Latif, 2012). Kejadian vulvovaginitis berkaitan erat dengan kejadian *sexual transmitted diseases (STD)*. Kejadian infertilitas sekunder lebih tinggi dibandingkan infertilitas primer, hal ini disebabkan tingginya kejadian *STD*, intervensi medis yang tidak higienis khususnya saat persalinan dan induksi abortus (Dhont, *et al.*, 2011). Infeksi *S. aureus* pada saluran reproduksi wanita akan memicu terbentuknya reaksi imun baik alami maupun yang adaptif khususnya pembentukan antibodi terhadap kuman tersebut.

Staphylococcus aureus yang diisolasi dari servik uteri wanita infertil dapat menyebabkan imobilisasi spermatozoa manusia secara *in vitro*. Komponen aktif pada lendir servik tersebut berada di ekstraseluler dan berupa protein yang disebut *sperm immobilization factor (SIF)* dengan berat molekul 20 kDa (Prabha, *et al.*, 2009). Prabha, Chaudhary and Kaur (2011) mendapatkan protein serupa dengan berat molekul 57 kDa. Ratri (2008) mendapatkan protein sejenis dengan berat molekul 37kDa. Sunihapsari (2002) menunjukkan bahwa protein membran

spermatozoa tidak dikenali oleh antibodi *Staphylococcus koagulasi negatif* isolat vagina. Kejadian infeksi saluran reproduksi wanita yang dilakukan kultur sekret vagina di Laboratorium Mikrobiologi RSSA Malang selama 4 tahun dari tahun 2007 hingga 2010 didapatkan angka kejadian infeksi *Staphylococcus* sebesar 30,5% dengan *S. aureus* sebesar 4,2% dan *Staphylococcus koagulase negatif* sebesar 26,3% (WHONET, 2012).

Oleh karenanya perlu dilakukan identifikasi protein-protein yang terdapat pada spermatozoa, pada kuman penyebab vulvovaginitis khususnya vaginosis bakterial, pada cairan atau sekret yang diproduksi pada saluran reproduksi wanita dan serum darah tepi pasangan infertil wanita agar dapat diketahui keterkaitan antara kejadian - kejadian tersebut. Pada karya tulis ini akan dibahas bahan pemeriksaan yang berasal dari cairan tubuh pasangan infertil untuk dilakukan isolasi, pemurnian dan pendeteksian keberadaan faktor - faktor imunologis yang ikut berperan serta dalam menyebabkan infertilitas.

1.2. Permasalahan

Berdasarkan kajian latar belakang di atas maka muncul permasalahan:

1. Media apa saja yang dapat dipergunakan sebagai bahan pemeriksaan imunologi infertilitas ?
2. Metode pemeriksaan bagaimana yang dapat digunakan untuk menilai respon imunologi infertilitas ?

1.3. Tujuan

1. Untuk mendapatkan gambaran asal bahan pemeriksaan imunologi infertilitas.
2. Untuk mendapatkan gambaran metode pemeriksaan yang digunakan untuk menilai respon imun infertilitas.

1.4. Manfaat

1. Mengetahui asal bahan yang akan dilakukan pemeriksaan imunologi infertilitas.
2. Mengetahui macam metode pemeriksaan yang digunakan untuk menilai respon imun infertilitas.

II

Tinjauan Pustaka

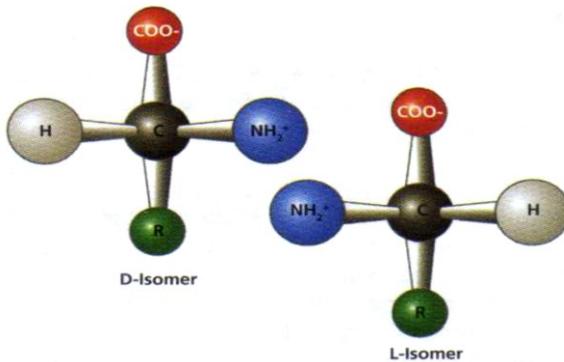
2.1. Protein

2.1.1. Struktur Dasar Protein

Protein terdiri dari rangkaian asam amino melalui pengkombinasian urutannya dari 20 macam asam amino. Setiap protein memiliki jumlah serta urutan asam amino tertentu. Di dalam sel, protein terdapat pada membran plasma atau pada membran internal yaitu penyusun organel sel seperti mitokondria, retikulum endoplasma, nukleus serta badan golgi yang fungsinya berbeda-beda tergantung pada lokasinya. Protein yang terlibat dalam reaksi biokimiawi biasanya berupa enzim yang banyak terdapat di sitoplasma dan sebagian pada kompartemen dari organel sel (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widyarti, 2011a).

Semua asam amino mempunyai struktur dasar sama (kecuali prolin) yaitu terdiri dari gugus karboksilat, gugus amino, dan gugus R yaitu gugus fungsional (side chain) yang menentukan sifat kimaiwi protein. Berdasarkan gugus R, asam amino dibedakan menjadi 4 seperti ditunjukkan pada gambar 2.1.1, yaitu (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widyarti, 2011a):

1. Asam amino yang mempunyai gugus R nonpolar atau hidrofobik, yaitu: Alanin, Valin, Leusin, Isoleusin, Metionin, Prolin, Fenilalanin dan Triptofan
2. Asam amino yang mempunyai gugus R bermuatan negatif pada pH 6-7, yaitu: Asam aspartat dan Asam glutamat
3. Asam amino yang mempunyai gugus R hidrofilik, yaitu: Asparagin, Glutamin, Glisin, Serin, Treonin, Tirosin dan Sistein
4. Asam amino yang mempunyai gugus R mempunyai muatan positif pada pH 6-7, yaitu: Lisin, Arginin dan Histidin



Gambar 2.1.1. Struktur Dasar Asam Amino. Semua asam amino mempunyai struktur dasar sama (kecuali prolin), terdiri dari gugus karboksilat (abu-abu), gugus amino

(biru), dan gugus R (hijau) yaitu gugus fungsional (side chain) yang menentukan sifat kimiawi protein. Ketiga gugus tersebut terikat pada atom karbon (hitam). Dikutip dari Sri Widyarti, 2011a.

2.1.2. Tingkatan Struktur Protein

Protein dikelompokkan menjadi 4 tingkat struktur seperti ditunjukkan pada gambar 2.1.2, yaitu:

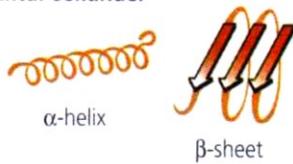
1. *Struktur primer* menggambarkan sekuen linier residu asam amino dalam suatu protein. Sekuen asam amino selalu dituliskan dari gugus terminal amino ke gugus terminal karboksil. Faktor yang menentukan untuk menstabilkan struktur protein adalah ikatan kovalen yang terdapat pada struktur primer.
2. *Struktur sekunder* dibentuk karena ikatan hidrogen antara hidrogen amida dan oksigen karbonil dari rangka peptida. Struktur sekunder utama meliputi α -heliks dan β -strands (termasuk β -sheets)
3. *Struktur tersier* menggambarkan rantai polipeptida yang mengalami folded sempurna dan kompak. Beberapa folded polipeptida terdiri dari beberapa protein globular yang berbeda yang dihubungkan oleh residu asam amino. Unit tersebut dinamakan domain. Struktur tersier distabilkan oleh interaksi gugus R yang terletak tidak bersebelahan pada rantai polipeptida. Pembentukan struktur tersier membuat struktur primer dan sekunder menjadi saling berdekatan.

4. *Struktur kuartener* melibatkan asosiasi dua atau lebih rantai polipeptida yang membentuk multi subunit atau protein oligomerik. Rantai polipeptida penyusun protein oligomerik dapat sama atau berbeda (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widyarti, 2011a).

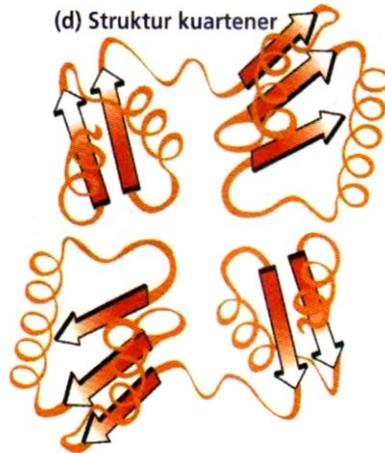
(a) Struktur primer

-Ala - Glc - Val - Thr - Asp - Pro - Gly -

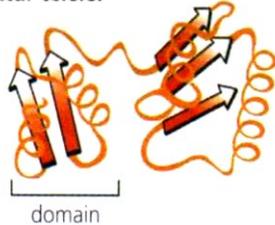
(b) Struktur sekunder



(d) Struktur kuartener



(c) Struktur tersier



Gambar 2.1.2. Tingkatan Struktur Protein. (a) Struktur primer menunjukkan sekuens linear dengan ikatan kovalen. (b) Struktur sekunder dibentuk ikatan hidrogen pada asam amino di depannya (α -heliks) dan pada asam amino dari struktur primer antiparalel (β -strands). (c) Struktur tersier rantai polipeptida yang mengalami folded sempurna dan kompak. (d) Struktur kuarternern merupakan penggabungan dua atau lebih domain rantai polipeptida. Dikutip dari Sri Widyarti, 2011a.

2.1.3. Asal Bahan Pemeriksaan Protein

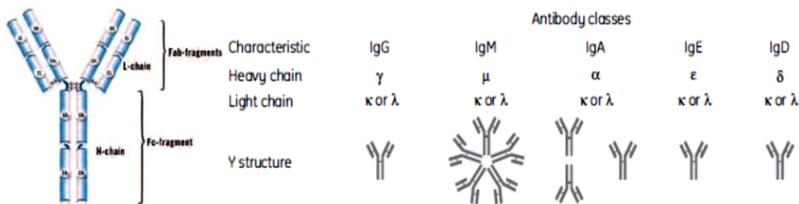
Asal bahan pemeriksaan protein bisa didapatkan dari : pertama, dinding permukaan *S. aureus* yang diambil dari hasil pembiakan kuman yang terdapat pada sekret fornix posterior vagina serta pada sekret servik uteri dan kedua, dinding permukaan membran spermatozoa.

2.2. Antibodi

2.2.1. Antibodi Natural

2.2.1.1. Struktur, Kelas dan Sifat Fisikokimia.

Antibodi/immunoglobulin merupakan sistem imun humoral membentuk 20% protein plasma manusia. Populasi immunoglobulin yang berbeda ditemukan pada permukaan limfosit, sekresi eksokrin dan cairan ekstrasvaskular. Antibodi diproduksi limfosit B dengan reseptor spesifik terhadap antigen yang memicu proses pembelahan dan diferensiasi menjadi sel plasma. Struktur antibodi terdiri dari rantai berat dan rantai ringan. Rantai berat akan membentuk regio Fc. Fungsi efektor antibodi dimediasi faktor penentu struktural pada regio Fc. Rantai ringan akan membentuk regio Fab yang berfungsi untuk mengikat antigen. Struktur dan klasifikasi antibodi seperti pada gambar 2.2.1.1 (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).



Gambar 2.2.1.1 Struktur Dasar Antibodi dan 5 Kelas Antibodi. Immunoglobulin memiliki struktur sama dengan 4 rantai polipeptida : 2 heavy chains (H), dan 2 light chains (L). Ikatan disulfida menggabung light chains dengan heavy chains dan antara 2 heavy chains. Ikatan disulfida di regio fleksibel heavy chains dikenal sebagai hinge. Setiap regio globular dibentuk oleh lipatan rantai polipeptida akibat ikatan disulfida disebut domain. Empat rantai polipeptida mengandung regio konstan (C) dan regio variabel (V), yang ditemukan pada bagian terminal karboksil dan amino. Immunoglobulin kelas G, D, dan E berbentuk monomer; IgA serum berbentuk monomer, tetapi IgA sekresi berbentuk dimer digabung dengan rantai J. IgA manusia terdiri IgA1 dan IgA2, sementara IgA tikus hanya satu subclass; IgM terdiri dari 5 unit monomer; IgG dan IgA dibagi menjadi subclass. Pada manusia IgG1, IgG2, IgG3, dan IgG4. Pada tikus IgG1, IgG2a, IgG2b, dan IgG3. Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001

Masing-masing kelas antibodi mempunyai sifat-sifat tertentu seperti sifat fisikokimia, pH, kelistrikan, kelarutan, ketahanan terhadap suhu, dan lainnya yang membedakan antara satu kelas antibodi dengan kelas antibodi yang lainnya seperti tampak pada tabel 2.2.1 dan tabel 2.2.2 (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).

Tabel 2.2.1. Sifat Fisikokimia Imunoglobulin Manusia

<i>Immuno globulin</i>	<i>Heavy chain</i>	<i>Ligh t chain</i>	<i>Sedime ntation coefficient</i>	<i>Relative molecula r weight (M_r)</i>	<i>M1 heavy chain</i>	<i>Carboh ydrate content (%)</i>	<i>A_{280nm}</i>	<i>Pi</i>
<i>IgG1</i>	$\lambda 1$	κ, λ	7S	146.000	50.000	2-3	13.8	5.0-9.5
<i>IgG2</i>	$\lambda 2$	κ, λ	7S	146.000	50.000	2-3		5.0-8.5
<i>IgG3</i>	$\lambda 3$	κ, λ	7S	170.000	60.000	2-3		8.2-9.0
<i>IgG4</i>	$\lambda 4$	κ, λ	7S	146.000	50.000	2-3		5.0-6.0
<i>IgM</i>	<i>M</i>	κ, λ	19S	900.000	68.000	12	12.5	5.1-7.8
<i>IgA1</i>	$\alpha 1$	κ, λ	7S	160.000	56.000	7-11	13.4	5.2-6.6
<i>IgA2</i>	$\alpha 2$	κ, λ	7S	160.000	52.000	7-11		5.2-6.6
<i>IgD</i>	Δ	κ, λ	7S	184.000	68.000	12	17.0	-
<i>IgE</i>	<i>E</i>	κ, λ	8S	190.000	72.000	12	15.3	-

Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

Tabel 2.2.2. Karakteristik IgG dan IgM Natural

<i>Characteristic</i>	
<i>Molecular Weight</i>	<i>M_r 150.000-160.000 (IgG)</i>
<i>Isoelectric point (pI)</i>	<i>4-9, most > 6.0, often more basic than other serum proteins</i>
<i>Hydrophobicity</i>	<i>IgG is more hydrophobic than many other proteins and so precipitates more readily in ammonium sulphate</i>
<i>Solubility</i>	<i>IgG is very soluble in aqueous buffers Lowest solubility (specific to each antibody) near pI or in very low salt concentration</i>
<i>Temperature stability</i>	<i>Relatively stable at room temperature (but specific to each antibody)</i>
<i>pH stability</i>	<i>Often stable over a wide pH interval, but unstable in very acidic buffers (specific to each antibody)</i>
<i>Carbohydrate content</i>	<i>2% to 3% for IgG, higher for IgM (12%), most carbohydrate is associated with Fc region of the heavy chains</i>
<i>The optimal selection and combination of purification technique for Capture, Intermediate Purification, and Polishing is crucial for an efficient purification. These principles are described in more detail in Appendix 9.</i>	

Dikutip dari GE Healthcare BioSciences, 2002.

2.2.1.2. Macam Antibodi menurut Reseptornya

2.2.1.2.1. Antibodi Poliklonal

Pejamu menghasilkan sejumlah besar antibodi yang mengenali epitop independen pada antigen. Setiap antibodi spesifik dihasilkan klon sel plasma yang berbeda. Serum merupakan sumber antibodi poliklonal yang sangat baik. Antibodi poliklonal digunakan sebagai reagen dalam teknik imunokemikal. Pemurnian lebih lanjut diperlukan untuk

mengisolasi antibodi poliklonal atau mengisolasi antibodi spesifik (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).

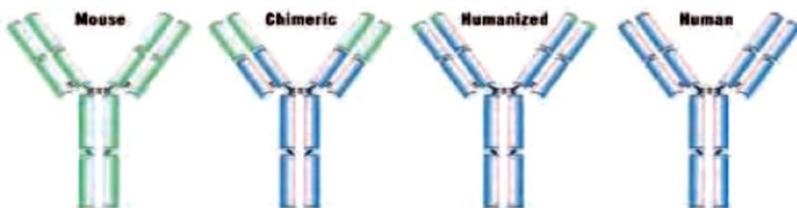
2.2.1.2.2. Antibodi Monoklonal

Antibodi monoklonal (mAbs) adalah antibodi yang sangat spesifik dihasilkan sel hibridoma. Sel hibridoma dibuat dengan menyatukan prekursor sel plasma dengan sel immortal. Sel hibridoma hanya menghasilkan antibodi monoklonal. Antibodi monoklonal spesifisitas tinggi sangat menguntungkan dalam aplikasi terapi (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).

2.2.2. Antibodi Rekombinan

2.2.2.1. Struktur Antibodi Rekombinan

Teknologi rekombinan dapat digunakan untuk memanipulasi dan memproduksi antibodi serta fragmennya. Antibodi sebagai agen terapeutik harus memiliki waktu paruh serum panjang, imunogenisitas rendah, afinitas tinggi dan mampu menetralsir aktivitas antigen. Potensi penggunaan protein untuk fusi antibodi sangat luas untuk aplikasi penelitian, diagnostik dan terapi. Penggabungan mitra fusi dengan semua atau bagian dari antibodi dapat mengaktifkan antibodi atau fragmen untuk mengakses daerah tertentu dari penjamu (misalnya, melintasi penghalang darah otak), membawa enzim ke tempat tertentu (misalnya, untuk terapi atau untuk membuat obat di tempat) atau membawa racun ke target tertentu untuk terapi (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).



Gambar 2.2.2.1. Modifikasi Antibodi Natural dan Rekombinan. Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

2.2.2.2. Fragmen Antibodi Rekombinan.

Fragmen antibodi rekombinan lebih kecil seperti fragmen antibodi monovalen klasik (Fab, scFv, dll) muncul sebagai alternatif. Fragmen antibodi rekombinan dikenal sebagai diabodies, triabodies dan minibodies. Fragmen ini memiliki target khusus dari keseluruhan mAbs, dapat diproduksi lebih ekonomis serta memiliki berbagai aplikasi diagnostik dan terapi (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).

Fusi protein untuk antibodi rekombinan dibagi dua kelompok :

1. Fusi Fab dan F(ab)₂, di mana tempat pengikat antigen tunggal atau ganda dipertahankan dan mitra fusi menggantikan atau terikat dengan domain Fc.
2. Fusi Fc (immuno-adhesions), di mana tempat pengenalan antigen digantikan oleh mitra fusi, namun regio Fc dipertahankan. Fusi Fc akan mempertahankan fungsi efektor dan waktu paruhnya lebih lama (Amersham Biosciences, 2001; Abbas, *et al.*, 2012).

2.2.3. Asal Bahan Pemeriksaan Antibodi

Asal bahan pemeriksaan antibodi bisa didapatkan dari : pertama, sekret servik uteri sebagai sumber sIgA dan kedua, serum darah tepi wanita infertil sebagai sumber IgG.

2.3. Isolasi dan Pemurnian Protein

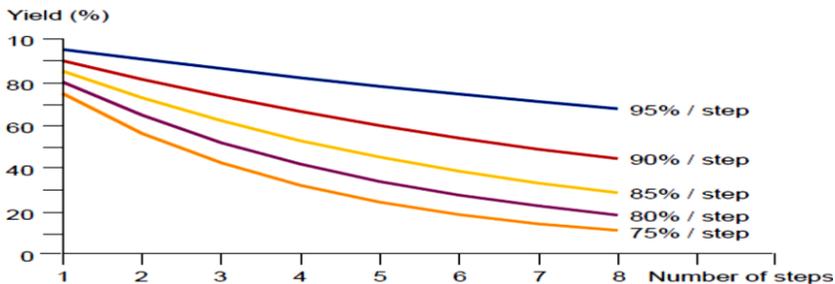
2.3.1. Preparasi Protein

Protein adalah molekul yang gampang rusak bila berada diluar kondisi fisiologisnya. Oleh karena itu, untuk mempertahankan struktur dan fungsi protein, fraksinasi dilakukan dalam bufer pada 0-4°C dan pH tertentu (tergantung jenis protein yang dianalisis) (Amersham Biosciences, 2001; Sri Widyarti, 2011b). Substrat pada tabel 2.3.1. digunakan untuk menjaga agar kondisi lingkungan protein selama proses pemurnian tetap terjaga sehingga struktur dan fungsinya dapat dipertahankan (Amersham Biosciences, 2001).

Tabel 2.3.1. Substrat untuk preparasi sampel (Bufer).

	<i>Typical conditions for use</i>	<i>Purpose</i>
Buffer components		
		<i>Maintain pH.</i>
<i>Tris</i>	<i>20 mM, pH 7.4</i>	<i>Minimize acidification caused by lysosomal disruptions</i>
<i>NaCl</i>	<i>100 Mm</i>	<i>maintain ionic strength of medium</i>
<i>EDTA</i>	<i>10 Mm</i>	<i>reduce oxidation damage, chelate metal ions</i>
<i>Sucrose or glucose</i>	<i>25 mM</i>	<i>stabilize lysosomal membranes.</i>
<i>Detergents</i>		<i>reduce protease release</i>
<i>ionic or non-ionic detergents</i>	<i>See Table 10</i>	<i>extraction and purification of integral membrane proteins</i>
<i>DNase and Rnase</i>	<i>1 pg/ml</i>	<i>solubilisation of poorly soluble proteins</i>
Protease inhibitors		<i>degradation of nucleic acids. remove viscosity of sample solution</i>
		Inhibits
<i>PMSF</i>	<i>0.5-1 Mm</i>	<i>serine proteases</i>
<i>APMSF</i>	<i>0.4-4 Mm</i>	<i>serine proteases</i>
<i>Benzamide-HO</i>	<i>0.2 mM</i>	<i>serine proteases</i>
<i>Pepstatin</i>	<i>1 Mm</i>	<i>aspartic protease</i>
<i>Leupeptin</i>	<i>100 Mm</i>	<i>cysteine and serine proteases</i>
<i>Chymostatin</i>	<i>100 μM</i>	<i>Chymostatin, pepsin. cysteine protease</i>
<i>Antipain-HCl</i>	<i>100 Mm</i>	<i>papain. cysteine and serine proteases</i>
<i>EDTA</i>	<i>2 - 10 mM</i>	<i>metal dependent proteases. zinc and Iron</i>
<i>EGTA</i>	<i>2 - 10 mM</i>	<i>metal dependent proteases e.g. calcium</i>
Reducing agents		
<i>1,4 dithiothreitol,</i>		
<i>DTT</i>	<i>1-10 mM</i>	<i>Keep cysteine residues reduced</i>

Semakin banyak tingkat pemurnian yang dilakukan maka akan semakin sedikit hasil yang tersisa dari proses tersebut, seperti ditunjukkan pada gambar 2.3.2 (Amersham Biosciences, 2001).



Gambar 2.3.2. Hasil akhir bahan dari pemurnian banyak tingkat. Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

Untuk proses pemurnian, protein harus diekstrak dari sel. Sel dipecah dengan : shock osmotik, getaran ultrasonik, dipaksa melewati lubang kecil, atau diblender, selengkapnya seperti pada tabel 2.3.2. Prosedur ini merusak membran sel menjadi fragmen berbentuk vesikel kecil dan menyisahkan organel seperti nukleus, mitokondria, aparatus golgi, lisosom, peroksisom (Sri Widyarti, 2011b). Suspensi sel yang mengendap disebut homogenat atau ekstrak. Media homogenisasi harus dipilih dengan cermat agar setiap komponen yang terbentuk tetap sifat biokimia aslinya (Alberts, *et al.*, 2008).

Tabel 2.3.2. Proses Ekstraksi Sampel.

Extraction process	Typical conditions	Protein source	Comment
Gentle Cell lysis (osmotic shock)	2 volumes water to 1 volume packed pre-washed cells	erythrocytes, <i>E.coli</i> periplasm: intracellular proteins	lower product yield but reduced protease Release
Enzymatic digestion	lysozyme 0.2 mg/ml, 37 °C, 15 mins.	bacteria: intracellular proteins	lab scale only, often combined with mechanical disruption
Hand homogenisation	follow equipment instructions	liver tissue	
Mincing (grinding)	follow equipment instructions	Muscle	
Moderate Blade homogeniser	follow equipment instructions	muscle tissue, most animal tissues, plant tissues	
Grinding with abrasive e.g. sand	follow equipment instructions	bacteria, plant tissues	
Vigorous Ultrasonication or bead milling	follow equipment instructions	cell suspensions: intracellular proteins in cytoplasm, periplasm, inclusion bodies	small scale, release of nucleic acids may cause viscosity problems Inclusion bodies must be resolubilised
Manton-Gaulin homogeniser	follow equipment instructions	cell suspensions	large scale only
French press	follow equipment instructions	bacteria, plant cells	
Fractional precipitation	see section on fractional precipitation	extracellular. secreted recombinant proteins, monoclonal antibodies, cell lysates	precipitates must be resolubilised

Details from Protein Purification, Principles and Practice, R.K. Scopes and other sources.

Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

Komponen homogenat harus dipisahkan (fraksinasi) dengan *ultracentrifuge preparatif*. Perlakuan ini memisahkan

komponen sel sesuai ukuran dan kepadatannya. Pada kecepatan relatif rendah, komponen besar seperti sedimen inti membentuk pelet di dasar tabung centrifuge, dengan kecepatan sedikit lebih tinggi, terjadi pelet mitokondria, dan pada kecepatan yang lebih tinggi dan dengan waktu yang lebih lama sentrifugasinya, pertama akan terbentuk pelet vesikel kecil tertutup dan kemudian ribosom. Semua fraksi ini tidak murni, banyak kontaminan, yang dapat dihilangkan dengan meresuspensi pelet dan mengulangi prosedur sentrifugasi beberapa kali (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widyarti, 2011b).

Sentrifugasi adalah langkah pertama fraksinasi. Pemisahan yang lebih halus dapat dicapai dengan membuat lapisan homogenat dalam band tipis di atas larutan garam encer. Ketika disentrifugasi, berbagai komponen dalam campuran bergerak sebagai rangkaian pita berbeda melalui larutan garam dalam proses yang disebut *velocity sedimentation*. Agar pita yang terbentuk tidak bercampur kembali perlu ditambahkan larutan gradien sukrosa, sehingga komponen sel yang berbeda terpisah dalam pita yang berbeda. *Ultracentrifuge* juga digunakan untuk memisahkan komponen sel berdasarkan kepadatan apung yang disebut *equilibrium sedimentation*. Sampel diendapkan melalui gradien sukrosa atau cesium klorida (Alberts, *et al.*, 2008). Dengan sentrifugasi, debris serta organel sel mengendap di dasar tabung sentrifus (pelet), sedangkan makromolekul (termasuk protein) dengan ukuran jauh lebih kecil dari debris dan organel sel tidak mengendap tetapi larut dalam bufer (supernatan). Supernatan yang didapatkan digunakan sebagai sampel untuk analisis protein dalam jaringan (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widyarti, 2011b).

2.3.3. Presipitasi Protein

Presipitasi protein dapat dilakukan dalam beberapa cara sesuai dengan sifat protein yang ditargetkan, seperti yang disajikan pada tabel 2.3.3 di bawah ini.

Tabel 2.3.3. Metode Presipitasi Protein.

Precipitation agent	Typical conditions for use	Sample type	Comment
Ammonium sulphate	as described below	>1mg/ml proteins especially immuno globulins	stabilizes proteins, no denaturation, supernatant can go directly to HIC. Reduce lipid content
Dextran sulphate	Add 0.04 ml of 10% dextran sulphate and 1ml of 1M CaCl ₂ /ml of sample, mix 15 min. Centrifuge at 10.000xg. discard pellet.	samples with high levels of lipoprotein, e.g ascites	precipitates lipoprotein
Polyvinylpyrrolidone	Add 3% (w/v), stir 4 hours, centrifuge at 17.000xg, discard pellet	samples with high levels of lipoprotein, e.g ascites	alternative to dextran sulphate
Polyethylene glycol (PEG, M.W. >4000)	up to 20% wt/vol	plasma proteins	no denaturation, supernatant goes direct to IEX or AC. Complete removal may be difficult. Stabilizes proteins.
Acetone	up to 80% (v/v) 0°C. Collect pellet after centrifugation at full speed in a microcentrifuge		may denature protein irreversibly. useful for peptide precipitation or concentration of sample for electrophoresis
Polyethyleneimine	0.1 % (w/v)		precipitates aggregated nucleoproteins
Protamine sulphate	1% (w/v)		precipitates aggregated nucleoproteins
Streptomycin sulphate acids	1% (w/v)		precipitation of nucleic acids
Caprylic acid	1.15 (w/w)	Antibody concentration should be > 1 mg/ml	Precipitates bulk of proteins from sera or ascites. Leaving immunoglobulins in solution

Details taken from Protein Purification, Principles and Practice, R.K. Scopes. 1994, Springer., Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, 2nd. Ed. John Wiley and Sons. Inc. New York (1998).

Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001; GE Healthcare BioSciences, 2002.

2.3.3.1. Presipitasi Ammonium Sulfat

Presipitasi amonium sulfat sering digunakan untuk pembersihan dan mengkonsentrasikan sampel awal. Metode ini sangat efektif untuk menghilangkan albumin, transferin dan kontaminan yang sangat larut lainnya. Prinsip metode ini untuk meningkatkan konsentrasi amonium sulfat ke tingkat di mana antibodi akan mulai “salting out”. Antibodi yang berbeda “salt out” pada konsentrasi yang berbeda, proses yang dapat digunakan manfaatnya untuk menghilangkan kontaminasi protein dari ekstrak kasarnya. Konsentrasi garam harus dioptimalkan untuk menghilangkan kontaminan dan antibodi yang tidak diinginkan. Langkah tambahan dengan peningkatan konsentrasi garam kemudian memicu presipitasi antibodi. Jika antibodi tidak dapat diendapkan dan dilarutkan kembali dengan aman, hanya langkah pertama yang harus digunakan. Jumlah amonium sulfat yang diperlukan untuk mencapai tingkat kejenuhan bervariasi sesuai dengan temperatur seperti ditunjukkan pada tabel 2.3.3.1 (GE Healthcare BioSciences, 2002; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widyarti, 2011b).

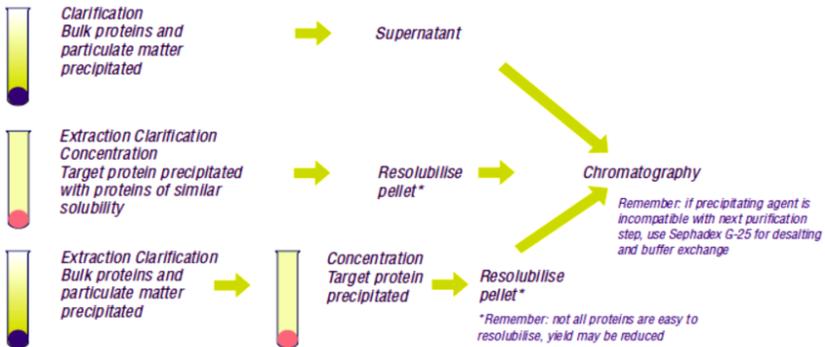
Tabel 2.3.3.1. Amonium Sulfat yang dibutuhkan untuk derajat saturasi pada suhu 20°C

Starting percent saturation	Final percent saturation to be obtained																		
	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100		
	Amount of ammonium sulphate to add (grams) per liter of solution at 20 °C																		
0	113	144	178	208	242	277	314	351	390	430	472	516	561	608	657	708	781		
5	85	115	148	179	212	248	282	319	358	397	439	481	528	572	621	671	723		
10	57	88	117	149	182	218	251	287	325	384	405	447	491	537	584	634	885		
15	28	58	88	119	151	185	219	255	293	331	371	413	456	501	548	598	647		
20	0	29	59	89	121	154	188	223	260	298	337	378	421	485	511	559	809		
25		0	29	60	91	123	157	191	228	265	304	344	388	429	475	522	571		
30			0	30	81	92	125	100	195	232	270	309	351	393	438	485	533		
35				0	30	62	94	128	163	199	236	275	316	358	402	447	495		
40					0	31	63	98	130	186	202	241	281	322	365	410	457		
45						0	31	64	98	132	100	206	245	288	329	373	419		
50							0	32	65	90	135	172	210	250	292	335	381		
55								0	33	66	101	138	175	215	258	298	343		
60									0	33	67	103	140	179	219	281	305		
65										0	34	89	105	143	183	224	287		
70											0	34	70	107	146	186	228		
75												0	35	72	110	149	190		
80													0	38	73	112	152		
85														0	37	75	114		
90															0	37	78		
95																0	38		

2.3.3.2. Presipitasi Asam Kaprilat

Asam Kaprilat (*oktanoat*) seefektif amonium sulfat dan dapat digunakan untuk mengendapkan sebagian besar protein dari serum dan ascites. Asam kaprilat adalah salah satu dari asam lemak yang telah dievaluasi untuk presipitasi antibodi dan asam lemak hanya digunakan untuk pengendapan antibodi monoklonal. Penggunaan asam kaprilat membantu menghindari pembentukan agregat protein (GE Healthcare BioSciences, 2002).

Teknik presipitasi dipengaruhi suhu, pH dan konsentrasi sampel. Parameter ini harus dikontrol untuk meyakinkan hasil yang dapat direproduksi. Presipitasi dapat digunakan dalam tiga cara berbeda, seperti ditunjukkan pada gambar 2.3.3 di bawah ini.

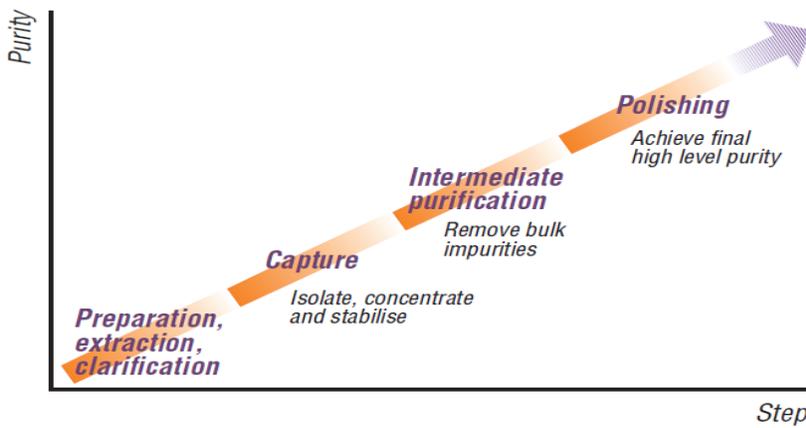


Gambar 2.3.3. Tiga cara pemakaian Presipitasi. Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

2.3.4. Pemurnian Protein

Pemurnian protein digunakan untuk mengenali jenis dan sifat protein yang dikandung organisme. Tahapan pemurnian protein terdiri dari 3 tingkat sesuai dengan tingkat pemurnian protein bergantung pada penggunaan atau identifikasi protein dimaksud, seperti terlihat pada gambar 2.3.4 dan tabel 2.3.4 di bawah (Amersham Biosciences, 2001):

1. Fase *Capture* bertujuan mengisolasi, mengkonsentrasi dan menstabilkan produk target.
2. Fase *Intermediate Purification* bertujuan menghilangkan sebagian besar massa yang tidak murni seperti protein, asam nukleat, endotoksin dan virus.
3. Fase *Polishing* bertujuan untuk mencapai kemurnian tinggi dengan menghilangkan ketidakmurnian samar (Amersham Biosciences, 2001; GE Healthcare BioSciences, 2002).



Gambar 2.3.4. Preparasi dan Strategi Tiga Fase Pemurnian. Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

Tabel 2.3.4. Tingkat pemurnian protein terhadap pemanfaatan protein.

Tingkat Pemurnian	Pemanfaatan
<i>Extremely high</i> >99 %	<i>Theraupetic use, in vivo studies</i>
<i>High</i> 95-99 %	<i>Xray crystallography and most physico-chemical characterisation methods</i>
<i>Moderate</i> < 95 %	<i>Antigen for antibody production</i> <i>N-terminal sequencing</i>

Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

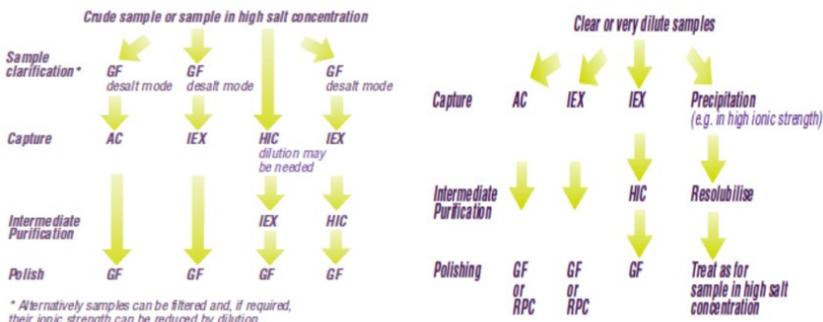
Protein merupakan molekul yang sangat heterogen. Protein sangat tidak stabil ketika berada di luar makhluk hidup. Tiap jenis protein butuh kondisi tertentu untuk mempertahankan fungsinya ketika diekstraksi. Protein yang diekstraksi supaya dihindarkan dari proteolisis atau aktivitas enzimatisnya dipertahankan. Untuk memenuhi hal ini maka dibutuhkan pelarut tertentu sesuai dengan kebutuhan tiap protein, seperti pada tabel 2.3.1 dan tabel 2.3.4.1 di bawah ini (Amersham Biosciences, 2001; Sri Widyarti, 2011b).

Tabel 2.3.4.1. Sifat protein dan pengaruh proses pemurnian.

<i>Sample and target protein properties</i>	<i>Influence on purification strategy</i>
<i>Temperature stability</i>	<i>Need to work rapidly at lowered temperature</i>
<i>pH stability</i>	<i>Selection of buffers for extraction and purification</i>
<i>Organic solvents stability</i>	<i>Selection of conditions for ion exchange, affinity or reversed phase chromatography</i>
<i>Detergent requirement</i>	<i>Selection of conditions for reversed phase chromatography</i>
<i>Salt (ionic strength)</i>	<i>Consider effects on chromatographic steps and the need for detergent removal. Consider choice of detergent.</i>
<i>Co-factors for stability or activity</i>	<i>Selection of conditions for precipitation techniques, ion exchange and hydrophobic interaction chromatography</i>
<i>Protease sensitivity</i>	<i>Selection of additives, pH, salts, buffers</i>
<i>Sensitivity to metal ions</i>	<i>Need for fast removal of proteases or addition of inhibitors</i>
<i>Redox sensitivity</i>	<i>Need to add EDTA or EGTA to buffers</i>
<i>Molecular weight</i>	<i>Need to add reducing agents</i>
<i>Charge properties</i>	<i>Selection of gel filtration media</i>
<i>Biospecific affinity</i>	<i>Selection of ion exchange conditions</i>
<i>Post translational modifications</i>	<i>Selection of ligand for affinity medium</i>
<i>Hydrophobicity</i>	<i>Selection of group-specific affinity medium</i>
	<i>Selection of medium for hydrophobic interaction chromatography</i>

Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

Protein paling sering difraksinasi dengan kromatografi kolom. Protein yang berbeda akan tertinggal pada area yang berbeda karena berinteraksi dengan matrik dan dikumpulkan secara terpisah. Tergantung pilihan matriknya, protein dipisahkan sesuai muatan listrik (pertukaran ion kromatografi), hidrofobisitas (kromatografi hidrofobik), ukuran (kromatografi gel filtrasi), atau kemampuan mengikat molekul tertentu (kromatografi afinitas), *High performance liquid chromatography column (HPLC)* digunakan untuk mendapatkan hasil dengan resolusi tinggi. Pada *HPLC*, pencampuran zat terlarut sangat cepat dengan bola kecil didalamnya, sehingga zat terlarut dengan afinitas berbeda terhadap matrik terpisah secara efisien dengan laju aliran sangat cepat. *HPLC* merupakan metode pilihan untuk memisahkan banyak protein dan molekul kecil (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widyarti, 2011a; Abbas, *et al.*, 2012). Untuk protein dalam plasma atau serum darah, karena protein sudah terlarut, maka hanya diperlukan sentrifugasi untuk mengendapkan sel darah sehingga protein yang larut dalam plasma atau serum tersedia dalam supernatan (Sri Widyarti, 2011b). Seleksi strategi pemisahan yang dipergunakan tergantung sifat sampel dan tingkat kemurnian yang diinginkan. Kombinasi logis dari teknik yang ada ditunjukkan pada gambar 2.3.4.1 di bawah ini (Amersham Biosciences, 2001).



Gambar 2.3.4.1. Kombinasi logis langkah kromatografi. Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

2.3.5. Penyimpanan Sampel Protein

Penyimpanan sampel protein bersifat individual. Sifat sampel harus dipertimbangkan sebelum mengikuti salah satu rekomendasi berikut :

2.3.5.1. Rekomendasi Umum :

Suhu lingkungan sampel dipertahankan 4°C dan disimpan dalam wadah tertutup untuk meminimalkan pertumbuhan bakteri dan aktivitas protease. Untuk penyimpanan jangka lama pada suhu 4°C (>24 jam) perlu ditambah agen preservasi (misal merthiolate 0,01%). Serum, supernatan kultur dan ascites harus disimpan beku (-20/-70°C) dalam aliquot kecil. Pembekuan / pencairan berulang terhadap sampel protein dapat mengurangi aktivitas biologis. Kondisi yang mendekati batas stabilitas (seperti pH, konsentrasi garam, agen pereduksi atau agen chelating) sebaiknya dihindari (GE Healthcare BioSciences, 2002).

2.3.5.2. Kondisi Umum Penyimpanan Protein yang Dimurnikan

Penambahan agen penstabil, seperti gliserol (5-20%), serum albumin (10mg/ml), ligan (konsentrasi sesuai dengan protein aktif) dapat mempertahankan aktivitas biologis protein. Endapan disimpan dalam ammonium sulfat konsentrasi tinggi (4,0 M). Enzim sebaiknya dibekukan dalam gliserol 50%. Perlu diketahui bahwa bahan aditif apapun akan mengurangi kemurnian protein dan perlu dihilangkan pada tahap berikutnya. Produk yang akan digunakan untuk uji biologis atau percobaan in vivo sebaiknya jangan menggunakan agen preservatif. Waktu penyimpanan dapat diperpanjang dengan melakukan filtrasi secara steril. Protein tertentu, termasuk IgG3 tikus, tidak boleh disimpan pada suhu 4°C karena akan mengendap (*cryoproteins*). Protein tersebut disimpan pada suhu kamar dengan penambahan agen preservatif (GE Healthcare BioSciences, 2002).

2.4. Pemurnian Antibodi

2.4.1. Sumber dan Kontaminan Sampel

Antibodi dan fragmen antibodi bisa didapatkan dari sumber natural dan rekombinan. Pemilihan sumber bahan mempengaruhi pemilihan teknik persiapan dan pemurnian sampel karena perbedaan kontaminan spesifik dan kuantitas target molekul yang dibutuhkan (GE Healthcare BioSciences, 2002; Abbas, *et al.*, 2012). Sumber kontaminan antibodi dapat dilihat pada tabel 2.4.1 di bawah ini.

Tabel 2.4.1. Sumber Kontaminan Antibodi Natural dan Rekombinan.

	Molecular types	Quantity	Significant contaminants
Source native			
<i>Human serum</i>	<i>Polyclonal</i>	<i>IgG 8-16 mg/ml</i>	<i>Albumin, transferrin. α2 mroglobulin. and other serum proteins</i>
	<i>IgG. IgM.</i>	<i>IgM 0.5-2 mg/ml</i>	
	<i>IgA. IgD,</i>	<i>IgA 1-4 mg/ml</i>	
	<i>IgE</i>	<i>IgE 10-400 ng/ml</i> <i>IgD > 0.4 mg/ml</i>	
<i>Hybridoma: cell culture supernatant</i>	<i>Monoclonal</i>	<i>Up to 1 mg/ml</i>	<i>Phenol red, albumin. transferrin. bovine IgG, α2 mroglobulin, other serum proteins, viruses</i>
	<i>l</i>		
<i>Hybridoma: cell culture supernatant, serum-free</i>	<i>Monoclonal</i>	<i>1-4 mg/ml</i>	<i>Albumin. Transferrin(often added as supplements)</i>
	<i>l</i>		
<i>Ascites</i>	<i>Monoclonal</i>	<i>1-15 mg/ml</i>	<i>Lipids. albumin. transferrin. lipoproteins. endogenous IgG. other host proteins</i>
	<i>l</i>		
<i>Egg yolk</i>	<i>IgY</i>	<i>3-4 mg/ml</i>	<i>Lipids. lipoproteins. Vitellin</i>
Source recombinant			
<i>Extracellular protein expressed into Supernatant</i>	<i>Tagged antibodies. antibody fusion proteins. Fab. or</i>	<i>Depends upon expression system</i>	<i>Proteins from the host. e.g.. E. cotr. General low level of Contamination</i>

<i>Intracellular protein expression</i>	<i>Flab'), fragments</i>	<i>Depends upon expression system</i>	<i>Proteins from the host.e.g.. E. col., Phage</i>
---	--------------------------	---------------------------------------	--

Dikutip dari GE Healthcare BioSciences, 2002.

2.4.2. Ekstraksi Antibodi Rekombinan dan Fragmen Antibodi

Sumber dan lokasi molekul antibodi rekombinan menentukan prosedur ekstraksi yang akan dipakai. Sumber asal dari bakteri atau mamalia, sistem ekspresi antar atau intraseluler mengeluarkan produk larut atau badan inklusi yang memiliki tuntutan khusus (Alberts, *et al.*, 2008). Komponen bufer memberikan kondisi ekstraksi yang optimal. Tabel 2.3.1 di atas menunjukkan beberapa ulasan umum tentang bufer dan bahan aditif yang digunakan dalam proses ekstraksi antibodi (GE Healthcare BioSciences, 2002).

Pemilihan teknik ekstraksi tergantung pada peralatan yang tersedia dan skala operasinya. Contoh proses ekstraksi secara umum ditunjukkan pada tabel 2.3.3 di atas dengan menggunakan prosedur selembut mungkin, karena adanya trade off (pertukarkan) antara efisiensi ekstraksi dan risiko degradasi proteolitik. Ekstraksi harus dilakukan cepat pada suhu *subambient* dengan bufer yang sesuai untuk mempertahankan pH, kekuatan ionik dan kestabilan sampel. Jika lisat terlalu kental karena konsentrasi asam nukleatnya tinggi lakukan sonikasi di atas es lebih lama, atau ikuti prosedur berikut (A-C) (GE Healthcare BioSciences, 2002; Alberts, *et al.*, 2008) :

- A. Penambahkan DNase I dengan konsentrasi akhir 10 µg/ml atau
- B. Penambahkan RNase A dengan konsentrasi akhir 10 µg/ml dan DNase I sampai 5 µg/ml, dan diinkubasi dengan es selama 10-15 menit atau
- C. Lisat dilewatkan melalui jarum suntik beberapa kali untuk menghindari penambahan enzim.

2.5. Persiapan Sampel sebelum Proses Pemurnian

Persiapan utama sampel sebelum pemurnian adalah klarifikasi meliputi sentrifugasi dan filtrasi. Sentrifugasi dan penyaringan merupakan teknik klarifikasi rutin sampel kecil dari sumber manapun segera sebelum proses pemurnian kromatografi. Lipid dan lipoprotein harus dihilangkan sebelum proses pemurnian karena akan menyumbat kolom kromatografi. Fenol merah sebagai indikator pH dapat mengikat ke media kromatografi sehingga disarankan untuk dihilangkan sebelum pemurnian (GE Healthcare BioSciences, 2002; Alberts, *et al.*, 2008).

2.5.1. Sentrifugasi dan Penyaringan Sampel

Sentrifugasi digunakan untuk menghilangkan banyak partikel, seperti debris sel. Sampel dengan volume kecil atau protein yang terserap ke filter disentrifus $10.000\times g$ selama 15 menit. Untuk sel lisat disentrifus $40.000-50.000\times g$ selama 30 menit (atau 10-15 menit jika diperlukan *handling* yang singkat). Proses sentrifugasi memerlukan pendinginan sentrifus dan rotor dengan menyimpan di ruang dingin (GE Healthcare BioSciences, 2002; Alberts, *et al.*, 2008).

Jika sampel belum jernih setelah sentrifugasi perlu dilakukan penyaringan dengan filter $5\ \mu\text{m}$ sebagai langkah awal kemudian dilakukan penyaringan kedua dengan filter seperti dalam tabel 2.5.1. Sampel serum disaring dengan *glasswool* setelah sentrifugasi untuk menghilangkan lemak yang tersisa. Penyaringan digunakan untuk menghilangkan partikel. Membran filter yang mengikat protein nonspesifik terdiri dari selulosa asetat atau *polyvinylidene fluoride (PVDF)*. Pemulihan target protein diperiksa dalam tiap uji coba (GE Healthcare BioSciences, 2002; Alberts, *et al.*, 2008).

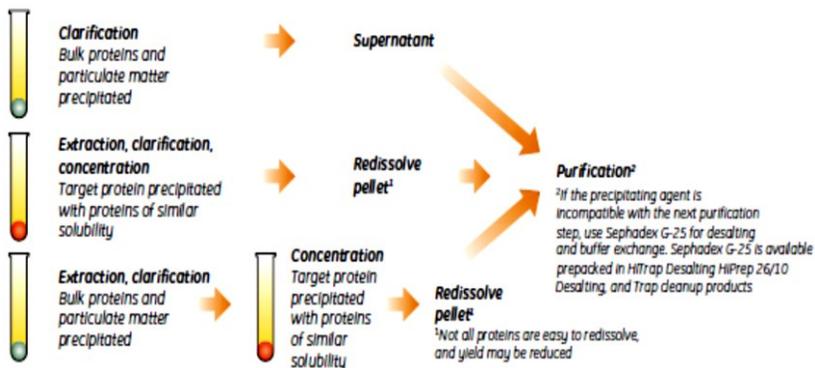
Tabel 2.5.1. Seleksi Ukuran Pori Filter

<i>Nominal pore size of filter</i>	<i>Particle size of chromatographic medium</i>
1 μm	90 μm and greater
0.45 μm	30 or 34 μm
0.22 μm	3,10,15 μm , or when extra-clean samples or sterile filtration is required

Dikutip dari GE Healthcare BioSciences, 2002.

2.5.2. Presipitasi Antibodi

Teknik presipitasi dipengaruhi suhu, pH dan konsentrasi sampel. Parameter ini harus dikontrol untuk memastikan hasilnya dapat direproduksi. Kebanyakan teknik presipitasi tidak cocok untuk preparasi skala besar. Tiga cara presipitasi untuk kotoran berukuran besar ditunjukkan pada gambar 2.5.1 di bawah ini, sedangkan metode presipitasinya seperti ditunjukkan pada tabel 2.3.3 di atas.



Gambar 2.5.1. Tiga cara presipitasi fraksional untuk menghilangkan kotoran besar. Dikutip dari GE Healthcare BioSciences, 2002.

2.5.2.1. Teknik Immunopresipitasi Antibodi

Target protein dapat dilakukan isolasi dan diperkaya dari sel lisat dengan immunopresipitasi. Pada tahap kedua,

antibodi immobil digunakan menangkap dan pengayaan target protein. Target protein dapat diperkaya ratusan kali, tergantung spesifisitas antibodi. Prosedur immunopresipitasi harus optimal untuk mendapatkan hasil terbaik. Pilihan kondisi sel lisis sangat penting berkaitan dengan jenis sel dan antigen yang digunakan. Sel tanpa dinding sel mudah terganggu dengan deterjen ringan, sedang sel lain butuh mekanika geser, seperti sonikasi atau homogenisasi *dounce*. Lihat tabel 2.3.1 di atas guna memilih media yang cocok untuk sumber dan subtype antibodi. Teknik presipitasi yang digunakan dapat dilihat pada tabel 2.3.3.1 (GE Healthcare BioSciences, 2002; Abbas, *et al.*, 2012).

2.5.2.2. Kondisi Sel Lisis

Pelisisan sel harus cukup kuat untuk melepaskan target antigen, tapi cukup ringan untuk mempertahankan imunoreaktivitasnya. Bufer lisis yang dipakai tercantum pada tabel 2.5.2.2.1. *RIPA (Radio Immunoprecipitation Assay)* melepaskan protein sitoplasma atau inti dan paling larut tanpa melepaskan DNA kromosom. *RIPA* merupakan pilihan yang baik untuk perlakuan awal (GE Healthcare BioSciences, 2002).

Tabel 2.5.2.2.1. Bufer Lisis.

Buffers and Contents solutions	Ability to disrupt cells
Lysis buffers	
<i>Low salt</i>	1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF +
<i>NP-40(IGRPAL CA-630)</i>	150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF ++
<i>RIPA</i>	150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.5% Sodium deoxycholate (DOC), 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF +++
<i>High salt</i>	500 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 50 mM Tris, pH 8.0, 1 mM PMSF ++++
Other buffers and solutions	

PBS	1 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.4
Wash buffer	50 mM Tris, pH 8.0
Sample buffer (reducing)	1% SDS, 100 mM DTT, 50 mM Tris, pH 7.5

Dikutip dari GE Healthcare BioSciences, 2002.

Banyak parameter yang mempengaruhi proses ekstraksi antigen meliputi konsentrasi garam (0-1M), deterjen nonionik (0,1-2%), deterjen ionik (0,01-0,5%) seperti yang tampak pada tabel 2.5.2.2.2 di bawah ini dan juga pH (6-9) (GE Healthcare BioSciences, 2002).

Tabel 2.5.2.2.2. Deterjen ionik dan non-ionik.

Detergent	Concentrate	Effect
<i>Sodium dodecyl sulphate</i>	0.1-0.50%	<i>denatures protens, used for SDS-PAGE use non-ionic detergents to avavoid denaturation non-ionic detergent for membrane solubilisation. Note: may absorb strongly at 280 nm</i>
<i>Triton X-100</i>	0.1%	-
<i>NP-40</i>	0.05-2%	-
<i>Dodecyl β D-matoslde</i>	1%	-
<i>Octyl β D-glucoside</i>	1-1.5%	-

For further Information on detergents: Protein Purification Principles, High Resolution Method and Application, J-C. Janson and L. Ryden. 1998. 2nd ed Wley VCH

Dikutip dari Amersham Biosciences, 2001.

2.5.2.3. Pilihan Antibodi

Serum poliklonal mengandung antibodi terhadap beberapa epitop antigen. Antibodi ini membantu menstabilkan kompleks antigen antibodi, tetapi membuat masalah dengan latar belakang yang gelap selama analisis. Antibodi monoklonal (mAbs) lebih spesifik dapat mengurangi kegelapan pada latar belakang, tetapi pembentukan kompleks

imun kurang stabil karena afinitasnya rendah. Hal ini dapat diatasi dengan tampungan dengan mAbs yang berbeda (GE Healthcare BioSciences, 2002).

2.5.2.4. Resolubilisasi Presipitat Antibodi

Banyak antibodi mudah dilarutkan kembali dengan bufer untuk digunakan pada langkah kromatografi berikutnya. Agen denaturasi diperlukan untuk melarutkan antibodi yang sulit larut. Agen denaturasi yang dapat digunakan ditunjukkan pada tabel 2.5.2.4 di bawah. Tetapi agen denaturasi harus dihilangkan untuk *refolding* antibodi dan pemulihan ukuran serta aktifitasnya. Kromatografi seringkali menghilangkan agen denaturasi selama pemurnian (GE Healthcare BioSciences, 2002; Alberts, *et al.*, 2008).

Tabel 2.5.2.4. Agen Denaturasi.

Denaturing agent	Typical conditions for use	Removal / comment
Urea	2 - 8 M	remove using Sephadex G-25
Guanidine hydrochloride	3 - 8 M	remove using Sephadex G-25 or during IEX
Triton X-100	2%	remove using Sephadex G-25 or during IEX
Sarcosyl	1.50%	remove using Sephadex G-25 or during IEX
N-octyl glucoside	2%	remove using Sephadex G-25 or during IEX exchange for non-ionic detergent during first chromatographic step, avoid anion exchange chromatography
Sodium dodecyl sulphate	0.1-0.50% > pH 9,	may need to adjust pH during chromatography to maintain solubility
Alkaline pH	NaOH	chromatography to maintain solubility

Details taken from Protein Purification, Principles and Practice, R.K. Scopes. 1994, Springer., Protein Purification, Principles, High Resolution Methods and Applications, J-C. Janson and L. Ryden, 1998, 2nd ed. Wiley VCH and other sources

Dikutip dari GE Healthcare BioSciences, 2002.

2.5.2.5. Desalting dan Bufer Penukar

Desalting merupakan metode yang sudah terbukti, sederhana dan cepat yang akan menghilangkan kontaminan

dengan berat molekul rendah dan mentransfer sampel ke bufer yang diinginkan dalam satu langkah. *Desalting* dan atau bufer penukar digunakan sebelum dan atau diantara proses pemurnian. Setiap penambahan langkah pada proses pemurnian dapat menurunkan hasil akhir. *Desalting* akan menambah volume sampel sedangkan sentrifugasi tidak menambah volume sampel. Garam dan senyawa molekul rendah lain dihilangkan dari protein dengan berat molekul >5000. Pemisahan dengan kecepatan dan kapasitas tinggi dapat memproses dengan cepat dan efisien volume sampel yang banyak. Konsentrasi sampel tidak mempengaruhi proses pemisahan asalkan konsentrasi antibodi tidak >70 mg/ml dalam kondisi stabil dan larut (GE Healthcare BioSciences, 2002).

Ketika *desalting* dilakukan pada kromatografi pertama, sampel harus diklarifikasi dulu dengan sentrifugasi dan atau filtrasi. 100 mM amonium asetat atau 100 mM amonium karbonat hidrogen digunakan ketika diperlukan bufer yang mudah menguap. Keunggulan *desalting* dibandingkan dialisis yang merupakan teknik lambat, membutuhkan volume bufer besar dan risiko kehilangan bahan selama penanganan (GE Healthcare BioSciences, 2002; Abbas, *et al.*, 2012). Pada skala laboratorium, bufer penukar dan *desalting* dihilangkan ketika sampel sudah cukup bersih setelah penyaringan atau sentrifugasi. Untuk kromatografi afinitas (AC) atau kromatografi penukar ion (IEX), cukup menyesuaikan pH sampel dan kekuatan ionik sampel. Bufer penukar dapat dihindari dengan pengenceran untuk mengurangi kekuatan ion, penambahan amonium sulfat sebelum kromatografi interaksi hidrofobik (HIC) atau titrasi untuk mengatur pH (GE Healthcare BioSciences, 2002; Prabha, *et al.*, 2010).

2.5.3. Strategi Pemurnian Multistep

Langkah pemurnian sangat tergantung sifat bahan awal. Keuntungan bekerja dengan antibodi natural atau rekombinan

adalah informasi tentang produk serta kontaminan utama tersedia cukup seperti pada tabel 2.2.1 dan tabel 2.2.2 di atas. Teknik pemisahan dan kondisi elusi dapat dipilih untuk menghasilkan produk yang sangat murni dengan sedikitnya dua langkah pemurnian. Pemilihan dan kombinasi teknik pemurnian yang optimal untuk *capture*, *intermediate purification* dan *polishing* sangat penting untuk pemurnian yang efisien (GE Healthcare BioSciences, 2002).

2.6. Karakterisasi Protein

Protein melakukan banyak proses dalam sel diantaranya adalah mengkatalisis reaksi metabolik, menghidrolisis nukleotida untuk melakukan pekerjaan mekanik dan berfungsi sebagai elemen struktural utama sel (Alberts, *et al.*, 2008). Tes analisis sangat penting untuk mengikuti perkembangan pemurnian, untuk menilai efektifitas setiap langkah, pemulihan biologi, aktifitas dan optimasi kondisi eksperimental. Fraksi kromatografi memastikan bahwa bufer yang digunakan tidak mengganggu pengujian tersebut. Kemurnian diperkirakan dengan *SDS-PAGE (Sodium Dodecyl PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)*, *IEF (isoelectric focusing)*, elektroforesis kapiler, kromatografi fase terbalik atau spektrometri massa (GE Healthcare BioSciences, 2002; Durrani, *et al.*, 2008; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widayarti, 2011d; Abbas, *et al.*, 2012).

2.6.1. Karakterisasi Protein atas dasar Komposisi Asam Amino

Urutan *genom organisme* sebagian besar dikenal dalam katalog gen. Identifikasi protein yang tidak diketahui dengan mencocokkan beberapa sekuen asam amino dalam sampel yang tidak diketahui dilakukan dengan katalog gen. Identifikasi ini dilakukan dengan menggunakan spektrometri massa yang dihubungkan dengan komputer pencari database. Dua spektrometri massa yang digabung (*MS/MS*) dapat digunakan untuk menentukan urutan asam amino secara langsung.

Spektrometri massa dapat memisahkan fragmen dan menampilkan massanya (Alberts, *et al.*, 2008; Nixon and Aitken, 2009).

Pembedaan lebih nyata untuk penentuan semua protein yang ada dalam organel atau campuran kompleks protein dapat dilakukan melalui pemaduan kromatografi cair dengan spektrometri massa tandem (LC-MS/MS). *Pertama*, campuran protein dicerna dengan tripsin menghasilkan peptida pendek, selanjutnya dipisahkan dengan kromatografi cair. *Dimensi kedua*, peptida tersebut diumpankan ke spektrometri massa tandem yang memungkinkan pengurutan asam amino dan penentuan modifikasi paska translasi (Alberts, *et al.*, 2008; Nixon and Aitken, 2009; Fatchiyah, 2011; Gupta and Prabha, 2012).

2.6.2. Karakterisasi Protein atas dasar Berat Molekul

Imunopresipitasi digunakan untuk mengenali suatu protein dengan ikatan antigen antibodi. Imunopresipitasi dalam kombinasi dengan teknik lain, seperti *SDS-PAGE* dan imunoblotting, imunopresipitasi dapat digunakan mendeteksi dan mengkuantifikasi antigen, menentukan berat molekul relatif, memantau perubahan protein dan modifikasi paska translasi dan memeriksa aktivitas enzim (GE Healthcare BioSciences, 2002; Hussain, *et al.*, 2001; Alberts, *et al.*, 2008; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widayarti, 2011d; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012).

Elektroforesis dengan kondisi protein yang terdisosiasi dapat digunakan untuk memperkirakan berat molekul protein. Berat molekul dapat ditentukan dengan mengukur mobilitas molekul protein dengan dasar kurva standar berat molekul yang dibuat dari protein standar. Mobilitas rate (M_r) diukur dengan rumus berikut ini (Alberts, *et al.*, 2008; Sri Widayarti, 2011c).

$$R = \frac{\text{jarak pergerakan pita protein dari posisi awal}}{\dots}$$

Jarak pergerakan warna pelacak dari posisi awal

SDS-PAGE banyak digunakan memisahkan semua jenis protein (Hussain, *et al.*, 2001; Durrani, *et al.*, 2008; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widyarti, 2011c; Sri Widayarti, 2011d; Abbas, *et al.*, 2012). *SDS-PAGE* dapat memberikan informasi tentang berat molekul dan komposisi subunit protein (Alberts, *et al.*, 2008). *SDS-PAGE* digunakan secara luas untuk menganalisis kemurnian protein, menentukan berat molekul protein, memverifikasi konsentrasi protein, mendeteksi proteolisis, mengidentifikasi protein imunopresipitasi, sebagai langkah awal immunoblotting, deteksi modifikasi protein, pemisahan dan pemekatan protein antigen serta pemisahan protein berlabel radioaktif (Hussain, *et al.*, 2001; Durrani, *et al.*, 2008; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widyarti, 2011c; Sri Widayarti, 2011d; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012).

Western Blotting dipakai untuk mentransfer dan juga imunodeteksi protein pada gel dengan tujuan : (1) rnengetahui keberadaan dan berat molekul protein, (2) membandingkan adanya reaksi silang antar protein, (3) mempelajari adanya modifikasi protein selama sintesis (Hussain, *et al.*, 2001; Alberts, *et al.*, 2008; Shetty and Herr, 2009; Nixon and Aitken, 2009; Sri Widyarti, 2011e; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012). *Dot blot* merupakan bentuk *Western Blotting* tanpa elektroforesis. Sampel protein langsung diaplikasikan pada membran dalam bentuk *dot* dan *diprobng* dengan antibodi berlabel. *Dot blot* dapat memperkirakan konsentrasi antigen dengan menggunakan antigen yang diketahui (Sri Widyarti, 2011e; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012). Tes Lowry atau Bradford adalah tes juga digunakan untuk penentuan kadar protein total. Tes Bradford sangat cocok dengan sampel dengan kadar lemak tinggi dibanding dengan tes Lowry (GE Healthcare BioSciences, 2002).

Matrix assisted laser desorption ionization time of flight spectrometry (MALDI-TOF) digunakan menentukan massa

protein dan peptida. *MALDI-TOF* juga digunakan untuk mengukur massa protein utuh sebesar 200KD (Alberts, *et al.*, 2008; Nixon and Aitken, 2009; Gupta and Prabha, 2012).

2.6.3. Karakterisasi Protein atas dasar Titik Isoelektrik

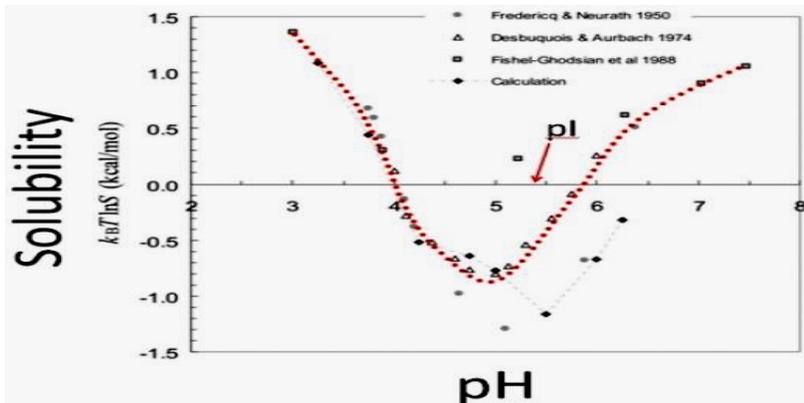
Titik isoelektrik yaitu pH dimana protein tidak bermuatan. Berdasarkan titik isoelektrik, protein dikatakan basa, netral atau asam tergantung pada muatan listrik permukaan pada pH fisiologis (Sri Widyarti, 2011a). Teknik ini memiliki keunggulan untuk membedakan dua protein berbeda dengan muatan listrik sama (Alberts, *et al.*, 2008; Nixon and Aitken, 2009; Shetty and Herr, 2009; Fatchiyah, 2011).

Prefraksinasi protein dengan preparasi elektroforesis elusi terus menerus dan preparasi *IEF (isoelectric focusing)* merupakan metode yang berguna untuk memperkaya pilihan protein berlimpah dengan kadar rendah (Shetty and Herr, 2009). Elektroforesis merupakan metode pemisahan molekul menggunakan medan listrik sebagai penggerak molekul dan matrik penyangga berpori (foresis). Dengan elektroforesis, protein bisa dipisahkan berdasarkan berat molekulnya menggunakan *SDS-PAGE* atau berdasarkan titik isoelektriknya menggunakan *IEF* (Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widyarti, 2011c; Sri Widyarti, 2011d; Abbas, *et al.*, 2012).

2.6.4. Karakterisasi Protein atas dasar Kelarutan

Kelarutan protein tergantung pada muatan listrik permukaan protein. Muatan listrik permukaan tergantung pH pelarut dan jumlah serta identitas asam amino pembentuk protein. Titik isoelektrik protein terjadi pada pH tertentu ketika muatan positif dan negatif saling berimbang dan muatan totalnya nol. Pada titik isoelektrik, protein dalam kondisi paling larut seperti ditunjukkan pada gambar 2.6.4. Kebanyakan protein berada pada pH 5,5-8. Ada banyak cara mengubah agregat protein menjadi terlarut. Tergantung

kondisi agregat protein dan pelarut protein, solubilisasi membutuhkan pemilihan reagen solubilisasi (aditif) dan teknik solubilisasi yang berbeda (Margot2000, 2013).



Gambar 2.6.4. pH (x-axis) menunjukkan insulin dan muatan total (y-axis) seperti yang ditunjukkan pada the online tool Proteine (aBi, Atelier Bio Informatique, Universite Aix-Marseille I) Urutan insulin diambil dari UniProtKB / Swiss-Prot P01308 (INS_HUMAN) With simply con

Ekstraksi diferensial protein sperma melibatkan berbagai metode solubilisasi untuk memperkaya protein membran perifer, protein berkaitan dengan membran hidrofobik atau protein hidrofilik. Teknik fase partisi dapat memisahkan protein membran hidrofobik integral dari protein hidrofilik. Teknik ini didasarkan kemampuan deterjen nonionik TX-114 mempartisi dalam dua tahap berbeda di atas 23°C : fase kaya deterjen dan fase tanpa deterjen atau fase air. Protein membran amfipatik menancap ke lipid melalui *glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)* atau polipeptida hidrofobik, partisinya terutama pada tahap kaya deterjen, sedangkan partisi protein hidrofilik terutama pada fase air (Shetty and Herr, 2009).

Keberhasilan kristalisasi membran protein diawali dengan identifikasi deterjen yang mempertahankan kelarutan

protein dalam monodispersi. Agregasi nonspesifik mengurangi asosiasi reguler molekul protein membentuk pola geometris kristal. Komponen bufer penting karena mempengaruhi agregasi protein membran termasuk pilihan deterjen, konsentrasi garam dan keberadaan gliserol. Uji *ultracentrifugation dispersity sedimentation (UDS)* menyentrifugasi protein membran terlarut yang dimurnikan dalam volume sangat kecil (5 μ l) dikombinasi dengan *SDS-PAGE* untuk menilai agregasi protein (Sri Widayarti, 2011d; Abbas, *et al.*, 2012; Prabha, *et al.*, 2010). Penggunaan *UDS* untuk identifikasi deterjen dan bufer yang sesuai pada kristalisasi protein membran prokariotik rekombinan (Gutmann, *et al.*, 2007).

2.6.5. Karakterisasi Protein atas dasar Struktur Subunit yang menyusun

SDS-PAGE dapat memisahkan semua jenis protein, termasuk yang larut air seperti protein membran. Metode pemisahan polipeptida berdasar ukuran molekul, memberikan informasi tentang berat molekul dan struktur subunit protein (Hussain, *et al.*, 2001; Alberts, *et al.*, 2008; Durrani, *et al.*, 2008; Sri Widayarti, 2011d; Abbas, *et al.*, 2012).

Pendekatan sifat hidrodinamika dapat menunjukkan perilaku kompleks protein ketika bergerak melalui medium cair melalui dua pengukuran terpisah. Konstanta sedimentasi yang diperoleh tergantung pada ukuran dan bentuk kompleks. Setelah pengukuran hidrodinamik kedua dilakukan dan memetakan migrasi kompleks protein melalui kolom kromatografi gel filtrasi, maka dapat dihitung bentuk dan berat molekul perkiraan kompleks protein (Alberts, *et al.*, 2008; Kresno, 2010).

Kristalografi x-ray merupakan teknik utama untuk menemukan struktur tiga dimensi molekul. Menafsirkan peta translasi kontur ke struktur tiga dimensi membutuhkan pengetahuan urutan asam amino protein. Struktur atau lipatan

protein tampak lebih dikonservasi daripada urutan asam amino yang membentuknya. Kristalografi x-ray juga digunakan untuk mempelajari kompleks makromolekul (Alberts, *et al.*, 2008; Krishman and Narayana, 2011).

Spektroskopi *nuclear magnetic resonance (NMR)* digunakan untuk menganalisis struktur molekul kecil. *NMR* membutuhkan larutan protein pekat dengan volume kecil yang ditempatkan dalam medan magnet kuat yang menghasilkan bukti rinci struktur tiga dimensi molekul. *NMR* dilakukan dalam larutan sehingga memberikan kemudahan memantau perubahan struktur protein, misalnya selama protein *folding* atau ketika protein mengikat molekul lain (Alberts, *et al.*, 2008).

Metode iodinasi iodomanik adalah metode efisien untuk iodinasi vectorial protein terikat membran. Identifikasi iodinasi dengan autoradiograf setelah elektroforesis gel 2D. Termasuk juga pelabelan permukaan dengan biotin menggunakan sulfo-NHS-LC-biotin yang bereaksi dengan amina primer pada permukaan sperma (Shetty and Herr, 2009).

Imunohistokimia merupakan suatu teknik penentuan keberadaan (lokasi) antigen (protein target) dalam jaringan atau sel. Imunohistokimia menggunakan reaksi antigen antibodi dalam preparat histologi (Sri Widyarti, 2011g; Abbas, *et al.*, 2012).

2.6.6. Karakterisasi Protein atas dasar Aktifitas Biologi

Sperma berinteraksi dengan lingkungan sekitarnya melalui permukaan membran plasma sperma dalam saluran laki-laki dan perempuan. Studi tersebut memiliki keuntungan untuk mendeteksi antigen yang diidentifikasi oleh antibodi dari transudat serum atau yang diproduksi lokal pada mukosa reproduksi, termasuk iso dan autoantigen yang dikenali oleh sekretori IgA, jika reagen anti-IgA sekunder yang sesuai digunakan (Shetty and Herr, 2009).

ELISA (Enzim Linked Immunosorbent Assay) paling sering digunakan sebagai uji aktivitas. Elisa didasarkan pada reaksi antigen antibodi yang dideteksi menggunakan enzim yang mencerna substrat pewarna. Macam elisa diantaranya direct elisa, indirect elisa dan sandwich elisa (GE Healthcare BioSciences, 2002, Rantam, 2003; Manyonda, 2006; Abbas, *et al.*, 2012).

Imunopresipitasi dalam kombinasi dengan teknik lain, seperti *SDS-PAGE* dan imunoblotting, imunopresipitasi digunakan mendeteksi dan mengkuantifikasi antigen, menentukan berat molekul relatif, perubahan protein dan modifikasi pasca translasi dan aktivitas enzim (GE Healthcare BioSciences, 2002; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widayarti, 2011d; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012).

SDS-PAGE dapat digunakan untuk menganalisis kemurnian protein, menentukan berat molekul protein, memverifikasi konsentrasi protein, mendeteksi proteolisis, mengidentifikasi protein imunopresipitasi, sebagai langkah awal imunoblotting, deteksi modifikasi protein, pemisahan dan pemekatan protein antigen, serta pemisahan protein terlabel radioaktif (Hussain, *et al.*, 2001; Durrani, *et al.*, 2008; Sri Widayarti, 2011c; Sri Widayarti, 2011d; Abbas, *et al.*, 2012).

Metode *surface plasmon resonance (SPR)* dapat mengkarakterisasi interaksi molekul seperti pengikatan antibodi antigen, kopling ligan reseptor dan pengikatan protein pada DNA, karbohidrat, molekul kecil, dan protein lainnya. *SPR* juga digunakan menentukan jumlah molekul yang terikat dalam kompleks (Alberts, *et al.*, 2008), dapat mendeteksi interaksi immunospesifik untuk penentuan konsentrasi aktif, pemetaan epitop dan studi interaksi kinetika (Hussain, *et al.*, 2001; GE Healthcare BioSciences, 2002; Abbas, *et al.*, 2012).

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) adalah energi cahaya yang ditransfer dari satu fluorokrom ke fluorokrom yang lainnya dari dua protein dengan fluorokrom

yang melekat padanya. Metode *FRET* digunakan untuk mengkarakterisasi interaksi protein protein di lokasi tertentu dalam sel hidup (Alberts, *et al.*, 2008).

Metode inhibitor kimia seperti *colchicine inhibitor* dapat digunakan untuk menguji peran mikrotubulus dalam proses biologis, tetapi juga untuk pemurnian tubulin. Dengan pengidentifikasian inhibitor kimia, maka inhibitor kimia tersebut dapat digunakan sebagai *probe* pengidentifikasi, melalui kromatografi afinitas atau cara lainnya. Metode ini juga digunakan untuk mengidentifikasi peran protein kinesin dalam mitosis sel (Alberts, *et al.*, 2008).

Banyak proses biologi hanya bergantung pada aktifitas beberapa molekul penting dalam sel. Strategi penempelan protein dengan struktur yang lebih besar sangat berguna dalam mengukur pergerakan motor protein ditambah pengamatan dengan mikroskop konvensional. Sebagai contoh, molekul motor protein kinesin dapat ditempelkan ke manik dan mengamati gerakan kinesin yang terpasang pada manik sepanjang mikrotubulus, ukuran langkah motor dapat diukur (Alberts, *et al.*, 2008).

Metode untuk mengisolasi molekul pada GPI di permukaan sel, melalui perlakuan pada sel dengan *GPI-specific phospholipase C (PI-PLC)* yang memotong jangkar GPI, meninggalkan bagian lipid di membran, dan melepaskan protein dengan terminal siklik fosfoinositol. Protein yang menancap pada GPI dari sperma diantaranya CD59, CD52, TESP5, PH20 dan SAMP14. (Shetty and Herr, 2009).

Western Blotting atau immunoblotting digunakan untuk proses transfer dan juga imunodeteksi protein pada gel dengan tujuan (1) rnengetahui keberadaan dan berat molekul protein sampel, (2) membandingkan adanya reaksi silang antar protein, (3) mempelajari adanya modifikasi protein selama sintesis (Shetty and Herr, 2009; Kresno, 2010; Sri Widyarti, 2011e; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012).

2.6.7. Karakterisasi Protein atas dasar Modifikasi Paska Translasi

Immunopresipitasi dikombinasi dengan *SDS-PAGE* dan immunoblotting, dapat digunakan mendeteksi dan mengkuantifikasi antigen, menentukan berat molekul relatif, perubahan protein dan modifikasi paska translasi dan memeriksa aktivitas enzim (GE Healthcare BioSciences, 2002; Durrani, *et al.*, 2008; Kresno, 2010; Prabha, *et al.*, 2010; Sri Widayarti, 2011d; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012).

Western Blotting atau immunoblotting digunakan untuk proses transfer dan juga imunodeteksi protein pada gel dengan tujuan (1) rnengetahui keberadaan dan berat molekul protein sampel, (2) membandingkan adanya reaksi silang antar protein, (3) mempelajari adanya modifikasi protein selama sintesis (Hussain, *et al.*, 2001; Shetty and Herr, 2009; Kresno, 2010; Sri Widyarti, 2011e; Sri Widayarti, 2011f; Abbas, *et al.*, 2012).

Kapasitasi sperma merupakan prasyarat terjadinya fertilisasi. Proses kapasitasi melibatkan fosforilasi tirosin yang membutuhkan peningkatan cAMP. Target fosfoprotein dideteksi dengan analisis gel 2D digabungkan immunoblotting antifosfotirosin dan spektrometri massa tandem. Sedangkan glikoprotein diidentifikasi dengan lektin blotting digabungkan elektroforesis gel 2D (Shetty and Herr, 2009; Sri Widayarti, 2011f).

Perpaduan antara kromatografi cair dengan spektrometri massa tandem (*LC-MS/MS*) dapat mengetahui urutan asam amino. Dengan demikian penentuan modifikasi paska translasi seperti fosforilasi atau asetilasi menjadi lebih mudah diamati (Alberts, *et al.*, 2008; Nixon and Aitken, 2009; Fatchiyah, 2011; Gupta and Prabha, 2012).

III

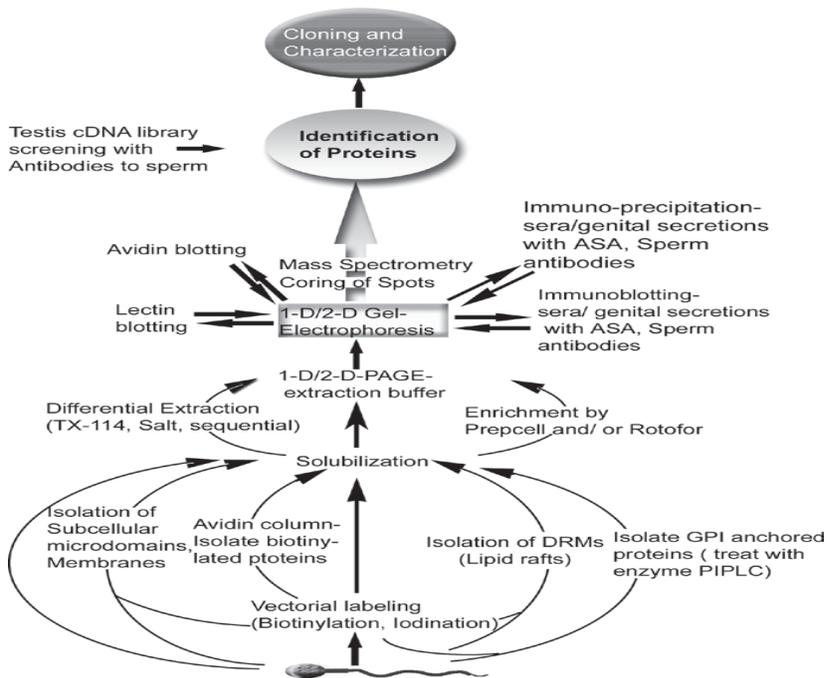
Pembahasan

3.1. Isolasi, Purifikasi dan Identifikasi Protein

Sel dianalisis dengan menghancurkan dan memfraksinya sehingga sistem fungsional sel bebas dapat diamati. Sistem sel bebas sangat murni diperlukan untuk menentukan rincian molekul dari proses sel yang kompleks. Proses ini memerlukan pemurnian semua protein dan komponen lain. Protein terlarut dalam ekstrak sel dimurnikan dengan kolom kromatografi. Pemilihan kolom kromatografi tergantung tipe matrik kolom. Protein aktif dipisahkan berdasarkan berat molekul, hidrofobik, muatan listrik, atau afinitas dengan molekul lain. Pada proses pemurnian sampel dilewatkan kolom berbeda sehingga diperoleh fraksi diperkaya. Teknik DNA rekombinan dengan tag khusus ditempelkan pada protein sangat menyederhanakan proses pemurnian (Alberts, *et al.*, 2008).

Proteomik adalah karakterisasi semua protein dalam sel termasuk interaksi protein protein dan modifikasi paska translasi. Dalam kombinasi dengan teknik pemurnian yang ada, spektrometri massa merupakan metode paling ampuh untuk pemetaan modifikasi paska translasi dari protein tertentu dan protein yang tetap terkait dengannya (Alberts, *et al.*, 2008; Nixon and Aitken, 2009). Analisis protein berbasis spektrometri massa pada skala besar telah mengidentifikasi ribuan kompleks protein sperma dengan batas yang dinamis dan *magnitude* besar. Data spektrometri massa yang tersedia telah membatasi langkah dalam proteomika sperma. Tantangan utamanya mengeksplorasi sumber daya yang ada untuk menentukan unsur mana dari proteomika yang memiliki signifikansi fungsional dan memahami kaskade modifikasi paska translasi yang terlibat dalam menghasilkan spermatozoa fungsional (Nixon and Aitken, 2009).

Integrasi beberapa metode isolasi, pengayaan dan identifikasi protein memberikan alat pembedah arsitektur molekul spermatozoa. Misal penggabungan label *vectorial*, fase partisi dan imunoblotting memiliki potensi memperkaya dan memudahkan identifikasi subset membran hidrofobik terkait autoantigen. Gambar 3.1 dibawah memberikan gambaran umum beberapa metode berbeda yang dapat digunakan untuk mengidentifikasi dan mengkarakterisasi antigen sperma yang relevan secara fungsional untuk fertilisasi. Meskipun teknologi elektroforesis 2D memiliki keterbatasan tetapi masih digunakan sebagai pendukung untuk karakterisasi proteomik ketika digabungkan dengan spektrometri massa. Tantangan utama identifikasi antigen sperma yang relevan secara fungsional adalah merancang metodologi isolasi dan memperkaya molekul subdomain sperma yang terlibat fertilisasi termasuk molekul dengan konsentrasi rendah. Penggunaan *ASA* natural merupakan pendekatan yang menarik untuk mengidentifikasi antigen imunoreaktif sebagai imunokontrasepsi dan menentukan autoantigen terkait imunoinfertilitas. Diperkirakan lebih banyak autoantigen sperma ditentukan dengan metode tersebut sebagai repertoar protein yang dikenali oleh keragaman kekebalan manusia. Imunoblotting 2D dan database gel 2D pada waktu mendatang akan dijadikan alat tes klinis standar untuk diagnosis diferensial imunoinfertilitas. Protein array yang mengandung protein imunodominan utama yang dikenal oleh respon imun manusia di masa depan akan menjadi alat tes diagnostik sederhana untuk menentukan pasien dengan antibodi terhadap antigen permukaan sperma yang esensial terhadap fertilitas (Shetty and Herr, 2009).



Gambar 3.1. Outline aplikasi pendekatan molekuler pada sel sperma yang berguna pada identifikasi antigen sperma yang terlibat pada fertilisasi. Dikutip dari Shetty and Herr, 2009.

Proses pemurnian protein yang digunakan untuk mengidentifikasi protein yang terlibat dalam imunoinfertilitas dengan bahan pemeriksaan berupa kuman penyebab vaginosis bakterial khususnya *S. aureus*, spermatozoa dan sekret yang diproduksi pada saluran reproduksi wanita infertil yang dicurigai karena faktor imunologi. Ekstraksi protein membran permukaan bakteri penyebab dan spermatozoa menggunakan sonikasi untuk melisis selnya atau imunopresipitasi. Dilanjutkan proses klarifikasi menggunakan ultrasentrifugasi dan filtrasi sesuai dengan kondisi lisat sel yang dihasilkan pada proses ekstraksi. Proses pemurnian protein bisa menggunakan kromatografi kolom satu tahap, dua tahap atau tiga tahap tergantung asal bahan pemeriksaan,

metode yang digunakan dan tingkat kemurnian yang diharapkan sesuai dengan keperluan pemakaian hasil akhir target protein. Untuk mengidentifikasi kesamaan epitop protein membran permukaan sel dan lokasi epitopnya digunakan imunopresipitasi, imunobloting dan atau imunositokimia. Penilaian kesamaan berat molekul dan atau titik isoelektriknya dapat digunakan *isoelectric focusing*, elektroforesis 1D atau 2D.

3.2. Test Antibodi Antisperma

Tes untuk mendeteksi dan mengkuantifikasi antibodi antisperma dikategorikan menjadi tiga kelompok berdasarkan sumber antigen:

- (a) *sperm extract assays* seperti imunodifusi atau immuno-elektroforesis,
- (b) *fixed sperm assays* seperti *immunofluorescence*, *mixed antiglobulin tests*, *enzyme linked immunoassays*, dan *radioimmunoassay*,
- (c) *live sperm assays* seperti *macroagglutination*, *microagglutination*, *cytotoxicity*, or *sperm/cervical mucus interaction tests*.

Hanya tes MAR dan IBT yang rutin dilakukan laboratorium diagnostik dan tampaknya berkorelasi baik dengan infertilitas imunologis (Agarwal and Said, 2009).

3.2.1. Pria

3.2.1.1. Makro / Mikro agglutinasi dan Imobilisasi

Protokol makroskopik untuk mengidentifikasi ASA dalam serum. *GAT (gelatin agglutination test)* dilakukan dengan menanggihkan air mani donor yang tidak memiliki ASA dengan serum komplemen inaktif pasien subfertil dalam campuran gelatin. Penggumpalan sperma di bawah campuran gelatin diartikan positif. Hasil positif palsu karena debris dalam plasma mani dan relevansi klinis ASA pada serum sangat diperdebatkan. *TSAT (tube slide agglutination test)*,

sampel air mani donor dicampur dengan serum pasien yang komplemen inaktif dan aglutinasi sperma dicatat dengan menggunakan drop mikroskopis. Prosedur *SIT* (*sperm immobilization test*) dengan sedikit serum kelinci / marmot sebagai sumber komplemen. Selama penilaian mikroskopis, jumlah sperma motil ditentukan dan tes dianggap positif jika lebih dari setengah sperma yang dihitung nonmotil. Selain kerugian yang disebutkan di atas untuk *GAT* dan *TSAT*, *SIT* tidak memiliki kemampuan mendeteksi IgA yang memfiksasi komplemen dan inisiasi urutan kaskade hanya mungkin jika antibodinya IgG dan IgM (Manyonda, 2006; Agarwal and Said, 2009).

3.2.1.2. *Enzim Linked Immunosorbent Assay dan Immunofluorescence*

ELISA untuk menilai *ASA* secara kuantitatif. *ELISA* menggabungkan reaksi antigen antibodi dengan kromogenik untuk memperkuat sensitivitas reaksi. Variabel uji meliputi konsentrasi sperma, jenis fiksasi sperma, agen pemblokir, pengenceran serum dan plasma seminalis (Manyonda, 2006; Agarwal and Said, 2009; Abbas, *et al.*, 2012).

3.2.1.3. *Mixed Antiglobulin Reaction Test*

Tes *MAR* mendeteksi *ASA* pada permukaan. Aglutinasi diamati sebagai gumpalan spermatozoa pada eritrosit dengan gerakan lambat "gemetar" di mikroskop cahaya. Hasil tes *MAR* dicatat sebagai persentase spermatozoa motil terhadap campuran agglutinasi. Tempat perlekatan juga dicatat. Tes *MAR* dinyatakan positif bila >10% aglutinasi, secara klinis penting bila >80% aglutinasi (Manyonda, 2006; Agarwal and Said, 2009).

3.2.1.4. *Immunobead Test*

IBT mirip tes *MAR*, sangat nyaman, hanya perlu sentrifuge, mikroskop cahaya, manik latek dilapisi antihuman

IgG, IgA, dan IgM dan waktu < 30 menit. Spermatozoa dicuci untuk membuang imunoglobulin bebas dalam plasma mani. IBT memungkinkan penentuan kelas antibodi yang melekat pada spermatozoa, lokalisasinya dan proporsi spermatozoa yang dilapisi antibodi (Manyonda, 2006; Agarwal and Said, 2009).

3.2.2. Pengujian Lendir Servik Wanita

IgG dan IgA ditemukan dalam lendir servik. Keberadaan ASA dalam lendir servik dinilai menggunakan tes interaksi sperma lendir in vivo atau in vitro. *Post coital test (PCT)* in vivo menunjukkan hasil jelek dengan keberadaan ASA. Pola gerakan sperma "gemetar" menandakan keberadaan ASA. *Sperm cervical mucus contact (SCMC) test* in vitro mengevaluasi keberadaan ASA pada lendir servik. Aliquot lendir servik dan semen dicampur dan diperiksa dengan pola motilitas sperma "gemetar". Tes positif jika >25% spermatozoa bergerak "gemetar" *(Agarwal and Said, 2009).

Isolasi dan pemurnian antibodi dilakukan dengan proses ekstraksi menggunakan ultrasentrifugasi dan filtrasi sesuai kondisi sekret yang ada. Kemudian dilakukan imunopresipitasi menggunakan amonium sulfat untuk mendapatkan antibodinya, selanjutnya dilakukan pemurnian dengan kromatografi kolom. Penilaian aktifitas antibodi tersebut dapat digunakan uji kualitatif seperti *TSAT, GAT, SIT, IBT, MAR test PGT atau SCMC*. Pada uji aktifitas antibodi tersebut untuk mendapatkan nilai kuantitatifnya maka uji yang dilakukan adalah *ELISA*.

IV

Kesimpulan

4.1. Kesimpulan

- 4.1.1. Asal bahan yang dipergunakan untuk pemeriksaan imunologi infertilitas meliputi serum darah tepi wanita infertil, cairan atau sekret yang disekresi saluran genitalia wanita, spermatozoa dan kuman patogen saluran genitalia wanita.
- 4.1.2. Metode pemeriksaan yang digunakan untuk menilai respon imunologi infertilitas meliputi ekstraksi, isolasi, pemurnian dan analisis protein atau imunoglobulin. Proses ekstraksi, isolasi dan pemurnian protein atau imunoglobulin mengikuti bahan asal, sifat protein atau imunoglobulin serta tingkat pemurnian yang diharapkan. Analisis protein atau imunoglobulin yang dihasilkan dapat dilakukan dengan imunopresipitasi, elisa, spektrometri massa, kristalografi x-ray, spektroskopi NMR, *SDS-PAGE*, *DIGE SDS-PAGE*, *Western Blotting*, Imunohistokimia, *Dot Blotting*, *FRET (Fluorescence resonance energy transfer)*, metode inhibitor kimia, Metode *surface plasmon resonance (SPR)*, metode iodinasi iodomanik, tes *ultracentrifugation dispersity sedimentation (UDS)*, metode *size exclusion chromatography (SEC)*, Teknik fase partisi, Elektroforesis, *Matrix assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) spectrometry*, *Post coital test (PCT)*, *Sperm cervical mucus contact test (SCMC)*, *Immunobead Test*, *Mixed Antiglobulin Reaction Test*, *Immunofluorescens*, Makro / Mikro agglutinasi dan Imobilisasi.

4.2. Saran

Penyebab infertilitas tak terjelaskan dapat disebabkan oleh kelainan imunologis yang berkaitan dengan infeksi pada saluran reproduksi wanita. Eksplorasi penyebab infeksi pada saluran reproduksi wanita yang dapat membangkitkan respon imun perlu dilakukan untuk mencari adanya kesamaan epitop kuman penyebab infeksi tersebut dengan molekul permukaan gamet dalam hal ini gamet yang berasal dari pria yaitu spermatozoa.



Daftar Pustaka

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S., 2012. 'Innate Immunity'. Cellular and Molecular Immunology. 7rd Ed. International Edition. Elsevier. United States.
- Agarwal, A. and Said, M.T., 2009. 'Test for Sperm Antibodies'. *Immune Infertility*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p 155-164.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, A., and Walter, P., 2008. 'Manipulating Proteins, DNA, and RNA'. *Molecular biology of The Cell*. 5th Ed. Garland Science Taylor & Francis Goup Madison Avenue, New York. p. 501-578.
- Amersham Biosciences, 2001. '*Protein Purification – Handbook*'. Amersham Biosciences AB Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden p.
- Dhont, N., *et al.*, 2011. 'The risk factor profile of women with secondary infertility : an unmatched case-control study in Kigali, Rwanda', *BMC Women's Health*, 11:32.
- Durrani, R., Abubakar, M., Arshed,M.J., Saleha, S., Ullah, I., and Ali, Q., 2008. Biological Characterization And Protein Profiles Of Two Model Bacteria By *SDS-PAGE* And FT-IR. *Journal of Agricultural and Biological Science* 2008 (3): 5&6
- Fatchiyah, 2011. 'Elektroforesis Gel 2D'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- GE Healthcare BioSciences, 2002. '*Antibody Purification – Handbook*'. GE Healthcare BioSciences AB Björkgatan 30, SE-751 84 Uppsala, Sweden p.

- Gutmann, D.A.P., Mizohata, E., Newstead, S., Ferrandon, S., Henderson, P.J.F., van Veen, H.W., and Byrne, E., 2007. A high-throughput method for membrane protein solubility screening : The ultracentrifugation dispersity sedimentation assay. *Protein Sci.* 2007 July; 16(7) : 1422-1428
- Hussain, M., Becker, K., Von Eiff, C., Schrenzel, J., Peters, G., and Herrmann, M., 2001. Identification and Characterization of a Novel 38.5-Kilodalton Cell Surface Protein of *Staphylococcus aureus* with Extended- Spectrum Binding Activity for Extracellular Matrix and Plasma Proteins. *Journal Of Bacteriology* (183):23. p 6778-6786.
- Kresno, S.B., 2010. *Imunologi : Diagnosis dan Prosedur Laboratorium.* Edisi kelima Cetakan Pertama. Badan Penerbit FKUI, Jakarta
- Krishman, V., and Narayana, S.V.L., 2011. 'Crystallography of Gram Positive Bacterial Adhesins' In: *Bacterial Adhesio Chemistry, Biology and Physics.* Springer Science + Business Media B.V. New York. 2011.
- Latif, O.M.S., 2012. *Vulvovaginitis.* <http://emedicine.medscape.com/article/270872-overview#showall> Diakses tanggal 12 Pebruari 2012.
- Manyonda, I.T., 2006. 'Immunological Test in Obstetrics and Gynecology' *The Immunology of Human Reproduction.* Taylor & Francis. 2006 London. p 145-160.
- Margot2000, 2013. *Protein Solubility and the Isoelectric Point.* <http://margot2000.hubpages.com/hub/Protein-Solubility-and-the-Isoelectric-Point> diakses tgl 7 april 2013 jam 09.35
- Nixon, B. dan Aitken, J. R., 2009. 'Proteomics of Human Spermatozoa'. *Immune Infertility.* Springer Verlag Berlin Heidelberg. p 3-12.
- Prabha V, Chaudhary N and Kaur S, 2011. 'Molecular Mimicry Between Spermatozoa and Bacteria', *THE JOURNAL OF UROLOGY*,186: 2442-2447

- Prabha V., *et al.*, 2009. 'Isolation of a spermatozoal immobilization factor from *Staphylococcus aureus* filtrates', *Can. J. Microbiol.* 55: 874–878.
- Prabha,V., Sandhu, R., Kaur, S., Kaur, K., Sarwal, A., Mavuduru, R.S., and Singh, S.K., 2010. *Research Article* Mechanism of SpermImmobilization by *Escherichia coli*. *Advances in Urology* Volume 2010, Article ID 240268, 6 pages
- Rantam, F.A., 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan I. Airlangga University Press, Surabaya.
- Ratri, D. R., 2008. 'Identifikasi Protein Adhesin *Staphylococcus* Isolat Vagina yang Memperantarai Perlekatan pada Spermatozoa'. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Shetty, J. and Herr, J.C., 2009. 'Methods of Analysis of Sperm Antigens Related to Fertility'. *Immune Infertility*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p 13-30.
- Sri Widayarti, 2011a. 'Struktur Dasar Protein'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011b. 'Isolasi Protein'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011c. 'Elektroforesis Gel Poliakrilamida'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011d. 'SDS-PAGE'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011e. 'Western Blotting'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011f. 'Analisis Western Blotting'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.

Sri Widayarti, 2011g. 'Imunohistokimia'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.

Sunihapsari, C., 2002. 'Protein Membran Sel Spermatozoa yang Mengenali Protein Permukaan *Staphylococcus*'. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

WHONET, 2012. Laporan Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSSA Malang tahun 2007, 2008, 2009 dan 2010. Diambil pada tanggal 10 Pebruari 2012.

Infection, Immunology and Infertility Series

Book Three
Metode Pengukuran Respon Imun dan
Aplikasi dalam Infertilitas

Part Six

Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa

Penulis :
Muhammad Anas

UMSurabaya Publishing
2019

Infection, Immunology and Infertility Series

Book Three : Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam
Infertilitas

Penulis : Muhammad Anas

Editor : Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM.,SpMK.(K).

Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.

dr. Hidayat Suyuti, PhD., SpM.

Prof.Dr.dr. Teguh Wahyu Sardjono, DTMH., M.Sc., SpParK.

Infection, Immunology and Infertility Series

Book One Infertilitas dan Imunologi Vaginitis

Part 1: Overview Infertilitas

Part 2 Vulvovaginitis: Etiopathogenesis dan Tinjauan Imunologi Infeksi

Book Two Infeksi Spermatozoa dan Karakteristik *Staphylococcus aureus*

Part 3: Peranan Infeksi pada Spermatozoa Terhadap Fertilitas

Part 4: Karakterisasi Molekuler faktor Virulensi dan peranannya pada patogenesis infeksi *Staphylococcus aureus*

Book Three Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas

Part 5: Metode Pengukuran yang Diperlukan untuk Menilai Respon Imunologis.

Part 6: Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa

KATA PENGANTAR REKTOR UMSurabaya

Alhamdulillah, kita panjatkan puji syukur ke hadirat Allah SWT berkat karunia Nya telah diterbitkan buku baru berupa buku seri untuk disiplin ilmu kedokteran khususnya dalam bidang obstetri dan ginekologi yang berisi tentang *infection, immunology, and infertility series* ilmu dan teknologi. Buku ini menjelaskan tentang cara pengukuran respon imun dan autoimunitas pada pasangan wanita yang terinfeksi *S. aureus* terhadap fertilitas spermatozoa.

Sebelum bergabung menjadi dosen tetap di Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya, saya mengenal Anas sejak menjadi mahasiswa, tetapi lebih sering berkomunikasi setelah kami berdua menjadi direktur Rumah Sakit Muhammadiyah di tempat yang berbeda, dari sinilah saya mengenal jauh lebih dekat dengan beliau. Meski pada kesehariannya berkecukupan di bidang management rumah sakit dan praktek sebagai spesialis kebidanan dan kandungan, tetapi beliau juga haus untuk meningkatkan wawasan keilmuannya terutama yang sesuai bidang yang digelutinya, beberapa kali beliau mencoba melakukan penelitian yang terkait masalah infertility, yang pada akhirnya setelah mengikuti beberapa saran dari sejawat lainnya, dr. Anas melanjutkan studi S3 nya di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, yang tentunya hal tersebut juga semakin mengasah kemampuan keilmuannya, dr. Anas dan juga kemampuan menulisnya yang dibuktikan dengan diterbitkannya buku kedokteran karya beliau ke-3 dengan judul Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas yang akan menjadi kontribusinya di dunia ilmu kedokteran.

Harapannya buku dapat menjadi salah satu referensi dan rujukan penelitian selanjutnya. Selain itu, dapat membantu para dosen dan mahasiswa kedokteran, keperawatan dan kebidanan

untuk memperkaya dan meningkatkan wawasan keilmuannya yang terkait dengan infeksi, imunologi, dan infertiliti dengan problematikanya.

Surabaya, Juli 2019
Rektor UM *Surabaya*

Dr. dr. Sukadiono, MM

KATA PENGANTAR DEKAN FK UMSurabaya

Bismillahirrahmanirrahim

Assalamu'alaikum wr. wb.

Alhamdulillah, Segala puji dan syukur kita panjatkan kepada Allah SWT atas segala limpahan nikmat dan karunia-Nya, sehingga Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG dapat menyelesaikan penulisan buku ke-3 Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas. Kami selaku pihak Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya dan seluruh civitas akademika menyambut dengan gembira atas terbitnya Buku Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas karya ke-3 Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG

Apresiasi yang besar dan ucapan terima kasih kami berikan kepada Dr. dr. Muhammad Anas Sp.OG selaku Peneliti dan Akademisi yang ditengah kesibukannya sebagai Dokter dalam melayani masyarakat dapat merampungkan suatu karya yang tidak hanya berguna bagi kemajuan ilmu Kedokteran namun juga membangun kemaslahatan bagi umat.

Sebagai ilmu yang senantiasa berkembang, Infertilitas dan Imunologi memiliki banyak bahan kajian yang secara keilmuan masih banyak belum tergali. Masing-masing memiliki kompleksitas dan kekhasan tersendiri. Seiring perkembangan zaman, dengan berkembangnya kemutakhiran teknologi, keduanya pun berkembang dengan pesat baik dari segi keilmuan maupun terapannya di Masyarakat. Menghubungkan keduanya, khususnya di bidang Ilmu Kebidanan dan Penyakit Kandungan, menjadi suatu tantangan tersendiri.

Melalui buku ke-3 ini penulis mencoba mengkaji dua hal tersebut melalui disiplin ilmu yang menjadi latar belakang profesional penulis. Hasilnya pun sungguh membuka wacana dan menginspirasi kita semua, terutama bagi Akademisi dan juga

Mahasiswa. Pesan untuk senantiasa memiliki semangat untuk meneliti dan menulis, terutama dalam bidang Ilmu Kedokteran, tertuang melalui karya Dr. dr. Muhammad Anas Sp. OG ini.

Penerbitan buku ini tentu melalui proses yang panjang . Semoga dengan terbitnya buku ini memberi kebaikan bagi kemajuan Ilmu Kedokteran dan tentunya bagi umat sehingga menjadi amal yang tidak pernah habis bagi penulis.

Wassalamu'alaikum wr wb

Surabaya, Juli 2019
Dekan FK Universitas Muhammadiyah Surabaya

dr. H.M.Jusuf Wibisono, Sp.P(K) FCCP

KATA PENGANTAR

Bismillahirrahmanirrahim
Assalamu'alaikum wr wb.

Puji syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, yang telah memberikan kekuatan kepada saya sehingga buku *Infection, Immunology and Infertility Series* yang terdiri dari tiga buku dan tiap buku terdapat dua judul yang akan diterbit, mulai dari *Book one* berisi *part one* dan *part two*; *Book two* berisi *part three* dan *part four*; serta *Book three* berisi *part five* dan *part six*. Shalawat serta salam saya persembahkan ke haribaan nabi dan rasul Muhammad SAW.

Pada *Book Three* berisi *Part Five* dan *Part Six*; ini memuat dua judul yaitu Metode Pengukuran yang Diperlukan untuk Menilai Respon Immunologis. Dan Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *S. aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa, yang menjelaskan tentang cara pengukuran respon imun dan autoimun akibat infeksi *S. aureus* pada pasangan wanita terhadap fertilitas spermatozoa.

Rangkaian buku ini saya persembahkan kepada kedua orang tua saya, H. Mu'asan (alm) dan Hj Siti Fatimah (alm). Semoga Allah SWT senantiasa melimpahkan kebaikan di akhirat.

Saya sampaikan terima kasih yang banyak kepada istriku tercinta Ummu Hanifah, SE atas kelonggaran waktu yang disediakan sehingga naskah ini terselesaikan. Kepada putra putri kami, Rudin, Ilham, Jamil, Ghazi dan 'Aisyah yang senantiasa memberikan semangat yang selalu terbaharui.

Saya sampaikan terima kasih yang tak terhingga kepada Prof. Dr. dr. Sumarno Reto Prawiro, DMM, SpMK (K) yang senantiasa mengarahkan penulisan naskah buku ini. Juga saya sampaikan terima kasih banyak kepada dr. Hidayat Suyuti, PhD., SpM, Dr. dr. Siti Candra Windubaktiani, SpOG(K)(alm) dan Prof. Dr. dr. Teguh

Wahju Sardjono, DTMH., M.Sc, SpParK yang senantiasa memberikan evaluasi dan koreksi terhadap naskah yang saya susun.

Kepada semua pihak yang tidak bisa saya sebutkan satu persatu, saya sampaikan banyak terima kasih atas bantuannya sehingga buku ini dapat diterbitkan.

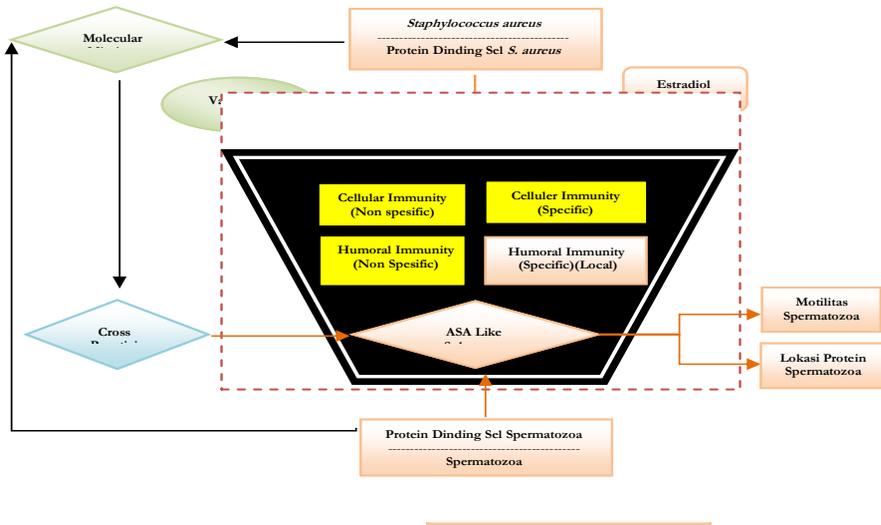
Saran perbaikan senantiasa saya harapkan demi lebih sempurnanya naskah buku ini di masa mendatang.

Billahi taufik wal hidayah. Wassalamu'alaikum wr wb.

Surabaya, Juli 2019
Penulis,

Muhammad Anas

KERANGKA KONSEP



Vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial merupakan penyakit kelamin wanita yang disebabkan oleh polimikrobal dengan dominasi *Lactobacillus spp* yang berkurang. *Staphylococcus spp* merupakan sebagian diantara mikroba yang ikut berperan pada vaginosis bakterial. Khususnya *Staphylococcus aureus* yang paling patogen pada manusia diantara *Staphylococcus spp*.

Pasangan suami istri bila melakukan hubungan badan maka istrinya akan terpapar dengan spermatozoa yang merupakan benda asing. Pada tubuh istri akan terjadi reaksi imunologi karena paparan benda asing dari suaminya yang meliputi reaksi imun bawaan dan reaksi imun adaptif yang berupa reaksi imun seluler maupun reaksi imun humoral. Pada reaksi imun humoral adaptif akan terbentuk antibodi terhadap spermatozoa yang biasa disebut antibodi antisperma / *antisperm antibody (ASA)*. Antibodi antispermatozoa selalu akan terbentuk setiap kali terjadi paparan spermatozoa suami pada istri. Sehingga jumlahnya semakin lama

akan semakin banyak. Pada level tertentu maka antibodi antisperma ini akan menghalangi proses fertilisasi dengan adanya reaksi antara antibodi antisperma dengan spermatozoa dan terjadi reaksi aglutinasi sehingga fungsi dari spermatozoa terganggu khususnya motilitasnya. Karena adanya hambatan motilitas spermatozoa tersebut maka pasangan tersebut menjadi infertil. *Staphylococcus aureus* merupakan salah satu penyebab infeksi vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial pada wanita. Dinding sel *Staphylococcus aureus* memiliki kesamaan molekul proteinnya dengan dinding sel spermatozoa yang dikenal sebagai *molecular mimicry*. Sehingga wanita yang menderita vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial yang salah satu penyebabnya adalah *Staphylococcus aureus* dapat memicu timbulnya substrat yang menyerupai antibodi antisperma (*ASA like substance*). Oleh karenanya wanita dengan infeksi vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial akan memperbesar kemungkinan untuk menjadi infertil akibat reaksi silang (*cross reactivity*) yang ditimbulkan oleh adanya kesamaan molekul dinding sel antara spermatozoa dengan *Staphylococcus aureus*.

Vaginitis non spesifik / vaginosis bakterial merupakan penyakit kelamin wanita yang disebabkan oleh polimikrobal dengan dominasi *Lactobacillus spp* yang berkurang. Dengan adanya infeksi pada alat kelamin wanita khususnya di daerah vagina dan servik uteri maka penjamu akan merespon keberadaan bakteri pada daerah tersebut dengan respon imun bawaan maupun respon imun adaptif. Respon imun bawaan meliputi barrier epitel, mukus, peptida antimikroba, komplemen dan sel imun seperti netrofil, makrofag dan sel NK. Respon imun adaptif merupakan kelanjutan dari respon imun bawaan melalui APC seperti sel epitel, sel dendrit dan makrofag, serta adanya MHC baik kelas I maupun kelas II. Dengan efektor berupa sel Th1, sel Th2, sel Th17 maupun sel Treg serta sel B atau sel plasma yang memproduksi imunoglobulin / antibodi sirkulasi maupun sekretori. Respon imun yang akan diteliti pada penelitian ini adalah respon imun adaptif humoral lokal yang berupa s-IgA yang disekresikan pada lumen

servik uteri terhadap bakteri yang terdeteksi pada infeksi vagina wanita pasangan infertil. Serta dilakukan tes kepekaan antibiotika terhadap bakteri yang terdeteksi pada infeksi vagina wanita pasangan infertil tersebut. Variabel yang akan diteliti diberikan ditandai dengan kotak berwarna putih.

Ringkasan Book One Part One

Overview Infertilitas

Pasangan Infertil adalah pasangan yang telah kawin dan hidup harmonis serta telah berusaha selama satu tahun tanpa menggunakan kontrasepsi tetapi belum hamil. Pasangan Infertil dibedakan menjadi 2 macam yaitu infertil primer dan infertil sekunder. Angka prevalensi pasangan infertil di dunia bervariasi antara 10 - 40%. Di Indonesia 17%, Jawa Timur 26%, Surabaya 25% dan Malang 18%. Besaran angka infertil primer dan sekunder tergantung kondisi daerah masing - masing sesuai dengan faktor penyebab yang menyertainya.

Faktor penyebab infertilitas dibedakan menjadi faktor penyebab pria dan wanita. Faktor penyebab dari pihak pria berkontribusi kurang lebih 40 %, selebihnya dari faktor wanita. Kelainan dari pihak pria terbanyak varikokel kemudian kelainan pada analisis spermanya, sedangkan dari pihak istri terbanyak kelainan tuba falopii dan peritoneum. Penyebab idiopatik kurang lebih 10-30%, diduga banyak berkaitan dengan kelainan imunologis dan berkaitan dengan infeksi sebelumnya. Faktor penyebab infertilitas dapat dicegah bila penyebabnya berasal dari luar khususnya infeksi. Pencegahan infeksi dapat dilakukan dengan cara mencegah seks pranikah, penanganan abortus dan persalinan secara aseptis.

Pemeriksaan dan pengobatan pasangan infertil berkembang pesat karena perkembangan teknologi kedokteran. Intervensi yang dilakukan pada pasangan infertil mulai pengobatan medisinal sampai dengan pemakaian teknologi reproduksi berbantu. Prognosisnya sangat bergantung pada usia pasangan wanita dan faktor - faktor lain yang mengikuti seperti gaya hidup, kondisi lingkungan, kondisi sosiokultural dan juga pemakaian obat-obatan tertentu.

Kata Kunci: pasangan infertil, faktor penyebab, idiopatik, infeksi, pemeriksaan, pengobatan, prognosis

Ringkasan Book One Part Two

Vulvovaginitis : Etiopatogenesis dan Tinjauan Imunologi Infeksi

Populasi flora normal yang dominan di vagina adalah *Lactobacilli spp.* Ketika jumlah *Lactobacilli spp* berkurang, maka populasi *Gardnerella vaginalis* dan bakteri anaerob lain (*Mobiluncus species*, *Mycoplasma hominis*, dan *peptostreptococcus species*) akan meningkat. Kondisi tersebut menyebabkan naiknya pH vagina dan menimbulkan vaginosis bakterial. Jadi etiologi vaginosis bakterial adalah multi mikroba dengan *Gardnerella vaginalis* yang hampir selalu muncul. *Staphylococcus aureus* termasuk salah satu bakteri yang ikut berperan serta pada terjadinya vaginosis bakterial, dengan kontribusi sebesar 3,05% (4,36% dari 70%).

Faktor risiko vaginosis bakterial meliputi : umur, aktifitas seksual, status hormonal, higiene yang jelek, status imunologi, penyakit kulit yang mendasari, kehamilan, penggunaan IUD, pemakaian douche, pakaian ketat, pemakaian sabun dan deterjen berparfum, spray kewanitaan, obat kontrasepsi, pengobatan pada vagina, antibiotik, STD serta stres. pH vagina yang normal sekitar 3,8-4,2. Pada pH ini pertumbuhan organisme patogen terhambat. Gangguan pH vagina dapat mempengaruhi keseimbangan flora normal vagina, dan berakibat pertumbuhan yang pesat dari organisme patogen. Patogenesis vaginosis bakterial melibatkan perubahan lingkungan vagina yang mengakibatkan perubahan komposisi flora normal vagina sehingga mikroba patogen tumbuh melalui *docking*, *anchoring*, proliferasi dan invasi maka terjadilah infeksi.

Respon imun saluran reproduksi wanita meliputi respon imun bawaan dan respon imun adaptif baik respon imun seluler maupun respon imun humoral. Pada respon imun bawaan melibatkan epitel mukosa vagina, flora normal, mukus, sitokin, protein antimikroba, sel dendritik, granulosit, makrofag dan sel NK.

Respon imun adaptif humoral dimediasi oleh sel B yang berdiferensiasi menjadi sel plasma dan menghasilkan imunoglobulin meliputi IgM, IgG dan yang terutama pada saluran genital wanita adalah sIgA. Sedangkan respon imun adaptif seluler terdiri dari sel T CD4+ maupun sel T CD8+.

Kata Kunci: vaginitis non spesifik, flora normal, pH, faktor resiko, patogenesis, respon imun bawaan, respon imun adaptif, seluler, humoral.

Ringkasan Book Two Part Three

Peranan Infeksi pada Genitalia Pria Terhadap Fertilitas

Proses pembentukan antibodi antisperma (ASA) diperantarai oleh obstruksi kronis pada saluran genitalia pria yang menyebabkan peningkatan tekanan intraluminal sehingga terjadi distensi epididimis dan pembentukan granuloma spermatozoa. Spermatozoa yang terhambat dihancurkan oleh makrofag intraluminal dan produk degradasinya diserap epitel epididimis dan memicu reaksi imun seluler maupun humoral. Produksi ASA terjadi secara bertahap dan lambat. Mekanisme imunotoleransi seluler juga terlibat pada produksi ASA dengan berkurangnya konsentrasi limfosit T supresor dalam semen pria.

Infeksi genitalia pria memicu pembentukan ASA melalui beberapa cara sebagai berikut : 1) Obstruksi MRT karena perubahan yang terjadi selama inflamasi dan pasca inflamasi, 2) Robeknya sawar darah testis (SDT) karena peradangan lokal, 3) Penurunan faktor imunomodulator baik seluler maupun humoral dalam semen yang biasanya dapat mencegah autoimunisasi spermatozoa, dan 4) Reaksi silang antara antigen mikroorganisma yang bertanggung jawab pada infeksi MRT dengan antigen spermatozoa. Penelitian khusus tentang pembentukan sIgA terhadap infeksi *S. aureus* pada saluran reproduksi pria belum didapatkan. Penelitian yang ada berkaitan dengan *S. aureus* hanya sebatas bakteriosepmia dan kenaikan lekosit semen.

Keberadaan ASA pada saluran genitalia pria akan menyebabkan gangguan migrasi spermatozoa, menghambat proses fertilisasi pada berbagai tahap, dan menunjukkan efek negatif pada perkembangan embrio sejak awal. Antibodi antisperma dapat mempengaruhi mekanisme transportasi spermatozoa dalam saluran genitalia wanita, mengubah kapasitas spermatozoa atau reaksi akrosom, mengganggu pembuahan sel telur, atau memiliki efek pasca fertilisasi pada zigot dan embrio preimplantasi. Sehingga kehamilan tidak terjadi atau terjadi

gangguan pertumbuhan embrio sejak awal yang mengakibatkan keguguran, sebagai hasil akhir terjadinya infertilitas.

Kata Kunci: infeksi, genitalia, pria, fertilitas, antibodi antisperma, sawar darah testis, imunomodulator, *Staphylococcus aureus*, transportasi, kapasitas, kehamilan, zigot, embrio, keguguran

Ringkasan Book Two Part Four

Karakterisasi Molekuler faktor virulensi dan peranannya pada patogenesis infeksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus merupakan flora normal pada hidung, kulit dan selaput mukosa manusia. Ia termasuk kuman gram(+) membentuk koloni warna kuning emas, tidak bergerak, *facultative anaerobe*, memfermentasi glukosa dan manitol, katalase dan kogulase (+). Dinding *S. aureus* terbentuk dari peptidoglikan, *teichoic acid* dan *lipoteichoic acid*. *Teichoic acid* terikat kovalen dengan peptidoglikan, sedangkan *lipoteichoic acid* menancap pada membran sitoplasma. Protein permukaan, lipoprotein, diangkut lewat membran bakteri, ditempatkan pada dinding sel bakteri. *S. aureus* umumnya dianggap sebagai patogen ekstraseluler, tetapi dapat diinternalisasi.

Faktor virulensi *Staphylococcus aureus* meliputi : a) Komponen struktur seperti kapsul, peptidoglikan dan protein permukaan; b) Komponen yang disekresi ada 2 macam : b.1) toksin seperti eksotoksin, leukocidin Panton Valentin, hemolisin, toksin eksfoliatif dan sitotoksin; b.2) enzim seperti katalase, koagulase, hyaluronidase, fibrinolysin, lipase, nuclease, penicillinase, phosphatase dan protease; c) Regulasi genetik.

Patogenesis *S. aureus* untuk dapat menimbulkan penyakit pada pejamu melalui 2 cara : 1) Invasi, meliputi kolonisasi, invasin dan mengatasi pertahanan sel pejamu, dan 2) Toksikogenesis, racun yang diproduksi oleh *S. aureus*. Spesifisitas kolonisasi dan perlekatan bakteri ke sel pejamu dipengaruhi oleh : 1. *tissue tropism*, 2. *species specificity* dan 3. *genetic specificity within a species*. Patogenesis *S. aureus* yang dianggap bisa berperilaku seperti bakteri intraseluler meliputi : 1. Internalisasi yaitu proses masuknya bakteri ke sitoplasma pejamu, 2. persistensi dan pertumbuhan intraseluler yaitu ketahanan bakteri terhadap pencernaan pejamu di dalam sitoplasma sel pejamu, 3.

menghindari phagosom yaitu proses bakteri menjauhi atau melepaskan diri dari phagosom, 4. menginduksi kematian sel hospes melalui apoptosis atau pironekrosis maupun nekrosis, 5. mengatasi autophagi yaitu bakteri menghindari proses pembersihan yang dilakukan oleh pejamu dan 6. kompetisi besi dengan jalan menghasilkan enzim tertentu yang dapat merebut zat besi dari pejamu.

Kata Kunci : karakterisasi molekuler, faktor virulensi, patogenesis, *Staphylococcus aureus*, internalisasi, persistensi, phagosom, apoptosis, autophagi

Ringkasan Book Three Part Five

Metode Pemeriksaan yang diperlukan untuk menilai Respon Imun Infertilitas

Bahan pemeriksaan yang dibutuhkan untuk menilai respon imun infertilitas berupa protein atau antibodi. Sumber bahan pemeriksaan tersebut dapat berasal dari pasangan pria maupun wanita. Pada pasangan pria, bahan pemeriksaan bisa diambil dari spermatozoa. Bahan pemeriksaan yang didapat dari pasangan wanita dapat diperoleh dari serum darah maupun sekret yang dikeluarkan dalam saluran genitalia wanita.

Metode pemeriksaan yang digunakan untuk menilai respon imun dari bahan yang membangkitkannya ataupun produk yang dihasilkannya banyak macamnya. Pemilihan metodenya bergantung pada hasil akhir yang kita harapkan. Sedangkan hasil akhirnya dapat berupa protein atau imunoglobulin atau antibodi. Protein dapat diketahui sifatnya seperti berat molekul, kadar, titik isoelektrik, kelarutan, aktifitas biologi, struktur bangun, urutan asam amino, urutan basa nukleotidanya. Imunoglobulin atau antibodi dapat diamati kelas, subkelas, berat molekul, titik isoelektrik, kadar, kelarutan, ataupun kestabilannya.

Metode pemeriksaan yang digunakan meliputi imunopresipitasi, elisa, kromatografi, spektrofotometri massa, spektroskopi, kristalografi, elektroforesis, sds-page, *western blot*, *dot blot*, 2d elektroforesis, Tes Lowry atau Bradford, Uji *ultracentrifugation dispersity sedimentation*, metode *size exclusion chromatography*, spektroskopi *nuclear magnetic resonance*, imunohistokimia, metode *surface plasmon resonance*, atau *fluorescence resonance energy transfer*.

Kata Kunci : metode pemeriksaan, respon imun infertilitas, bahan pemeriksaan, serum, sekret, protein, antibodi, imunoglobulin

Respon Imun yang terjadi akibat infeksi *Staphylococcus aureus* pada Saluran Reproduksi Wanita terhadap Spermatozoa

Muhammad Anas

Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Surabaya

ABSTRAK

Vaginitis non spesifik yang terjadi pada wanita pasangan infertil khususnya yang disebabkan oleh *Staphylococcus aureus* akan merangsang sistem imun bawaan maupun sistem imun adaptif. Pada respon imun adaptif terdapat respon imun adaptif seluler dan respon imun adaptif humoral.

Respon imun adaptif humoral dapat diproduksi sebagai sekresi dalam sirkulasi dan dalam lumen organ - saluran reproduksi wanita. Pada saluran reproduksi wanita khususnya servik uteri akan disekresikan sekretori-IgA anti *Staphylococcus aureus*.

Sekretori-IgA anti *Staphylococcus aureus* dapat bereaksi silang dengan protein permukaan spermatozoa. Sehingga fungsi spermatozoa terganggu khususnya untuk melakukan fertilisasi.

Kata Kunci: *Staphylococcus aureus*, protein permukaan, s-IgA, spermatozoa.

Immune Respons induced by *Staphylococcus aureus* infection of female reproductive tract against spermatozoa

Muhammad Anas
Medical Faculty of UM Surabaya

ABSTRACT

Non-specific vaginitis in women of infertile couples, especially that caused by *Staphylococcus aureus* stimulates the innate immune system and the adaptive immune system. In the adaptive immune responses there are cellular adaptive immune response and humoral adaptive immune response.

Humoral adaptive immune response can be produced as a secretion in the circulation and in the lumen of the organ - the female reproductive tract. In the female reproductive tract, especially at cervix uteri be secreted secretory IgA anti-*Staphylococcus aureus*.

Secretory IgA anti-*Staphylococcus aureus* can cross-react with sperm surface protein. Thus impaired sperm function, especially for fertilization.

Key word: *Staphylococcus aureus*, surface protein, s-IgA, spermatozoa.

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Kata Pengantar	ii
Ringkasan Book One	iv
Ringkasan Book Two	v
Ringkasan Book Three	vi
Ringkasan Book Four	vii
Ringkasan Book Five	viii
Kerangka Konsep	ix
Abstrak	xi
Abstact	xii
Daftar Isi	xiii
Daftar Tabel	xvi
Daftar Gambar	xvii
Daftar Singakatan dan Istilah	xviii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.2. Latar Belakang	1
1.2. Permasalahan Umum	4
1.2.1. Permasalahan Khusus	4
1.3. Tujuan Umum	4
1.3.1. Tujuan Khusus	5
1.4. Manfaat Penelitian	5
1.4.1. Manfaat Akademis	5
1.4.2. Manfaat Klinis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1. Vaginitis non Spesifik	6
2.1.1. Etiologi Vaginitis non Spesifik	6
2.1.2. Profil Protein Permukaan Bakteri	9
2.1.3. Mukus Serviko Vagina	10
2.1.3.1. Mukus Vulvovagina	10
2.1.3.2. Komposisi Mukus Vulvovagina	10
2.1.3.3. Komposisi Mukus Servik Uteri	10
2.1.3.4. Tempat Produksi Mukus Servik Uteri	11

2.1.3.5. Jenis Mukus Servik Uteri	11
2.1.3.6. Fungsi Mukus Servik Uteri	12
2.2. Imunologi Vagina dan Servik Uteri	13
2.2.1. Efek Siklus Menstruasi pada Sel Epitel dan Sel Imun pada Saluran Reproduksi Wanita	14
2.2.2. Migrasi Sel Imun pada Saluran Reproduksi Wanita	16
2.2.3. Aktifital CTL pada Saluran Reproduksi Wanita	17
2.2.4. Antibodi pada Saluran Reproduksi Wanita	18
2.3. Hubungan Infeksi pada Saluran Reproduksi Wanita dan Imunitas	19
2.4. Regulasi aktivitas antimikroba oleh hormon seks pada Saluran Reproduksi Wanita	28
2.5. Hubungan infeksi pada Saluran Reproduksi Wanita, Sistem Imun dan Infertilitas	30
2.6. Ekspresi Reseptor Kemokin pada Saluran Reproduksi Wanita	35
2.7. Kemokin, Sitokin dan Antimikroba pada Saluran Reproduksi Wanita	35
2.8. Spermatozoa	37
2.8.1. Permukaan Spermatozoa	37
2.8.2. Proteomik Spermatozoa Manusia	37
2.8.3. Gerakan Spermatozoa Manusia melalui Saluran Reproduksi Wanita	38
2.8.3.1. Gerakan Spermatozoa Manusia yang Belum Terkapasitas	38
2.8.3.2. Gerakan Spermatozoa Manusia yang Terkapasitas	39
2.9. ASA pada Wanita	40
2.9.1. Asal Usul ASA pada Wanita	41
2.9.2. Mekanisme ASA Menginduksi Infertilitas	43
2.9.2.1. ASA Menurunkan Motilitas Spermatozoa	44
2.9.2.2. ASA Mempengaruhi Penetrasi Spermatozoa pada Mukus Servik Uteri	44

BAB III PEMBAHASAN	46
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	47
4.1. Kesimpulan	47
4.2. Saran	47
DAFTAR PUSTAKA	48

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1	Peta mikroba spesimen sekret vagina dari penderita vaginitis non spesifik	7
Tabel 2.2	Pola mikroba spesimen sekret vagina dari penderita vaginitis non spesifik	8
Tabel 2.3	Pola Bakteri Sekret Vagina dari Wanita Pasangan Infertil di RSI Hasanah Muhammadiyah Mojokerto tahun 2013	9
Tabel 2.4	Sel Imun pada saluran reproduksi wanita. Ringkasan fungsi dan distribusi sel dalam saluran reproduksi wanita bagian atas (tuba falopii, uterus dan mukosa endoservik) dan saluran reproduksi wanita bagian bawah (ektoservik dan mukosa vagina). Distribusi sel (bagian atas vs bawah) dinyatakan relatif terhadap satu sama lain	17
Tabel 2.5	Penetrasi 35S-TSST-1 melalui mukosa vagina babi yang intak dengan keberadaan TSS <i>S. aureus</i>	26
Tabel 2.6	Mucosal site of antigen encounter determines the quality of immune responses. Situs mukosa antigen pertemuan menentukan kualitas respon imun	30
Tabel 2.7	Defined antigens of naturally occurring human ASA	38

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Zona Kriptus dan Struktur Servik	11
Gambar 2.2	Katup Biologis	13
Gambar 2.3	Skema Sistem Imun Mukosa Saluran Reproduksi Wanita Manusia	15
Gambar 2.4	Skema komponen utama sistem imun bawaan mukosa pada saluran reproduksi wanita	16
Gambar 2.5	Efektor Respon Imun Adaptif (TH1: seluler dan TH2: humoral)	19
Gambar 2.6	<i>Mediators of adaptive immunity in the human female</i>	24
Gambar 2.7	Produksi sitokin dan kemokin oleh HVEC setelah dipaparkan 10^9 CFU TSST-1 yang diproduksi <i>S. aureus</i> MNSM per ml pada 3 dan 6 jam diukur dengan ELISA	26
Gambar 2.8	Mukosa vagina babi	26
Gambar 2.9	Pola konsentrasi hormon reproduksi, imunoglobulin dan sitokin, dengan perbandingan hari relatif terhadap ovulasi	29
Gambar 2.10	Spermatozoa	37
Gambar 2.11	Respon imun terhadap antigen (Ag) menghasilkan antibodi dengan bentukan idiotypic (Id) yang unik terdiri dari tempat pengikatan antigen atau antibodi paratope	42

DAFTAR SINGKATAN DAN ISTILAH

<i>A-CMD</i>	: <i>Abnormal Cervical Mucus Discharge</i>
<i>ADCC</i>	: <i>Antibody Dependent Cell Cytotoxicity</i>
<i>APC</i>	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
<i>ASA</i>	: <i>Antisperm antibody</i>
<i>ASC</i>	: <i>Antigen Secreting Cells</i>
<i>BV</i>	: <i>Bacterial Vaginosis</i>
<i>C3, C1q</i>	: <i>Complement 3, Complement 1q</i>
<i>cAMP</i>	: <i>Cyclic Adenosine MonoPhosphate</i>
<i>CD1d</i>	: <i>Cluster Differentiation 1d</i>
<i>CFU</i>	: <i>Colony-forming units</i>
<i>CT</i>	: <i>Cholera Toxin</i>
<i>CTL</i>	: <i>Cytotoxic Lymphosite</i>
<i>DC</i>	: <i>Dendritic Cells</i>
<i>DNA</i>	: <i>Deoxyribo Nucleaic Acid</i>
<i>DTH</i>	: <i>Delayed Type Hypersensitivity</i>
<i>ELISA</i>	: <i>Enzim Linked Immunosorbent Assay</i>
<i>ESWBC</i>	: <i>Eleveted Seminal White Blood Cells</i>
<i>Fab</i>	: <i>Antigen binding fragment</i>
<i>Fc</i>	: <i>crystallizable Fragment</i>
<i>FcRn</i>	: <i>Neonatal Fc receptor</i>
<i>FS-CR</i>	: <i>First service Conception Rate</i>
<i>G-CSF</i>	: <i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
<i>GM-CSF</i>	: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>

<i>GPI</i>	: <i>Glycosyl phosphatidyl inositol</i>
<i>GROα</i>	: <i>Growth-related oncogene α</i>
<i>HBD2</i>	: <i>Human Beta Defensine 2</i>
<i>HSV</i>	: <i>Herpes Simplex virus</i>
<i>HVEC</i>	: <i>Human Vaginal Epthelial Cells</i>
<i>ICAM-1</i>	: <i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
<i>IFN-γ</i>	: <i>Interferron – gamma</i>
<i>IgG</i>	: <i>Imunoglobulin G</i>
<i>IL 12</i>	: <i>Interleukin 12</i>
<i>LC</i>	: <i>Langhan Cell</i>
<i>LF</i>	: <i>Lactoferin</i>
<i>LFA-3</i>	: <i>Lymphocyte Function Associated Antigen 3</i>
<i>MAC</i>	: <i>Membrane Attack Complex</i>
<i>MCP-1</i>	: <i>Macrophage chemotactic protein 1</i>
<i>MIP-1α</i>	: <i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
<i>MUC</i>	: <i>Mucins Gene</i>
<i>MyD88</i>	: <i>Myeloid Differentiation Factor 88</i>
<i>MΦ</i>	: <i>Macrophage</i>
<i>N-CMD</i>	: <i>Normal Cervical Mucus Discharge</i>
<i>NOD</i>	: <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
<i>OMP</i>	: <i>Outer Membrane Protein</i>
<i>OUP</i>	: <i>Opportunistic Uterine Pathogen</i>
<i>PBMC</i>	: <i>Peripheral Blood Monocyte Cells</i>
<i>PC</i>	: <i>Plasma Cell</i>
<i>pDC</i>	: <i>Plasmacytoid dendritic cell</i>

<i>PDGF</i>	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
<i>PID</i>	: <i>Pelvic Inflammatory Disease</i>
<i>pIgR</i>	: <i>Polimer Immunoglobulin Receptor</i>
<i>PMN</i>	: <i>Limfosit Polimorfonuklear</i>
<i>PPD</i>	: <i>Purified Protein Derivative</i>
<i>PPD</i>	: <i>Purified Protein Derivative</i>
<i>PRRs</i>	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
<i>PUP</i>	: <i>Potensial Uterine Pathogen</i>
<i>RANTES</i>	: <i>Regulated on activation normal T cell expressed and secreted</i>
<i>RNA</i>	: <i>RiboNucleic Acid</i>
<i>SC</i>	: <i>Secretory Component</i>
<i>SDF1</i>	: <i>Stromal Derived Factor 1</i>
<i>SDS-PAGE</i>	: <i>Sodium Dodecyl PolyAcrylamide Gel</i>
<i>Sel NK</i>	: <i>Sel Nuklear Killer</i>
<i>SIF</i>	: <i>Sperm immobilization factor</i>
<i>sIgA</i>	: <i>Secretory IgA</i>
<i>SLPI</i>	: <i>Secretory leucocyte protease inhibitor</i>
<i>STD</i>	: <i>Sexual Transmitted Disease</i>
<i>TGFβ</i>	: <i>Tumor Growth Factor-β</i>
<i>Th1,2,17</i>	: <i>T Helper 1,2,17</i>
<i>TLR</i>	: <i>Toll Like Receptor</i>
<i>TNF-α</i>	: <i>Tumor Necrotizing Factor- α</i>
<i>Treg</i>	: <i>T Regulator</i>
<i>TSST-1</i>	: <i>Toxic shock syndrome toxin 1</i>

TZ : *Transitional Zone*
UP : *Uterine Pathogen*
VLP : *Virus like particle*
WHO : *World Health Organisation*
α-DF : *Alpha Defensine*

1

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Vulvovaginitis adalah kondisi ginekologis yang paling sering dijumpai para praktisi di pelayanan primer pada wanita (Latif, 2012). Kejadian vulvovaginitis berkaitan erat dengan kejadian *sexual transmitted diseases (STD)*. *Staphylococcus aureus (S. aureus)* merupakan salah satu kuman penyebab vulvovaginitis. Kejadian infertilitas sekunder lebih tinggi dibandingkan infertilitas primer, hal ini disebabkan tingginya kejadian *STD*, intervensi medis yang tidak higienis khususnya saat persalinan dan induksi abortus (Dhont, *et al.*, 2011).

Staphylococcus aureus yang diisolasi dari servik uteri wanita infertil dapat menyebabkan imobilisasi spermatozoa manusia secara *in vitro*. Komponen aktif tersebut berada di ekstraseluler dan berupa protein yang disebut *sperm immobilization factor (SIF)* dengan berat molekul 20 kDa (Prabha, *et al.*, 2009). Prabha, Chaudhary and Sarwal (2010) mengatakan berat molekul *spermagglutinating factor* dari *S. aureus* sebesar 57 kDa. Ratri (2008) mendapatkan berat molekul dinding *S. aureus* sebesar 37 kDa. Sunihapsari (2002) menunjukkan bahwa protein membran spermatozoa tidak dikenali oleh antibodi *Staphylococcus koagulasi negatif* isolat vagina. Kultur sekret vagina yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSSA Malang selama 4 tahun dari tahun 2007 hingga 2010 didapatkan angka kejadian *Staphylococcus* sebesar 30,5% dengan *S. aureus* sebesar 4,2% dan *Staphylococcus koagulase negatif* sebesar 26,3% (WHONET, 2012). Studi pendahuluan Hubungan Vaginitis Non Spesifik dengan Sekretori Imunoglobulin A Servik Uteri Pada Wanita Pasangan Infertil Di RSI Hasanah Muhammadiyah Mojokerto tahun 2013-2014 mendapatkan dominasi *S. aureus* dan *Escherichia coli (E. coli)* masing-masing sebesar 21%, dengan sensitivitas terhadap antibiotika berkisar antara 25-100% (Anas, *et al.*, 2016).

perkembangan janin yang secara allogenik berbeda. Ada lebih dari 30 jenis parasit, bakteri dan virus yang menginfeksi saluran reproduksi wanita. Termasuk di dalamnya *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Herpes simplex virus tipe 2*, *Human papillomavirus*, *Human immunodeficiency virus (AIDS)* dan *virus Hepatitis B* (Hickey, et al., 2011).

Berbagai penelitian khususnya di India menunjukkan bahwa *S. aureus* merupakan salah satu organisme paling lazim dalam saluran reproduksi pria dan wanita, tetapi kebanyakan praktisi menganggapnya sebagai kontaminasi dan dianggap tidak penting. Saat ini keberadaan organisme ini tidak boleh diabaikan, karena inkubasi spermatozoa dengan *S. aureus* dapat mengurangi motilitas spermatozoa. Meskipun *S. aureus* telah dilaporkan menyebabkan imobilisasi spermatozoa, namun perannya dalam infertilitas belum dijelaskan (Kaur, S., & Prabha, V., 2012).

Terdapat keunikan dalam penyeimbangan antara sistem imun dengan prokreasi, sistem imun yang terdiri dari komponen imun bawaan dan adaptif responsif terhadap estradiol dan progesteron secara siklik selama siklus menstruasi. Dalam mempersiapkan saluran reproduksi untuk fertilisasi dan implantasi, estradiol dan progesteron secara bersamaan mengatur sistem imun di tuba falopii, uterus, servik uteri, dan vagina untuk mendukung proses reproduksi (Wira, et al., 2010).

Sistem imun mukosa saluran reproduksi terdiri dari sel imun yang bermigrasi ke uterus, servik uteri, dan vagina serta sel epitel residen dan menunjang sel stroma. Hormon seks mempengaruhi migrasi makrofag dan sel dendritik serta sel T dan sel B dengan mempengaruhi ekspresi molekul adhesi dan faktor kemotaktik. Diantara sel-sel penting dalam memberikan perlindungan imun, sel epitel diakui sebagai sel pluripoten. Sel epitel, selain memberikan perlindungan barrier, transportasi imunoglobulin (IgA dan IgG) dalam sekresi saluran reproduksi wanita, juga menghasilkan antimikroba baik bakterisidal maupun virusidal. Melalui produksi sitokin dan kemokin, sel epitel memberi

sinyal perekrutan dan aktivasi sel lainnya dari imun bawaan dan adaptif. Dalam keseimbangan dinamis, sel epitel saluran reproduksi wanita merespon langsung pada estradiol dan progesteron, serta secara tidak langsung dengan sitokin dan faktor pertumbuhan yang dihasilkan fibroblas residen dan sel imun yang bermigrasi ke saluran reproduksi. Respon ini merupakan komunikasi dua arah yang terjadi di mana sel epitel langsung baik fungsi reproduksi serta fungsi imun untuk mempertahankan tingkat perlindungan yang efektif, yang membedakan antara patogen, komensal, sperma alogenik, dan janin yang sedang berkembang (Wira, *et al.*, 2010). Siklus menstruasi terbukti mempengaruhi secara langsung maupun tidak langsung pada semua aspek imunitas bawaan dan adaptif pada saluran reproduksi wanita (Hickey, *et al.*, 2011).

Patogen yang diperoleh secara seksual awalnya menginfeksi mukosa saluran reproduksi wanita kemudian terjadi penyebaran sistemik. Dengan HIV, misalnya, sel-sel saluran reproduksi wanita, termasuk makrofag, sel dendritik (DC) dan sel epitel mentransfer virus tersebut melalui mukosa untuk menargetkan sel T CD4+, yang menyebabkan replikasi virus dan penyebaran ke seluruh tubuh. Perlindungan saluran reproduksi wanita terdapat beberapa lapisan respon imun yang diatur hormon seks untuk memberikan perlindungan terhadap patogen (Hickey, *et al.*, 2011).

Jaringan mukosa saluran reproduksi dan usus distal wanita dan pria merupakan portal masuknya agen infeksi penyakit menular seksual (PMS). Saluran reproduksi dan usus keduanya merupakan komponen sistem imun mukosa, yang menampilkan respon imun sangat berbeda. Sekresi eksternal yang khas cairan usus mengandung sebagian besar sekretori IgA (s-IgA) yang diproduksi secara lokal sebagai isotipe dominan, air mani serta cairan serviko-vagina, mengandung lebih banyak IgG dari IgA dengan tingkat imunoglobulin yang sangat bervariasi di saluran kelamin wanita dengan kendali hormonal, karena ekspresi reseptor imunoglobulin yang terlibat dalam transportasi transepitelialnya (Hickey, *et al.*, 2011).

Selama beberapa dekade pertama abad 20 banyak penelitian pada hewan menunjukkan imunisasi homolog atau heterolog pada wanita dengan spermatozoa atau testis dapat menginduksi aktivitas antibodi anti spermatozoa dan infertilitas. Baskin melaporkan 20 wanita subur diimunisasi 3 kali intramuskular dengan interval mingguan menggunakan ejakulat pasangannya. Sembilan belas wanita menunjukkan aktifitas yang melumpuhkan spermatozoa dalam serumnya setelah 1 minggu injeksi terakhir dan bertahan 1 tahun. Seorang wanita hamil setelah 12 bulan ketika immobilisasi spermatozoa tidak terdeteksi lagi di serumnya (Clarke, 2009). Franklin dan Dukes menemukan bahwa 20,1% dari 214 wanita yang menjalani investigasi infertilitas memiliki aktivitas agglutinasi spermatozoa dalam serumnya. Wanita dengan infertilitas tak terjelaskan memiliki insiden yang lebih tinggi (72,1%) dibanding wanita dengan penyebab organik (8,4%) atau wanita usia subur (5,7%) (Clarke, 2009).

Pengaruh infeksi pada saluran reproduksi baik pria maupun wanita akan berkontribusi terhadap terjadinya infertilitas di kemudian hari. Kejadian ini berkaitan dengan terbentuknya *antisperm antibody (ASA)* yang akan mengganggu pengangkutan spermatozoa menuju tempat keberadaan oosit. Dengan tidak sampainya spermatozoa di tempat oosit berada yaitu di tuba fallopii bagian distal maka pembuahan tidak terlaksana sehingga kehamilan tidak akan terjadi.

Oleh karenanya pada karya tulis ini, kita membahas identifikasi protein-protein yang terdapat pada kuman penyebab vulvovaginitis khususnya vaginitis non spesifik, spermatozoa, cairan atau sekret yang diproduksi pada saluran reproduksi wanita pasangan infertil.

1.2. Permasalahan Umum

Apakah terjadinya kolonisasi dan infeksi bakteri *S. aureus* pada saluran reproduksi bagian bawah (vagina dan servik uteri) wanita pasangan infertil menyebabkan diproduksi sekretori IgA anti *S. aureus* sehingga mengganggu motilitas spermatozoa pria pasangan infertilnya?

1.2.1. Permasalahan Khusus

- a) Bagaimana profil protein permukaan bakteri penyebab vaginitis non spesifik khususnya bakteri *S. aureus* pada wanita pasangan infertil ?
- b) Bagaimana reaksi imun adaptif humoral lokal wanita pasangan infertil dalam merespon vaginitis non spesifik khususnya yang disebabkan bakteri *S. aureus* ?
- c) Apakah terdapat variabilitas protein permukaan bakteri lain penyebab vaginitis non spesifik pada wanita pasangan infertil terhadap sekretori Immunoglobulin A anti bakteri *S. aureus*
- d) Bagaimana profil protein permukaan spermatozoa pada pria pasangan infertil yang wanita pasangan infertil nya mengalami vaginitis non spesifik dengan bakteri *S. aureus* ?
- e) Dimana lokasi protein spermatozoa pria pasangan infertil yang dikenali oleh sekretori imunoglobulin A anti bakteri *S. aureus* wanita pasangan infertil yang mengalami vaginitis non spesifik ?
- f) Apakah pergerakan spermatozoa pria pasangan infertil terganggu oleh sekretori IgA anti *S. aureus* wanita pasangan infertil ?

1.3. Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah kolonisasi dan infeksi bakteri *S. aureus* pada saluran reproduksi bagian bawah wanita pasangan infertil menyebabkan diproduksi sekretori IgA sehingga mengganggu motilitas spermatozoa pria pasangan infertil nya.

1.3.1. Tujuan Khusus

- a) Mengetahui profil protein permukaan bakteri penyebab vaginitis non spesifik khususnya bakteri *S. aureus* pada wanita pasangan infertil
- b) Membuktikan adanya reaksi imun adaptif humoral lokal pada saluran reproduksi bagian bawah wanita pasangan infertil dalam merespon vaginitis non spesifik khususnya yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* .
- c) Mengetahui variabilitas protein permukaan bakteri penyebab vaginitis non spesifik pada wanita pasangan infertil terhadap sekretori Imunoglobulin A anti bakteri *S. aureus*
- d) Mengetahui profil protein permukaan spermatozoa pada pria pasangan infertil yang wanita pasangan infertil nya mengalami vaginitis non spesifik dengan bakteri *S. aureus*
- e) Menentukan lokasi protein spermatozoa pria pasangan infertil yang dikenali oleh sekretori imunoglobulin A anti bakteri *S. aureus* wanita pasangan infertil yang mengalami vaginitis non spesifik
- f) Membuktikan adanya gangguan pergerakan spermatozoa pria pasangan infertil oleh sekretori IgA anti *S. aureus* wanita pasangan infertil

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademis

Menambah wawasan ilmu pengetahuan mengenai pengaruh kolonisasi dan infeksi bakteri *S. aureus* pada saluran reproduksi bagian bawah wanita pasangan infertil sehingga menyebabkan diproduksinya sekretori IgA dan menginduksi gangguan motilitas spermatozoa pria pasangan infertil .

1.4.2. Manfaat Klinis

- Memberikan peluang strategis untuk merancang penelitian lebih lanjut pengaruh kolonisasi dan infeksi bakteri *S. aureus* pada saluran reproduksi bagian bawah wanita pasangan infertil

- Memberikan peluang untuk pengembangan vaksin bakteri *S. aureus* dalam upaya pencegahan vaginitis non spesifik yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* .
- Memberikan peluang untuk pengembangan terapi dalam upaya pencegahan vaginitis non spesifik oleh bakteri *S. aureus* pada wanita pasangan infertil .

II

Tinjauan Pustaka

2.1. Vaginitis non Spesifik

Vaginitis non Spesifik merupakan salah satu manifestasi dari vulvovaginitis yaitu infeksi yang terjadi di vulva dan vagina. Keluhan yang sering muncul adalah keputihan dan ketidaknyamanan di daerah vulva dan vagina atau kedua-duanya (Gor, 2012; Latif, 2012). Vulvovaginitis adalah kondisi ginekologis yang paling sering dijumpai oleh para praktisi pada pelayanan primer pada wanita (Latif, 2012). Keluhan mengenai keadaan vagina sering didapatkan di masyarakat dan merupakan salah satu alasan yang paling sering mengapa pasien mengunjungi ahli obstetri ginekologi. Meskipun keluhan yang berhubungan dengan vagina jarang sampai mengancam nyawa, keluhan tersebut dapat merupakan morbiditas yang penting, jika ditinjau dari ketidaknyamanan, nyeri, dan fungsi seksual serta citra diri (Nyirjesy *et al.*, 2006).

2.1.1. Etiologi Vaginitis non Spesifik

Sekitar 90% kasus vaginitis terbagi menjadi tiga penyebab utama : 1) vaginitis non spesifik (vaginosis bakterial), 2) kandidiasis vagina dan 3) infeksi trikomonas vagina (Latif, 2012). Penyebab yang paling sering dari vaginitis pada wanita yang simtomatik adalah vaginitis non spesifik (vaginosis bakterial) 40-45%, kandidiasis vagina 20-25% dan trikomoniasis 15-20%; sekitar 7-72% wanita dengan vaginitis belum terdiagnosis (Gor, 2012).

Vaginitis non spesifik (vaginosis bakterial) adalah infeksi polimikrobal yang saling sinergi. Di vagina populasi flora normal predominan dengan *Lactobacilli* ketika jumlahnya berkurang, maka populasi *Gardnerella vaginalis* (*G. vaginalis*) dan bakteri anaerob lain meningkat (Curran, 2012). Vaginitis non spesifik (vaginosis bakterial) ini disebabkan karena pertumbuhan yang berlebihan dari mikroorganisma seperti *G. vaginalis*, *Mobiluncus*

2012). *G. vaginalis* merupakan satu-satunya spesies dari genus *Gardnerella*. *G. vaginalis* semula dikenal sebagai *Haemophilus vaginalis*, kemudian sebagai *Corynebacterium vaginale*. *G. vaginalis* merupakan bakteri *non motile, non flagellated, non sporeforming, facultative anaerobic dan non encapsulated*. Walaupun *G. vaginalis* tampak secara mikroskopis sebagai batang *gram-variable*, biasanya dikategorikan sebagai batang *gram-negative* (Curran, 2012).

Penelitian Asih (2003) di Poliklinik Kandungan RSUD Dr Sutomo Surabaya mendapatkan peta mikroba pada kasus vaginitis non spesifik seperti pada dua tabel berikut :

Tabel 2.1. Peta mikroba spesimen sekret vagina dari penderita vaginitis non spesifik

Jenis Mikroba	Jumlah isolat positif (%) n=46
<i>Anaerob :</i>	
<i>Gardnerella vaginalis</i>	52,17
<i>Peptostreptococcus sp</i>	13,04
<i>Peptococcus sp</i>	13,04
<i>Lactobacillus acidiphilus</i>	10,87
<i>Bacteriodes fragilis</i>	4,35
<i>Fusobacterium sp</i>	2,17
<i>Aerob :</i>	
<i>Psedomonas aeruginosa</i>	21,74
<i>Escherichia coli</i>	19,57
<i>Klebsiella sp</i>	13,04
<i>Proteus sp</i>	6,52
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	6,52
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,35
<i>Streptococcus pyogenes</i>	4,35
<i>Streptococcus viridans</i>	2,17
<i>Jamur :</i>	
<i>Candida albicans</i>	8,7

Disadur dari Asih, 2003.

Tabel 2.2. Pola mikroba spesimen sekret vagina dari penderita vaginitis non spesifik.

Jenis Mikroba	Jumlah isolat positif (%) n=46
Deteksi isolat campuran (pada satu spesimen)	
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,7
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Staphylococcus aureus</i>	4,35
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Escherichia coli</i>	4,35
<i>Escherichia coli</i> + <i>Lactobacillus acidofilus</i>	4,35
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Candida albicans</i>	4,35
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Streptococcus pyogenes</i>	4,35
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Streptococcus viridans</i>	4,35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Peptostreptococcus sp</i>	2,17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + <i>Candida albicans</i>	2,17
<i>Staphylococcus coagulase negative</i> + <i>Lactobacillus acidofilus</i>	2,17
<i>Staphylococcus coagulase negative</i> + <i>Peptostreptococcus sp</i>	2,17
<i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Lactobacillus acidofilus</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Peptococcus sp</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Peptostreptococcus sp</i>	2,17
<i>Escherichia coli</i> + <i>Peptostreptococcus sp</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Bacteriodes fragilis</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Escherichia coli</i> + <i>Peptostreptococcus sp</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Bacteriodes fragilis</i> + <i>Peptococcus sp</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Klebsiella pneumoniae</i> + <i>Peptococcus sp</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,17

<i>+ Fusobacterium sp</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa + Peptococcus sp + Lactobacillus acidophilus</i>	2,17
<i>Pseudomonas aeruginosa + Peptostreptococcus sp + Lactobacillus acidophilus</i>	2,17
<i>Gardnerella vaginalis + Proteus mirabilis + Peptococcus sp + Candida albicans</i>	2,17
Penyebab infeksi campuran :	69,57
Deteksi isolat tunggal (pada satu spesimen) :	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	6,52
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6,52
<i>Gardnerella vaginalis</i>	4,35
<i>Proteus mirabilis</i>	4,35
<i>Escherichia coli</i>	2,17
<i>Peptostreptococcus sp</i>	2,17
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2,17
<i>Staphylococcus coagulase negative</i>	2,17
Penyebab infeksi tunggal :	30,43

Keterangan : Spesimen sekret vagina diperoleh dari hapusan daerah fornix vagina sebelum penderita dapat pengobatan

Disadur dari Asih, 2003.

Terdapat lebih dari 30 jenis parasit, bakteri dan virus yang menginfeksi saluran reproduksi wanita, termasuk di dalamnya *Trichomonas vaginalis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Herpes simplex virus tipe 2*, *Human papillomavirus*, *Human immunodeficiency virus (AIDS)* dan virus *Hepatitis B*. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO), 2001, memperkirakan setiap hari satu juta orang terkena infeksi menular seksual, yang telah mencapai proporsi epidemi di seluruh dunia (Hickey, *et al.*, 2011). Kultur sekret vagina yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi RSSA Malang selama 4 tahun dari

tahun 2007 hingga 2010 mendapatkan angka kejadian *Staphylococcus* sebesar 30,5% dengan *S. aureus* sebesar 4,2% dan *Staphylococcus koagulase negatif* sebesar 26,3% (WHONET, 2012).

Studi Pendahuluan Hubungan Vaginitis Non Spesifik dengan sekretori Immunoglobulin A Servik Uteri Pada Wanita Pasangan Infertil di RSI Hasanah Muhammadiyah Mojokerto tahun 2013 mendapatkan profil peta bakteri seperti tabel di bawah :

Tabel 2.3. Pola Bakteri Sekret Vagina dari Wanita Pasangan Infertil di RSI Hasanah Muhammadiyah Mojokerto tahun 2013.

No	Mikroorganisma	Σ	%	Σ	%
1	<i>S. aureus</i>	4	21	4	27
2	<i>E. coli</i>	4	21	4	27
3	<i>S. epidermidis</i>	3	16	3	20
4	<i>C. albican</i>	3	16		
5	<i>Streptococcus faecalis</i>	2	11	2	13
6	<i>Streptococcus alfa H</i>	2	11	2	13
7	Tidak ada pertumbuhan	1	5		
Jumlah		19	100	15	100

Disadur dari Anas, *et al*, 2016

Dari tabel 2.3 diatas isolat bakteri yang didapatkan terbesar adalah *S. aureus* dan *E. coli* sebesar masing-masing 27% yang merupakan separuh lebih dari bakteri yang teridentifikasi.

2.1.2. Profil Protein Permukaan Bakteri

Kuman penyebab vaginitis non spesifik sangat banyak variasinya, *S. aureus* merupakan salah satu penyebabnya. *S. aureus* yang diisolasi dari servik uteri wanita pasangan infertil dapat menyebabkan imobilisasi spermatozoa manusia secara in vitro. Komponen aktif tersebut berada di bagian ekstraseluler dan berupa protein yang disebut *sperm immobilization factor (SIF)* dengan berat molekul 20 kDa (Prabha, *et al.*, 2009). Prabha, Chaudhary and Sarwal (2010) mengatakan berat molekul reseptor *spermagglutinating factor* 57 kDa. Ratri (2008) mendapatkan berat molekul dinding sel *S. aureus* 37 kDa. Sunihapsari (2002)

menunjukkan bahwa protein membran spermatozoa tidak dikenali oleh antibodi anti *Staphylococcus koagulasi negatif* isolat vagina.

2.1.3. Mukus Serviko Vagina

2.1.3.1. Mukus Vulvovagina

Leukore (mukus vulvovagina) adalah cairan yang dikeluarkan dari alat reproduksi wanita selain darah. Leukore dibedakan menjadi leukore fisiologis dan leukore patologis. Leukore fisiologis terdiri dari cairan dan mukus dengan banyak epitel dan sedikit leukosit, sedangkan leukore patologis mengandung banyak leukosit (Wiknjosastro, 2009).

2.1.3.2. Komposisi Mukus Vulvovagina

Sekresi vagina merupakan campuran dari beberapa komponen termasuk ion (Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-), protein/peptida, glikoprotein, asam laktat, asam asetat, gliserol, urea dan glikogen, yang bervariasi tergantung pada tingkat absolut dan rasio estrogen dengan progesteron, rangsangan seksual dan status *microbiocenosis*. Selain itu, sekresi vagina mengandung sel ekfoliatif dibawah stimulasi estrogen yang didominasi sel lapisan superfisial, sedangkan dalam fase progesteron dari sel lapisan *intermediate*. Pada wanita usia subur, sel epitel vagina terdeskuamasi melepaskan glikogen, yang memasok nutrisi bakteri utama (*Lactobacillus*). Bakteri ini mencerna glikogen dan menciptakan lingkungan asam yang membatasi pertumbuhan bakteri patogen. Dengan demikian, pada usia subur pH normal vagina berkisar 3,5-4,5, dengan nilai khas pH 4,2. Sekresi vagina juga mengandung komponen antimikroba dari sistem imun tubuh dan leukosit (Nikolaitchouk, 2009).

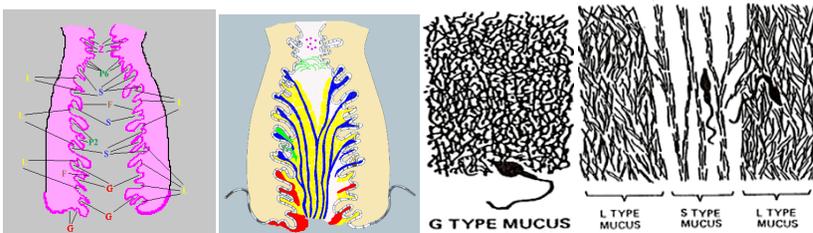
2.1.3.3. Komposisi Mukus Servik Uteri

Mukus servik merupakan penyumbang utama sekresi vagina dan secara fisik mencegah mikroba melekat pada permukaan mukosa. Mukus terdiri dari air (92-98%), glikoprotein (musin), ion, garam anorganik seperti NaCl (Odeblad, 2013),

protein antimikroba dan polipeptida seperti laktoferin, lisozim, imunoglobulin dan defensin (Nikolaitchouk, 2009). Mukus servik berupa hidrogel terdiri dari 90-95% air dan konstituen lain, kadar air naik 98-99% sebelum hari 'puncak' ovulasi, senyawa organik dengan berat molekul rendah misalnya gula sederhana seperti glukosa, maltosa dan manosa (Odeblad, 2013). Konstituen dengan berat molekul tinggi yang paling khas dari sekresi servik adalah mucin pembentuk gel, yang merupakan molekul berpolimer besar. Mucin MUC5B, MUC5A, dan MUC6, dan transmembran MUC16 dan MUC1 diidentifikasi dalam cairan endoservik. Mucin servik merupakan karbohidrat kaya glikoprotein adalah konstituen paling penting yang mendasari sifat fisik dan biologinya (Bjorkman, *et al.*, 2007; Odeblad, 2013). Mukus servik memiliki pH sekitar 8,0 (Odeblad, 2013).

2.1.3.4. Tempat Produksi Mukus Servik Uteri :

Selaput mukus yang melapisi endoservik mengandung banyak celah yang disebut kriptus. Kelenjar dalam kriptus mengeluarkan mukus servik. Letak zona kriptus endoservik : 1. kriptus G gestogenik berada di bagian bawah pembukaan servik, 2. kriptus L estrogenik terdistribusikan pada kanal servik setengah bagian bawah, 3. kriptus S estrogenik mendominasi setengah bagian atas kanal servik, 4. kriptus P2 estrogenik pada pertengahan servik dan setengah bagian atas servik, dan 5. kriptus P6 estrogenik berada di isthmus servikal bagian atas, seperti pada gambar di bawah (Odeblad, 2013).



Gambar 2.1. Zona Kriptus dan Struktur Servik : a,b. Bagian longitudinal servik menunjukkan lokasi dari zona kriptus

endoservik di mana berbagai jenis mukus disekresikan. c. Struktur Mukus G bertindak sebagai penghalang lengkap untuk pergerakan spermatozoid saluran servik. d. Struktur Mukus L menyaring spermatozoid cacat, dan Mukus S mengangkut spermatozoid jalur renang (Odeblad, 2013).

2.1.3.5. Jenis Mukus Servik Uteri:

Mukus servik diklasifikasi dalam 2 jenis, mukus gestogenik dan estrogenik. Jumlah relatif dari setiap jenis mukus menentukan kondisi kesuburan : 1. Mukus Gestogenik disekresikan di bawah stimulasi progesteron disebut mukus G, dan ada dalam fase kurang subur dari siklus dan 2. Mukus Estrogenik disekresikan karena stimulasi estrogen. Mukus servik estrogen merupakan campuran tiga sub tipe dengan viskositas berbeda, yaitu Mukus L, S, P {L (loaf), S (string/sperma-carrier), P (peak)} yang ada pada masa subur dari siklus. Mukus P dibedakan menjadi mukus P2 dan P6. Proporsi tiga sub tipe mukus estrogenik bervariasi selama siklus, dengan kualitas yang berbeda (Odeblad, 2013).

2.1.3.6. Fungsi Mukus Servik Uteri

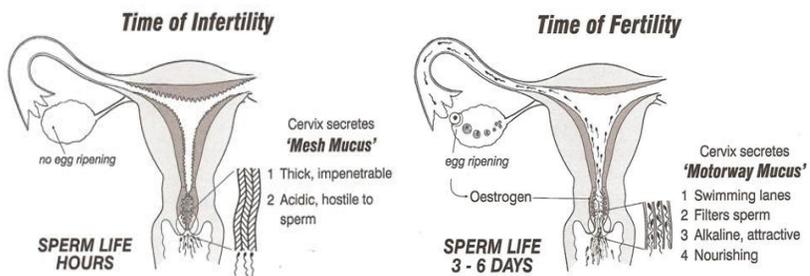
Mukus G berfungsi stopper yang elastis antara vagina dengan uterus berviskositas tinggi yang bertindak sebagai penghalang alami sperma. Mukus G mengandung imunoglobulin dan antimikroba lain yang melindungi organ kelamin bagian atas (Odeblad, 2013).

Mukus L diantara fungsinya adalah sebagai berikut : (A) bersifat basa sehingga menetralkan cairan asam vagina untuk menyediakan media bagi kelangsungan hidup spermatozoa. Spermatozoa mati dalam 30 menit pada lingkungan asam di fase kurang subur, tetapi dapat bertahan hingga lima hari pada mukus tipe subur, (B) memasok kerangka pendukung jalur renang mukus S. Mukus L dan S bekerja sama untuk mempropagasi spermatozoa ke kripta, (C) memiliki viskositas menengah dan bertindak sebagai filter biologis untuk menyaring spermatozoa yang cacat,

dan (D) menutup kriptus S setelah mereka terisi sekitar 20-30 spermatozoa (Odeblad, 2013).

Mucus S mengangkut dan memelihara sperma. Mukus S sangat cair dan membentuk jalur berenang di mana sel spermatozoa bergerak sangat cepat sepanjang kanal servik, mencapai kriptus S pada servik dalam 3-10 minutes. Mukus L dan S bekerja sama mempropagasi spermatozoa secara optimal ke kriptus. Mukus S memelihara spermatozoa dalam kriptus. Spermatozoa dapat bertahan dalam mukus estrogenik yang lebih subur sampai lima hari (Odeblad, 2013).

Mucus P memiliki dua fungsi: (i) P2 memiliki aksi mukolitik (melarutkan mukus), dan (ii) P6 memiliki kapasitas untuk membantu pemindahan sel spermatozoa dari kriptus S ke rongga uterus. Mukus P2 memiliki aktivitas mukolitik mencairkan mukus G untuk memberikan ruang bagi mukus L, dan untuk mencairkan mukus L untuk memfasilitasi aliran mukus S yang diperlukan untuk propagasi spermatozoa ke kriptus. Setelah spermatozoa tinggal di kriptus S, mukolisis dapat membantu mencairkan mukus L untuk memblokir outlet kriptus, sehingga spermatozoa dapat terus bergerak ke atas. Mukus P6 mulai muncul dan meningkat kuantitasnya pada akhir fase subur terutama di sekitar dan tak lama setelah ovulasi yang membantu spermatozoa bergerak dari kriptus S ke kavum uterus (Odeblad, 2013).



Gambar 2.2. Katup Biologis. Katup biologis ditutup (A) : Pada fase kurang subur saluran servik tersumbat oleh plug mukus kental tebal-mukus G gestogenic. Katup biologis terbuka (B) : Pada fase

subur dari siklus os servik terbuka mengeluarkan mukus subur yang jernih, elastis dan seperti putih telur mentah, mukus S estrogen (Odeblad, 2013).

2.2. Imunologi Vagina dan Servik Uteri

Vagina sebagai tempat berupa mukosa menyediakan lingkungan yang menyatukan peran ganda dan kadang bertentangan: reproduksi dan pertahanan. Luas permukaan mukosa vagina berkisar 65-108 cm², dan dilapisi oleh beberapa lapisan sel epitel skuamosa non keratin, yang memberikan penghalang fisik terhadap masuknya patogen pada saluran reproduksi bawah. Selain itu, vagina menopang populasi bakteri komensal yang mendukung fungsi utamanya (Wirth, 2007; Anderson, 2008).

Vagina mempunyai mekanisme pertahanan terhadap bakteri patogen melalui : sekret mukosa, siklus menstruasi, sekresi bioaktif reproduksi, pH yang rendah, dan produk dari metabolisme bakteri komensal. Epitel vagina mempunyai sistem kanal interselular yang menyediakan mekanisme migrasi makromolekul, cairan dan sel dari basal lamina vagina ke lumen vagina. Basal lamina vagina mengandung makrofag, sel langerhans, eosinofil, limfosit, sel plasma dan sel mast. Makrofag, sel langerhans dan limfosit dapat bermigrasi ke dalam intraepithelial (Samoraes, 2000; Todar, 2016).

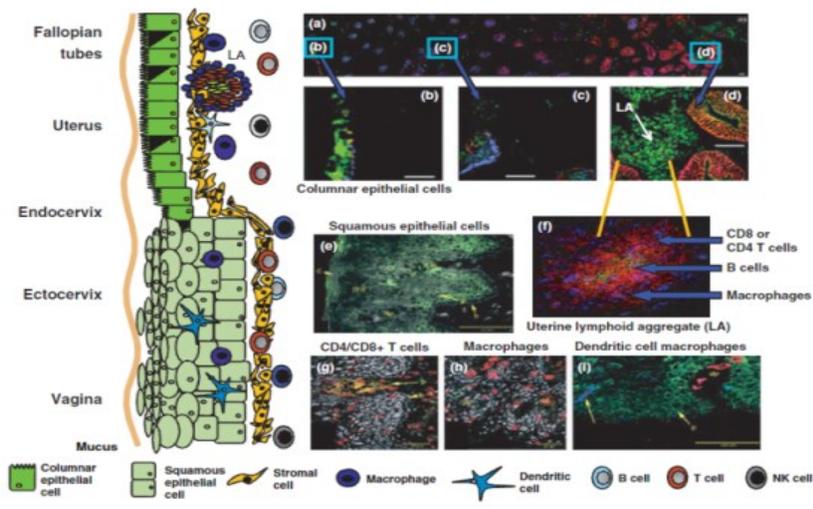
Sebagai penjaga dari sistem imun bawaan, sel epitel vagina mengekspresikan toll-like receptors (TLR) 2, 3, 5, dan 6. Stimulasi TLR menimbulkan respon imun bawaan termasuk produksi sitokin proinflamasi. Sel epitel vagina primer sensitif terhadap poli (I:C), agonis TLR3 virus, yang menginduksi upregulasi IL-1b, IL6, IL8, dan MCP-1 yang kuat. TNFa disekresikan untuk menanggapi rangsangan senyawa LPS mikroba (TLR4) dan peptidoglikan (TLR2). Sampai saat ini vagina dan perannya dalam pertahanan imun bawaan masih relatif kurang dipelajari dengan mayoritas percobaan yang dilakukan masih menggunakan sel line dibanding

menggunakan isolat primer (Wirth, 2007; Anderson, 2008, Hickey, *et al.*, 2011).

Epitel yang melapisi kanal endoservik adalah kolumnar, daerah ini banyak mengandung kelenjar yang mensekresi musin. Lapisan endometrium uterus adalah epitel kelenjar sangat khusus yang mengalami perubahan struktural dramatis selama siklus menstruasi dan kehamilan. Mukus terdiri dari 2 macam : 1) Mukus yang terkait dengan membran (MUC1,3A, 3B, 4, 11-13, 15-17 dan 20) dan 2) Mukus yang disekresikan yang terdiri dari a) bentuk gel besar (MUC2, 3AC, 5B, 6 dan 19), serta b) Mukus kecil yang larut (MUC 7 dan 9) (Wirth, 2007; Anderson, 2008).

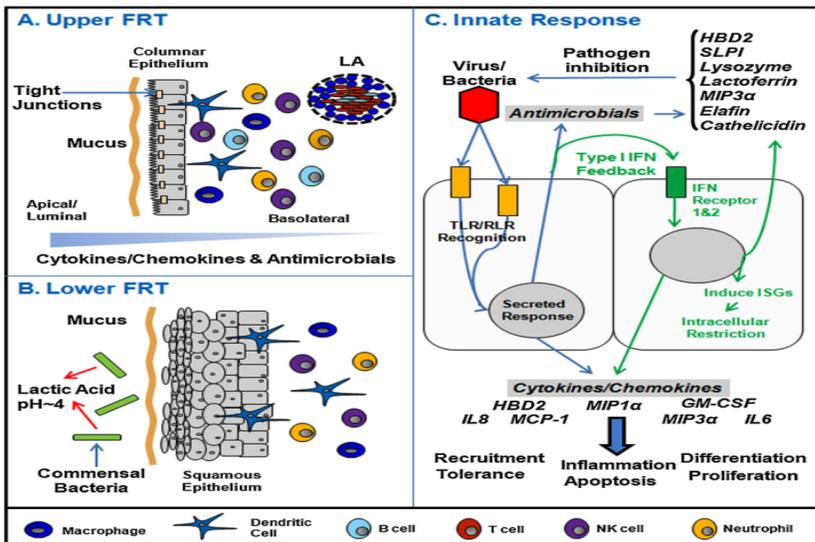
2.2.1. Efek Siklus Menstruasi pada Sel Epitel dan Sel Imun pada Saluran Reproduksi Wanita

Sistem imun saluran reproduksi wanita berkembang menjadi responsif dan diatur oleh hormon seks, estradiol dan progesteron, yang diproduksi secara siklik oleh ovarium selama siklus menstruasi. Dalam mempersiapkan saluran reproduksi untuk fertilisasi dan implantasi, estradiol dan progesteron secara bersamaan mengatur sistem imun di saluran tuba, uterus, servik uteri, dan vagina untuk mendukung proses reproduksi. Selama siklus menstruasi, sel imun didistribusikan dalam jumlah besar dan tidak merata di lapisan stroma dan epitel saluran reproduksi wanita. Leukosit merupakan 6-20% dari total jumlah sel pada saluran reproduksi wanita. Ketika sel NK diperhitungkan, populasi sel imun menjadi dobel. Limfosit T (CD4+ dan atau CD8+) merupakan unsur utama leukosit saluran reproduksi. Tuba falopii berisi granulosit sebagai unsur utama kedua tetapi sangat kurang di jaringan reproduksi yang lain. Semua jaringan berisi limfosit B dan monosit tetapi jumlahnya sedikit. Selama siklus menstruasi, terjadi migrasi makrofag, sel B dan neutrofil ke saluran reproduksi yang lebih bawah dan sel dendritik memasuki epitel skuamosa (Wira, *et al.*, 2010, Hickey, *et al.*, 2011).



Gambar 2.3. Skema Sistem Imun Mukosa Saluran Reproduksi Wanita Manusia. Seperti yang terlihat pada gambar di sisi kiri, vagina dan ektoservik dilapisi sel epitel skuamosa. Sel kolumnar ada di seluruh saluran reproduksi wanita bagian atas termasuk endoservik, endometrium, dan saluran tuba. Panel a-d fotomikrograf konfokal menunjukkan distribusi sel imun di seluruh uterus. Irisan beku langsung diwarnai dengan tiga tag fluoresecent antibodi monoklonal : sel antibodi spesifik epitel (Cy3-berlabel klon BerEP4, panel warna merah a-d), anti-CCR5 (FITC-label klon 2D7, panel warna hijau a-d), dan anti-CXCR4 (Cy5 berlabel 12G5, panel warna biru a-d). Panel a menunjukkan kelenjar epitel sepanjang antarmuka miometrium (paling kiri) ke epitel luminal (sisi kanan). Panel b sampai d menampilkan perbesaran lapangan yang lebih tinggi dari area yang sama. Epitelium luminal, berbeda dengan kelenjar yang berdekatan, mempertahankan ekspresi BerEP4 relatif intens (panel warna merah a dan d). Ekspresi CCR5 adalah menonjol pada agregat limfoid yang terletak di stratum basalis berbatasan langsung dengan miometrium ('LA' di panel b). Ekspresi CCR5 epitel rendah pada stratum basalis dan meningkat pada sepertiga proksimal stratum fungsionalis. Panel f: foto sediaan ini terdiri dari agregat limfoid di endometrium pada tahap

proliferasi akhir siklus menstruasi. Tiga fluorochrome adalah sel T (Cy3-anti-CD3, merah), sel B (FITC-anti-CD19, hijau), dan makrofag (Cy5-anti CD14, biru). Panel e : sel skuamosa vagina mengekspresikan GalCer (hijau) diekspresikan pada sel epitel parabasal (p) dan di area permukaan lapisan keratin. Panel g : Sel T CD8+ ada di epitel submukosa maupun epitel skuamosa. Panel h : Ekspresi CD14 ditemukan pada makrofag stroma maupun makrofag epitel skuamosa. Panel i : sel dendritik CD1a-positif (DC) ada pada epitel skuamosa (biru). Panel a-d, 28 Panel f ; 22 Panel e, g, h, i (Wira, *et al.*, 2010)



Gambar 2.4. Skema komponen utama sistem imun bawaan mukosa pada saluran reproduksi wanita. Panel A: saluran reproduksi wanita bagian atas, terdiri dari saluran telur, endometrium dan endoserviks dilapisi satu lapisan sel epitel kolumnar dihubungkan oleh tight junctions. Sel epitel tersebut dilapisi lapisan mukus pelindung (Bagian 2). Sekresi preferensial menuju kompartemen apikal / luminal dengan gradien melintasi lapisan epitel dari lumen ke jaringan. Yang berada dibawah sel epitel adalah sel imun bawaan dan adaptif (Bagian 3). Di uterus ditampilkan agregat

limfoid (LA) yang unik. Panel B : saluran reproduksi wanita bagian bawah, terdiri dari ektoservik dan vagina ditutupi lapisan sel epitel skuamosa bertingkat (Bagian 2 dan 3). Serupa dengan saluran reproduksi wanita bagian atas, sel-sel epitelnya dilindungi lapisan mukus. Saluran reproduksi wanita bagian bawah memiliki populasi bakteri komensal yang menghasilkan asam laktat sehingga menurunkan pH vagina (Bagian 2). Di bawah lapisan epitel adalah sel imun bawaan dan adaptif. Panel C: respon imun bawaan sel epitel saluran reproduksi wanita bagian atas terhadap patogen yang menyerang. Sel epitel mengekspresikan Toll-like receptors (TLR) dan RIG-like receptors (RLRs) yang memungkinkan mereka mengenali dan menanggapi bakteri atau virus. Respon interferon (IFN) tipe I (panah hijau, bagian tengah panel C) adalah sistem pertahanan yang kuat dalam sel saluran reproduksi wanita (Bagian 4 dan 5). Selain itu, dalam menanggapi patogen dan hormon seks, antimikroba dan sitokin/kemokin disekresikan untuk memberikan perlindungan dengan spektrum yang luas. (Hickey, *et al.*, 2011)

2.2.2. Migrasi Sel Imun pada Saluran Reproduksi Wanita

Seperti yang terlihat pada Gambar 2.4, distribusi sel imun pada saluran reproduksi wanita bervariasi dengan tempat yang diperiksa. Di uterus terdapat agregat limfoid secara eksklusif, terdiri dari inti sel B dikelilingi sel T dan halo luar berisi makrofag (Gambar 2.4a, f). Bagian inti berisi sel B (CD19+) yang paling sering terlihat dalam agregat besar yang nampak pada fase proliferasi akhir dan sekresi. Agregat terdiri dari hanya sel berfenotip CD3+CD4+ kadang-kadang ditemukan sel CD4+ individual yang terletak di luar agregat dalam stroma. Monosit / makrofag (CD14+) sebagai mantel sekitar sel T. Agregat saluran reproduksi wanita berbeda secara anatomi dan fungsional dengan Peyer patch usus. Ukuran agregat limfoid bervariasi dengan siklus menstruasi, agregat lebih besar selama fase sekretorik (3000-4000 sel) dibanding fase proliferasi (300-400 sel). Agregat limfoid sebagian besar disusun dari pertukaran sel yang membentuk nukleasi pada endometrium, bukan dengan pembelahan sel prekursor. Saluran

reproduksi wanita bagian bawah, kurang agregat limfoidnya, tetapi berisi sel imun dengan spektrum luas/penuh yang terletak di submukosa dan lapisan epitel (Gambar 2.4g-i) (Wira, *et al.*, 2010, Hickey, *et al.*, 2011).

2.2.3. Aktifitas CTL pada Saluran Reproduksi Wanita

Selama pembentukan agregat dalam uterus, White *et al.* menemukan bahwa aktifitas limfosit T sitotoksik CD8+ (CTL), tertekan pada uterus dan tuba falopii selama fase sekresi. Penekanan ini terjadi tanpa penurunan jumlah sel T CD8+. Pada jaringan ektoervik dan vagina wanita terdeteksi aktivitas CTL selama fase proliferasi atau sekresi (Wira, *et al.*, 2010, Hickey, *et al.*, 2011). Untuk fungsi masing - masing sel imun serta distribusinya dapat dilihat pada tabel di bawah.

Tabel 2.4. Sel Imun pada saluran reproduksi wanita. Ringkasan fungsi dan distribusi sel dalam saluran reproduksi wanita bagian atas (tuba falopii, uterus dan mukosa endoservik) dan saluran reproduksi wanita bagian bawah (ektoservik dan mukosa vagina). Distribusi sel (bagian atas vs bawah) dinyatakan relatif terhadap satu sama lain.

Cell	Role	Function	Upper	Lower
Epithelial cells	Innate	Physical barrier Mucin production Broad spectrum antimicrobials (uterine) pIgR mediated IgA transport (uterine)	Single cuboidal	Stratified squamous
Neutrophils	Innate	Phagocytosis Antimicrobial α Defensins	High	Low
Dendritic / Langerhans	Innate	Anigen presentation	High	Low
Macrophages	Innate	Phagocytosis (include antibody bound pathogens)	High	Low

		Anigen presentation		
Natural killer	Innate	Apoptosis of infected cells	Low	High
CD4+ T cells	Adaptive	TH-1 cell mediated responses IFN secretion – antiviral activity	High	Low
CD8+ T cells	Adaptive	TH-1 cell mediated responses	High	Low
B cells	Adaptive	Apoptosis of infected cells TH-2 humoral responses	IgG <?> IgA	IgG > IgA
		Maturation into IgA/IgG secreting plasma cells		

For adaptive responses cell distribution is dependent on inflammation site in FRT

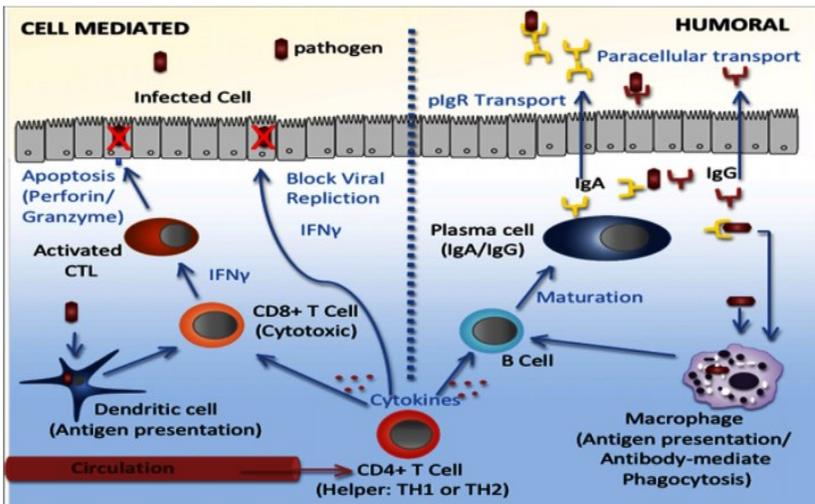
Disadur dari Hickey, *et al.*, 2011

2.2.4. Antibodi pada Saluran Reproduksi Wanita

Sistem imun humoral dikontrol oleh hormon dan ekspresinya bervariasi menurut lokasi dan fase siklus menstruasi. Pada uterus, kadar *pIgR* (*polimer Immunoglobulin receptor*) bervariasi selama siklus menstruasi. Kadar *SC* (*Secretory Component*) luminal uterus tertinggi selama fase sekretori, berkurang selama fase proliferasi dan terendah saat menstruasi. Jumlah *SC* terbesar selama fase sekretori, rata-rata sekitar 2 kali lipat dari produksi *SC* selama fase proliferasi dan menstruasi. Pada penelitian lain, kadar IgG dari sekresi mukosa uterus tertinggi selama fase peri-ovulasi, sedangkan sekresi terendah pada tuba falopii. Kesimpulan yang didapat pada masing-masing organ (tuba falopi, uterus, servik uteri, dan vagina) dan bahkan tempat yang berbeda pada setiap organ dapat merespon secara independen satu sama lain pada perubahan jumlah hormon, dengan memproduksi berbagai jenis dan jumlah protein sekretori. Pada saluran reproduksi wanita bagian bawah, kadar IgA, IgG dan laktoferin pada mukus servik uteri mengalami penurunan 10-100 kali lipat pada pertengahan siklus, relatif dengan yang terjadi di awal fase proliferasi, dan meningkat menjelang akhir siklus menstruasi. Ketika wanita mendapatkan kontrasepsi oral, kadar imunoglobulin dan laktoferin ditekan selama paparan hormon. Pada penelitian

lain, mukus servik uteri dievaluasi mulai dari 5 hari sebelum sampai dengan 3 hari setelah ovulasi, IgA dan IgG memiliki pola bifasik dengan puncak sebelum ovulasi diikuti dengan peningkatan kecil setelah ovulasi (Wira, *et al.*, 2010; Chan, *et al.*, 2011; Hickey, *et al.*, 2011).

Secara umum, dapat dikatakan bahwa kadar hormon estrogen berbanding terbalik dengan status imunitas pada vagina, yaitu semakin tinggi kadar estrogen, status imunitas pada vagina akan semakin menurun. Penelitian pada model binatang menunjukkan bahwa sekresi IgG dan IgA ke dalam cairan vagina berkurang pada kondisi estrogen yang tinggi. Sebaliknya, pada saat kadar hormon estrogen rendah didapatkan konsentrasi sel imunokompeten yang tinggi pada vagina dan servik uteri. Estrogen (estradiol) juga menghambat presentasi ovalbumin (sebagai antigen) dari sel Langerhan mukosa vagina ke sel limfoid klon. Penambahan progesteron dapat membalikkan efek inhibisi tersebut. Estradiol juga menghambat *macrophage chemotactic protein 1 (MCP-1)*, yang dapat mempengaruhi akumulasi makrofag dalam vagina (Fidel & Sobel, 1996).



Gambar 2.5. Efektor Respon Imun Adaptif (TH1: seluler dan TH2: humoral). Selama infeksi, respon adaptif terhadap patogen tertentu didahului dengan presentasi antigen ke sel T dan B langsung oleh sel dendritik, makrofag dan sel epitel pada mukosa atau diikuti aktivasi sel T CD4+ yang migrasi dari peredaran. Setelah diaktifkan melalui stimulasi sitokin, sel T dan B berkembang biak dan berdiferensiasi. Respon yang dimediasi oleh sel (kiri) ditandai dengan produksi IFN γ dan apoptosis sel yang terinfeksi oleh sel T sitotoksik CD8+. IFN γ juga merangsang produksi gen antivirus intraseluler yang menghambat replikasi virus. Respon humoral (kanan) dimediasi oleh diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang mensekresi antibodi. Baik IgG atau IgA diproduksi dalam saluran reproduksi wanita dan disekresikan ke dalam mukosa. Antibodi mengikat patogen, menghambat infeksi melalui jalur fagositosis atau komplemen (Hickey, *et al.*, 2011)

2.3. Hubungan Infeksi pada Saluran Reproduksi Wanita dan Imunitas

Untuk menginfeksi permukaan epitel mukosa, patogen harus mengatasi barrier epitel yang dilindungi oleh lapisan mukus tebal dihuni oleh mikroflora komensal dan sarat dengan sejumlah molekul antimikroba (Anderson, 2008; Todar, 2016). Sistem imun vagina terdiri atas sistem imun seluler dan sistem imun humoral. Sistem imun seluler vagina tidak mempunyai jaringan limfoid terorganisasi seperti *Peyer's patches* pada mukosa usus. Namun, penelitian pada tikus menunjukkan mukosa vagina tikus memiliki banyak sel epitel, sel langerhan, makrofag dan sel T (Fidel & Sobel, 1996; Todar, 2016).

Epitel yang melapisi kanal endoservik adalah kolumnar, daerah ini banyak mengandung kelenjar yang mensekresi musin. Lapisan endometrium rahim adalah epitel kelenjar sangat khusus yang mengalami perubahan struktural dramatis selama siklus menstruasi dan kehamilan. Mukus yang disekresikan di saluran reproduksi wanita dikendalikan hormon dan perubahan viskositasnya terlihat selama siklus menstruasi. Kapasitas bakteri

untuk mendegradasi molekul musin dengan enzim mikroba (mucinase, sialidase) dapat mengganggu pertahanan barier mukosa, karena ini merupakan interface langsung antara lingkungan internal dan eksternal (Nikolaitchouk, 2009).

Sel epitel saluran reproduksi mengekspresikan berbagai *Pattern Recognition Receptors (PRRs)* termasuk *Toll-like receptor (TLR)*, *nucleotide oligomerization domain (NOD)-like reseptor* dan komplemen serta reseptor imunoglobulin. Ketika diaktifkan oleh patogen atau produknya, mereka melepaskan kemokin seperti IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β dan SDF1; sitokin proinflamasi termasuk IL-1 α dan TNF- α , yang mengaktifkan lekosit dan mengekspresikan sitokin lain seperti IL-6, IL-15, TGF- β dan G-CSF yang mempengaruhi diferensiasi sel dan mengatur respon limfosit T dan B. Sel epitel juga mengekspresikan molekul adhesi seperti e-kaderin, ICAM-1 dan LFA-3 yang penting untuk perlekatan lekosit dengan lapisan epitel. Sel epitel mukosa juga mengekspresikan MHC kelas II (Fidel & Sobel, 1996; Todar, 2016) dan molekul CD1d, yang menunjukkan kemampuan untuk menyajikan antigen peptida dan glikolipid. Sehingga sel epitel dapat menginisiasi dan mengkoordinasikan respon imun mukosa dengan mengatur sel imun profesional (Anderson, 2008). Sel epitel vagina permeabel terhadap protein dengan berat molekul bervariasi, hal ini menunjukkan bahwa antigen pada lumen vagina bisa mendapatkan akses ke sel langerhan, pada gilirannya akan menstimulasi limfosit T residen. Jadi, keberadaan sel T dan *Antigen Presenting Cell (APC)* menunjukkan bahwa mukosa vagina berperan sebagai jaringan imunokompeten (Fidel & Sobel, 1996; Chan, *et al.*, 2011; Todar, 2016).

Komponen imunitas non spesifik utama terhadap bakteri intraseluler terdiri makrofag, *DC (Dendritic Cells)* maupun sel NK. Makrofag dan *DC* adalah sel penting yang memfagosit dan membunuh patogen dengan asam dan enzim pencernaan. Makrofag jumlahnya sekitar 10 % lekosit yang ada pada saluran reproduksi wanita dengan angka tertingginya pada stroma endometrium dan jaringan ikat miometrium (Hickey, *et al.*, 2011).

Limfosit intraepitelial pada submukosa mampu bermigrasi ke permukaan epitel atau ke dalam lumen uterus sebagai respon terhadap kemotaktik (Fidel & Sobel, 1996; Todar, 2016). Sel NK memiliki aktivitas sitotoksik merupakan 10 % dari lekosit sistemik tetapi pada endometrium jumlahnya sampai 70%. Sel NK terlibat pada beberapa proses diantaranya pertahanan penjamu, implantasi dan kehamilan. Sel NK rahim menghasilkan sitokin proinflamasi seperti GM-CSF, IL10, IL8 dan IFN γ , yang merangsang respon inflamasi, menginduksi aktivasi makrofag dan sel T sitotoksik. Sel NK rahim juga memproduksi faktor pertumbuhan angiogenik dan faktor penghambat leukemia, yang sangat penting untuk perkembangan pembuluh darah (Hickey, *et al.*, 2011). Sel NK membunuh sel target melalui pelepasan proteolitik seperti perforin dan granzymes. Selain itu, sel NK mengekspresikan reseptor Fc yang memungkinkan menangkap antigen atau mikroba pada permukaan sel. Proses hancurnya mikroba ini dikenal sebagai *Antibody Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC)* (Anderson, 2008; Abbas, *et al.*, 2012).

Komponen imunitas non spesifik utama terhadap bakteri ekstraseluler adalah komplemen, respon inflamasi dan fagositosis. Fungsi biologis dari komplemen ada empat yaitu : lisisnya bakteri, opsonisasi, reaksi inflamasi dan clearance (pembersihan kompleks imun). Untuk memenuhi fungsi tersebut maka terdapat tiga jalur yaitu jalur klasik, jalur alternatif dan jalur lektin. Pemicu jalur klasik yaitu keberadaan kompleks imun. Pada jalur alternatif dipicu persinggungan antara C3 dengan permukaan bakteri dibantu protein B dan P. Pemicu jalur lektin yaitu mannose pada dinding sel bakteri. Lektin yang ditemukan di peredaran darah akan mengikat mannose dan ikatan ini homolog dengan C1q. Produk akhir jalur-jalur ini adalah polimerisasi C9 (bentuknya seperti cerobong) pada dinding sel bakteri sehingga menyebabkan lisisnya bakteri. Proses ini dikenal sebagai *Membrane Attack Complex (MAC)*. Pada perjalanan ketiga jalur tersebut akan menghasilkan C3a dan C5a. Kedua fragmen ini dapat berikatan dengan reseptornya pada sel limfosit bergranula (neutrofil, basofil dan eosinofil). Ikatan

tersebut akan menimbulkan proses degranulasi sehingga melepaskan mediator inflamasi (Abbas, *et al.*, 2012).

Imunitas adaptif merupakan respon imun spesifik patogen setelah presentasi dan stimulasi sel T oleh APC. Sejumlah sel di saluran reproduksi wanita menyajikan antigen pada molekul MHC, termasuk APC klasik diantaranya makrofag, sel dendritik dan sel langerhan, tetapi juga sel epitel servik uteri dan endometrium. Hal ini menunjukkan bahwa presentasi antigen dimediasi oleh APC sirkulasi dan lokal di saluran reproduksi wanita. Imunitas adaptif meliputi respon Th1 (selular), Th2 (humoral), Treg (T regulator) dan Th17 (Hickey, *et al.*, 2011). Sel T CD4⁺ berdiferensiasi menjadi sel Th1, sel Th2, sel Th17 atau sel T reg dengan memproduksi sitokin khusus. Sel Th1 menginduksi respon imun selular, melibatkan peningkatan aktivitas antimikroba dari makrofag dan meningkatkan efisiensi dalam melisis mikroorganisma dalam kompartemen intraseluler (Schmaler, 2010; Abbas, *et al.*, 2012).

Proteksi utama respons imun spesifik terhadap bakteri intraselular berupa imunitas selular. Imunitas selular terdiri atas 2 tipe reaksi, yaitu sel CD4⁺ Th1 yang mengaktifkan makrofag (*DTH*, *Delayed Type Hypersensitivity*) sehingga memproduksi IFN- γ dan sel CD8⁺ CTL, yang memacu pembunuhan mikroba serta lisis sel terinfeksi (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Makrofag yang diaktifkan sebagai respon terhadap mikroba intraselular dapat membentuk granuloma dan menimbulkan kerusakan jaringan seperti yang terjadi pada *DTH* terhadap protein PPD (*Purified Protein Derivative*) *M. tuberculosis*. Sel CD4⁺ dan CD8⁺ bekerja sama dalam pertahanan terhadap mikroba (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Sel T CD8⁺ memberikan respons terhadap molekul MHC kelas I yang mengikat antigen sitosol dan membunuh sel terinfeksi, menginduksi apoptosis melalui sitolisis yang dimediasi perforin dan granzim (Hickey, *et al.*, 2011). Perbedaan dalam respon sel T terhadap mikroba intraselular pada berbagai individu merupakan determinan dalam perkembangan penyakit dan gambaran klinis (Baratawidjaja dan Rengganis, 2009). Sel T tersebar di stroma vagina, servik dan rahim ataupun di bawah

epitel dan juga tersebar dalam sel epitel yang dikenal dengan limfosit intraepithelial (Hickey, *et al.*, 2011).

Antibodi merupakan komponen imun protektif utama terhadap bakteri ekstraseluler yang berfungsi menyingkirkan mikroba dan menetralkan toksinnya. Sel *Th2* memproduksi sitokin yang merangsang respon sel B, aktivasi makrofag dan inflamasi (Schmaler, 2010). Keberadaan imunitas humoral pada vagina ditunjukkan dengan keberhasilan mengisolasi dan mengidentifikasi antibodi pada bilasan vagina. Meskipun mukosa vagina tikus, uterus manusia dan tikus, serta endoservik manusia mengandung sedikit sel B dan jumlah komponen sekretoris sistem imun humoral yang minim, tampaknya imunoglobulin pada bilasan vagina berasal dari sumber di luar mukosa vagina. Hal ini dibuktikan oleh adanya IgG antitoksin tetanus pada bilasan vagina manusia yang berasal dari serum. Oleh karena itu, dipostulasikan bahwa imunoglobulin mencapai lumen melalui difusi atau mekanisme transpor bergantung reseptor *Fc*. Kelas imunoglobulin utama yang ada dalam traktus reproduksi wanita adalah IgA dan IgG (Fidel & Sobel, 1996). Sedangkan IgG dan IgM yang merupakan hasil dari limfosit dan sel plasma pada basal lamina yang migrasi ke lumen vagina akan meningkatkan respon imun mukosa (Moraes and Taketomi, 2000).

Imunitas humoral ditandai produksi antibodi yang mengikat antigen pada sel bebas, sehingga mencegah masuknya sel dan/atau menetralkan aktivitas biologis patogen (Gambar 2.4). Antibodi yang terikat memediasi eliminasi patogen lebih lanjut melalui fagositosis oleh makrofag atau sistem komplemen. Sel *Thelper CD4+* berperan dalam imunitas humoral dengan memandu pematangan sel B untuk mensekresi antibodi sebagai sel plasma. Tidak seperti permukaan mukosa lain seperti permukaan pencernaan dan saluran pernapasan dimana sekresi IgA adalah isotipe dominan, baik IgG dan sekretori-IgA (sIgA) disekresikan dalam mukus saluran reproduksi (Hickey, *et al.*, 2011).

Menonjolnya IgA pada cairan eksternal karena banyaknya limfosit B dalam jaringan mukosa. Perbandingan kadar IgG:IgA

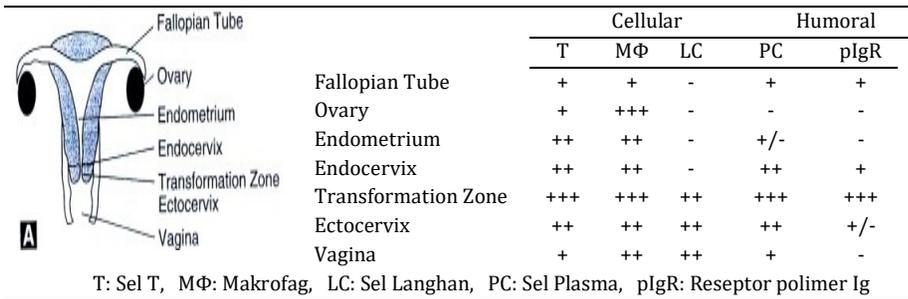
dalam serum adalah 4:1 atau 5:1. Perbandingan kandungan antibodi ini merupakan perbedaan mendasar antara serum dengan cairan eksternal. Sekresi IgA secara selektif karena adanya struktur khas imunoglobulin yang berupa polimer (*pIgA*). *pIgA* berikatan dengan reseptor Ig yang dinamakan *secretory component (SC)* yang terdapat pada membran sel bagian dasar sel epitel sehingga membentuk *sIgA (secretory IgA)*. *sIgA* tahan terhadap pengaruh enzim proteolitik. *sIgA* yang telah ditransfer dalam lumen akan mengikat bakteri sehingga dapat mengurangi mobilitasnya dengan akibat mencegah pembentukan koloni pada permukaan epitel mukosa (Murtiastutik, 2008; Subowo, 2009).

Studi rasio IgG : IgA pada sekresi saluran reproduksi wanita lebih rendah menunjukkan bahwa kadar IgG ada 2-6 kali lipat lebih tinggi dari IgA pada mukus servik dan cairan lavase servik-vagina. Berbeda dengan saluran reproduksi wanita yang lebih bawah, rasio dalam sekresi uterus tidak diketahui karena rendahnya sekresi selama siklus menstruasi. Berbeda dengan penelitian lain dari mukus servik, sekresi endoservik dilaporkan memiliki IgA lebih tinggi dari IgG (Quesnel, *et al.*, 1997). Sekresi IgA berkaitan dengan keberadaan sel plasma yang mensekresi IgA dalam endoservik. Pada uterus manusia, polimer imunoglobulin reseptor (*pIgR*), reseptor sel epitel yang bertanggung jawab untuk mengangkut IgA dari jaringan ke lumen, jumlahnya bervariasi dengan tiap fase siklus menstruasi. Tingkat sekresi komponen luminal uterus, bagian pembelah dari membran yang terikat *pIgR*, tertinggi selama fase sekretori, berkurang secara signifikan selama fase proliferasi dan terendah selama menstruasi. Dengan model tikus, studi sebelumnya dari laboratorium kami menunjukkan bahwa IgA, IgG dan *pIgR* meningkat pada uterus dengan estradiol selama siklus reproduksi dan setelah pengobatan estradiol pada tikus yang diovariectomi. Sebaliknya, ketiganya dihambat pada vagina dengan pengobatan hormon. Tidak seperti IgA yang diangkut dari jaringan ke lumen melawan gradien konsentrasi, IgG bergerak menuruni gradien dari darah ke jaringan ke lumen dalam merespon estradiol. Apakah IgG bergerak pasif dengan difusi paracellular atau diangkut

ke sekresi luminal dalam saluran reproduksi wanita oleh neonatal Fc reseptor (FcRn), seperti yang diekspresikan pada mukosa lainnya termasuk saluran reproduksi pria, masih harus ditentukan (Hickey, *et al.*, 2011).

Meskipun sekresi antibodi IgA dikontrol hormon selama siklus menstruasi, perubahan pada produksi lokal lebih lanjut dimediasi oleh stimulasi antigen. Telah dilaporkan terjadi peningkatan antibodi spesifik yang signifikan pada cairan lavase servik-vagina dibandingkan serum setelah infeksi HIV. Dalam hal vaksinasi, rute pemberian antigen, memediasi lokalisasi respon humoral. Misalnya, imunisasi vagina menginduksi homing sel yang mensekresi antibodi ke servik, sedangkan vaksinasi hidung merangsang homing pada mukosa vagina. Perbedaan jenis, intensitas dan lokalisasi anatomi antibodi pada saluran reproduksi wanita menunjukkan kompartementalisasi hormonal dan respon humoral yang dimediasi antigen (Hickey, *et al.*, 2011).

Gambar 2.6 berikut menunjukkan distribusi mediator imunitas adaptif.



Gambar 2.6. *Mediators of adaptive immunity in the human female.*
Disadur dari Anderson, 2008

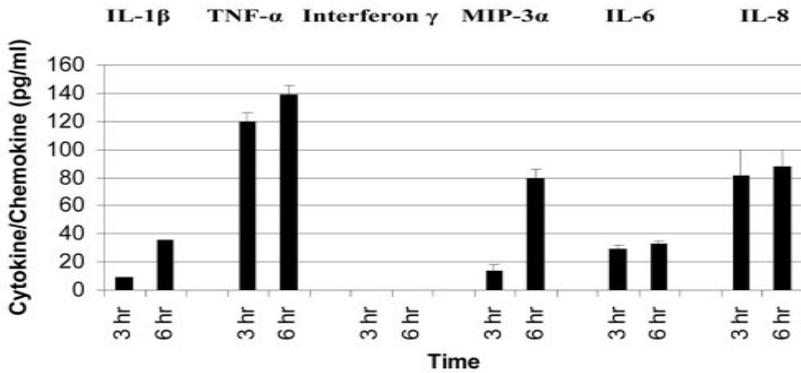
Penelitian Sawada, *et al.*, 2006 pada 157 wanita dengan kehamilan tunggal tidak terkomplikasi antara minggu ke-6 dan ke-36. Semua wanita melahirkan aterm, 69 tanpa BV atau servisitis, 9 dengan BV, dan 79 dengan servisitis. Hasil yang didapatkan adalah konsentrasi IL-8, LF, dan α -DF lebih tinggi pada wanita dengan

servisititis (0.81 ± 0.36 pg/ml, 14.8 ± 12.3 μ g/ml, dan 0.60 ± 0.49 μ g/ml) dibandingkan pada wanita tanpa BV atau servisititis (0.35 ± 0.34 pg/ml, 8.0 ± 11.0 μ g/ml, dan 0.15 ± 0.12 μ g/ml). Konsentrasi IL-6 lebih tinggi pada wanita dengan BV (0.26 ± 0.32 pg/ml) dibandingkan pada wanita tanpa BV atau servisititis (0.09 ± 0.15 pg/ml) atau pada wanita dengan servisititis (0.12 ± 0.18 pg/ml). Sehingga tingginya tingkat sitokin inflamasi dalam mukus servik uteri wanita hamil dapat mendeteksi lebih awal infeksi saluran reproduksi bagian bawah (Sawada, *et al.*, 2006.).

Struktur permukaan *S. aureus* yang diikat komplemen (C3b) terikat pada antibodi Fc dan antibodi pada fraksi Fab. Ketiga ikatan ini dikenal sebagai opsonisasi. Hal ini memungkinkan proses fagositosis bakteri menjadi maksimal (Schmaler, 2010). Telah ditunjukkan dalam model infeksi yang berbeda bahwa beberapa PRR terlibat dalam respon penjamu terhadap *S. aureus*, termasuk diantaranya adalah scavenger receptor. Kurangnya TLR2 akan meningkatkan kerentanan tikus pada infeksi sistemik dan subkutan. Hal ini ternyata dapat menyebabkan peningkatan jumlah *S. aureus* sebagai penghuni hidung. TLR7 dan TLR9 terlibat dalam pengenalan RNA dan DNA dari *S. aureus* (Schmaler, 2010).

Penelitian Peterson, *et al.*, 2005 menyelidiki interaksi *TSS S. aureus* dan *TSST-1* (*toxic shock syndrome toxin 1*) dengan sel epitel vagina manusia (*HVEC*) dan permukaan mukosa babi. *TSS S. aureus MN8* berkembang biak ketika dikultur bersama dengan *HVEC* selama 6 jam dan membentuk agregat pada permukaan *HVEC* serta memproduksi eksotoksin. Studi pengikatan reseptor menunjukkan bahwa *35S-TSST-1* terikat pada 5×10^4 reseptor per *HVEC*, dengan kejenuhan pada menit ke-15. *TSST-1* (100 μ g/ml) menyebabkan up/down regulasi 2.386 gen *HVEC* dalam 6 jam. Gen *HVEC* paling diup-regulasi saat merespon *S. aureus* dibandingkan kontrol yang mengkode kemokin atau sitokin - MIP3 α , 478 kali, GRO α , 26 kali; GRO β , 14 kali; dan GRO γ , 30 kali - menunjukkan aktivasi kekebalan bawaan. *TSST-1* juga menyebabkan up-regulasi gen kemokin/sitokin. *S. aureus MN8*, ketika diinkubasi dengan jaringan vagina babi, meningkatkan aliran *35S-TSST-1* melalui permukaan

mukosa, dan disertai masuknya limfosit ke lapisan atas jaringan. Data ini menunjukkan aktivasi sistem kekebalan bawaan melalui sel epitel yang tercermin dalam produksi kemokin/sitokin dan masuknya limfosit, yang dapat menyebabkan perubahan permeabilitas mukosa vagina, memfasilitasi penetrasi *TSST-1* (Peterson, *et al.*, 2005).



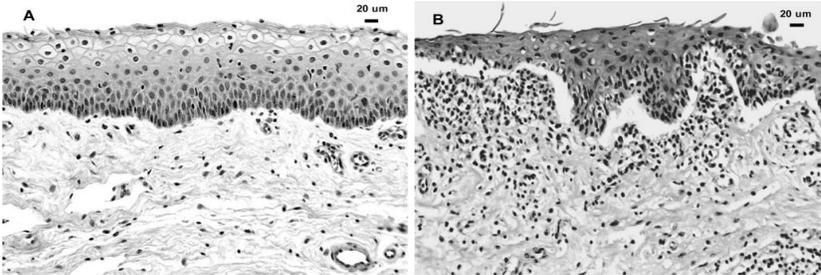
Gambar 2.7. Produksi sitokin dan kemokin oleh HVEC setelah dipaparkan 10^9 CFU *TSST-1* yang diproduksi *S. aureus* MNSM per ml pada 3 dan 6 jam diukur dengan ELISA. (Peterson, *et al.*, 2005).

Tabel 2.5. Penetrasi 35S-*TSST-1* melalui mukosa vagina babi yang intak dengan keberadaan TSS *S. aureus*

Treatment	No. of tissue samples tested	Total toxin penetrating Through tissue ^a (ng)	Maximum flux (ng/cm ² /min) ^{a,b}
MN8			
Live cells	9	200 ±18	2.68 ±0.40
Killed cells	9	115 ±20	1.66 ±0.41
Untreated controls	7	36 ±7.8	0.44 ±0.01

^a Values are means standard error.

b Maximum flux was defined as the greatest amount of radiolabeled TSST-1 penetrating across the entire porcine vaginal mucosa per square centimeter of tissue per minute (Peterson, *et al.*, 2005).



Gambar 2.8. (A) Mukosa vagina babi diinkubasi pada kontrol KFSM 10 jam. Jaringan dipreservasi dengan baik, dengan sedikit infiltrasi sel inflamasi atau nekrosis. (B) Mukosa vagina babi dipreinkubasi dengan sel MN8 *S. aureus* hidup selama 1 jam sebelum aplikasi topical dari TSST-1 yang dilabel radioaktif dan diinkubasi selama 10 jam. Catatan infiltrasi limfosit subepitelial yang signifikan dan separasi epitel dari jaringan ikat pada regio membran basal dan deskuamasi sel epitel permukaan (Peterson, *et al.*, 2005).

Untuk menentukan strategi yang optimal dalam menginduksi sel spesifik yang mensekresi antibodi (ASC spesifik) pada mukosa dubur dan vagina, dilakukan imunisasi pada monyet dengan imunogen prototipe mukosa, toksin kolera (CT), yang diberikan secara lokal, melalui pemberian lambung atau parenteral. Pengulangan imunisasi CT pada dubur atau vagina dapat menimbulkan respon ASC mukosa dan sistemik yang kuat. Tanggapan mukosa terbatas pada tempat imunisasi dan terdiri dari imunoglobulin A spesifik antitoksin (IgA) dan IgG dengan titer yang tinggi. Sebagian besar ASC IgA spesifik dan IgG terdeteksi dalam suspensi sel dari jaringan reproduksi dan rektum, yang menunjukkan akumulasi lokal sel B efektor di tempat tersebut. Imunisasi intragastrik dengan CT tidak dengan sendirinya

meningkatkan respon ASC servikovaginal atau dubur tetapi memberikan respon ASC IgA dubur yang prima dengan imunisasi boster lokal. Baik Imunisasi dubur dan vagina juga menginduksi ASC IgG dan ASC IgA sirkulasi. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian antigen secara lokal pada mukosa dubur atau vagina menghasilkan respon ASC lebih tinggi dari pemberian sistemik atau mukosa yang jauh. Selanjutnya, baik mukosa vagina atau dubur dapat berfungsi sebagai tempat penginduksi respon ASC sistemik (Eriksson, *et al.*, 1998)

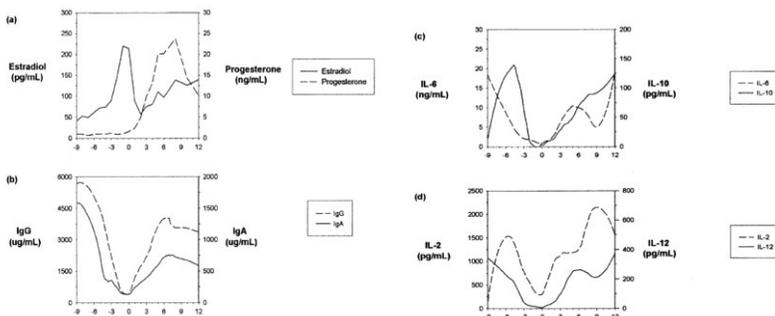
Sampai saat ini masih kurangnya pengetahuan untuk merangsang respon imun tubuh yang optimal di saluran reproduksi manusia. Pada studi terhadap 21 relawan yang divaksinasi melalui hidung atau vagina dengan model mukosa antigen kolera subunit toksin B dan ditentukan tingkat imunoglobulin spesifik A (IgA) dan antibodi IgG dalam cairan vagina dan servik serta dalam serum. Untuk menilai pengaruh hormonal pada induksi respon antibodi setelah vaksinasi vagina, kami memberikan vaksin secara mandiri pada tahapan dalam siklus menstruasi atau pada hari 10 dan 24 dalam siklus menstruasi pada kelompok yang berbeda. Vaksinasi vagina dan hidung keduanya menghasilkan respon IgA dan IgG anti-kolera subunit B toksin yang signifikan dalam serum pada sebagian besar relawan pada berbagai kelompok vaksinasi. Hanya vaksinasi vagina yang diberikan pada hari 10 dan 24 dalam siklus yang menginduksi respons antibodi spesifik yang kuat di servik uteri dengan peningkatan IgA 58 kali dan IgG 16 kali. Sebaliknya, respon sederhana terlihat setelah vaksinasi hidung dan kelompok vagina divaksinasi lainnya. Vaksinasi nasal lebih unggul dalam menginduksi respon IgA spesifik dalam cairan vagina, dengan peningkatan 35 kali lipat, sedangkan vaksinasi vagina hanya meningkat 5 kali. Kami menyimpulkan bahwa kombinasi vaksinasi hidung dan vagina mungkin menjadi strategi vaksinasi terbaik untuk merangsang respon antibodi protektif pada sekresi servik uteri dan vagina, asalkan vaksinasi vagina diberikan pada titik waktu yang optimal dalam siklus. (Johansson, *et al.*, 2001)

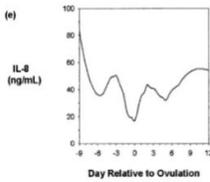
2.4. Regulasi Aktivitas Antimikroba oleh Hormon Seks pada Saluran Reproduksi Wanita

Sel epitel uterus manusia mensekresikan molekul antimikroba yang membunuh atau menghambat bakteri patogen, jamur dan virus. Sekresi apikal sel epitel uterus terhadap molekul ini menyebabkan lumen uterus memiliki mikroorganisma relatif sedikit dibandingkan dengan saluran reproduksi wanita bagian bawah meskipun aliran sekresi tersebut terjadi di seluruh saluran reproduksi. Sekresi antimikroba baik konstitutif maupun yang disebabkan agonis TLR dan mikroorganisma serta yang dipengaruhi banyak faktor lain seperti kemokin, sitokin dan hormon steroid. Untuk menunjukkan pengaruh estradiol pada aktivitas antimikroba, sekresi sel epitel uterus diuji langsung terhadap bakteri (Gambar 2.8). Sel epitel uterus manusia diberi perlakuan dengan atau tanpa estradiol selama 48 jam. Aliquot dari media yang terkondisi dengan apikal kemudian diinkubasi dengan *S. aureus* selama 1 jam, dan bakteri dikultur semalam. Kontrol *colony-forming units (CFU)* mengacu pada koloni yang tumbuh pada media yang tidak adanya sel epitel uterus. Penghambatan pertumbuhan bakteri tanpa estradiol terlihat dengan keberadaan antimikroba konstitutif yang diproduksi sel epitel uterus. CFU yang rendah terlihat pada sekresi yang diperoleh dari perlakuan dengan estradiol, yang menunjukkan bahwa estradiol menginduksi sekresi antimikroba konstitutif. Data ini memperkuat premis bahwa estradiol memiliki efek signifikan pada sekresi antimikroba oleh sel epitel uterus manusia. Pada penelitian lain, ditunjukkan bahwa media yang terkondisi secara konstitutif dari sel epitel uterus manusia, serta sel epitel servik uteri dan ektoservik manusia menghambat *Candida albicans* dan *Neisseria gonorrhoeae*, seperti infeksi sel *TZM-bl* oleh HIV-1. Menariknya, *Lactobacillus crispatus* komensal tidak dipengaruhi oleh salah satu media yang terkondisi ini. Hal ini menunjukkan bahwa sel epitel saluran reproduksi

wanita mensekresi antimikroba yang selektif untuk mikroorganisma patogen yang berpotensi (Wira, *et al.*, 2010).

Penelitian Shrier, *et al.*, 2003 mengkarakterisasi imunitas mukosa saluran reproduksi remaja selama siklus menstruasi dan menentukan level imunoglobulinnya pada fase folikuler dibanding orang dewasa. Mukus servik uteri dikumpulkan dengan spon Weck-Cel selama siklus menstruasi dari hari 9 sampai ovulasi, kemudian setiap hari sampai menstruasi, untuk diperiksa IgA, IgG dan sitokin serta serum LH, estradiol dan progesteron yang diambil dari tiga gadis remaja (usia rata-rata 16,8 tahun). Level imunoglobulin dan sitokin bervariasi selama siklus menstruasi, mencapai titik terendah sekitar ovulasi. Dibandingkan dengan 13 orang dewasa, remaja mengalami penurunan IgG lebih besar selama fase folikuler (mean β -953 vs -269 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hari}$, $p = 0,045$), tetapi kenaikan IgGnya sama selama fase luteal (mean β +118 vs +100 $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{hari}$, $p = 0,252$). Perubahan IgA tidak berbeda antara remaja dan orang dewasa untuk kedua fase tersebut. Meskipun jumlah sampelnya kecil, temuan ini menunjukkan bahwa remaja kemungkinan lebih sensitif terhadap *unopposed* estrogen. Dengan pola seperti pada gambar di bawah (Shrier, *et al.*, 2003). Nardelli-Haefliger *et al.*, juga menunjukkan bahwa titer antihuman papilloma virus 16 virus like partikel (VLP) IgG dalam cairan di servik uteri turun sekitar 9 kali lipat pada pertengahan siklus ovulasi yang menunjukkan peningkatan kerentanan terhadap patogen pada pertengahan siklus menstruasi (Wira, *et al.*, 2010).





Gambar 2.9. Pola konsentrasi hormon reproduksi, imunoglobulin dan sitokin, dengan perbandingan hari relatif terhadap ovulasi (Shrier, *et al.*, 2003; Kumamoto and Iwasaki, 2012)

Tabel 2.6. Mucosal site of antigen encounter determines the quality of immune responses. Situs mukosa antigen pertemuan menentukan kualitas respon imun.

Site of Immunization	Antibody response			Cell mediated immunity	Mucosal tolerance	Note
	Local	Other mucosal sites	Systemic			
Nasal	++	+	+	+	+	Human /animals
		(Female genital tract) (Male genital tract)				
Oral (Local, no Ag ingestion)	±	?	±	+	+	Human /animals
Sublingual	+	+	+	+	+	Human /animals
Ingestion	+	+	+	+	+	Human /animals
		(Female and male genital tract)				
Rectal	+	+	+(?)	+(?)	?	Human /animals
		(Female genital tract)				
Vaginal	±	-	-	+(?)	+ in mice ? in Human	Human /animals (menstrual cycle)

From: Wu and Russell (1997), Russell and Mestecky (2002, 2010), Boyaka *et al.*, (2005), Kutteh *et al.*, (2005), Moldoveanu *et al.*, (2005) and Mestecky *et al.*, (2007). (Mestecky, *et al.*, 2010)

Infeksi yang terbatas pada mukosa vagina manusia atau imunisasi intravaginal dengan tidak menggunakan adjuvant mukosa yang kuat, seperti toksin kolera (*CT*), menghasilkan respon humoral terbatas pada tempat imunisasi. Namun, infeksi ascenden atau imunisasi intrauterin pada hewan dapat menyebabkan respon humoral yang kuat dan ditingkatkan dengan penambahan adjuvant, karena adanya sel-sel yang terlibat dalam penyerapan, pengolahan, dan penyajian antigen pada mukosa uterus. Imunisasi vagina wanita dengan antigen larut atau virus polio yang dilumpuhkan, atau infeksi dengan *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *streptokokus grup B*, *HSV tipe 2*, atau *HPV* menyebabkan respon lokal yang lemah dan jarang terbentuk respon imun humoral sistemik (Mestecky, *et al.*, 2010).

2.5. Hubungan Infeksi pada Saluran Reproduksi Wanita, Sistem Imun dan Infertilitas

Penelitian Aurich and Spergser, 2007 mendapatkan bahwa air mani dari kuda jantan yang sehat setelah diproses dengan pengencer berbasis susu dengan atau tanpa gentamisin (1 g/l). Pada campuran tersebut ditambahkan bakteri *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus equi subsp. equi*, *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus*, *Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis* atau medium kultur saja (kontrol). Kesimpulan yang didapatkan adalah bakteri tertentu memiliki efek yang merusak pada kualitas air mani selama penyimpanan di tempat yang dingin. Efek ini tidak berkurang dengan penambahan gentamisin. Gentamisin menurunkan fungsi spermatozoa pada air mani dalam penyimpanan yang dingin bila diperpanjang waktunya (Aurich and Spergser, 2007).

Penelitian Ata, *et al.*, 2010 menjelaskan bahwa *abnormal cervical mucus discharge (A-CMD)* atau patogen dalam mukus servik berefek pada kinerja reproduksi sapi dan heifer saat estrus. Hewan yang memiliki sekret jernih (68 sapi, 38 heifer) dengan kekentalan normal dan tanpa bau dikelompokkan pada kelompok *normal cervical mucus discharge (N-CMD)*. Hewan lain (84 sapi, 32 heifer) dikelompokkan dalam kelompok A-CMD. Mikroorganisma yang diisolasi dari sampel dibagi menjadi 3 kelompok : pertama, patogen uterus (UP), kedua, patogen uterus potensial (PUP) atau ketiga, patogen uterus oportunistik (OUP). Keberadaan PUP dikaitkan dengan A-CMD baik pada sapi ($p < 0,01$) maupun heifer ($p < 0,02$). Angka konsepsi pada layanan pertama inseminasi (FS-CR) lebih rendah pada sapi dengan PUP ($p < 0,01$). Selain itu, keberadaan PUP dan OUP berpengaruh terhadap FS-CR pada heifer ($p < 0,01$). Meskipun A-CMD berpengaruh terhadap FS-CR pada sapi ($p < 0,04$), hal itu tidak mempengaruhi FS-CR pada heifer. Perbedaan rata-rata hari terbuka (tidak hamil) untuk sapi ($p < 0,02$) dan umur saat layanan pertama inseminasi untuk heifer ($p < 0,01$) yang berbeda signifikan antara N-CMD dan kelompok A-CMD. Penelitian ini menunjukkan bahwa CMD harus dievaluasi lebih hati-hati bila ada masalah infertilitas. Selain mikroorganisma diketahui yang menyebabkan sterilitas dan infertilitas pada kelompok UP, patogen dalam kelompok PUP harus dipertimbangkan potensinya terhadap kejadian infertilitas (Ata, *et al.*, 2010)

Kejadian bakteriospermia sebesar 15%, yang terdiri dari 22 spesies bakteri. Empat spesies paling umum sebesar 90% dari isolat bakteri, yaitu : *E. fecalis* (56%), *E. coli* (16%), *Streptococcus Grup B* (13%) dan *Staphy. aureus* (5%). Pada penelitian ini menunjukkan bahwa bakteriospermia dan *ESWBC (Elevated Seminal White Blood Cells)* lazim pada pria dengan infertilitas, namun bakteriospermia tidak berhubungan dengan *ESWBC* secara statistik. Tetapi keduanya berkaitan dengan parameter air mani yang berkurang, *ESWBC* berkaitan dengan kerusakan yang lebih serius (Domes, *et al.*, 2011). Ekhaise, and Richard (2008) mendapatkan tiga isolat bakteri yang diisolasi dari sampel air mani,

yaitu : *S. aureus* 7 (77,8%) ditemukan paling dominan, *E. coli* 1 (11,1%) dan sisanya *Citrobacter spp.* Motilitas spermatozoa tercatat sebesar 20%, 10% dan 45% untuk *S. aureus*, *E. coli* dan *Citrobacter spp.* dibanding motilitas spermatozoa dari sampel normal 50% atau lebih. Keberadaan dan pengaruh mikroorganisma sangat besar dalam air mani yang membuktikan bahwa mikroorganisma memainkan peran penting pada infertilitas pria.

Okonofua, Ako-Nai and Dighitoghi (1995) meneliti prevalensi mikro organisma di vagina dan kanal endoservik wanita infertil dibandingkan dengan kontrol wanita hamil. Sebanyak 92 wanita infertil dibandingkan dengan kontrol 86 wanita hamil. Didapatkan hasil isolasi *N. gonorrhoeae* adalah 17,4% pada wanita infertil dan 10,5% pada wanita hamil ($p > 0,05$). Tidak ada perbedaan signifikan antara 2 kelompok dari isolasi *C. albicans*, *T. vaginalis* dan organisma fakultatif lainnya. Isolasi mikroorganisma pada kedua kelompok teramati cukup tinggi. Namun, wanita dengan infertilitas sekunder memiliki tingkat karier *N. gonorrhoeae*, *C. albicans* dan *S. aureus* yang lebih tinggi dibandingkan dengan wanita dengan infertilitas primer. Hampir 15% wanita infertil memiliki episode penyakit radang panggul sebelumnya dan 26% pernah melakukan induksi aborsi. Riwayat keputihan adalah prediktor yang jelek terhadap karier mikroorganisma pada vagina dan endoservik.

Penelitian Kaur & Prabha (2012) menggunakan tikus perempuan jenis Balb/c diinokulasikan *S. aureus* intravaginal yang mengaglutinasi spermatozoa dari isolat servik uteri wanita dengan infertilitas tak terjelaskan memakai dosis berbeda (10^4 , 10^6 dan 10^8 cfu/20ml) selama 10 hari. Kolonisasi mikroba dipantau setiap 3 hari dengan kultur vagina, yang menunjukkan bahwa *S. aureus* dapat berkolonisasi secara efisien pada vagina tikus. Perkawinan pada hari ke 12, dengan pejantan yang baik menyebabkan penurunan kesuburan 100% dibandingkan dengan kontrol. Bahkan dengan dosis tunggal 10^6 atau 10^8 cfu dapat menyebabkan kolonisasi pada vagina yang berlangsung selama 10 hari diikuti pembersihan secara bertahap sampai 21 hari, dengan hasil kultur

vagina yang negatif. Mencit betina dikawinkan pada hari ke 7 (kultur positif), yang tidak subur, namun, tikus dikawinkan pada hari 22 (kultur negatif), dapat mempertahankan kesuburan dan melahirkan anak menunjukkan perannya dalam memprovokasi infertilitas. Selanjutnya tidak ada manifestasi klinis lain yang dapat dilihat wujudnya atau secara histologis. Namun, ketika strain standar *S. aureus* MTCC6625 yang tidak mengimobilisasi spermatozoa diinokulasikan intravaginal dengan dosis 10^8 cfu selama 10 hari diikuti dengan perkawinan pada hari ke 12, kesuburan teramati pada semua tikus betina. Ini mendukung hipotesis bahwa infertilitas yang diamati pada kelompok tersebut sebagai akibat kolonisasi strain *S. aureus* yang mengaglutinasi spermatozoa.

Sampel spermatozoa motil dikoinkubasi selama 4 jam dengan *S. aureus* hidup dari servik wanita. Setelah 30 menit campuran ejakulat dengan bakteri hidup terdapat penurunan motilitas dan aglutinasi spermatozoa. Tidak didapatkan aglutinasi dan imobilisasi oleh bakteri yang sudah mati karena panas, lisozim atau antibiotik. Liu, *et al.*, (2002) mempelajari mikroorganisma uropatogen lain menemukan penurunan signifikan pada motilitas spermatozoa ketika dikoinkubasi dengan *S. aureus*. Ohri and Prabha (2005) mengatakan bahwa *S. aureus* merupakan salah satu flora yang dominan pada pria infertil dan bisa ada pada servik uteri wanita yang dapat melumpuhkan spermatozoa (Kaur, *et al.*, 2010; Gupta and Prabha, 2012).

Kverka, *et al.*, (2012) mengkultur PBMC dari wanita infertil dengan ASA kemudian direaksikan dengan antigen spermatozoa, maka PBMCnya memproduksi lebih sedikit IL-3, IL-11, IL-13, ICAM-1, GCSF dan lebih banyak IL-2, IL-4 dan IL-12p70 dibandingkan dengan PBMC dari wanita sehat. PBMC dari wanita infertil dengan ASA menghasilkan lebih sedikit IL-13, IL-7, IL-17 dan MIG, dan lebih banyak MIP-1b dan IL-8, dibandingkan dengan PBMC dari wanita infertil tanpa ASA. PBMC dari wanita infertil tanpa ASA dalam merespon sel lisat spermatozoa awalnya meningkatkan produksi faktor pertumbuhan (GCSF, GM-CSF dan PDGF-BB) diikuti dengan peningkatan kemokin (seperti IL-8, MCP-

1 dan MIP-1b). Sehingga disimpulkan respon imun seluler terhadap antigen sperma berbeda antara wanita infertil dengan ASA, wanita infertil tanpa ASA dan wanita sehat. Perbedaan ini dapat memainkan peran penting pada langkah-langkah awal patogenesis infertilitas. Antibodi anti-spermatozoa sangat mengurangi kemungkinan pembuahan alami. Etiologi imunitas anti-spermatozoa pada wanita tidak diketahui.

Pada saat fertilisasi, sistem imun sepanjang saluran reproduksi wanita dilemahkan untuk mengoptimalkan implantasi dan kehamilan. Selama fase proliferasi (estradiol-dominan) dari siklus menstruasi menjelang ovulasi, terjadi ekspansi sel T regulator CD4+CD25+Foxp3+ dalam uterus manusia. Hal ini bertepatan dengan penurunan aktivitas sitolitik sel T CD8+ dalam uterus setelah ovulasi. Selanjutnya, subset unik limfosit intraepithelial, sel T $\gamma\delta$, yang ada dalam uterus menekan respons imun maternal anti-janin melalui TGF β . Sel T $\gamma\delta$ diduga menjembatani imunitas bawaan dan adaptif dengan menggunakan respon sel T helper adaptif tipe 1 (Th1) melalui sekresi IFN yang terjadi setelah infeksi saluran reproduksi oleh HSV-2 sehingga terjadi toleransi (Hickey, *et al.*, 2011; Chan, *et al.*, 2011).

Dengan memahami pembentukan toleransi yang dimediasi hormon seks, penting untuk pengembangan vaksin yang melindungi saluran reproduksi wanita. Studi pada tikus menunjukkan bahwa, tidak seperti antigen yang diberikan pada saat diestrus, ketika antigen diberikan pada saat estrus dengan kadar estradiol tinggi akan menyebabkan induksi toleransi. Pemahaman toleransi yang dimediasi siklus menstruasi penting untuk pembentukan respon adaptif yang kuat terhadap patogen menular seksual termasuk HIV (Hickey, *et al.*, 2011).

Dengan keberadaan sitokin pro-inflamasi seperti IL-6, sel Treg berdiferensiasi menjadi subset Th17 dalam peradangan. Sel Th17 berkaitan dengan rekrutmen neutrofil pada saluran reproduksi wanita dan sangat penting untuk pembersihan *N. gonorrhoeae* selama infeksi. Sel Th17 juga mengatur migrasi neutrofil ketika terjadi infeksi klamidia pada tikus dan diperkirakan memainkan peran dalam tahap akhir aborsi spontan (Hickey, *et al.*, 2011).

Secara keseluruhan, pembentukan respon imun adaptif Th1, Th2, Treg dan Th17 dimediasi langsung oleh hormon dan / atau tidak langsung oleh lingkungan sitokin hormon yang diatur selama stimulasi antigen. Sejumlah penelitian pada hewan menunjukkan bahwa dengan vaksinasi atau infeksi, pembentukan respon imun adaptif seluler dan humoral dipengaruhi oleh tahapan siklus reproduksi. Mekanisme yang dilalui respon adaptif adalah seimbang guna menginduksi perlindungan khusus terhadap patogen dan memori sementara untuk mendukung kehamilan masih harus dijelaskan (Chan, *et al.*, 2011; Hickey, *et al.*, 2011).

Hirano, *et al.*, 1999 mengidentifikasi molekul protein tidak larut air dengan aktivitas mengikat imunoglobulin yang dimurnikan dari mukus servik uteri manusia dengan fraksinasi ammonium sulfat. Dua puluh satu asam amino sisi N-terminus dari protein pengikat imunoglobulin ditentukan dan dianalisis dalam pencarian homologi dengan menggunakan komputer database protein. Fraksi yang dimurnikan mengandung protein 15-kd yang mengikat IgA, IgM, dan semua subklas IgG manusia dalam analisis Western blot. Urutan asam amino dari N-terminus identik dengan sekretori leukosit protease inhibitor (SLPI). Kapasitas SLPI mengikat imunoglobulin dikonfirmasi dengan analisis Western blot. Disimpulkan bahwa sebuah komponen dalam mukus servik uteri manusia mampu mengikat imunoglobulin yang diidentifikasi sebagai sekresi leukosit protease inhibitor. Kapasitas pengikatan imunoglobulin merupakan properti unik dari protein, yang memberikan dukungan tambahan terhadap anggapan bahwa ia memainkan peran fisiologis penting dalam mekanisme pertahanan jaringan lokal. Hal ini juga terlibat dalam patogenesis imunologi infertilitas dengan menjebak spermatozoa pada mukus servik uteri (Hirano, *et al.*, 1999)

Pada saluran reproduksi wanita, sel T CD8+ (35-50 %) mendominasi dibanding sel T CD4+ (25 %). Pada mukosa rahim, terdapat agregat limfosit mayoritas terdiri dari sel B sebagai inti pusat dikelilingi oleh sel T CD8+ dan diliputi oleh makrofag disebalah luarnya. Agregat limfosit berkembang selama fase proliferasi dan terbesar selama fase sekresi. Meskipun tidak jelas,

perkembangan agregat limfosit menunjukkan peran pada penekanan imunitas seluler yang terjadi dalam rahim selama fase sekresi, ketika ovulasi dan implantasi yang paling mungkin terjadi (Hickey, *et al.*, 2011).

2.6. Ekspresi Reseptor Kemokin pada Saluran Reproduksi Wanita

Ekspresi reseptor CXCR4 dan CCR5 dikenal sebagai molekul penting dalam implantasi, sebagaimana CD4 pada sel epitel uterus ekspresinya bervariasi selama siklus menstruasi (Gambar 2.4a-d). Kadar ketiganya rendah selama fase proliferasi, memuncak pada saat ovulasi dan kemudian mendatar (CXCR4, CD4) atau menurun (CCR5) selama fase sekresi. Reseptor kemokin pada kultur sel epitel endometrium menunjukkan up-regulasi dan polarisasi reseptor CXCR1, CXCR4, dan CCR5 ketika ada blastokista manusia. Distribusi dan regulasi reseptor ini di epitel endometrium dan blastokista manusia menunjukkan bahwa masing-masing penting dalam aposisi dan adhesi pada fase implantasi manusia. Selain ekspresi pada saluran reproduksi wanita bagian atas, leukosit dan sel epitel pada saluran reproduksi wanita bagian bawah (Gambar 2.4g-i) mengekspresikan CCR5 dan GalCer. Yeaman, *et al.*, menunjukkan bahwa sel epitel basal dan parabasal dari ektoserviks mengekspresikan CD4, CCR5, dan GalCer, tidak seperti sel zona pertengahan dan lapisan sel lumen superfisial. Meskipun perubahan ekspresi protein tidak sejelas yang terlihat pada uterus, bukti histologis mendukung kesimpulan bahwa ekspresi CD4 dan CCR5 lebih besar selama fase proliferasi dari fase sekresi (Wira, *et al.*, 2010; Hickey, *et al.*, 2011).

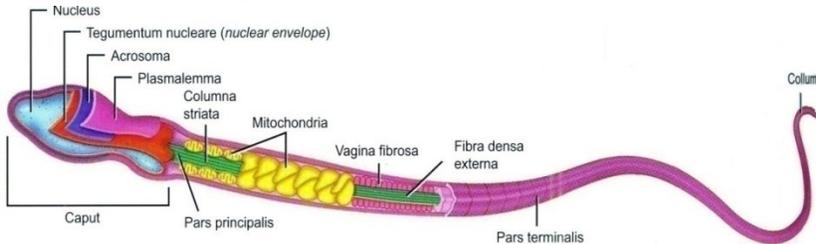
2.7. Kemokin, sitokin dan antimikroba pada Saluran Reproduksi Wanita

Kemokin dan sitokin penting bagi pertumbuhan jaringan yang cepat dan renovasi yang terjadi selama siklus menstruasi, sementara antimikroba melindungi terhadap potensi patogen. Serviks uteri dan vagina mensekresi kemokin dan sitokin (IL-6 dan IL-8) serta antimikroba yang diproduksi secara endogen (SLPI, HBD2, HNP1-3, dan laktoferin) yang turun secara signifikan pada

HBD2, HNP1-3, dan laktoferin) yang turun secara signifikan pada pertengahan siklus (13 hari) dan tetap tertekan selama 7-10 hari, dan kembali ke level fase proliferasi sebelum menstruasi. Sebaliknya, level total protein dan TGF β tetap tidak berubah selama siklus menstruasi. Pada penelitian lain, level defensin-5 usus manusia tertinggi di lavas serviko-vagina selama fase sekresi. Penelitian ini mendukung hipotesis bahwa perubahan hormon selama siklus menstruasi mengatur sistem imun pada seluruh saluran reproduksi wanita melalui cara yang disinkronkan dengan fungsi reproduksi yang mengoptimalkan kondisi saluran reproduksi wanita untuk suksesnya migrasi spermatozoa, fertilisasi, implantasi, dan kehamilan (Wira, *et al.*, 2010; Chan, *et al.*, 2011).

Pada eksperimen terbaru, estradiol secara signifikan menurunkan produksi antimikroba HBD2 dan elafin *in vitro* lebih dari 48 jam pada sel epitel skuamosa vagina yang baru diisolasi (Gambar 2.8). Sebaliknya, hasil *in vitro* dari sel epitel uterus primer menunjukkan peningkatan transkripsi HBD2 dan sekresi elafin yang regulasinya tergantung estradiol (Fahey *et al.*, Pengamatan tidak diterbitkan). Dengan menggunakan sel line vagina, sekresi sel vagina primer dari MIP3a tidak terdeteksi pada sekresi sel kontrol dan sel yang diberi perlakuan estradiol (Gambar 2.8). Penekanan sekresi HBD2 dan elafin yang diinduksi estradiol oleh sel epitel skuamosa menunjukkan menurunnya perlindungan sel epitel vagina *in vivo* selama fase proliferasi dan sekresi dari siklus menstruasi saat kadar estradiol relatif tinggi. Perubahan dalam perlindungan bisa terjadi sekunder terhadap perubahan fisiologis yang memungkinkan kelangsungan hidup spermatozoa yang tersimpan di saluran tersebut. Respon yang sebaliknya terhadap rangsangan estradiol antara saluran reproduksi bagian atas dan bawah mungkin karena perubahan mekanistik yang timbul dari perbedaan asal embrionya. Kurangnya produksi MIP3a oleh sel epitel vagina menunjukkan peran penting bagi leukosit dan sel epitel saluran reproduksi bagian atas dalam produksinya, seperti yang terdeteksi dalam cairan vagina. Secara keseluruhan, seperti yang terlihat pada Gambar 2.8, estradiol memberikan efek stimulasi dan

Subdomain kepala spermatozoa memiliki diversifikasi fungsi pada proses pembuahan. Daerah apikal kepala spermatozoa secara khusus mengenali dan mengikat zona pelusida (matriks ekstraseluler oosit). Sementara area yang lebih luas dari permukaan kepala spermatozoa (domain praequator) terlibat dalam reaksi akrosom, melepaskan komponen akrosom yang diperlukan untuk penetrasi zona. Segmen equator kepala spermatozoa tetap utuh setelah reaksi akrosom dan merupakan daerah khusus yang mengenali dan berfusi dengan oolemma (membran plasma sel telur) untuk membuahi oosit (Manyonda, 2006; Gadella, 2009).



Gambar 2.10. Spermatozoa
Disadur dari Heffner and Schust, 2008

2.8.2. Proteomik Spermatozoa Manusia

Ketika kita akan mempelajari proteomik permukaan spermatozoa, ada keterbatasan pada spermatozoa manusia yang perlu dipertimbangkan dibandingkan dengan spermatozoa dari hewan. Beberapa keterbatasan tersebut adalah (Gadella, 2009; Shetty and Herr, 2009) :

1. Manusia menghasilkan air mani dengan kandungan spermatozoa abnormal cukup tinggi (belum matang, deteriorasi, atau penyimpangan morfologi).
2. Untuk isolasi permukaan spermatozoa yang benar diperlukan sejumlah besar sel spermatozoa.
3. Genomik dan proteomik spesies manusia lebih menarik dibandingkan hewan domestik.

Tabel dibawah ini menunjukkan beberapa antigen dan lokasinya yang sudah dilakukan identifikasi dari spermatozoa.

Table 2.7. Defined antigens of naturally occurring human ASA

Antigen	Localisation	Effect of ASA
YWK-II mAb	Equatorial sector of the human sperm head	Agglutination
hSMP-1	Acrosome	Agglutination
Calpastatin	Acrosome region, tail	Agglutination
YLP(12), a 50±5 kDa membrane protein	Sperm surface	Agglutination
Caspase-3	Sperm surface	Apoptosis
HSP 70	Sperm surface	Apoptosis
Human CD52 antigen	Sperm surface, inserted into the sperm membrane during the epididymal passage	Inhibition of motility
1.8- and 2.8 kb mRNAs highly and specifically expressed	Tails of permeabilized human sperm	Inhibition of motility
FSA-1	Sperm surface	Inhibition of acrosome reaction
SPRASA	Acrosome region	Inhibition of acrosome reaction
Calpastatin	Plasma membrane and the outer acrosomal membrane of sperm	Inhibition of acrosome reaction
Protein P36	Acrosome-reacted sperm	Inhibition of acrosome reaction
hSMP-1	Acrosome	Inhibition of acrosome reaction
FASA-57	Acrosome of non acrosome-reacted sperm, equatorial region after acrosome reaction	Inhibition of acrosome reaction
Sperm protein 17 (Sp17), highly conserved	Testis, head and tail of ejaculated Spermatozoa	Inhibition of acrosome reaction
PH-20, a glycerolphosphatidyl-inositol-linked hyaluronidas	Sperm surface	Inhibition of zona binding
55-kDa protein of Spermatozoa	Apical edge of the head in capacitated sperm	Inhibition of zona binding
Ag IF10		Inhibition of zona binding
Fertilization antigen 1 (FA-1)	Specifically reacted with zona protein 3 (ZP3)	Inhibition of zona binding
hSMP-1	Sperm surface	Inhibition of zona binding
hSMP-1, PubMed locus U12978	Acrosome	Inhibition of zona binding
Human nuclear autoantigenic sperm protein (NASP)	Vasectomized men develop ASA to NASP	Unknown
SP-10, a highly conserved intra acrosomal sperm protein	Sperm surface after acrosomal reaction	Inhibition of sperm-oocyte fusion
YLP(12)	Sperm surface	Inhibition of zona binding
Acrin-1	Acrosomal	Inhibition of acrosome reaction

Disadur dari Krause, 2009; Nixon and Aitken, 2009.

2.8.3. Gerakan Spermatozoa Manusia melalui Saluran Reproduksi Wanita.

Gerakan spermatozoa pada saluran reproduksi wanita dibedakan menjadi dua macam : 1. Gerakan spermatozoa yang belum terkapasitasi dan 2. Gerakan spermatozoa yang terkapasitasi

2.8.3.1. Gerakan Spermatozoa Manusia yang Belum Terkapasitasi

Saat koitus, jutaan spermatozoa terdeposit pada vagina bagian atas. Sebagian besar tidak pernah sampai pada tempat fertilisasi (Heffner and Schust, 2008). Spermatozoa manusia disimpan dalam vagina anterior untuk menghindari asam vagina dan respon imun, mereka segera kontak dengan mukus servik dan masuk servik. Mukus servik menyaring spermatozoa dengan kelainan morfologi dan motilitas sehingga hanya sebagian kecil spermatozoa yang benar-benar masuk servik uteri dalam hitungan menit (Heffner and Schust, 2008; Odeblad, 2013). Spermatozoa bertahan hidup dalam kriptus epitel endoservik selama beberapa jam. Spermatozoa tidak dapat melewati servik uteri menuju rongga uterus bila mukosa servik uteri tidak dalam keadaan siap. Estrogen melunakkan stroma servik dan membuat mukus servik uteri menjadi tipis dan encer. Progesteron menimbulkan efek sebaliknya, yaitu suatu keadaan yang tidak cocok untuk spermatozoa (Suarez and Pacey, 2006; Heffner and Schust, 2008).

Pada kondisi paling baik, spermatozoa membutuhkan 2-7 jam melewati uterus menuju tempat fertilisasi di tuba falopii. Transpor spermatozoa ini disebabkan oleh gerakan spermatozoa, dan dibantu pergerakan silia sel epitel dinding uterus. Biasanya hanya beberapa ratus spermatozoa yang mencapai tuba falopii, di mana mereka tetap hidup sampai terjadi ovulasi. Setelah ovulasi, spermatozoa mengalami reaktivasi dan mulai bergerak menuju sel telur. Sinyal yang menarik spermatozoa menuju sel telur tidak diketahui. Spermatozoa manusia dapat bertahan hidup selama 24-48 jam di dalam saluran reproduksi wanita (Suarez and Pacey, 2006; Heffner and Schust, 2008).

2.8.3.2. Gerakan Spermatozoa Manusia yang Terkapasitasi

Spermatozoa yang baru dikeluarkan saat ejakulasi belum mampu membuahi sel telur. Mereka mendapatkan kemampuan menembus lapisan sel di sekeliling oosit melalui proses kapasitasi. Selama kapasitasi, glikoprotein yang menempel pada membran spermatozoa dilepaskan, yang menyebabkan perubahan dan reorganisasi permukaan membran spermatozoa. Spermatozoa yang terkapasitasi mengubah gerakan ekornya dari gerakan undulasi yang teratur menjadi gerakan menyerupai cambuk yang menyentak dan mendorong spermatozoa ke depan. Secara biokimia, spermatozoa yang terkapasitasi mengalami peningkatan sensitivitas terhadap kalsium dan peningkatan kadar cAMP internal. Kapasitasi dapat diinduksi secara *in vitro*, namun proses ini terjadi *in vivo* di dalam saluran reproduksi wanita. Kapasitasi membutuhkan waktu beberapa jam baik secara *in vivo* maupun *in vitro* (Suarez and Pacey, 2006; Heffner and Schust, 2008).

Selama kapasitasi, spermatozoa kehilangan beberapa protein permukaan yang diberikan epididimis dan ejakulat vesikula seminalis. Hal ini disertai perubahan bikarbonat pada membran plasma lipid serta sterol dan sulfat yang ada pada spermatozoa. Protein pengikat sterol dan sterol sulphatase ada pada saluran reproduksi wanita dan cairan folikel wanita. Pembelahan enzimatis dari ester sterol polar menjadi sterol non-polar mengubah kekakuan membran. Dan pelepasan kolesterol oleh protein pengikat sterol mengubah status membran lipid raft microdomain. Tempat ini merupakan kompleks transduksi sinyal yang terlibat dalam pengenalan dan pengikatan zona pelusida. Membran plasma lipid raft adalah mikrodomain kaya kolesterol, sphingomyelin, glycosphingolipid, glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored protein dan kompleks molekul transduksi sinyal. Hilangnya kolesterol dari membran spermatozoa merupakan langkah penting yang menyebabkan gangguan membran lipid untuk meningkatkan fluiditas membran dan memfasilitasi fusi membran yang diperlukan untuk reaksi akrosom dan fusi spermatozoa-telur. Protein spermatozoa juga mengubah lokasi lipid raft, cAMP dan status fosforilasi yang tergantung protein kinase A (Chamley and Clarke, 2007; Cooper and Yeung, 2010).

Kapasitasi spermatozoa sangat penting untuk memfasilitasi reaksi akrosom dan eksositosis berfusinya membran plasma spermatozoa dengan membran akrosom bagian luar yang memaparan isi akrosom, seperti acrosin dan hyaluronidase untuk penetrasi tudung oosit oleh spermatozoa. Reaksi akrosom juga menghasilkan pemaparan protein membran akrosom bagian dalam, seperti protein CD46 yang mengontrol komplemen ke luar dari spermatozoa (Chamley and Clarke, 2007).

2.9. Antibodi antispermatozoa pada Wanita

Servik uteri adalah tempat imunitas mukosa yang sangat kompeten, berisi banyak sel plasma yang menghasilkan IgA di lapisan sub-epitel endoservik. Sebagian besar IgA dalam mukus servik uteri adalah sekretori IgA (s-IgA). Antibodi s-IgA ditujukan pada patogen potensial dan kadang-kadang spermatozoa, yang dapat melumpuhkan penyusup dengan mengikat ke helai mukus servik uteri, yang efektif menghalangi pergerakannya ke hulu saluran reproduksi. Ada mekanisme yang dapat mencegah reaksi imunologi terhadap spermatozoa pada wanita. Namun, pada sebagian kecil pasangan infertil mekanisme tersebut terganggu, sehingga memproduksi ASA (Antibodi antispermatozoa) lokal dan sirkulasi yang menurunkan pembuahan alami. Pada wanita dengan infertilitas yang tidak jelas penyebabnya, aktivitas antibodi antispermatozoa terdeteksi di mukus servik uteri lebih dari 10% kasus (Clarke, 2009).

Antibodi antispermatozoa ditemukan pada pria maupun wanita dalam darah atau sekresi saluran reproduksi seperti plasma mani, mukus servik uteri atau cairan folikel. Satu studi menunjukkan bahwa wanita dengan ASA dalam darahnya memiliki tingkat antibodi yang sama dalam cairan folikelnya dengan pengecualian antibodi kelas IgM. ASA dalam cairan folikel berasal dari transudat darah sehingga terdiri dari IgG dan IgA. Keberadaan ASA pada mukus servik uteri memiliki dampak yang jelek pada transportasi spermatozoa dan kesuburan (Chamley and Clarke, 2007).

Analisis retrospektif hasil IVF oleh Clarke *et al.*, memberikan beberapa bukti pertama bahwa ASA dari serum wanita bisa menghambat pembuahan oosit manusia oleh spermatozoa manusia dengan tingkat fertilisasi hanya 15% pada pasien dengan titer ASA IgG dan IgA yang tinggi dalam serum sebagai suplemen media kultur IVF, vs 69% pada pasien dengan serum donor. Hasil eksperimen menegaskan bahwa titer ASA IgG yang tinggi pada serum wanita dapat menghambat fertilisasi oosit manusia. Penelitian pada hewan juga menunjukkan bahwa eksperimen dengan induksi iso-imunisasi spermatozoa memiliki efek merugikan pada fertilitas dan bayi tabung (Clarke, 2009).

2.9.1. Asal Usul Antibodi antispermatozoa pada Wanita

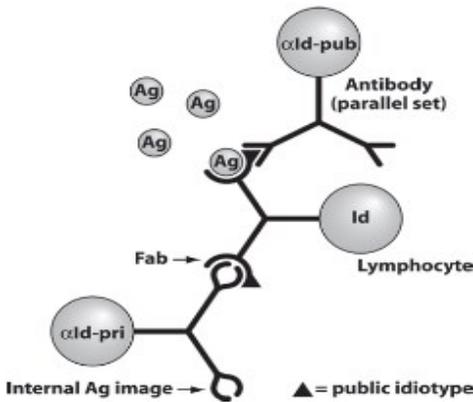
Beberapa hipotesis diusulkan untuk menjelaskan asal-usul imunitas spermatozoa pada wanita dan hubungan imunitas spermatozoa antara pria dan wanita dalam proporsi pasangan (Clarke, 2009).

Hipotesis pertama, spermatozoa manusia memiliki antigen yang bereaksi silang dengan antigen mikroba tertentu. Sarkar melaporkan 75% serum pria dengan ASA bereaksi spesifik pada molekul 1,6 ragi mannan, beberapa pada molekul 1,3 ragi mannan atau dengan *Salmonella paratyphi C* chemotype C1. Blum, *et al.*, mengamati hubungan yang kuat antara antibodi anti *Chlamydia* dan ASA pada wanita muda yang menggunakan kontrasepsi oral. Cunningham *et al.*, melaporkan 56% wanita dengan penyakit radang panggul primer terdeteksi ASA dengan tes indirek MAR (Clarke, 2009).

Hipotesis kedua. Steven Witkin menyatakan antibodi yang melapisi spermatozoa (*in vitro*) merangsang limfosit dari donor wanita mensintesis interferon gamma (IFN γ). Sebaliknya, spermatozoa yang bebas tidak memproduksi IFN γ . Mengingat bahwa IFN γ menginduksi makrofag untuk mengekspresikan antigen Ia (penanda MHC kelas II) pada permukaan sel, hasil penjarangan antigen spermatozoa dan antigen Ia pada permukaan sel makrofag akan memfasilitasi perekrutan sel T-helper dan inisiasi produksi ASA oleh limfosit B. Pengamatan ini konsisten

dengan temuan bahwa wanita lebih mungkin memproduksi antibodi anti spermatozoa jika pasangannya memiliki autoimunitas spermatozoa (Clarke, 2009).

Hipotesis ketiga jika pria dengan ASA pada air maninya kemudian melakukan hubungan seksual berulang, pasangan wanitanya akan memproduksi antibodi anti-idiotipe yang berpotensi memfasilitasi respon imun terhadap spermatozoa. Jerne mengusulkan antibodi harus antigenik terhadap sistem imunnya sendiri, sehingga menghasilkan autoantibodi terhadap bagian unik (idiotypic) antibodi pada tempat pengikatan antigen. Hasilnya merupakan jaringan interaksi idiotipe / anti-idiotipe yang terlibat dalam regulasi dan modulasi sistem imun. Tempat pengikatan antigen anti-idiotipe meniru struktur antigen asli yang dikenali sistem imun individu (Gambar 2.12). Akibatnya, imunisasi terhadap antibodi idiotipe tertentu memberikan cara yang efektif untuk merangsang atau setidaknya memfasilitasi respon imun yang ditujukan pada antigen alami. Pengujian anti-idiotipe mendukung hipotesis bahwa kemampuannya untuk menghambat antibodi monoklonal asli karena tempat pengikatan antigen membentuk bentuk yang mirip dengan epitop antigen asli, yang disebut "internal antigen image". Jika pasangan pria memiliki ASA pada air maninya, ada kemungkinan pasangan wanitanya akan memproduksi antibodi anti-idiotipe yang bisa meningkatkan respon imun antispermatozoa. Pasangan wanita berpotensi memproduksi antibodi anti-idiotipe yang ditujukan pada antibodi pasangan pria khususnya pada komponen internal spermatozoa, selain yang spesifik pada antigen membran spermatozoa. Gabungan "parallel set" anti-antiidiotypes berpotensi bereaksi dengan beberapa epitop permukaan spermatozoa (Clarke, 2009).



Gambar 2.11. Respon imun terhadap antigen (Ag) menghasilkan antibodi dengan bentukan idiotypic (Id) yang unik terdiri dari tempat pengikatan antigen atau antibodi paratope. Sistem imun individu melihat Id unik sebagai benda asing dan merespon dengan

membentuk antibodi anti-Id (a-Id), beberapa dikenal sebagai Id publik (Id-pub) yang ada bersama antibodi lain dengan spesifisitas antigen yang berbeda, sementara beberapa mengenali bagian Fab internal atau pivot (Id-pri) (gambar Ag internal). Pembentuk merekrut limfosit B yang memproduksi antibodi dengan berbagai kekhususan (paralel set), sementara yang terakhir berpotensi meningkatkan produksi antibodi yang bereaksi dengan antigen aslinya (Clarke, 2009).

Produksi ASA pada beberapa wanita sangat mungkin melibatkan satu atau lebih dari tiga mekanisme utama yang didalilkan. Sebagai contoh, sintesis IFN γ pada limfosit pasangan wanita yang distimulasi antibodi yang melapisi spermatozoa berpotensi meningkatkan respon imun pada antibodi idiotype pada air mani. Awalnya beberapa wanita merespon antigen mikroba (mikroba yang melekat pada permukaan spermatozoa dapat merangsang produksi IFN γ oleh sel limfoid wanita), sehingga membentuk antibodi yang bereaksi silang dengan spermatozoa, respon imun ini dipertahankan dalam periode yang lama dengan paparan berulang dan respon terhadap idiotype antispermatozoa pada air mani dan / atau produksi antibodi anti-idiotype terhadap antibodi anti spermatozoanya. Hubungan antara tiga mekanisme yang dihipotesiskan memerlukan investigasi (Clarke, 2009).

2.9.2. Mekanisme Antibodi antispermatozoa Menginduksi Infertilitas

Imunologi infertilitas merupakan konsekuensi aksi gabungan beberapa ASA. ASA bisa ada di lokasi yang berbeda, dapat bereaksi terhadap antigen yang berbeda, dan dapat mengganggu kesuburan dengan berbagai cara. ASA dapat berpengaruh jelek terhadap motilitas spermatozoa, penetrasi mukus servik uteri, AR, pengenalan ZP dan fusi gamet, dengan melumpuhkan dan / atau agglutinasi spermatozoa, menghalangi interaksi spermatozoa - telur, mencegah implantasi, dan / atau menahan perkembangan embrio. ASA hanya memiliki makna fungsional ketika menempel pada antigennya. ASA paling penting ditujukan pada kepala spermatozoa, sedangkan yang menempel ekor spermatozoa terlibat dalam penurunan motilitas. Selain itu, spermatozoa yang dilapisi ASA lebih rentan terhadap fagositosis dalam saluran reproduksi wanita (Chiu and Chamley, 2004; Lu, *et al.*, 2008).

Antibodi antispermatozoa mempengaruhi fungsi spermatozoa ketika terikat padanya (Manyonda, 2006; Sarda, *et al.*, 2012). Secara umum, antibodi dapat mempengaruhi fungsi sel dengan cara yang berbeda : (Krause, 2009a).

1. Mekanisme yang relevan adalah penghambatan fungsi protein, meliputi antigen serumpun (epitop).
2. Aktivasi komplemen kurang penting. Pengaktifan ASA melalui komplemen tidak efektif karena dalam air mani mengandung inhibitor komplemen. Spermatozoa dilindungi dari serangan komplemen oleh CD46, protein utama pengatur komplemen, yang terdapat pada membran bagian dalam akrosom.
3. Antibodi dapat mengaktifkan sel efektor aksesori (fagosit) atau sel NK setelah mengikat fragmen Fc-Ig. Fagosit yang merusak spermatozoa (spermiphage) merupakan konstituen normal dari sel seminal. Walaupun kurang aktifitasnya, mereka akan menghancurkan spermatozoa yang terikat ASA dari pada mengeliminasi spermatozoa melalui apoptosis.

2.9.2.1. Antibodi Anti - spermatozoa Menurunkan Motilitas Spermatozoa

Modifikasi motilitas spermatozoa merupakan penyebab infertilitas, sehingga menghambat transportasi spermatozoa menuju oosit. ASA mengikat antigen membran spermatozoa, tetapi tidak dapat mencapai struktur subselular pada spermatozoa hidup. ASA mempengaruhi fungsi protein transmembran atau melalui kerusakan membran yang dimediasi komplemen yang merupakan salah satu mekanisme biologis infertilitas wanita (Lu, *et al.*, 2008).

IgG ASA mampu mengaktivasi komplemen dan mendeposisi MC5b-9 pada spermatozoa manusia. IgG dan C3 yang terikat pada spermatozoa motil menempel pada neutrofil manusia pada akrosom spermatozoa (*in vitro*). Adhesi ini meningkatkan pelepasan radikal oksigen di lokasi penempelan neutrofil pada membran spermatozoa. Atau hilangnya motilitas spermatozoa dimediasi C5b-9 (43-87%) dikaitkan dengan perubahan morfologi spermatozoa bahkan menyebabkan lisis spermatozoa (Lu, *et al.*, 2008; Krause, 2009b).

2.9.2.2. Antibodi antispermatozoa Mempengaruhi Penetrasi Spermatozoa pada Mukus Servik Uteri.

Keberadaan ASA pada mukus servik uteri tidak sering namun dapat menjadi penyebab infertilitas yang berat. Gangguan penetrasi spermatozoa dalam lendir servik uteri dengan mengaktivasi kaskade komplemen oleh imunoglobulin yang melekat pada permukaan spermatozoa yang akhirnya melisis sel dan menginisiasi proses fagositosis. Komplemen yang menginduksi lisis sel tergantung pada kelas imunoglobulin. IgM jauh lebih efektif dari IgG, sementara beberapa subklas IgA tidak dapat berinteraksi dengan komplemen sejak awal. Selama spermatozoa dalam mukus servik uteri, mereka terpapar pada aktifitas komplemen. Aktifitas komplemen dalam mukus servik uteri sekitar 12% dari aktifitasnya di serum. Sehingga membutuhkan waktu lebih lama untuk mengimobilisasi spermatozoa. Selain itu, pengikatan juga terjadi pada regio Fc antibodi dan mukus servik uteri. Proses ini berkontribusi untuk

pengikatan spermatozoa terhadap antibodi dan imobilisasi kompleks ini oleh mukus servik uteri (Chamley and Clarke, 2007; Lu, *et al.*, 2008).

Permukaan spermatozoa yang ditemplei IgA ASA lebih penting daripada IgG ASA dalam menghambat penetrasi mukus servik uteri dan diduga ASA bereaksi dengan kepala atau ekor spermatozoa untuk mencegah penetrasi mukus. Komponen s-IgA ASA terikat ke glikoprotein dari mukus servik uteri yang diduga menyebabkan gemetaran spermatozoa pada mukus servik uteri. Jager *et al.*, melaporkan bahwa IgG juga dapat menyebabkan fenomena gemetar dan menduga fragmen crystallizable (Fc) IgG mengganggu motilitas spermatozoa yang terikat antibodi dalam mukus servik uteri. Clarke juga mengamati IgA ASA serum juga menyebabkan fenomena gemetar. Ia mengemukakan bahwa ASA pada spermatozoa yang terikat pada reseptor Fc, seperti protein 15 kDa dengan amino-terminus identik dengan sekresi leukosit protease inhibitor (SLPI) dalam mukus servik uteri manusia, dan menghambat transportasi spermatozoa (Chamley and Clarke, 2007).

III

Pembahasan

Profil protein permukaan *S. aureus* pada penelitian pendahuluan ini didapatkan berat molekul bervariasi. Profil protein permukaan bakteri penyebab vaginitis non spesifik khususnya bakteri *S. aureus* pada wanita pasangan infertil bermacam-macam antara penelitian yang satu dengan yang lainnya sesuai dengan sumber koloni yang didapatkan.

Keberadaan *S. aureus* pada saluran reproduksi wanita pasangan infertil yang mengalami vaginitis non spesifik dapat memicu reaksi imun adaptif humoral lokal sebagai langkah pertahanan terhadap serangan bakteri. Dalam hal ini belum ada penelitian tersendiri yang menelisik reaksi imun dimaksud.

Keberadaan bakteri pada saluran reproduksi wanita bagian bawah beragam macamnya. Sehingga dimungkinkan terjadinya respon imun yang hampir mirip antara bakteri yang satu dengan bakteri yang lainnya.

Sebagaimana yang sudah diketahui bahwa keberadaan pasangan infertil yang pada eksplorasi kedua pasangan tidak ditemukan adanya kelainan yang berarti. Tetapi apabila masing-masing pria dan wanita pasangan infertil tersebut berganti pasangan, banyak kita amati bahwa pasangan infertil baru tersebut bisa mendapatkan keturunan (Wiknjastro, 2009). Oleh karenanya perlu kita amati lebih lanjut adanya kemungkinan respon imun yang terbentuk oleh bakteri penyebab vaginitis non spesifik khususnya *S. aureus* dapat mempengaruhi fungsi spermatozoa pria pasangan infertil.

Dengan mengidentifikasi protein permukaan spermatozoa pria pasangan infertil, kita akan mengetahui kesamaan antara protein permukaan bakteri khususnya *S. aureus* dengan protein permukaan spermatozoa dimaksud.

Dan kita melakukan analisa terhadap protein yang disekresi di vagina ataupun servik uteri wanita pasangan infertil sebagai

hasil dari respon imun adaptif humoral lokal yang terjadi. Sehingga diperkirakan imunoglobulin yang disekresikan mempengaruhi fungsi spermatozoa sebagai bagian dari kesatuan fertilitas.

VI

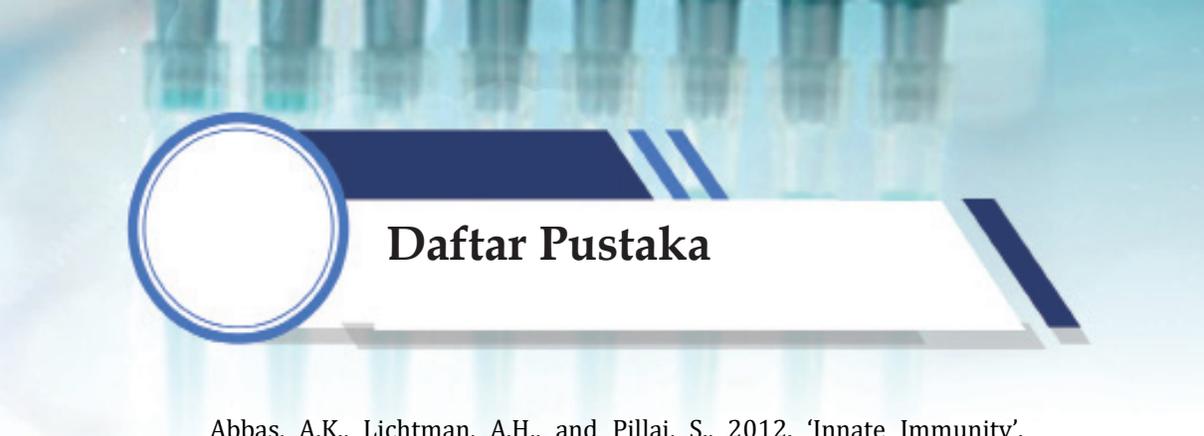
Kesimpulan Dan Saran

6.1. Kesimpulan

1. Profil protein permukaan bakteri penyebab vaginitis non spesifik khususnya bakteri *S. aureus* pada wanita pasangan infertil bervariasi.
2. Reaksi imun adaptif humoral lokal pada saluran reproduksi bagian bawah wanita pasangan infertil dalam merespon vaginitis non spesifik khususnya yang disebabkan oleh bakteri *S. aureus* belum banyak diteliti sampai saat ini.
3. Variabilitas protein permukaan bakteri penyebab vaginitis non spesifik pada wanita pasangan infertil terhadap s-IgA anti bakteri *S. aureus* belum diketahui.
4. Profil Protein spermatozoa pria pasangan infertil yang dikenali oleh sekretori imunoglobulin A anti bakteri *S. aureus* wanita pasangan infertil yang mengalami vaginitis non spesifik belum diketahui.
5. Lokasi protein spermatozoa pria pasangan infertil yang dikenali oleh s-IgA anti bakteri *S. aureus* wanita pasangan infertil yang mengalami vaginitis non spesifik belum diketahui.
6. Gangguan pergerakan spermatozoa pria pasangan infertil oleh s-IgA anti *S. aureus* wanita pasangan infertil belum diketahui.

6.2. Saran

Agar dapat mengenali penyebab infertilitas tak ter jelaskan khususnya yang disebabkan oleh kelainan imunologis berkaitan dengan infeksi pada saluran reproduksi wanita maka diperlukan eksplorasi tentang penyebab infeksi saluran reproduksi wanita dan respon imun yang dibangkitkannya serta dicari adanya kesamaan epitop kuman penyebab infeksi tersebut dengan molekul permukaan gamet dalam hal ini gamet yang berasal dari pasangan pria yaitu spermatozoa.



Daftar Pustaka

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S., 2012. 'Innate Immunity'. Cellular and Molecular Immunology. 7rd Ed. International Edition. Elsevier. United States.
- Anderson, D.J., 2008. 'Genitourinary Immune Defense'. *Sexually Transmitted Diseases*. 4th Ed. McGraw Hill. United States. p. 271-319.
- Anas, M., Wiyasa, IWA., Riyanto, S., Sardjono, TW., Aulani'am, A., and Prawiro, S.R., 2016. Microorganism spectrum of nonspecific vaginitis in women of infertile couples recognized by s-IgA uterine cervix secretion. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 2016; 5(6): 467-470
- Ata, A., Türütöğlü, H., Kale, M., Gülay, M.G., and Pehlivanoğlu, F., 2010. Microbial Flora of Normal and Abnormal Cervical Mucous Discharge Associated with Reproductive Performance of Cows and Heifers in Estrus. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 8 : 1007 - 1012 August 2010
- Aurich and Spergser, 2007. Influence of bacteria and gentamicin on cooled-stored stallion spermatozoa. *Theriogenology*. 2007 Mar 15; 67(5):912-8. Epub 2006 Dec 1.
- Baratawidjaja, K.G., dan Rengganis, I., 2009. 'Imunologi Infeksi'. *Imunologi Dasar*, Edisi ke-8 Cetakan ke-2. Balai Penerbit FKUI, Jakarta. hal : 399-450.
- Bjorkman, Y.A., Thomsson, K.A., Larsson, J.M.H., Ekerhovd, E., and Hansson, G.C., 2007. Large Scale Identification of Proteins, Mucins, and Their O-Glycosylation in the Endocervical Mucus during the Menstrual Cycle. *Molecular & Cellular Proteomics* 6:708-716, 2007.

- Chan, T., Barra, N.G., Lee, A.J., and Ashkar, A.A., 2011. Innate and adaptive immunity against herpes simplex virus type 2 in the genital mucosa. *Journal of Reproductive Immunology* 88 (2011) 210–218
- Chiu, W.C.C., and Chamley, L.W., 2004.* Clinical associations and mechanisms of action of antisperm antibodies. *Fertil Steril* 2004; 83:529–35.
- Clarke, G.N., 2009. 'ASA in the Female'. *Immune Infertility*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p
- Cooper, G.T., and Yeung, C.H., 2010. 'Physiology of Sperm Maturation and Fertilization'. *Andrology*, 3rd, completely revised and updated Edition. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p
- Dhont, N., *et al.*, 2011. 'The risk factor profile of women with secondary infertility : an unmatched case-control study in Kigali, Rwanda', *BMC Women's Health*, 11:32.
- Eriksson, K., Jarbrink, M.Q., Osek, J., Moller, A., Bjork, S., Holmgren, J., and Czerkinsky, C., 1998. Specific-Antibody-Secreting Cells in the Rectums and Genital Tracts of Nonhuman Primates following Vaccination. *INFECTION AND IMMUNITY*, Dec. 1998, p. 5889–5896 Vol. 66, No. 12.
- Fidel, P.L., and Sobel, J.D., 1996. Immunopathogenesis of Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, July 1996, p. 335–348 Vol. 9, No. 3
- Gupta, S., and Prabha, V., 2012. *Research Article* Human Sperm Interaction with Staphylococcus aureus : A Molecular Approach. *Journal of Pathogens* 2012, Article ID 816536, 7 pages
- Heffner, L.J. and Schust D.J., 2008. The Reproductive System at a Glance. 2006. Umami, V. (penterjemah), 2008. *At a Glance SISTEM REPRODUKSI*, Edisi Kedua. Penerbit Erlangga, Surabaya. hal.

- Hickey, D.K., Patel, M.V., Fahey, J.V., and Wira, C.R., 2011. Review. Innate and adaptive immunity at mucosal surfaces of the female reproductive tract: stratification and integration of immune protection against the transmission of sexually transmitted infections. *Journal of Reproductive Immunology* 88 (2011) 185–194
- Hirano, M., Kamada, M., Maegawa, M., Gima, H., and Aono, T., 1999. Binding of human secretory leukocyte protease inhibitor in uterine cervical mucus to immunoglobulins: pathophysiology in immunologic infertility and local immune defense. *Fertil Steril* 1999;71:1108–14
- Johansson, E.L., Wasse'n, L., Holmgren, J., Jertborn, M., and Rudin, A., 2001. Nasal and Vaginal Vaccinations Have Differential Effects on Antibody Responses in Vaginal and Cervical Secretions in Humans. *INFECTION AND IMMUNITY*, Dec. 2001, p. 7481–7486 Vol. 69, No. 12.
- Kaur, S., Prabha, V., & Sarwal, a., 2010. Receptor Mediated Agglutination of Human Spermatozoa by Spermagglutinating Factor Isolated from *Staphylococcus aureus*. *The Journal of Urology* 18(2010): 2586-90.
- Kaur, S., & Prabha, V., 2012. Infertility as a Consequence of Spermagglutinating *Staphylococcus aureus* Colonization in Genital Tract of Female Mice. *PloS ONE* 7(12): e52325. doi :10.1371 / journal.pone.0052325
- Kumamoto, Y., and Iwasaki, A., 2012. Unique features of antiviral immune system of the vaginal mucosa. *Current Opinion in Immunology* 2012, 24:411–416
- Kverka, M., Gallova, Z.U., Bartova, J., Cibulka, J., Bibkova, K., Micanova, Z., and Hogenova, H.T., (2012) Sperm Cells Induce Distinct Cytokine Response in Peripheral Mononuclear Cells from Infertile Women with Serum Anti-Sperm Antibodies. *PLoS ONE* 7(8): e44172. doi:10.1371 / journal.pone. 0044172

- Latif, O.M.S., 2012. Vulvovaginitis. <http://emedicine.medscape.com/article/270872-overview#showall> Diakses tanggal 12 Pebruari 2012.
- Lu, J.C., Huang, Y.F., and Lu, N.Q., 2008. Antisperm immunity and infertility *Expert Rev. Clin. Immunol.* 4(1), 113–126 (2008)
- Manyonda, I.T., 2006. 'Immunological Test in Obstetrics and Gynecology' *The Immunology of Human Reproduction*. Taylor & Francis. 2006 London. p 145-160.
- Mestecky, J., Raska, M., Novak, J., Alexander, R.C., and Moldoveanu, Z., 2010. Review. Antibody-mediated protection and the mucosal immune system of the genital tract: relevance to vaccine design. *Journal of Reproductive Immunology* 85 (2010) 81–85
- Nikolaitchouk, N., 2009. The female genital tract microbiota. Composition, relation to innate immune factors, and effects of contraceptives. Dissertation. Department of Infectious Diseases/Clinical Bacteriology, Institute of Biomedicine at Sahlgrenska Academy University of Gothenburg, Guldhedsgatan 10A, S-413 46 Gothenburg, Sweden, 2009.
- Nixon, B. dan Aitken, J. R., 2009. 'Proteomics of Human Spermatozoa'. *Immune Infertility*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p 3-12.
- Odeblad, E., 2013. Natural Family Planning Teachers Association of Ireland (NFPTAI) diakses <http://www.naturalfamilyplanning.ie/> tgl 13-8-2013 jam 14.02
- Okonofua, F.E., Ako-Nai, A. K., and Dighitoghi, M.D., 1995. Lower genital tract infections in infertile Nigerian women compared with controls. *Genitourin Med* 1995;71:163-168
- Peterson, M.L., Ault, K., Kremer, M.J., Klingelutz, A.J., Davis, C.C., Squier, C.A, and Schlievert, P.M., 2005. The Innate Immune System Is Activated by Stimulation of Vaginal Epithelial Cells with

Staphylococcus aureus and Toxic Shock Syndrome Toxin 1. INFECTION AND IMMUNITY, Apr. 2005, Vol. 73, No. 4, p. 2164–2174

Prabha V, Chaudhary N and Kaur S, 2011. 'Molecular Mimicry Between Spermatozoa and Bacteria', THE JOURNAL OF UROLOGY, 186: 2442-2447

Prabha V., *et al.*, 2009. 'Isolation of a spermatozoal immobilization factor from *Staphylococcus aureus* filtrates', Can. J. Microbiol. 55: 874–878.

Prabha, V., Sandhu, R., Kaur, S., Kaur, K., Sarwal, A., Mavuduru, R.S., and Singh, S.K., 2010. *Research Article* Mechanism of Sperm Immobilization by *Escherichia coli*. Advances in Urology Volume 2010, Article ID 240268, 6 pages

Rantam, F.A., 2003. *Metode Immunologi*. Cetakan I. Airlangga University Press, Surabaya.

Ratri, D. R., 2008. 'Identifikasi Protein Adhesin *Staphylococcus* Isolat Vagina yang Memperantarai Perlekatan pada Spermatozoa'. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

Russell, M.W., and Mestecky, J., 2002. Humoral immune responses to microbial infections in the genital tract. *Microbes and Infection* 4 (2002) 667–677.

Sawada, M., Otsuki, K., Mitsukawa, K., Yakuwa, K., Nagatsuka, M., and Okai, T., 2006. CLINICAL ARTICLE. Cervical inflammatory cytokines and other markers in the cervical mucus of pregnant women with lower genital tract infection. *International Journal of Gynecology and Obstetrics* (2006) 92, 117—121

Shetty, J. and Herr, J.C., 2009. 'Methods of Analysis of Sperm Antigens Related to Fertility'. *Immune Infertility*. Springer Verlag Berlin Heidelberg. p 13-30.

- Shrier, L.A., Bowman, F.P., Lin, M., and Crowley-Nowick, P.A., 2003. Mucosal Immunity of the Adolescent Female Genital Tract. *JOURNAL OF ADOLESCENT HEALTH* 2003;32:183–186
- Sri Widayarti, 2011a. 'Isolasi Protein'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011b. 'SDS-PAGE'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011c. 'Western Blotting'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011d. 'Analisis Western Blotting'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Sri Widayarti, 2011e. 'Imunohistokimia'. *Biologi Molekuler Prinsip Dasar Analisis*. Penerbit Erlangga. 2011 Jakarta. hal.
- Suarez, S.S., and Pacey, A.A., 2006. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, Vol.12, No.1 pp. 23–37, 2006
- Sunihapsari, C., 2002. 'Protein Membran Sel Spermatozoa yang Mengenali Protein Permukaan *Staphylococcus*'. Tugas Akhir. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
- Schmaler, M., 2010. 'Staphylococcus aureus lipoproteins-TLR2-mediated activation of innate and adaptive immunity'. *Inauguraldissertation*. Universitat Basel.
- WHONET, 2012. Laporan Laboratorium Mikrobiologi Klinik RSSA Malang tahun 2007, 2008, 2009 dan 2010. Diambil pada tanggal 10 Pebruari 2012.
- Wiknjosastro, H (ed.). 2009. 'Radang dan Beberapa Penyakit lain pada Alat Genital Wanita, *Ilmu Kandungan*, Cetakan ke-7. PT Bina Pustaka Sarwono Prawirohardjo, Jakarta. hal : 269-313

- Wira, C.R., Fahey, J.V., Ghosh, M., Patel, M.V., Hickey D.K., and Ochiel, D.O., 2010. Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens. *American Journal of Reproductive Immunology* 63 (2010) 544–565.
- Wira, C.R., Ghosh, M., Smith, J.M., Shen, L., Connor, R.I., Sundstrom, P., Frechette, G.M., Hill, E.M., and Fahey, J.V., 2011. Epithelial Cell Secretions from the Human Female Reproductive Tract Inhibit Sexually Transmitted Pathogens and *Candida albicans* but not *Lactobacillus*. *Mucosal Immunol.* 2011 May ; 4(3): 335–342
- Wirth, M., 2007. Immunology of the genital tract a review. Dissertation. zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.

RIWAYAT HIDUP



Muhammad Anas, putra kedua dari tujuh bersaudara dari Abah H. Mu;asan (alm) dan Ibu Hj. Siti Fatimah, lahir di Dusun Jatisari Desa Jatirenggo Kecamatan Glagah Kabupaten Lamongan pada hari Ahad tanggal 05 Maret 1967. Pendidikan Sekolah Dasar ditempuh di Desa Kalimalang Kentong Glagah Lamongan dan Madrasah Ibtidaiyyah di Desa Wangen Glagah Lamongan tamat tahun 1980. Pendidikan Menengah Pertama dijalani di SMP Negeri 1 Kabupaten Lamongan, lulus tahun 1983. Pendidikan Menengah Atas diselesaikan di kota yang sama Kota Lamongan di SMPP Lamongan yang kemudian berganti nama menjadi SMA Negeri 2 Lamongan pada tahun 1986. Selanjutnya hijrah ke Surabaya untuk melanjutkan studi di Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, tamat pada tahun 1992. Sembari menyelesaikan pendidikan kedokteran, di waktu senggangnya dijalannya dengan menjadi guru bidang studi fisika di SMP Bina Bangsa Siwalankerto Wonocolo Surabaya dan di SMP Bina Bangsa 2 Krembangan Jaya Surabaya serta guru bidang studi biologi di SMA Bina Bangsa Surabaya. Setelah menamatkan pendidikan kedokteran kemudian melaksanakan tugas sebagai dokter PTT di Desa Sambutan Kecamatan Samarinda Ilir Kotamadya Samarida Propinsi Kalimantan Timur sekaligus sebagai Dokter Perusahaan di perusahaan kayu PT. TYSP Palaran Samarinda sampai tahun 1997. Pada tahun 1998 menjalani pendidikan sebagai peserta didik PPDS1 di Departemen Obstetri Ginekologi RS Dr Sutomo /

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya dan lulus pada tahun 2002. Setelah menyelesaikan pendidikan spesialis, mengabdikan diri di RSI Hasanah Muhammadiyah Mojokerto dan menjadi dosen part time pada beberapa Akademi dan Sekolah Tinggi (Akademi Kebidanan YARSI Surabaya, Poltekes Majapahit Mojokerto, Stikes Majapahit Mojokerto, Akademi Keperawatan PPNI Mojokerto, Akademi Keperawatan Dian Husada Mojokerto, Akademi Kebidanan Sitti Khadijah Wonoayu Sidoarjo). Pada tahun 2012 menempuh pendidikan Diploma Immunologi di Fakultas Kedokteran Universitas Gajah Mada Yogyakarta dan pada tahun 2017 menyelesaikan pendidikan Doktorat di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Sambil menjalani pendidikan doktorat ikut mempersiapkan pendirian Fakultas Kedokteran UMSurabaya dan menjadi dosen di sana.

Daftar Karya Tulis

Publikasi		
1	Differences in Response of Staphylococcus aureus Protein to Serum IgG and Secretion of Uterine Cervical s-IgA from Fertile and Infertile Couples Women with Non-... M Anas, Aulanni'am Aulanni'am, I. Wayan Arsana Wiyasa, Teguh Wahyu Sardjono, Sumarno Advanced Science Letters 23 (12), 12652-12655	2017
2	Microorganism spectrum of nonspecific vaginitis in women of infertile couples recognized by s-IgA uterine cervix secretion M Anas, IWA Wiyasa, S Riyanto, TW Sardjono, SR Prawiro Asian Pacific Journal of Reproduction 5 (6), 467-470	2016
3	Molecular modeling for revealing cross-reaction antibody with Staphylococcus aureus and human spermatozoa protein M Anas, Didik Huswo Utomo, Edi Widjajanto, Sumarno, Aulani'am, I Wayan Arsana Wiyasa International Journal of ChemTech Research 9 (1), 233-239	2016
4	Angka Kejadian Kehamilan Pada Penderita Infertil Dengan Endometriosis Minimal Ringan Yang Mendapatkan Terapi Medroksi Progesteron Asetat Oral Di RSUD D... M Anas, Samsulhadi Majalah Obstetri dan Ginekologi (MOG) 14 (1), 29-39	2006
Proceeding		
1	Penggunaan Nitrovasodilator Sebagai Donor Oksida Nitrik Pada Preeklamsia M Anas, Uning Marlina Proceeding Annual Meeting APKKM Ke 6 Surabaya 1 (ISBN: 9786025786020), 97	2018
2	S-IgA Uterine Cervix Secretion in Women of Infertile Couples Recognized Microorganism Spectrum of Nonspecific Vaginitis M Anas, IW Arsana Wiyasa, Teguh Wahyu Sardjono, Aulani'am, Sumarno Reto Prawiro BIT's 5th International Congress of Gynaecology and Obstetrics (ICGO-2017) 1 ...	2017
3	Revealing Cross Reaction Antibody between Staphylococcus aureus and Human Spermatozoa Protein by Biocomputational Approach to Discover Infertility Mechan... M Anas, Didik H Utomo, Edi Widjajanto, IWA Wiyasa, Aulani'am, Sumarno Reto Prawiro BIT's 7th Annual Wolrd Congress Molecular & Cell Biology-2017 1 (2017), 388	2017
4	Cross-reaction Between Staphylococcus aureus Protein and Human Sperm Protein at Female of Infertile Couple with Nonspecific Vaginitis M Anas, Aulanni'am, I Wayan Arsana Wiyasa, Teguh Wahyu Sardjono, Sumarno 1st International Conference on One Health 1 (2017), 36	2017
5	Local Humoral Adaptive Immune Response influence on the occurrence of Infertility in Women Infertile Couple with Non-Specific vaginitis due to cross reaction betw...	2016

	M Anas, Aulanni'am, I Wayan Arsana Wiyasa, Teguh Wahyu Sardjono, Sumarno Temu Ilmiah Nasional dan Rapat Kerja KIBI Prosiding ISBN: 9786026061706, 65	
Buku		
1	Infeksi Spermatozoa dan Karakteristik <i>Staphylococcus aureus</i> (Book Two) M Anas UMSurabaya Publishing ISBN: 9786025786082	2018
2	Infertilitas dan Immunologi Vaginitis (Book One) M Anas UMSurabaya Publishing ISBN: 9786025015120 1, 124	2017

Sinopsis

Buku Infection, Immunology and Infertility Series diterbitkan dalam tiga seri buku. Buku pertama dengan judul "Infertilitas dan Imunologi Vaginitis", dengan subjudul pertama "Overview Infertilitas" dan subjudul kedua "Vulvovaginitis: Etiopathogenesis dan Tinjauan Imunologi Infeksi". Buku kedua dengan judul "Infeksi pada Spermatozoa dan Karakteristik *Staphylococcus aureus*", dengan subjudul pertama "Peranan Infeksi pada Spermatozoa Terhadap Fertilitas" dan subjudul kedua "Karakterisasi Molekuler faktor Virulensi dan peranannya pada patogenesis infeksi *Staphylococcus aureus*". Buku ketiga dengan judul "Metode Pengukuran Respon Imun dan Aplikasi dalam Infertilitas", dengan subjudul "Metode Pengukuran yang Diperlukan untuk Menilai Respon Imunologis" dan subjudul kedua "Respon Imun yang Terjadi akibat Infeksi *Staphylococcus aureus* pada Genitalia Wanita terhadap Spermatozoa".

Buku ketiga membahas metode pemeriksaan yang digunakan untuk menilai respon imun infertilitas dari bahan yang membangkitkannya ataupun produk yang dihasilkannya banyak macamnya. Pemilihan metode bergantung pada hasil akhir, baik berupa protein atau imunoglobulin atau antibodi. Protein dapat diketahui sifatnya seperti berat molekul, kadar protein, titik isoelektrik, kelarutan, aktifitas biologi, struktur bangun, urutan asam amino, urutan basa nukleotidanya. Imunoglobulin atau antibodi dapat diamati kelas, subkelas, berat molekul, titik isoelektrik, kadar, kelarutan, juga kestabilannya. Metode pemeriksaan yang dipilih meliputi imunopresipitasi, elisa, kromatografi, spektrometri massa, kristalografi x-ray, elektroforesis 1D/2D, sds-page, western blot, dot blot, Tes Lowry atau Bradford, Uji Ultracentrifugation dispersity sedimentation, spektroskopi NMR, imunohistokimia, metode surface plasmon resonance, fluorescence resonance energy transfer.

Vaginitis non spesifik yang terjadi pada wanita pasangan infertil khususnya yang disebabkan oleh *S. aureus* akan merangsang sistem imun bawaan maupun sistem imun adaptif. Pada respon imun adaptif terdapat respon imun adaptif seluler dan respon imun adaptif humoral. Respon imun adaptif humoral dapat diproduksi sebagai sekresi dalam sirkulasi dan dalam lumen organ - saluran reproduksi wanita. Pada saluran reproduksi wanita khususnya serviks uteri akan disekresikan sekretori-IgA anti *S. aureus* yang dapat bereaksi silang dengan protein permukaan spermatozoa. Sehingga fungsi spermatozoa terganggu khususnya untuk melakukan fertilisasi.

