



PERPUSTAKAAN
F.K.U.I.

T

WF 600

W631e

1997

UNIVERSITAS INDONESIA

EKSPRESI mRNA PADA SEL-SEL KURASAN
BRONKOALVEOLAR PENDERITA
SARKOIDOSIS PARU MENGGUNAKAN
TEKNIK *DIFFERENTIAL DISPLAY*

WIWIEN HERU WIYONO

BAGIAN PULMONOLOGI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS INDONESIA
1997

PENELITIAN INI DIKERJAKAN DI :

LABORATORIUM BAGIAN PENYAKIT DALAM II
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS HIROSHIMA
JEPANG

PEMBIMBING :

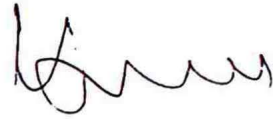
Prof. Michio Yamakido, M. D., Ph. D.

Keiko Hiyama, M. D., Ph. D.

Shinichi Ishioka, M. D., Ph. D.

TESIS INI DISETUJUI OLEH :

Dr. H. Hadiarto Mangunnegoro, Sp. P



Kepala Bagian Pulmonologi

Dr. H. Faisal Yunus, Ph. D., Sp. P



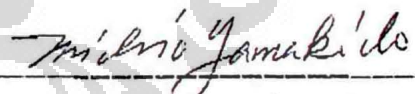
koordinator Penelitian

Dr. H. Anwar Yusuf, Sp. P



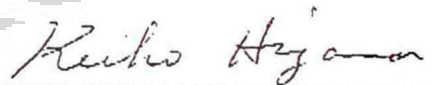
Ketua Program Studi

Prof. Michio Yamakido, M. D., Ph. D



Pembimbing I

Keiko Hiyama, M. D., Ph. D



Pembimbing II

Shinichi Ishioka, M. D., Ph. D



Pembimbing III

UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah puji dan syukur saya panjatkan ke hadirat Allah Yang Maha Kuasa, yang telah melimpahkan rahmat serta karunia-Nya sehingga saya dapat menyelesaikan tesis ini yang merupakan syarat akhir dalam pendidikan keahlian di Bagian Pulmonologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Tidak seperti biasanya, penelitian ini dilakukan di luar negeri yaitu di Bagian Ilmu Penyakit Dalam II Fakultas Kedokteran Universitas Hiroshima Jepang, dan pada akhirnya ternyata memenuhi syarat untuk diajukan menjadi disertasi setingkat S3 di sana.

Untuk itu saya ingin menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga kepada Dr. H. Hadiarto Mangunnegoro, Sp. P, Kepala Bagian Pulmonologi FKUI/ SMF Paru RSUP Persahabatan yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan ini disertai bimbingan, pengarahan dan petuah yang berharga dan juga kesempatan untuk mengikuti pendidikan lanjutan iptek kedokteran bidang Pulmonologi di Jepang semasa saya masih menjadi peserta PPDS Pulmonologi.

Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada Prof. Rasmin Rasyid (alm), yang telah membuka pintu kesempatan pertama kali pada

saya untuk dapat menjalani pendidikan ilmu penyakit paru serta memberikan motivasi dan dorongan untuk pengembangan Pulmonologi di Indonesia.

Terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. H. Nirwan Arief, Sp. P. Beliau yang sewaktu menjabat Ketua Program Studi PPDS I Pulmonologi FKUI telah menerima saya untuk mengikuti pendidikan ini, serta memberikan bekal ketrampilan khusus dan juga memberikan kesempatan serta dorongan untuk mengikuti pendidikan lanjutan di luar negeri.

Rasa terima kasih juga saya ucapkan kepada Dr. H. Anwar Jusuf, Sp. P, Ketua Program Studi PPDS I Pulmonologi FKUI yang telah banyak meluangkan waktunya untuk membimbing, memberikan petunjuk yang sangat berharga guna mendapatkan keahlian dokter paru. Perhatian dan bantuan beliau semasa saya menjalani pendidikan di luar negeri sungguh tak ternilai hingga saya dapat menyelesaikannya dengan baik.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. H. Menaldi Rasmin, Sp. P, Sekretaris Program Studi PPDS I Pulmonologi FKUI yang telah memberikan ilmu dan ketrampilan khusus serta dorongan, motivasi untuk pengembangan Pulmonologi FKUI.

Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. H. Faisal Yunus, PhD, Sp. P, Koordinator Penelitian Bagian Pulmonologi FKUI yang telah

memberikan dorongan dan motivasi untuk menempuh pendidikan lanjutan di luar negeri. Berkat bimbingan beliau yang tak ternilai sebelum dan selama di luar negeri akhirnya saya dapat menyelesaikannya dengan baik.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada: Dr. H. Husaeri Fachrurodji, Sp. P, Dr. Wibowo Suryatenggara, Sp. P, Dr. H. A. Syakur Gani, Sp. P, Dr. Erwin Peetosutan, Sp. P, Dr. E.J. Manuhutu, MS, Sp. P, Dr. H. Muhamad Farid, Sp. P, Dr. I Made Pastika, Sp. P, Dr. H. Arifin Nawas, Sp. P, Dr. H. Tjandra Yoga Aditama, DTM&H, Sp. P, Dr. Achmad Hudoyo, Sp. P, Dr. Priyanti ZS, Sp. P, Dr. H. Sardikin Giriputro, Sp. P, Dr. Hj. Dianiati KS Soewarta, Sp. P, Dr. H. Muchtar Ichsan, Sp. P, Dr. H. Boedi Swidarmoko, Sp. P, Dr. H. Pudjo Astowo, Sp. P atas segala petunjuk, bimbingan dan pengarahannya selama saya mengikuti pendidikan dan keahlian.

Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada :

1. Direktur RSUP Persahabatan
2. Kepala SMF Radiologi RSUP Persahabatan
3. Kepala Instalasi Laboratorium Mikrobiologi RSUP Persahabatan
4. Kepala Bagian Kardiologi FKUI/ RS Jantung Harapan Kita
5. Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam FKUI/ RSUPN Cipto Mangunkusumo

6. Kepala Bagian Anestesiologi FKUI/ RSUPN Cipto Mangunkusumo
7. Kepala Bagian Ilmu Kesehatan Anak/ RSUPN Cipto Mangunkusumo
8. Direktur RSUD Pasar Rebo Jakarta

beserta seluruh staf, atas kesempatan dan bimbingan yang telah diberikan kepada saya dalam rangka menjalankan kurikulum pendidikan di masing-masing institusi tersebut.

Rasa terima kasih pula saya sampaikan kepada seluruh teman sejawat peserta PPDS Pulmonologi, seluruh paramedis dan staf nonmedis SMF Paru RSUP Persahabatan atas segala bantuan dan kerjasama yang baik selama pendidikan ini.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dan Rektor Universitas Indonesia atas kesempatan yang telah diberikan kepada saya untuk mengikuti pendidikan di luar negeri.

Penghargaan dan terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada Prof. Michio Yamakido, MD, PhD, Kepala Bagian Ilmu Penyakit Dalam II Fakultas Kedokteran Universitas Hiroshima yang telah memberi saya kesempatan untuk menimba ilmu di institusi yang beliau pimpin serta memberi bimbingan dan bantuan moril dan materiil tak ternilai sehingga saya dapat menyelesaikan penelitian ini.

Rasa terima kasih juga saya sampaikan kepada Shinichi Ishioka,

MD, PhD dan Keiko Hiyama, MD, PhD yang telah bersedia menjadi pembimbing saya serta dengan tulus dan sabar memberikan ilmunya, dorongan dan semangat hingga penelitian ini selesai.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Mitsuhide Ohmichi, MD, PhD dan Yohmei Hiraga, MD, PhD, dari Department of Respiratory Disease, Sapporo Hospital of Hokkaido Railway Company, Japan, yang telah bermurah hati memberikan sampel sel BAL penderita Sarkoidosis.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Hiroyuki Maeda, MD, PhD dan Akihiro Maeda, MD, PhD dari Bagian Ilmu Penyakit Dalam II Fakultas Kedokteran Universitas Hiroshima yang telah memberikan bimbingan teknik sehingga penelitian ini dapat terlaksana dengan baik.

Rasa hormat dan terima kasih yang tak terhingga saya sampaikan kepada Ayahanda dan Ibunda tercinta yang dengan tulus hati telah mendidik serta membesarkan saya sehingga saya mampu mencapai keadaan seperti ini.

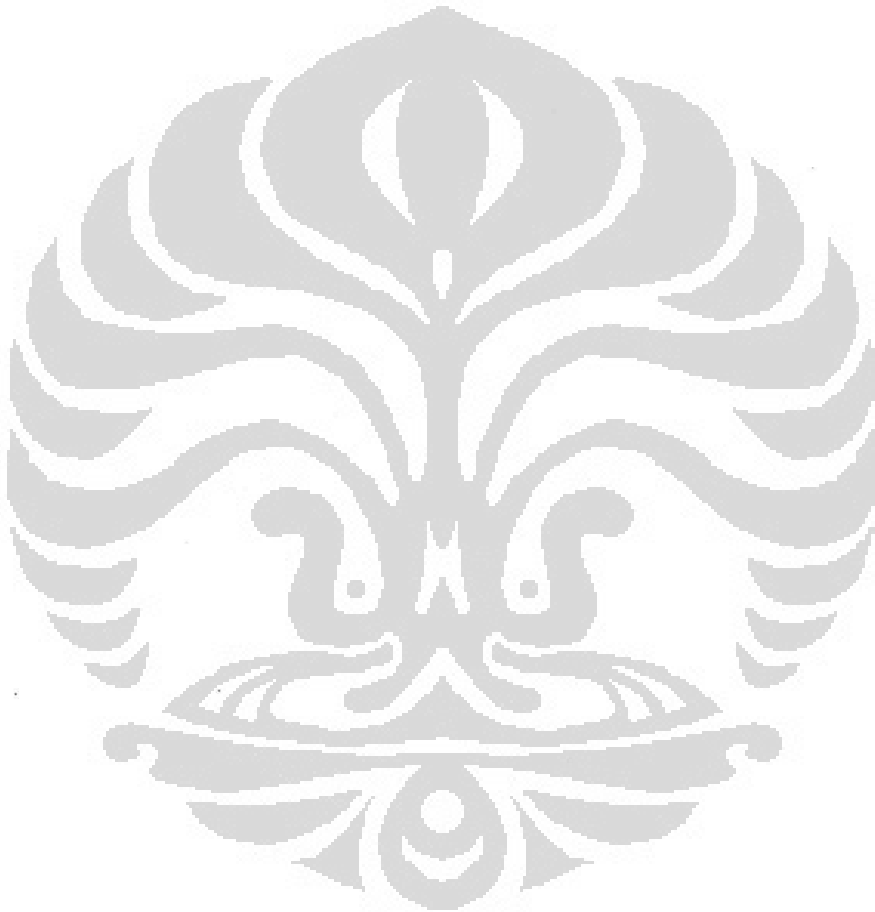
Tak lupa rasa terima kasih saya sampaikan kepada isteri serta ketiga putraku tersayang atas pengertian, kesabaran dan pengorbanan yang telah diberikan selama ini.

Akhirnya pada kesempatan ini saya mohon maaf yang sebesar-besarnya bila ada kesalahan dan kekurangan. Semoga Allah Yang Maha

Pengasih dan Penyayang selalu melimpahkan rahmat dan karunia-Nya kepada kita semua. *Amin ya robbal alamin.*

Jakarta, 1997

Wiwien Heru Wiyono



DAFTAR ISI

Halaman

UCAPAN TERIMA KASIH	i
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
ABSTRAK	x
BAB I : PENDAHULUAN	1
BAB II : TINJAUAN PUSTAKA	4
BAB III : PENELITIAN SENDIRI	16
BAB IV : HASIL PENELITIAN	27
BAB V : PEMBAHASAN	36
BAB VI : RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN	40
DAFTAR PUSTAKA	44
LAMPIRAN	52

DAFTAR GAMBAR

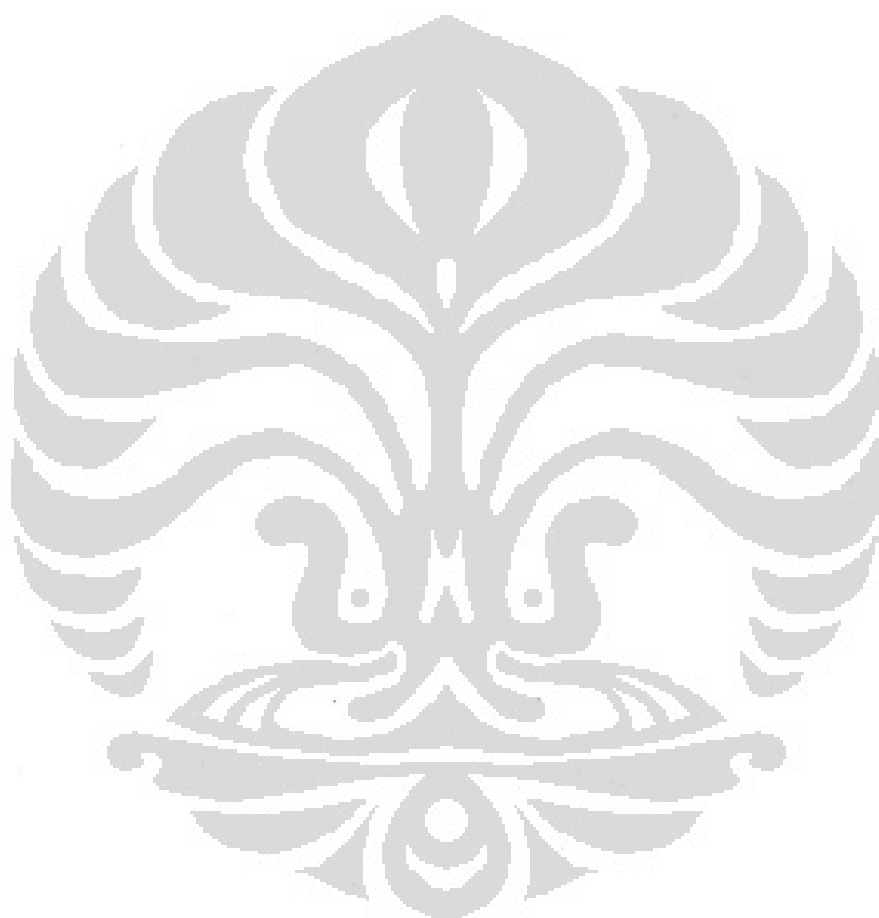
Gambar 1. Patogenesis sarkoidosis	2
Gambar 2. Skema prinsip dasar teknik <i>differential display</i>	10
Gambar 3. Skema cara kerja sekuensing dideoksi cara Sanger	13
Gambar 4. Skema tahapan aplikasi DD mRNA sel BAL	19
Gambar 5. Perhitungan jumlah relatif mRNA β -aktin sebagai <i>internal control</i> menggunakan CCD <i>imaging system</i>	26
Gambar 6. <i>Differential Display</i> mRNA sel BAL	28
Gambar 7. Analisis fragmen 10(#10) menggunakan CCD <i>imaging system</i>	32
Gambar 8. Sekuen nukleotida fragmen 10 dan fragmen 12 yang ekspresinya masing-masing meningkat dan menurun di sel BAL penderita sarkoidosis.....	33
Gambar 9. RT-PCR kuantitatif mRNA dari CD44 (bagian atas) dan TNF α (bagian bawah).....	34

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Daftar primer yang digunakan untuk <i>differential display</i>	22
Tabel 2. Nilai ekspresi relatif PGK, fragmen 10, CD44 dan TNF- α yang diukur menggunakan teknik DD atau RT-PCR.....	30
Tabel 3. Analisis sekuens beberapa fragmen yang didapat dari sel BAL menggunakan teknik <i>differential display</i>	31

LAMPIRAN

1. Prosedur baku pemeriksaan BAL	52
2. Tabel induk	57



Abstrak

Sarkoidosis adalah penyakit granulomatosis sistemik yang belum diketahui penyebabnya. Untuk lebih memperjelas patogenesis penyakit ini, dicari gen-gen baik yang telah dikenal maupun yang belum dikenal tetapi terekspresi secara spesifik pada penyakit sarkoidosis. Sel-sel yang didapat melalui kurasan bronkoalveolar (BAL) 18 penderita sarkoidosis dan 8 penderita penyakit paru selain sarkoidosis dianalisis menggunakan cara *differential display*. Diekstraksi mRNA dari sel BAL dan di *reverse transcript* (RT) dengan 12 macam *anchored primer* yang secara teoritis akan mencakup seluruh mRNA, kemudian diikuti dengan *polymerase chain reaction* (PCR) menggunakan *anchored primer* dan *arbitrary primer* dengan besar 10 mer. Produk PCR kemudian ditampakkan pada agar poliakrilamida. Beberapa fragmen yang menunjukkan perubahan intensitas yang karakteristik pada sarkoidosis atau penyakit paru lain diekstraksi, dilakukan *sequencing* dan dibandingkan dengan data dasar DNA pada perangkat lunak *Genbank* atau European Molecular Biology Library (EMBL).

Terdeteksi satu fragmen yang intensitasnya menunjukkan peningkatan serta satu fragmen dengan penurunan intensitas secara spesifik pada penderita sarkoidosis. Kedua fragmen ini adalah bagian dari gen yang belum dikenal. Ditemukan pula *sequences* cDNA dari

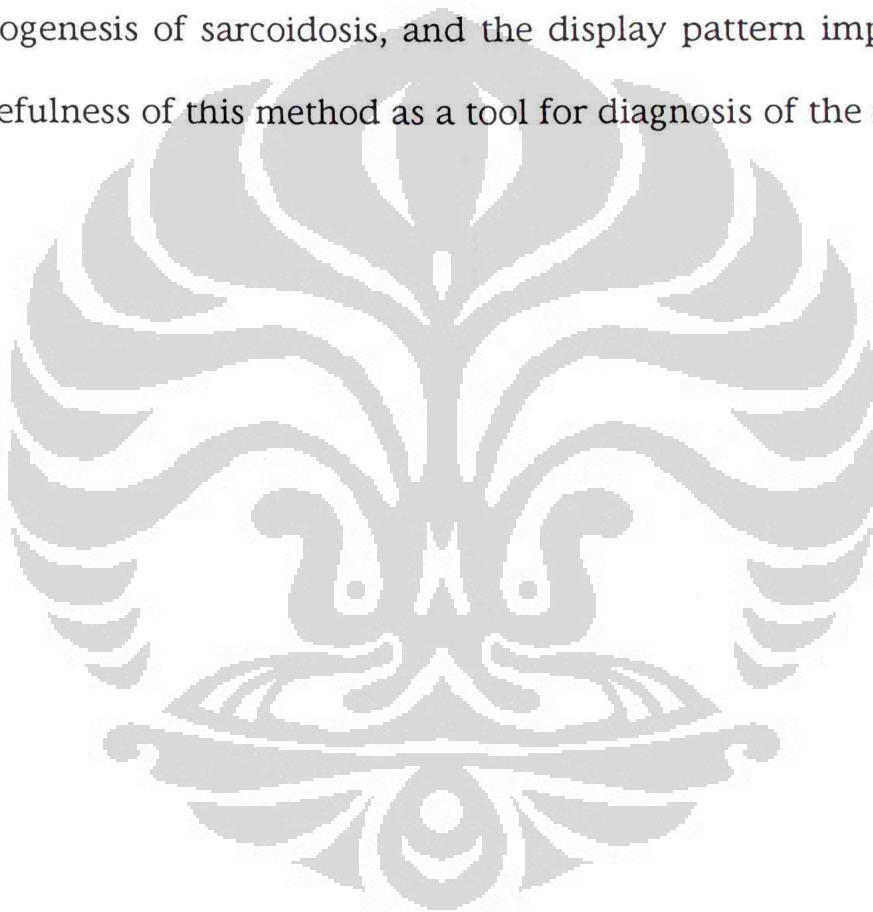
CD44 dan *tumor necrosis factor* (TNF- α) sebagai fragmen yang hampir sering ditemukan pada sarkoidosis.

Fragmen yang intensitasnya secara spesifik meningkat dan menurun pada sarkoidosis ini mungkin dapat memberikan informasi penting pada patogenesis sarkoidosis. Cara ini juga dapat dipertimbangkan sebagai alat diagnosis yang cukup berguna bila dilihat dari bentuk khas penampakan yang diperoleh.

ABSTRACT

Sarcoidosis is a systemic granulomatous disease of unknown origin. To clarify its pathogenesis, we searched for known or unknown genes which are specifically expressed in sarcoidosis. Bronchoalveolar lavage (BAL) cells from 18 patients with sarcoidosis and 8 patients with various lung diseases were analyzed by differential display method. mRNA was extracted from BAL cells and reverse transcribed with 12 kinds of anchored primer, which theoretically cover all mRNAs, followed by polimerase chain reaction (PCR) with the anchored primer and a 10-mer arbitrary primer. PCR products were displayed on a polyacrylamide gel and fragments showing characteristic alterations in intensity between sarcoidosis and other patients were extracted, sequenced, and compared against Genbank and EMBL DNA data bases. One fragment was detected with specifically increased intensity and another

disappeared in patients with sarcoidosis. These fragments were likely derived from unknown genes. CD44 and tumor necrosis factor (TNF- α) cDNA sequences were also detected as fragments commonly expressed in sarcoidosis. The cloned fragments with specifically increased or decreased intensity in sarcoidosis may provide important information on the pathogenesis of sarcoidosis, and the display pattern implies the potential usefulness of this method as a tool for diagnosis of the disease.



BAB I

PENDAHULUAN

SARKOIDOSIS

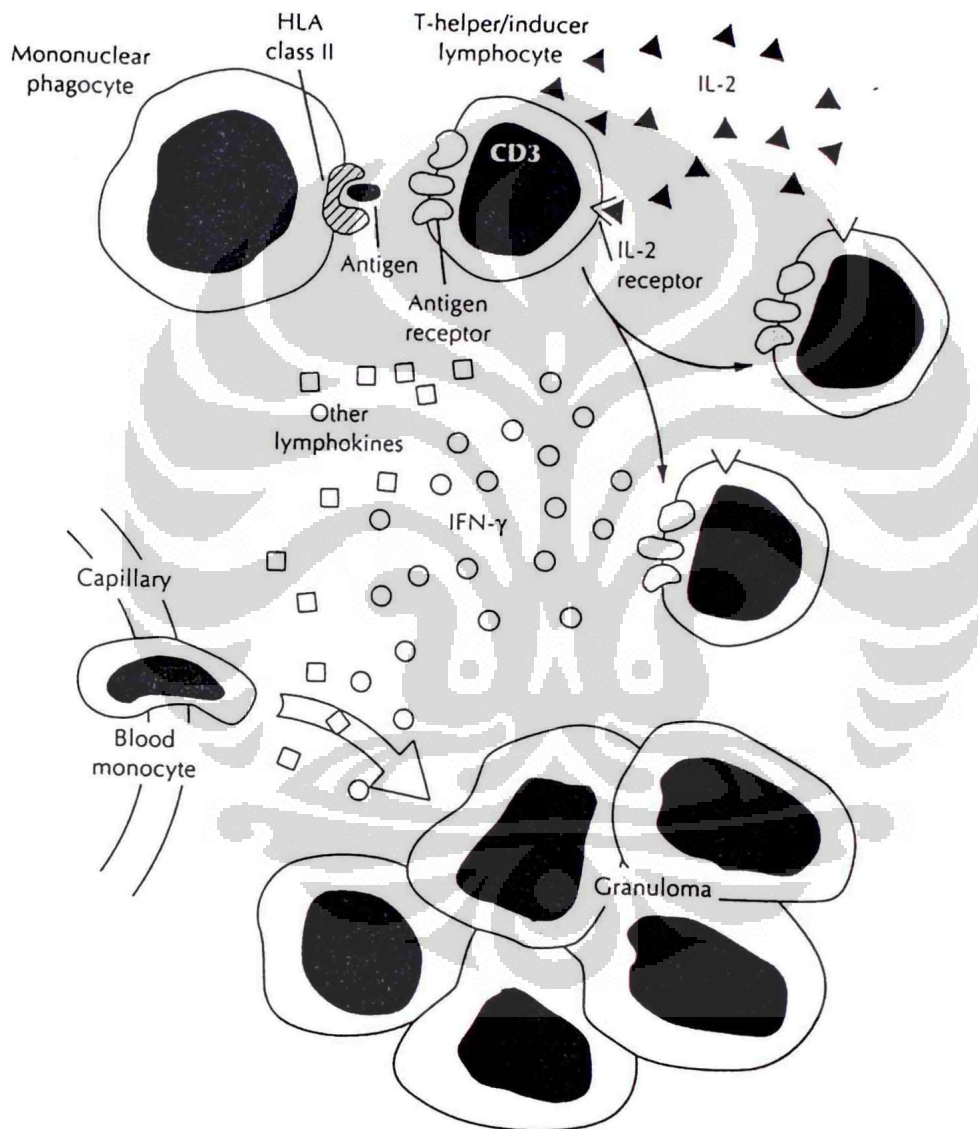
Definisi

Sarkoidosis adalah penyakit multisistem ditandai oleh tuberkel sel epitelioid tanpa perkijuan pada seluruh organ yang terlibat. Organ yang paling sering terlibat adalah organ intratoraks berupa pembesaran kelenjar getah bening hilus dan infiltrasi parenkim paru.¹ Organ lain yang juga sering terlibat adalah mata serta kulit. Penyakit ini dapat menyerang laki-laki maupun perempuan pada semua golongan umur. Prevalensi sarkoidosis bervariasi antara kurang dari 1 sampai 64 kasus per 100.000 populasi tergantung dari negara, wilayah serta ras.^{2,3}

Patogenesis dan etiologi

Paru adalah organ yang hampir selalu terlibat pada kelainan ini dan menjadi penyebab kesakitan dan kematian penyakit ini, walaupun organ lain dapat pula terlibat.^{3,4} Proses patologik yang mendasari adalah akumulasi makrofag dan pembentukan jaringan granuloma akibat hiperfungsi sel limfosit T di tempat timbulnya lesi sarkoid. Belum ditemukan penyebab awal aktivasi limfosit T, diduga akibat stimulasi reseptor antigen pada limfosit T oleh suatu antigen atau autoantigen

yang berikatan dengan *histocompatibility leukocyte antigen* (HLA) kelas II pada fagosit mononuklear (lihat gambar 1). Sel limfosit T teraktivasi memproduksi interleukin-2 yang juga akan merangsang proliferasi limfosit T. Pada gambar 1 dapat dilihat skema patogenesis sarkoidosis.



Gambar 1. Patogenesis sarkoidosis.

Stimulus/antigen mengaktivasi makrofag alveolar mengeluarkan IL-1, dan limfosit T mengeluarkan IL-2 sehingga terbentuk akumulasi limfosit T yang telah teraktivasi di paru. Limfosit T ini akan membentuk granuloma dengan mengeluarkan beberapa sitokin seperti *monocyte chemotactic factor* dan *interferon -γ* yang akan menarik sel monosit darah ke dalam jaringan dan akan berubah menjadi makrofag dan sel epitelioid. Makrofag, sel epitelioid dan limfosit T bersama-sama membentuk granuloma.

Dikutip dari (1)

Di samping itu limfosit T mengeluarkan beberapa limfokin seperti *monocyte chemotactic factor* dan interferon- γ yang akan menyebabkan akumulasi sel monosit darah di daerah lesi serta merangsang diferensiasi monosit menjadi makrofag dan sel epitelioid. Sel limfosit teraktivasi juga mengeluarkan interleukin-4 atau interleukin-6 yang akan merangsang dan mengaktivasi sel limfosit B memproduksi gama globulin serum.¹

Sejak sarkoidosis pertama kali diperkenalkan oleh Jonathan Hutchinson pada tahun 1869 sampai kini upaya mencari penyebab penyakit ini terus dilakukan. Mikobakterium, *Mycobacterium atypical*, *pine pollen* dan beberapa virus sempat dicurigai sebagai penyebab dan menjadi pusat perhatian para peneliti, namun tak satupun memberi hasil yang reproduibel, sehingga diduga sarkoidosis adalah penyakit yang bukan disebabkan oleh satu agen penyebab, tetapi disebabkan oleh lebih dari satu materi patogenik yang mengaktivasi limfosit T.^{1,3}

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

Gambaran klinik sarkoidosis

Sarkoidosis intratoraks

Kelainan intratoraks terdiri dari limfadenopati hilus, pembesaran kelenjar getah bening paratrakeal dan infiltrat di parenkim paru. Gejala yang ditimbulkan biasanya ringan. Kelainan pada foto toraks lebih banyak terdeteksi secara tidak sengaja pada pemeriksaan rutin. Ini sering didapatkan pada orang kulit putih dan orang Asia. Pada orang kulit hitam penyakit umumnya timbul sesuai dengan gejala yang ditimbulkan seperti batuk dan sesak napas. Sesak timbul pada penyakit yang kronik dan telah terjadi fibrosis.^{1,3}

Gambaran radiologis

Berdasarkan gambaran radiologis derajat sarkoidosis dibagi atas:

- Derajat 0 = foto toraks normal
- Derajat 1 = limfadenopati hilus
- Derajat 2 = limfadenopati hilus dan infiltrat paru
- Derajat 3 = infiltrat paru dan atau fibrosis tanpa limfadenopati hilus

Sebagian besar penderita sarkoidosis menunjukkan limfadenopati hilus bilateral sekalipun pada awalnya unilateral.¹

Sarkoidosis ekstra toraks

Sarkoidosis kulit

Ada dua jenis yaitu akut dan kronik, bentuk yang akut biasanya berupa eritema nodosum. Didapatkan bilateral pada permukaan anterior ekstremitas inferior. Pada yang kronik lesi lebih bervariasi, seperti *plaque, maculopapular rashes, lupus pernio dan sarcoid scar*.^{5,6}

Sarkoidosis mata

Uveitis disertai penglihatan kabur bilateral adalah kelainan pada mata yang sering dijumpai pada sarkoidosis. Selain itu dapat pula ditemukan konjungtivitis nonspesifik dan nodul konjungtiva.⁷

Sarkoidosis jantung

Kelainan jantung dijumpai pada sekitar 5 % penderita sarkoidosis. Kelainan yang paling sering didapatkan adalah gangguan hantaran atau aritmia yang dapat dihubungkan dengan kematian mendadak.⁸

Pemeriksaan Laboratorium

Tidak ada kelainan yang khas pada pemeriksaan darah. Pada fase aktif cenderung terjadi limfositopenia. Laju endap darah sering meningkat. Lebih dari 30 % penderita sarkoidosis menunjukkan peningkatan kadar gama globulin, tetapi peningkatan ini bukan disebabkan oleh peningkatan salah satu subkelas imunoglobulin. Peningkatan ini tidak berhubungan dengan prognosis penyakit. *Serum angiotensin converting enzyme (SACE)* diproduksi oleh sel-sel makrofag yang teraktivasi serta granuloma sel epitelioid. Kadar SACE meningkat pada 60 % sampai 70 % penderita sarkoidosis aktif. Tingginya kadar enzim ini dapat digunakan sebagai indikator aktivitas penyakit walaupun belum dapat menjadi indikator prognosis penyakit.^{1,6}

Kurasan bronkoalveolar (Bronchoalveolar lavage = BAL)

Pada penderita sarkoidosis paru yang aktif, cairan bronkoalveolar menunjukkan peningkatan jumlah sel limfosit T dan rasio CD4/CD8. Walaupun tidak khas nilai ini juga dapat digunakan sebagai indikator aktifitas penyakit.¹⁻⁴

Uji fungsi paru

Jarang ditemukan kelainan fungsi paru pada sarkoidosis stadium 1 dan 2. Pada stadium 3 dimana proses fibrosis telah terjadi timbul

kelainan restriksi atau obstruksi.¹

Uji Kveim

Uji Kveim adalah suatu uji dengan memasukkan larutan jaringan limpa penderita sarkoidosis yang telah dimurnikan secara intrakutan kepada seseorang yang dicurigai menderita sarkoidosis. Dikatakan uji positif bila setelah 3-5 minggu pada kulit bekas tempat suntikan timbul papula yang berisi granuloma sel epiteloid. Uji Kveim saat ini sudah tidak rutin dikerjakan lagi dikarenakan sulitnya memperoleh reagen yang sangat murni.^{1,5}

Diagnosis

Untuk mendapatkan diagnosis definitif sarkoidosis pemeriksaan biopsi harus dilakukan. Khususnya untuk derajat 0 dan derajat 3. Pembesaran kelenjar getah bening hilus bilateral pada derajat 1 dan 2 mudah di kenal secara radiologis. Akurasi diagnosis pada stadium ini meningkat pada penderita asimtomatik dan tidak ada riwayat terpajan oleh sesuatu yang menyebabkan penyakit pneumokoniosis. Pemeriksaan biopsi paru lewat bronkus sering dilakukan karena relatif noninvasif walaupun angka kepositifannya hanya 50 %. Biopsi menggunakan mediastinoskopi memiliki akurasi mendekati 100 %.¹

Pengobatan

Kortikosteroid adalah obat yang efektif untuk penyakit sarkoidosis. Tetapi kortikosteroid tidak diberikan pada penderita sarkoidosis tanpa gejala. Beberapa gejala / keadaan yang perlu diberikan steroid adalah bila secara radiologis tampak perburukan, hiperkalsemia dan hiperkalsiuria, didapatkan uveitis, ada gejala akibat infiltrasi ke meningeum dan aritmia jantung.^{1,7,8} Diberikan dosis awal 20-40 mg prednison setiap hari selama 4 sampai 8 minggu. Bila efektif dosis dapat diturunkan secara bertahap sampai 6 bulan dan dipertahankan 5 - 10 mg setiap hari. Pengobatan dihentikan bila gejala menghilang dan diulang bila kambuh kembali. Untuk mengurangi efek samping obat pemberian prednison dapat diberikan selang sehari. Bila kortikosteroid tidak efektif, penghentiannya juga dilakukan secara bertahap.¹

Prognosis

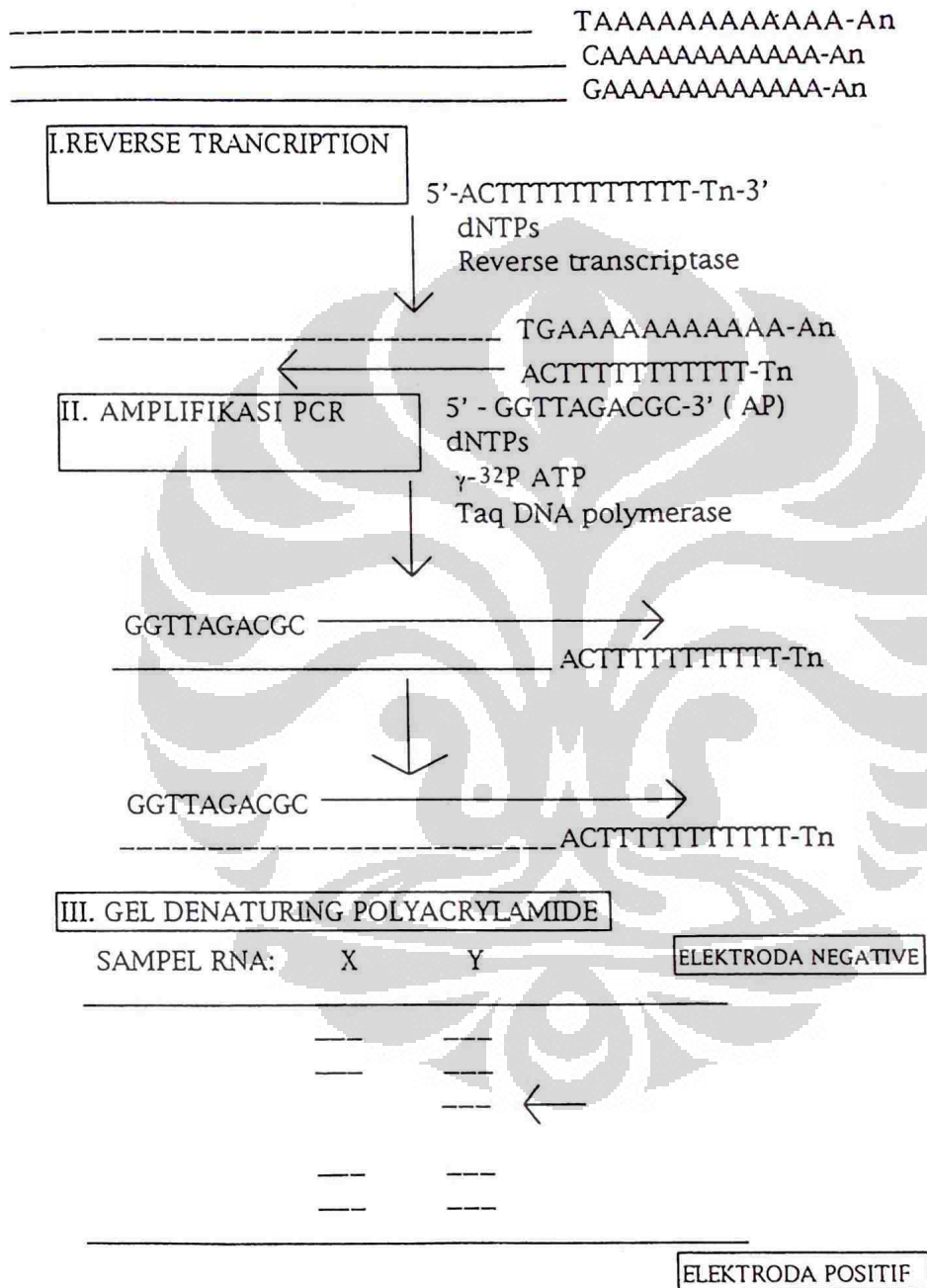
Penderita muda asimtomatik dengan pembesaran kelenjar getah bening hilus bilateral dan umur dibawah 30 tahun mempunyai prognosis baik, karena gambaran radiologis dapat menghilang spontan dalam jangka waktu 2 tahun.¹ Prognosis lebih buruk bila didapatkan

sarkoidosis ekstratoraks, umur penderita lebih tua terutama wanita.^{1,6}

TEKNIK *DIFFERENTIAL DISPLAY*

Setiap organisme memiliki sekitar 100.000 gen, tetapi hanya kurang lebih 15% atau sekitar 15.000 terekspresi dalam tiap sel. Perubahan-perubahan yang terjadi pada gen menentukan seluruh fenomena kehidupan termasuk kehidupan normal, diferensiasi, proses menua serta perubahan patologik. Liang dan Pardee mengembangkan teknik yang dapat mengidentifikasi secara langsung perbedaan ekspresi gen di antara 15.000 mRNA yang ada pada setiap individu. Pada penelitiannya diidentifikasi beberapa gen yang hanya terekspresi pada sel normal tetapi tidak pada sel tumor. Teknik ini disebut sebagai teknik *differential display* (DD).⁹ Pada prinsipnya teknik ini terdiri dari beberapa tahap (lihat gambar 2). Tahap pertama adalah mengubah mRNA menjadi cDNA menggunakan teknik *reverse transcription* (RT). Dengan menggunakan *anchored primer* seperti T₁₁CA (TTTTTTTTTTTCA= 11 basa timin, basa sitosin dan basa adenin), maka akan diperoleh cDNA yang mengandung timin, guanin dan poly (polypeptide) A (TGAAAAAAAAAAAA). Artinya primer T₁₁CA akan terkait pada ujung mRNA yang mengandung TG pada lokasi poly A berada (poly A adalah bagian akhir/ ujung mRNA pada hampir seluruh

mRNA sel eukariotik).



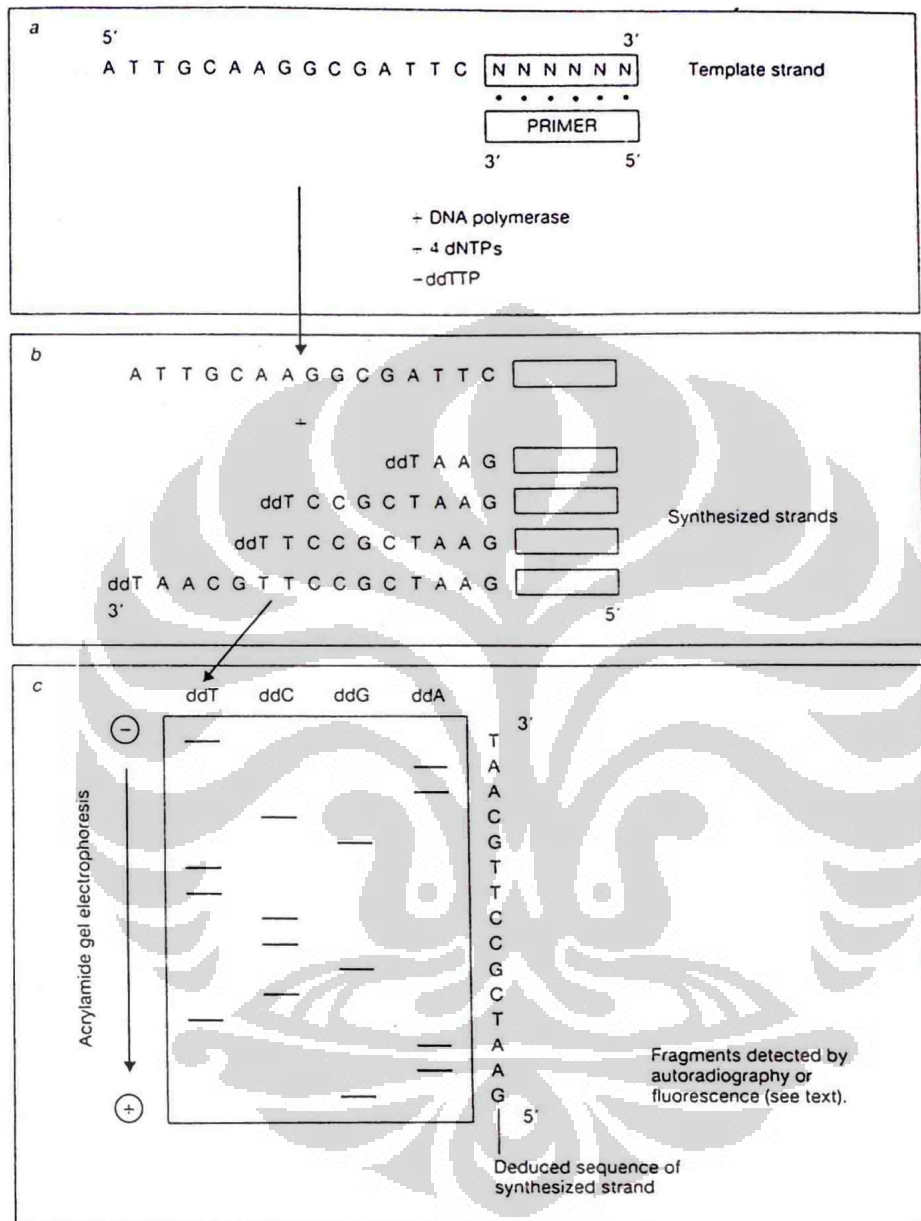
Gambar 2. Skema prinsip dasar teknik *differential display*.

Dikutip dari (10).

Tahap kedua adalah tahap amplifikasi cDNA menggunakan *arbitrary primer*. *Arbitrary primer* berbeda dengan primer yang biasa digunakan pada amplifikasi biasa dalam hal jumlah basanya. Pasangan primer dengan jumlah basa sekitar 20 - 30 buah, pada amplifikasi biasa akan dihasilkan 1 buah pita yang spesifik, sedangkan dari pasangan *anchored primer* dengan *arbitrary primer* yang jumlah basanya 10 buah akan dihasilkan sekitar 50-100 buah pita dengan ukuran 100 - 500 bp (base pair) pada agar *DNA sequencing* setelah dipajankan pada film X- ray. Hal ini sesuai dengan tujuan penelitian yaitu mendapatkan gen sebanyak mungkin tetapi masih dapat dibedakan diantara kemajemukannya bila dibandingkan dengan populasi sel yang memiliki karakteristik berbeda. Inilah yang dimaksud dengan *differential display*. Semakin banyak variasi *anchored* dan *arbitrary primer* yang digunakan, maka semakin banyak pita/ gen yang dapat didisplay dan berarti semakin banyak kemungkinan pita/ gen spesifik diperoleh. Setelah diperoleh pita mRNA yang ekspresinya meningkat atau melemah secara bermakna, maka tahap berikutnya adalah mengidentifikasi susunan basa/ nukleotida mRNA tersebut dengan teknik yang disebut *sequencing*. *Sequencing* adalah teknik untuk membaca rangkaian urutan nukleotida suatu DNA dengan tepat. Analisis sekuen DNA dapat digunakan untuk mencari data homologi sekuen DNA

atau protein yang akan dipelajari fungsi, struktur gen serta produknya. Selain itu digunakan pula untuk mengidentifikasi daerah- daerah yang mengkode protein, mengidentifikasi mutasi pada sekuen DNA yang menimbulkan penyakit dan untuk mendisain suatu primer untuk PCR. Saat ini teknik sekuensing Sanger atau *dideoxy chain termination sequencing* paling sering digunakan.¹¹ Prinsip dasar metode ini adalah digunakannya 2', 3'- dideoksiribonukleosida- 5' trifosfat (ddNTP) sebagai inhibitor terhadap 2'- deoksiribonukleosida- 5' trifosfat (dNTP). Bila ddNTP digunakan pada reaksi sintesis DNA maka beberapa nukleotida tidak dapat membentuk ikatan fosfodiester yang dibutuhkan untuk pembentukan rantai DNA berikutnya atau dengan kata lain reaksi terputus. Maka untuk melengkapi pembentukan rantai DNA hingga tetap utuh dibutuhkan sejumlah kecil ddNTP yang spesifik serta keempat dNTP. Pada gambar 3 dapat dilihat skema cara kerja sekuensing dideoksi (dikutip dari 11).

Hasil sebuah sekuen adalah pita- pita nukleotida pada film X- ray yang tersusun berdasarkan posisinya secara konsisten berurutan dari atas ke bawah sesuai dengan urutan sekuen. Saat ini metode sekuensing dideoksi sudah dapat dilakukan secara otomatis menggunakan alat.



Gambar 3. Skema cara kerja sekuensing dideoksi cara Sanger.
 Dikutip dari (11).

Program komputer digunakan untuk menyimpan dan menganalisa data

sekuen DNA sebagai suatu bank (Genbank, EMBL= European Molecular Biology Library). Program tersebut membantu mencari suatu sekuen homologi dan mengidentifikasi fungsi suatu sekuen yang belum diketahui.¹¹

APLIKASI DD

Usaha mengisolasi mRNA yang gambarannya meningkat atau melemah berbeda bermakna diantara 2 populasi sel atau lebih dibutuhkan teknik yang mudah, cepat, sensitif dan reproduibel. DD adalah hasil pengembangan teknik yang telah terbukti mempunyai sifat-sifat tersebut. Dalam bidang onkologi misalnya, menggunakan teknik ini diperoleh satu fragmen mRNA yang ekspresinya sangat lemah pada sel JB6 jenis neoplastik dibandingkan dengan jenis praneoplastik. JB6 adalah varian sel epidermis mencit. Hasil sekuen terungkap bahwa fragmen tersebut ternyata identik dengan inhibitor metalloproteinase-3 jaringan manusia, yaitu salah satu gen yang mempunyai peran pada tumorigenesis dan invasi tumor.¹² Dalam bidang metabolik diteliti pengaruh pemberian glukosa konsentrasi fisiologik (5.5 mM) dibandingkan dengan konsentrasi patologik (20 mM) terhadap ekspresi gen pada sel perisit retina sapi. Setelah glukosa diberikan selama 7 hari, menggunakan tehnik DD didapatkan hasil bahwa protein Caldesmon

pada sel perisit yang diberikan konsentrasi patologik ekspresinya menurun dibandingkan dengan yang memperoleh konsentrasi fisiologik. Protein Caldesmon berfungsi menghambat kerja aktomiosin ATPase di jaringan otot. Penurunan protein Caldesmon akan mengurangi efektifitas penghambatan kerja aktomiosin ATPase sehingga kontraksi vaskular meningkat dan aliran vaskular menurun. Proses ini terbukti terjadi pada retina tikus percobaan hanya 1 minggu setelah mengalami hiperglikemia.¹³ Teknik DD untuk membandingkan ekspresi mRNA diantara 2 populasi sel terbukti mudah, cepat, sensitif dan reproduibel.^{12,13}

Untuk lebih memperjelas patogenesis sarkoidosis perlu penelitian lebih lanjut sehingga didapatkan suatu gen yang mempunyai peran penting pada proses patogenesis penyakit ini. Dalam upaya mendapatkan gen-gen yang ekspresinya menunjukkan gambaran penyakit sarkoidosis, dilakukan *differential display* (DD) yang dikembangkan oleh Liang dan Pardee.⁹ Dari fragmen-fragmen yang didapat ditentukan *DNA sequence* -nya kemudian diidentifikasi jenis gen-nya menurut datadasar DNA/RNA secara komputerisasi.

BAB III

PENELITIAN SENDIRI

Telah banyak dilakukan penelitian untuk mempelajari penyebab serta patogenesis yang mendasari sarkoidosis paru. Beberapa hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat peningkatan ekspresi sitokin seperti *tumor necrosis faktor- α* (TNF- α),¹⁴⁻²² *interleukin 1 β* (IL-1 β),^{17,18,20} *interleukin-6* (IL-6),²⁰⁻²² *platelet-derived growth factor-B* (PDGF-B) dan *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* (GMCSF).²² Disamping sitokin, telah dilaporkan pula peningkatan ekspresi *LeuCAM leucocyte adhesion molecules* di leukosit darah perifer²³ dan *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) di serum dan cairan kurasan bronkoalveolar (BAL) penderita sarkoidosis.²⁴ Walaupun sitokin-sitokin dan *adhesion molecule* tersebut terbukti terlibat pada patogenesis sarkoidosis, namun penyebab sarkoidosis masih tetap belum diketahui.

TUJUAN PENELITIAN

Tujuan Umum :

Untuk lebih memperjelas patogenesis sarkoidosis

Tujuan Khusus :

Mendeteksi gen- gen baik yang sudah dikenal maupun yang belum

dikenal yang ekspresinya meningkat atau melemah secara spesifik pada sel- sel kurasan bronkoalveolar penderita sarkoidosis paru

METODE PENELITIAN

Sifat Penelitian

Penelitian ini bersifat survei

Subyek Penelitian

Sampel yang diteliti adalah sel BAL penderita sarkoidosis paru pada Rumah Sakit Perusahaan Kereta Api Hokkaido di Sapporo, Jepang dan sel BAL penderita penyakit paru selain sarkoidosis pada Rumah Sakit Universitas Hiroshima yang memenuhi kriteria penelitian.

Kriteria Penerimaan

1. Penderita sarkoidosis, pria dan wanita, usia 13- 80 tahun
2. Diagnosis sarkoidosis ditegakkan berdasarkan klinik dan histopatologi
3. Penderita sarkoidosis tidak mendapat terapi kortikosteroid pada waktu pemeriksaan BAL dilakukan
4. Kasus kelola adalah penderita penyakit paru selain sarkoidosis yang diketahui jumlah sel limfosit pada cairan BAL meningkat
5. Diagnosis klinik kasus kelola ditegakkan berdasarkan anamnesis,

pemeriksaan fisik, pemeriksaan darah, radiografi, dan BAL

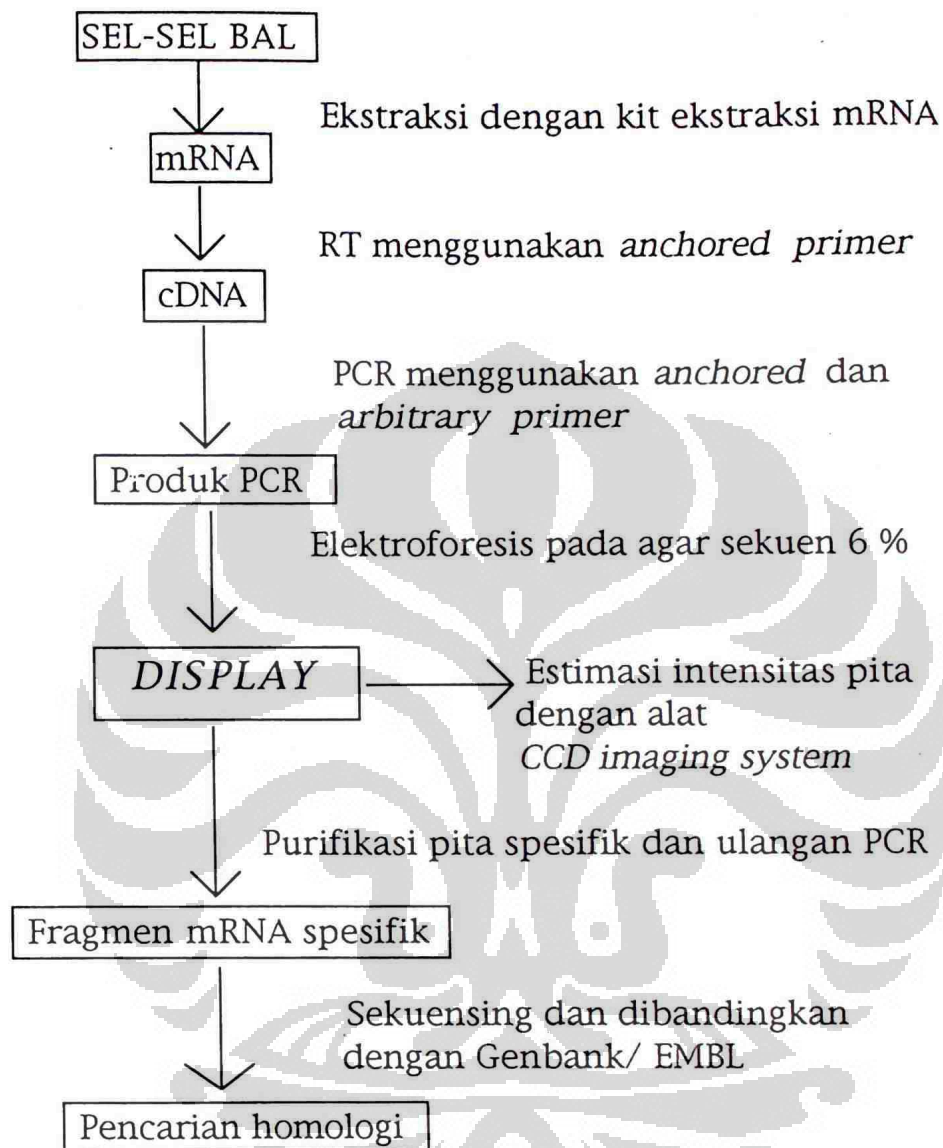
6. Pemeriksaan BAL pada semua penderita untuk tujuan diagnostik sesuai prosedur baku disertai *informed consent*

Kriteria Penolakan

Penderita sarkoidosis yang mendapat terapi kortikosteroid pada waktu pemeriksaan BAL

Jumlah Sampel

Berhubung penderita sarkoidosis dan kasus kelola jumlahnya sedikit maka untuk menentukan jumlah sampel yang diperiksa tidak digunakan rumus statistik. Sel BAL diperoleh dari 18 orang penderita sarkoidosis dan 8 penderita penyakit paru selain sarkoidosis seperti *pneumonitis hipersensitif* (HP), tuberkulosis milier, fibrosis paru idiopatik, pneumokoniosis, pneumonitis lupus dan *bronchiolitis obliterans organizing pneumonitis* (BOOP). Semua penderita sarkoidosis didiagnosis secara histopatologik kecuali kasus nomer17 yang diagnosisnya ditegakkan hanya berdasarkan klinis yaitu manifestasi pada mata. Sepuluh orang di antaranya perokok.



Gambar 4. Skema tahapan aplikasi DD mRNA sel BAL.

Tempat dan Waktu

- Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Bagian Penyakit Dalam II

- Penelitian ini dikerjakan mulai 1 April 1994 sampai 31 Agustus 1995

CARA KERJA

Sel BAL yang diperoleh dihitung jumlah total, hitung jenis serta jenis limfosit (CD3, CD4 dan CD8). Prosedur pemeriksaan BAL, hitung jumlah sel total, hitung jenis dan jenis limfosit terlampir. Sisa sel kemudian dicuci dengan larutan Hank, disentrifugasi dan disimpan pada suhu minus 80° C sebelum digunakan. Gambaran klinik serta profil BAL tiap subyek dapat dilihat pada tabel induk.

Ekstraksi RNA dan *Reverse transcribe* (RT)

Poly(A)+RNA diekstraksi langsung dari $1-2 \times 10^6$ sel BAL menggunakan larutan guanidium tiosianat dan *oligo (dT)-cellulose spun column* (Quick Prep mRNA Purification Kit™, Pharmacia Biotech, USA). RNA direvers transkrip menjadi cDNA dalam campuran larutan yang terdiri dari 20 pmol *anchored dT primer* (T₁₅AA, T₁₅AG, T₁₅CG, T₁₅GC, T₁₅GT, T₁₅GA, T₁₅AC, T₁₅GG, T₁₅AT, T₁₅CT, T₁₅CC atau T₁₅CA, dibuat oleh Toyobo, Osaka, Jepang), 20 mM masing-masing deoksinukleotida (Takara, Kyoto, Jepang), 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 20 unit *RNase inhibitor* (RNasin™, Promega,

Madison, MI), dan 200 unit *Molony murine leukemia virus RNase H-reverse transcriptase* (Superscript™, GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD).

Campuran larutan RT diinkubasi pada suhu 42 °C selama 60 menit, kemudian pada suhu 95 °C selama 5 menit untuk menginaktifkan kerja enzim reverse transkriptase.

Amplifikasi PCR dan *differential display*

Dilakukan cara *differential display* seperti telah dilakukan sebelumnya^{9,10} dengan beberapa modifikasi. Digunakan 19 set primer seperti tertera pada tabel 1. Fragmen fosfoglisarat kinase (PGK)²⁵ sebesar 330 base pair (bp) merupakan amplifikasi dari set primer 1 berfungsi sebagai *internal control*. Satu mikroliter cDNA dilakukan PCR dalam 20 µl larutan campuran yang mengandung 8 pmol *anchored primer* yang telah dilabel dengan 74 Kbpq γ -³²P ATP, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 2mM tiap deoksinukleotida, 50 pmol *arbitrary primer* dan 1 unit Taq DNA polymerase (Wako, Osaka, Japan). PCR dilakukan menggunakan alat Program Temp Control System (PC-700™, ASTEC, Fukuoka, Japan) sebanyak 40 siklus dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi pada suhu 95 °C selama 60 detik, *annealing* pada suhu 40 °C kecuali primer set 4, 6, dan 8 (35 °C) selama 90 detik, dan *extension* pada suhu 72 °C selama 60 detik. Tiap produk PCR

ditanam pada agar poliakrilamida 6% kemudian dielektroforesis pada 500 Volt selama 16 jam, dikeringkan, kemudian dipajankan pada film X-ray Fuji pada suhu minus 80 °C selama 16 jam. Prosedur ini diulang dua kali untuk konfirmasi reproduksibilitas patron dari display.

Tabel 1. Daftar primer yang digunakan untuk *differential display*

Set Primer	Anchored Primer	Arbitrary Primer
1	T ₁₅ CA	5'—GGAACCCTTA—3'
2	T ₁₅ CA	5'—GGTTAGACGC—3'
3	T ₁₅ AG	5'—TCAGGTGACC—3'
4	T ₁₅ AG	5'—ACCAAGGGGT—3'
5	T ₁₅ AA	5'—GAATGATGAG—3'
6	T ₁₅ AA	5'—ACCGGGGTAT—3'
7	T ₁₅ CA	5'—GGTTCCATGC—3'
8	T ₁₅ AG	5'—GAATGATGAG—3'
9	T ₁₅ AA	5'—GGAACCCTTA—3'
10	T ₁₅ AG	5'—GGAACCCTTA—3'
11	T ₁₅ CG	5'—GGAACCCTTA—3'
12	T ₁₅ GC	5'—GGAACCCTTA—3'
13	T ₁₅ GT	5'—GGAACCCTTA—3'
14	T ₁₅ GA	5'—GGAACCCTTA—3'
15	T ₁₅ AC	5'—GGAACCCTTA—3'
16	T ₁₅ GG	5'—GGAACCCTTA—3'
17	T ₁₅ AT	5'—GGAACCCTTA—3'
18	T ₁₅ CT	5'—GGAACCCTTA—3'
19	T ₁₅ CC	5'—GGAACCCTTA—3'

Intensitas pita yang tampak pada display diukur dengan alat charge-coupled device (CCD) *imaging system* (Densitograph™ AE-6900 MF, ATTO, Tokyo, Japan) dan diekspresikan sebagai persentase dari area puncak pita yang diinginkan dibagi dengan seluruh area pita yang terdeteksi untuk memperkirakan jumlah total mRNA. Fragmen-fragmen yang intensitasnya khas dan reproduibel pada penderita sarkoidosis kemudian diisolasi dari agar keringnya dan direndam dalam 100 µl air suling.

Sequencing

Satu mikroliter larutan DNA dari fragmen yang telah diisolasi tersebut dilakukan PCR menggunakan set primer yang sama digunakan di DD dalam 50 µl campuran larutan terdiri dari 20 mM dNTP, 4 pmol *arbitrary primer*, 20 pmol *anchored primer*, 1 unit Taq DNA Polimerase. PCR dilakukan dengan kondisi yang sama seperti di DD. Produk PCR ini kemudian disaring menggunakan Ultrafree-C3TK Millipore Column™ dengan sentrifugasi dan dilakukan *sequencing* menggunakan dsDNA cycle Sequencing System Kit™ (GIBCO BRL) dengan masing-masing primer yang digunakan pada PCR. Untuk konfirmasi reproduibilitas, lebih dari 2 DNA sampel hasil ekstraksi dari tiap pita yang ukuran besarnya sama dilakukan *sequencing* secara terpisah. Novelitas

sequence ditentukan dengan komputer dan dibandingkan dengan *Genbank* dan data dasar European Molecular Biology Library (EMBL).

Kuantifikasi mRNA dari gen-gen spesifik

Setelah gen-gen yang telah dikenal didapatkan sebagai pita-pita yang intensitasnya karakteristik di DD pada penderita sarkoidosis, tingkat ekspresinya dikonfirmasi menggunakan RT-PCR kuantitatif dengan primer spesifik sesuai cDNANYA. Karena fragmen CD44 dan TNF- α yang didapatkan ternyata memberikan gambaran yang umum pada sarkoidosis, primer spesifik untuk CD44 dan β -actin (sebagai *internal control*) didisain sesuai dengan publikasi terdahulu^{26,27} dan primer spesifik untuk TNF- α dipesan dari Perkin Elmer Cetus (Norwalk, CT) untuk RT-PCR sebagai berikut:

CD44 (162 bp)

F: 5'-CCATACCACTCATGGATCTG-3'

R: 5'-GCAATGCAAACTGCAAGAATC-3'

TNF- α (301 bp)

F: 5'-CAGAGGGAAGAGTTCCCCAG-3'

R: 5'-CCTTGGTCTGGTAGGAGACG-3'

β -aktin (218 bp)

F: 5'-AAGAGAGGCATCCTCACCCCT-3'

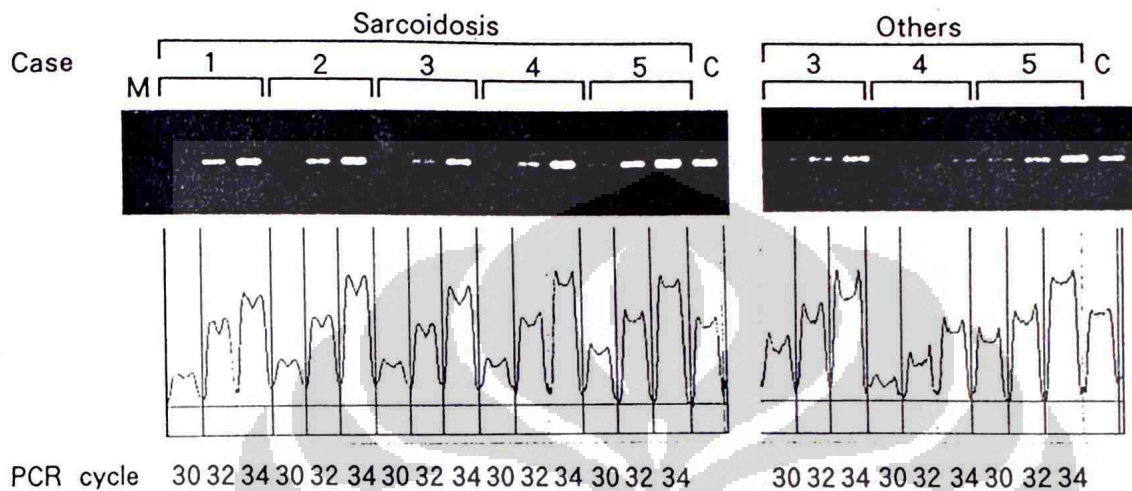
R: 5'-TACATGGCTGGGGTGTGAA-3'

Satu mikroliter larutan cDNA yang telah direverse transkrip dengan *anchored primer* T15AA diamplifikasi dalam campuran larutan berisi 25 pmol tiap primer, 200 mM tiap deoksinukleotida, 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl(pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂ dan 1 unit Taq DNA Polimerase(Wako, Osaka, Japan). PCR dilakukan dengan kondisi sebagai berikut: denaturasi pada suhu 95°C selama 60 detik, *annealing* pada suhu 58°C (CD44), 60°C (TNF- α), atau 63°C (β -aktin) selama 60 detik, dan *extension* pada suhu 74°C selama 60 detik (CD44 dan β -aktin) atau selama 90 detik (TNF- α). Siklus untuk amplifikasi adalah 30-34 untuk β -aktin (gambar5) dan 40 untuk CD44 dan TNF- α . Produk PCR (8 μ l) dielektroforesis pada agar agarosa 2 % dan dipulas dengan etidium bromida. Intensitas etidium bromida tiap produk PCR diukur dengan CCD imaging system seperti terlihat pada gambar 5.

Analisis statistik

Analisis statistik dilakukan menggunakan perangkat lunak Stat View-JII pada komputer Macintosh. Uji nonparametrik Mann Whitney digunakan untuk membandingkan nilai kuantitatif antara penderita sarkoidosis dengan penyakit paru lain. Nilai probabilitas kurang dari

0.05 secara statistik dianggap mempunyai nilai signifikan.

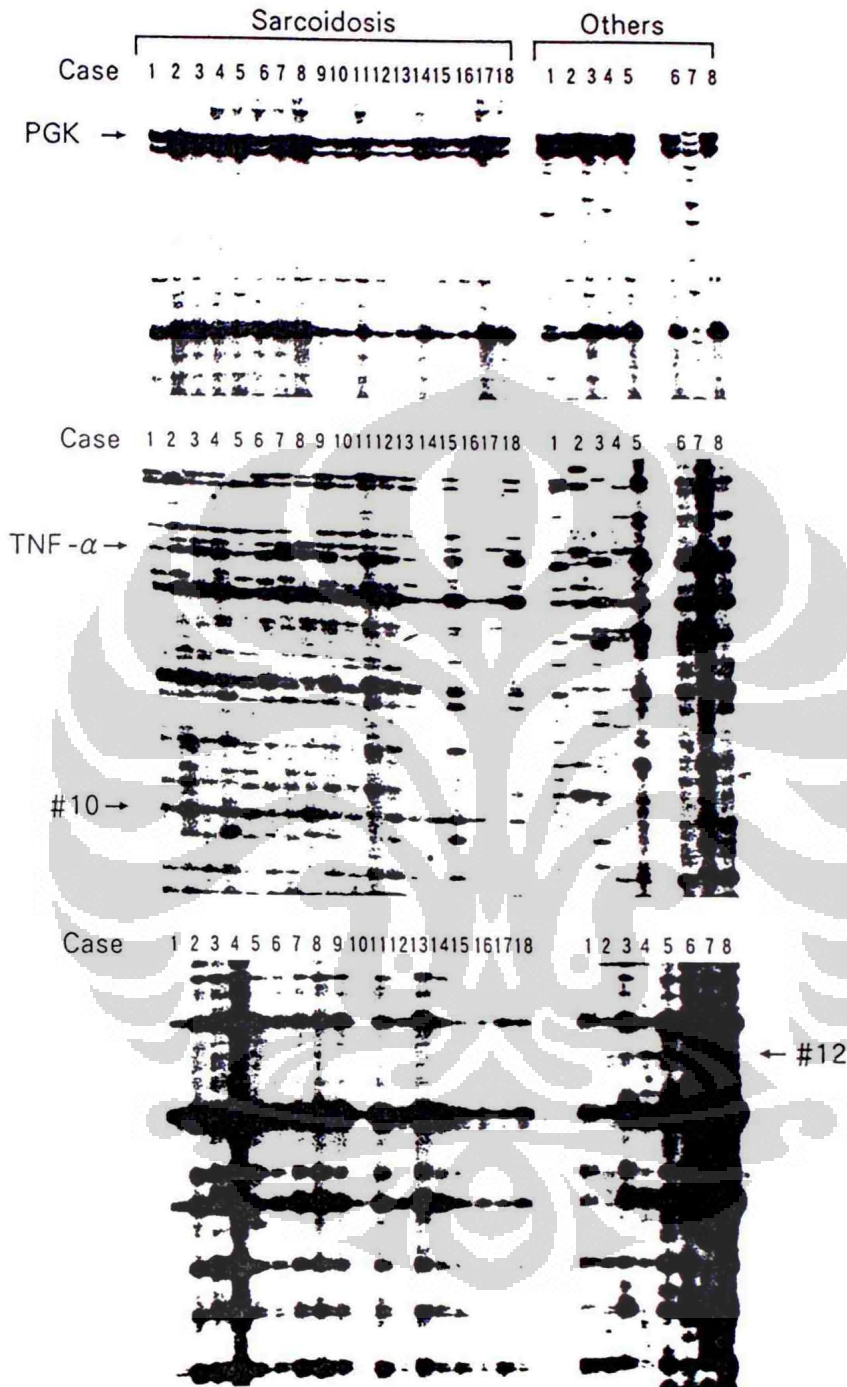


Gambar 5. Perhitungan jumlah relatif mRNA β -aktin sebagai *internal control* menggunakan CCD *imaging system*. Memakai primer spesifik untuk cDNA β -aktin, tiap cDNA sampel dilakukan PCR berturut-turut 30, 32 dan 34 siklus. Produk PCR kemudian dielektroforesis pada agar agarosa 2% dan dipulas dengan etidium bromida (panel sebelah atas). Intensitas pita diukur dengan CCD *imaging system* (panel sebelah bawah). Ditetapan bahwa proses amplifikasi berlangsung pada fase eksponensial dari amplifikasi antara 30 sampai 34 siklus di semua sampel. M=panjang penanda(100 bp DNA *ladder*); C=produk PCR β -aktin kelola untuk menyesuaikan variasi intensitas tiap agar.

BAB IV

HASIL PENELITIAN

Telah dianalisis tingkat ekspresi bermacam gen di sel BAL penderita sarkoidosis dibandingkan dengan penyakit paru lain menggunakan 19 set primer untuk DD. Dari tiap satu set primer untuk DD dapat divisualisasikan kurang lebih 100 - 150 pita berukuran antara 100 sampai 350 bp. Menggunakan set primer 1, fragmen mRNA dari PGK sebagai *internal control* terdeteksi hampir di seluruh sampel dengan intensitas yang relatif sama kecuali 1 kasus dengan intensitas lemah (kasus kelola nomer 7, bagian atas gambar 6). Hasil ini dikonfirmasi dengan menghitung intensitas relatif pita, yaitu rasio antara area puncak pita PGK dengan area total seluruh pita yang terdeteksi. Tidak didapatkannya perbedaan statistik nilai ini antara penderita sarkoidosis dengan penyakit lain menandakan bahwa cara ini dapat digunakan untuk membandingkan tingkat ekspresi mRNA berbagai sampel (tabel 2). Walaupun mRNA di sel BAL menunjukkan patron yang secara umum sama pada hampir seluruh subyek yang diperiksa seperti juga didapatkan pada hasil penelitian terdahulu menggunakan bahan lain,^{9,12,28} ditemukan 2 fragmen yang perubahan intensitasnya spesifik dan reproduibel pada penderita sarkoidosis



Gambar 6. *Differential display* mRNA sel BAL. Menggunakan set primer 1 fragmen PGK terdeteksi sebagai *internal control* (bagian atas). Pita ini terlihat pada seluruh sampel dengan sedikit perbedaan intensitas kecuali pada kasus nomor 7 pada "others" yang intensitasnya lemah. TNF- α dan fragmen 10 (# 10) diklon memakai set primer 6 (bagian tengah), sebagai fragmen yang ekspresinya sangat kuat pada penderita sarkoidosis. Fragmen 12 (#12) diklon memakai set primer 8 (bagian bawah) sebagai gen bakul yang ekspresinya sangat lemah pada penderita sarkoidosis.

dibandingkan dengan penyakit lain(#10 pada bagian tengah gambar 6 , dan #12 pada bagian bawah gambar 6). Fragmen 10 (#10) terdeteksi di seluruh penderita sarkoidosis yang diagnosisnya ditegakkan secara histologik, sementara tidak terdeteksi di 3 dari 8 sampel kelola dan juga di kasus sarkoidosis nomer 17 yang diagnosis histologiknya tidak didapatkan. Nilai rasio antara area puncak #10 dengan area total seluruh pita yang terdeteksi pada sarkoidosis secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan kelola ($p < 0.01$, gambar 7, tabel 2). Fragmen 12 (# 12) terdeteksi pada lebih separuh sampel kelola, sementara tidak satupun pita ini terdeteksi pada sarkoidosis. Baik fragmen # 10 maupun # 12 tidak mempunyai homologi yang signifikan terhadap gen-gen manusia yang telah tercatat di *Genbank* atau data dasar EMBL (gambar 8). Di samping kedua fragmen ini diisolasi beberapa fragmen lain yang ekspresinya hampir selalu ditemukan pada penderita sarkoidosis (tabel 3). Hampir seluruh fragmen ini tidak memiliki homologi yang signifikan terhadap satupun *sequence* mRNA atau DNA manusia. Kecuali 2 fragmen disamping PGK, terbukti identik dengan *sequence* mRNA yang telah dikenal yaitu TNF- α ²⁹ dan glikoprotein sel permukaan CD44. ^{25,30}

Tabel 2. Nilai ekspresi relatif PGK, fragmen 10, CD44 dan TNF- α yang diukur menggunakan teknik DD atau RT-PCR

Kasus*	DD**		RT-PCR †	
	PGK	#10	CD44	TNF- α
S1	7.04	7.10	1.03	1.24
S2	6.56	8.31	0.78	0.66
S3	6.89	5.19	0.57	0.28
S4	6.84	6.76	0.81	0.64
S5	7.51	9.27	0.51	0.26
S6	7.43	3.69	0.89	1.10
S7	7.93	4.82	1.10	1.10
S8	7.11	9.61	0.80	0.76
S9	9.19	3.82	0.64	1.06
S10	9.41	4.29	1.58	0.48
S11	7.45	1.91	0.94	1.30
S12	8.74	6.21	0.90	1.45
S13	9.63	5.32	0.93	1.60
S14	7.67	29.2	0.97	1.04
S15	10.62	7.0	0.98	0.86
S16	8.56	15.8	0.85	0.90
S17	7.03	0	1.72	1.30
S18	6.77	4.35	0.95	0.78
C1	9.17	0	1.45	1.10
C2	11.59	0	1.77	0.10
C3	7.45	0.85	0.56	0.28
C4	9.44	0	0.80	0.02
C5	6.73	1.73	0.82	0.20
C6	7.53	2.88	0.54	0.80
C7	4.39	3.82	5.20	0.80
C8	7.76	6.33	0.38	0.80

* S1-18= penderita sarkoidosis; C1-8= penderita penyakit paru bukan sarkoidosis

** Intensitas relatif PGK dan fragmen10 pada analisis DD dihitung sebagai (area puncak pita yang diinginkan)/(area total seluruh pita yang terdeteksi)

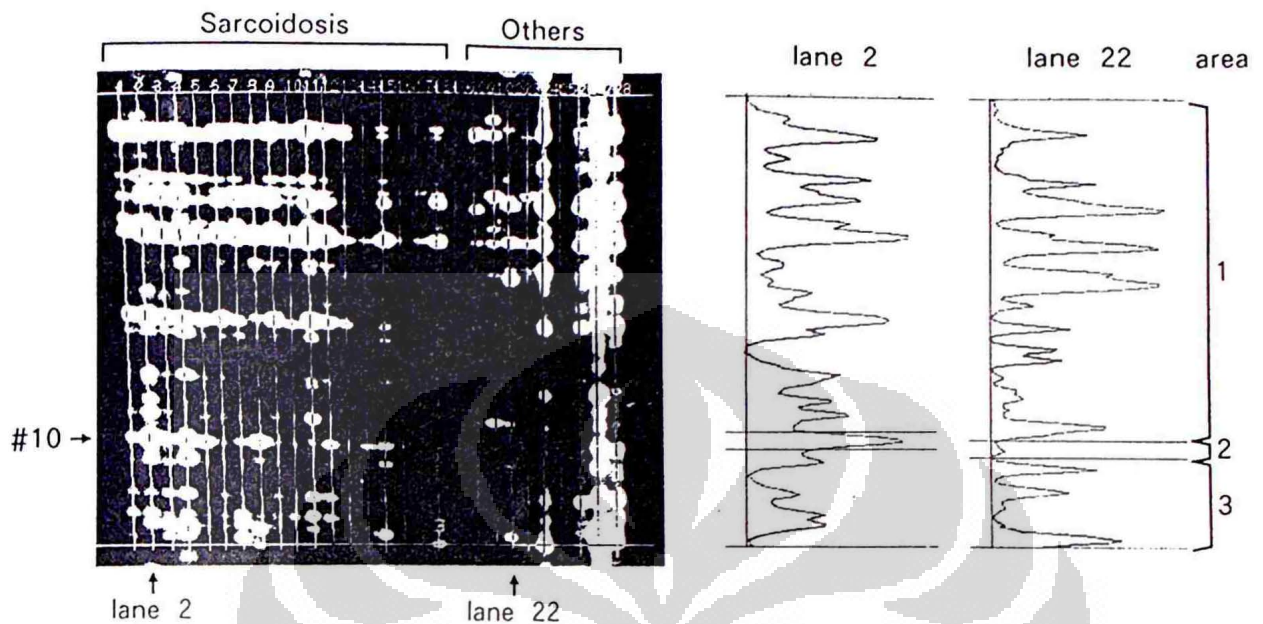
† Intensitas relatif pita CD44 dan TNF- α pada analisis RT-PCR dihitung sebagai (area puncak pita yang diinginkan)/(area puncak pita β -aktin). Tingkat ekspresi #10 dan TNF- α lebih besar pada penderita sarkoidosis dibanding dengan penyakit lain ($p < 0.01$ dan $p < 0.05$), sementara tidak didapatkan perbedaan bermakna secara statistik antara PGK dan CD44.

Tabel 3. Analisis sekuens beberapa fragmen yang didapat dari sel BAL menggunakan teknik *differential display*

Nomor Fragmen	Set Primer	Panjang fragmen (bp)	Panjang sekuens (bp)	Nilai ekspresi*	Homologi
1	1	330	300	Ekivalen	PGK
2	1	217	217	Ekivalen	Novel
3	1	≈260	160	Ekivalen	Novel
4	5	≈175	135	Ekivalen	Novel
5	5	≈210	170	Ekivalen	Novel
6	5	≈230	185	Ekivalen	Novel
7	5	≈330	230	Ekivalen	Novel
8	5	≈200	120	Umum	CD44
9	6	285	230	Umum	TNF- α
10	6	≈220	172	Meningkat	Novel
11	7	≈180	146	Menurun	TS**
12	8	≈240	115	Tidak terdeteksi	Novel

*Ekivalen=terdeteksi pada seluruh penderita sarkoidosis dan kasus kelola dengan sedikit perbedaan intensitas; Umum= terdeteksi pada hampir seluruh penderita sarkoidosis dengan sedikit perbedaan intensitas; Meningkatkan= intensitasnya meningkat pada sarkoidosis dibandingkan penyakit lain; Menurun/ tidak terdeteksi= intensitasnya menurun pada sarkoidosis dibandingkan dengan penyakit lain.

**97% homolog terhadap intron 3 dari timidilat sintase



Gambar 7. Analisis fragmen 10(#10) menggunakan CCD *imaging system*. Intensitas relatif #10 tiap sampel dihitung dengan $(\text{area}_2) / (\text{area}_1 + \text{area}_2 + \text{area}_3)$ yaitu (area puncak #10)/(area total seluruh puncak yang terdeteksi). Nilai baris 2 (kasus sarkoidosis nomor 2) adalah 8.31, sedangkan baris 22 (kasus nomor 3 pada "others") adalah 0.85.

Ukuran fragmen PGK dan TNF- α sesuai dengan ukuran *sequence* mRNA yang diperkirakan. Walaupun *sequence* fragmen 8 identik dengan bagian gen CD44, pada 3 sampel BAL yang diperiksa (2 sarkoidosis dan 1 HP) *poly A site*-nya berlokasi di 544 bp upstream terhadap *sequence* cDNA CD44 retikulosit yang telah dipublikasikan.³⁰

Fragment 10 (#10)

```

ACCGGGGTAT --(~60bp)-- AGGGATAATG  AAAGTTAGG  GNCAACTGGG
AAGATTGTAA  NNHCATAGTA  CTCAACCAAT  GAGGAACNGG  GGGAGGGACT
TGCCTGCTAG  GAGATAAATT  ACCTGTTGTG  ACTGCCGTGG  ATGTGCCTGC
TCACCAGACA  CCAATCTTG  CAAGACTGTT  ATNAANGTCT  CA
--(~20bp)-- TTAAAAAAAAAAAAAAAA

```

Fragment 12 (#12)

```

GAATGATGAG --(~10bp)-- GAGGAAGTAG  AGTNNHCAA  AACATTTTGA
AAAGGAGAGA  AAGTAATGGC  TATTTTGAAA  GATTATAGCT  GGCTCTGTAA
AACTACTCAG  AAAACCCTTT  ATGAGATTAG  GCAAA --(~10bp)--
CTAAAAAAAAAAAAAAAA

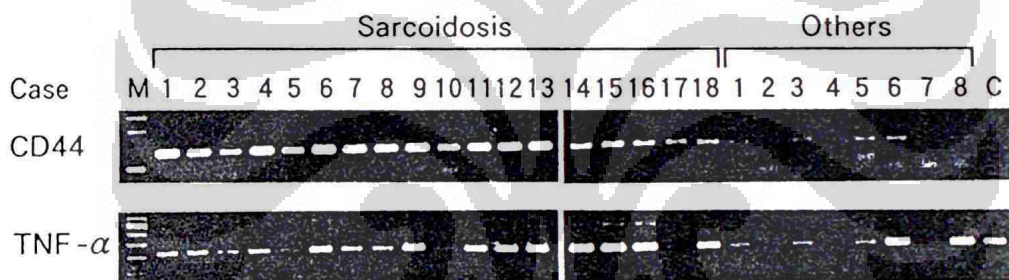
```

Gambar 8. Sekuen nukleotida fragmen 10 dan fragmen 12 yang ekspresinya masing-masing meningkat dan menurun di sel BAL penderita sarkoidosis. Sekuen set primer tampak digaris bawah. Sekuen-sekuen ini tidak menunjukkan homologi terhadap satupun gen dikenal yang tercatat pada data dasar Genbank atau EMBL.

Sekuen fragmen 11 (#11) yang diisolasi sebagai fragmen yang intensitasnya rendah pada sarkoidosis ternyata 97 % homolog dengan intron 3 gen timidilat sintase (TS) manusia.³¹ Ini menandakan kemungkinan terjadi positif palsu pita dari genomik DNA yang mengkontaminasi mRNA. Untuk mengkonfirmasi apakah ekspresi CD44 dan TNF- α selalu ditemukan pada penderita sarkoidosis seperti tampak di DD, dianalisis RT-PCR menggunakan primer spesifik CD44, TNF- α dan β -aktin manusia sebagai *internal control*.

Seperti perkiraan dari hasil analisis DD, ekspresi kedua gen terdeteksi

secara konstan pada penderita sarkoidosis dan tingkat ekspresi $\text{TNF-}\alpha$ didapatkan lebih tinggi bermakna pada penderita sarkoidosis dibanding penyakit lain ($p < 0.05$, uji Mann Whitney, gambar 9). Nilai rasio $\text{CD44}/\beta\text{-aktin}$ dan $\text{TNF-}\alpha/\beta\text{-aktin}$ tiap sampel dapat dilihat pada tabel 2. Pada kasus kontrol nomor 7 dengan pita PGK lemah, produk PCR $\beta\text{-aktin}$ nya juga kurang dari 1/10 kasus kelola yang lain, sehingga rasio $\text{CD44}/\beta\text{-aktin}$ menjadi lebih besar.



Gambar 9. RT-PCR kuantitatif mRNA dari CD44 (bagian atas) dan $\text{TNF-}\alpha$ (bagian bawah). Menggunakan primer spesifik untuk masing-masing cDNA, terdeteksi ekspresi kedua gen tersebut di semua penderita sarkoidosis. Intensitas tiap pita dibagi intensitas $\beta\text{-aktin}$ tiap sampel dan rasio CD44 atau $\text{TNF-}\alpha$ dianggap sepadan dengan jumlah relatif masing-masing mRNA. Jumlah relatif mRNA $\text{TNF-}\alpha$ di sel BAL penderita sarkoidosis lebih besar bermakna dibandingkan dengan penderita bukan sarkoidosis. M= panjang penanda (ladder DNA100 bp); C= kelola produk PCR CD44 atau $\text{TNF-}\alpha$ untuk menyelaraskan variasi intensitas pita tiap agar.

Dari hasil penelitian disimpulkan :

1. Dengan teknik DD diidentifikasi 12 fragmen mRNA yang berasal dari sel BAL penderita sarkoidosis paru dan penderita penyakit paru selain sarkoidosis
2. Diantara 12 fragmen tersebut :
 - a. 1 fragmen yang homolog dengan PGK dapat berfungsi sebagai *internal control* dari teknik yang digunakan
 - b. 2 fragmen masing- masing ekspresinya meningkat dan menurun secara bermakna pada sarkoidosis, diharapkan menjadi bagian dari suatu mRNA yang berperan pada patogenesis sarkoidosis
 - c. Ekspresi CD44 konsisten pada hampir seluruh penderita sarkoidosis, tetapi dibandingkan dengan penyakit paru lain secara kuantitatif tidak berbeda bermakna. Ekspresi TNF- α juga terlihat pada hampir seluruh penderita sarkoidosis, dan secara kuantitatif berbeda bermakna dibandingkan penyakit paru lain
3. Teknik ini dapat diaplikasikan untuk mengidentifikasi beberapa gen spesifik pada sel BAL penderita sarkoidosis

BAB V

PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian pertama yang membandingkan tingkat ekspresi mRNA bermacam gen termasuk gen yang belum dikenal pada penderita sarkoidosis dan penyakit paru lainnya. Untuk tujuan ini digunakan teknik DD dan ternyata tehnik ini cukup sensitif dan reproduibel, sama seperti telah dilaporkan oleh peneliti lain.^{9,10,12,13} Untuk deteksi gen spesifik pada sarkoidosis, yang tingkat ekspresinya secara spesifik bukan disebabkan oleh proses inflamasi atau akibat peningkatan jumlah limfosit di sel BAL, digunakan sampel BAL penderita sarkoidosis dan bervariasi penyakit paru lainnya daripada menggunakan orang normal sebagai kelola. Tidak didapatkan perbedaan bermakna pada jumlah hitung jenis sel limfosit dan makrofag antara grup sarkoidosis dan grup kelola. Pada autoradiogram patron ekspresi mRNA yang berbeda dari sel BAL penderita sarkoidosis dan penyakit paru lain hampir identik, sehingga memberikan latar belakang yang reproduibel dan dengan demikian perbedaan yang spesifik dapat dikenali. Kasus nomor 7 penderita kelola memiliki ekspresi mRNA PGK dan β -aktin yang rendah sebagai gen *housekeeping* atau sebagai *internal control*. Kemungkinan sampel ini kurang baik

akibat terjadi kerusakan mRNA, sehingga dengan menggunakan *internal control* pada DD kita dapat menseleksi sampel yang tidak baik. Secara teoritis dibutuhkan 120-240 set primer pada DD untuk mengekspresikan seluruh mRNA di sel.⁹ Dengan menggunakan 19 set primer didapatkan 2 fragmen yaitu #10 dan #12 yang ekspresinya karakteristik dan reproduibel menampakkan intensitas meningkat atau melemah pada sampel sarkoidosis. Hasil ini menandakan bahwa cara ini memiliki potensi dan berguna sebagai alat bantu diagnosis penyakit ini. Fragmen 10 terdeteksi pada seluruh penderita sarkoidosis yang didiagnosis secara histologis tetapi tidak terdeteksi pada pasien nomor 17 yang diagnosisnya ditegakkan hanya berdasarkan gejala klinis. Penderita ini menderita uveitis, tetapi foto toraksnya tidak menunjukkan kelainan dan tidak ditemukan lesi granuloma pada pemeriksaan biopsi paru melalui bronkus. Sehingga fragmen 10 kelihatannya spesifik untuk sarkoidosis dengan lesi granuloma. Pemakaian seluruh 12 *anchored primer* pada RT, pita yang karakteristik pada sarkoidosis akan didapatkan lebih banyak lagi bila digunakan *arbitrary primer* lain daripada yang digunakan pada analisis DD ini. Di antara 12 fragmen yang telah diisolasi dan kemudian disekuen, 2 fragmen yang hampir selalu tampak pada penderita sarkoidosis ternyata CD44 dan TNF- α . Temuan ini kemudian

dikonfirmasi lebih lanjut dengan analisis RT-PCR kuantitatif menggunakan primer spesifik untuk masing-masing cDNAny.

CD44 adalah suatu molekul adhesi permukaan sel termasuk dalam golongan protein tulang rawan dan diperkirakan mempunyai peran penting pada proses fisiologis seperti *homing of lymphocyte*,³² adhesi sel,³³ aktivasi sel T,^{33,34} dan migrasi sel.³⁵ Ekspresi CD44 pada penderita sarkoidosis belum pernah dilaporkan, kecuali beberapa varian CD44 telah dilaporkan meningkat ekspresinya pada jaringan neoplasma.^{36,37} CD44 juga merupakan reseptor permukaan sel terhadap hialuronat.³⁸ Hialuronat berikatan dengan makrofag dan limfosit untuk menimbulkan agregasi sel, pelepasan sitokin dan aktivasi sel T.³⁹ Ekspresi CD44 juga terlihat pada penyakit paru lain dan tampaknya tidak sangat spesifik untuk sarkoidosis. Tetapi peningkatan ekspresi CD44 bersama-sama dengan meningkatnya kadar hialuronat dalam cairan BAL penderita sarkoidosis^{40,41} menambah kontribusi peran hialuronat dan CD44 pada patogenesis sarkoidosis. CD44 diekspresi juga pada makrofag,⁴² sementara makrofag merupakan sel imunoinflamator di paru yang berperan pada proses inflamasi penyakit paru interstitial.⁴³ Dengan demikian secara umum CD44 juga terlibat pada patogenesis penyakit paru interstitial.

Sejumlah peneliti¹⁴⁻²² melaporkan peningkatan ekspresi TNF- α di sel BAL penderita sarkoidosis. Pada penelitian ini dengan teknik RT-PCR ini didapatkan pula peningkatan yang bermakna ekspresi mRNA TNF- α penderita sarkoidosis dibanding penyakit paru lain. TNF- α adalah sitokin yang dihasilkan oleh sel monosit dan makrofag setelah distimulir oleh bermacam penyebab.⁴⁴ TNF- α meningkatkan ikatan limfosit dengan sel endotelial sehingga ini diduga sebagai penyebab bermigrasinya limfosit dari darah ke dalam jaringan.⁴⁵ Dari percobaan binatang diketahui bahwa TNF- α juga mempunyai peran dalam proses fibrosis.⁴⁶ Webb dkk secara invitro melaporkan peningkatan CD44 oleh antibodimonoklonal spesifik setelah diinduksi oleh TNF- α dan IL-1 β .⁴⁷

Satu fragmen (#11) diduga positif palsu berasal dari genomik DNA, karena *sequence* nya menunjukkan 97% homolog terhadap intron 3 dari gen timidilat sintase (TS) manusia.³¹ Tetapi karena 4 nukleotidanya berbeda dari *sequence* yang telah dilaporkan, maka masih ada kemungkinan ini bukan positif palsu melainkan berasal dari mRNA belum dikenal dengan homologi yang tinggi terhadap intron 3 dari gen TS. Dengan terbatasnya jumlah mRNA yang diperoleh dari sel BAL, sulit untuk mengkonfirmasi tingkat ekspresi mRNA dengan teknik *Northern blotting*.

BAB VI

RINGKASAN, KESIMPULAN DAN SARAN

Ringkasan

Telah dilakukan penelitian untuk menganalisis ekspresi beragam gen di sel BAL 18 penderita sarkoidosis dibandingkan dengan 8 penderita penyakit paru selain sarkoidosis menggunakan teknik *differential display*. Penderita sarkoidosis berusia 13- 77 tahun dan kasus kelola berusia 47- 70 tahun. Semua penderita sarkoidosis didiagnosis secara histopatologik kecuali kasus nomer 17 yang diagnosisanya ditegakkan hanya berdasarkan klinis yaitu manifestasi di mata. Tidak satupun penderita sarkoidosis mendapat terapi kortikosteroid pada waktu pemeriksaan BAL dilakukan. Pada delapan penderita penyakit paru selain sarkoidosis diagnosis klinik ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik, pemeriksaan darah, radiografi, dan BAL.

Digunakan 19 set primer pada penelitian ini, dari tiap satu set primer dapat divisualisasikan kurang lebih 100- 150 pita berukuran antara 100 sampai 350 bp. Menggunakan set primer 1, fragmen mRNA dari PGK sebagai *internal control* terdeteksi hampir di seluruh sampel

dengan intensitas yang relatif sama kecuali 1 kasus dengan intensitas lemah (kasus kelola nomor 7). Tidak didapatkan perbedaan statistik antara nilai intensitas pita PGK pada kelompok sarkoidosis dengan kelompok kelola menandakan bahwa cara ini dapat digunakan untuk membandingkan tingkat ekspresi mRNA berbagai sampel.

Menggunakan 19 set primer dengan teknik DD diidentifikasi 12 fragmen mRNA yang berasal dari sel BAL penderita sarkoidosis dan kelola. Walaupun mRNA di sel BAL menunjukkan patron yang secara umum sama pada hampir seluruh subyek yang diperiksa, ditemukan 2 fragmen yang perubahan intensitasnya spesifik dan reproduibel pada penderita sarkoidosis dibandingkan dengan penyakit lain yaitu fragmen 10 dan fragmen 12. Fragmen 10 terdeteksi di seluruh penderita sarkoidosis yang diagnosisnya ditegakkan secara histologik, sementara tidak terdeteksi di 3 dari 8 sampel kelola dan juga di kasus sarkoidosis nomor 17 yang diagnosis histologiknya tidak didapatkan. Nilai rasio antara area puncak fragmen 10 dengan area total seluruh pita yang terdeteksi pada sarkoidosis secara bermakna lebih tinggi dibandingkan dengan kelola. Fragmen 12 terdeteksi pada lebih separuh sampel kelola, sementara tidak satupun pita ini terdeteksi pada sarkoidosis. Baik fragmen 10 maupun fragmen 12 tidak mempunyai homologi yang signifikan terhadap gen- gen manusia yang telah tercatat di *GenBank*

atau data dasar EMBL. Sepuluh fragmen lain ekspresinya hampir selalu ditemukan pada penderita sarkoidosis, tetapi tidak memiliki homologi yang signifikan terhadap satupun *sequence* mRNA atau DNA manusia. Kecuali 2 fragmen disamping PGK, terbukti identik dengan TNF- α dan CD44. Sekuen fragmen 11 yang diisolasi sebagai fragmen yang intensitasnya rendah pada sarkoidosis ternyata 97% homolog dengan intron 3 gen timidilat sintase manusia. Ini menandakan kemungkinan terjadi positif palsu pita dari genomik DNA yang mengkontaminasi mRNA. Untuk mengkonfirmasi apakah ekspresi CD44 dan TNF- α selalu ditemukan pada penderita sarkoidosis seperti tampak di DD, dianalisis RT-PCR menggunakan primer spesifik CD44 , TNF- α dan β - aktin manusia sebagai *internal control*. Seperti perkiraan dari hasil analisis DD, ekspresi kedua gen terdeteksi secara konstan pada penderita sarkoidosis dan tingkat ekspresi TNF- α didapatkan lebih tinggi bermakna pada penderita sarkoidosis dibanding penyakit lain.

Peranan fragmen 10 dan fragmen 12 pada patogenesis sarkoidosis belum dapat dijelaskan karena membutuhkan analisis struktur keseluruhan serta fungsi fragmen tersebut.

Kesimpulan

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa teknik *differential*

display mRNA untuk menganalisis ekspresi beragam gen di sel BAL dalam rangka menerangkan patogenesis sarkoidosis dapat dilaksanakan, dan cara ini juga berguna sebagai alat bantu diagnosis penyakit ini. Kenyataan bahwa dengan DD dapat dideteksi mRNA CD44 dan TNF- α yang benar terekspresi di sel BAL penderita sarkoidosis, menguatkan dugaan bahwa 2 fragmen yang intensitasnya karakteristik pada sarkoidosis walaupun ternyata berasal dari gen yang belum dikenal dapat merupakan 2 gen novel yang mempunyai peran penting pada patogenesis sarkoidosis. CD44 yang terbukti ekspresinya konsisten pada sarkoidosis bersama-sama dengan meningkatnya kadar hialuronat dalam cairan BAL penderita sarkoidosis, menambah kontribusi peran hialuronat dan CD44 pada patogenesis sarkoidosis.

Saran

Perlu penelitian lanjutan terhadap fragmen 10 dan fragmen 12 yaitu kloning keseluruhan *sequence* cDNA dari pustaka cDNA menggunakan 2 fragmen ini sebagai *probe* dan kemudian dianalisis struktur serta fungsinya.

DAFTAR PUSTAKA

1. Izumi T. Sarcoidosis. In: Bone RC, ed. Pulmonary and Critical Care Medicine, Vol. 2. St. Louis: Mosby, 1994; 1- 9.
2. Siltzbach LE, James DG, Turiaf J. Course and prognosis of sarcoidosis around the world. Am J Med 1974; 57: 847- 52.
3. Crystal RG, Bitterman PB, Rennard SI, Hance AJ, Keogh BA. Interstitial lung diseases of unknown cause. Disorders characterized by chronic inflammation of the lower respiratory tract (second of two parts). New Engl J Med 1984; 310:235-44.
4. Thomas PD, Hunninghake GW. Current concepts of the pathogenesis of sarcoidosis. Am Rev Resp Dis 1987; 135:747-60.
5. Arnold HL, Odom RB, James WD. Andrews' Diseases of the Skin. Philadelphia: WB Saunders Company, 1990; 840- 6.
6. Orkin M, Maibach HI, Dahl MV. Dermatology. London: Prentice- Hall International Inc, 1991; 564- 8.
7. Yanoff M, Fine BS. Ocular Pathology a text and atlas. Cambridge: Harper & Row, 1982; 117- 8.
8. Braunwald E. Heart Disease. A textbook of Cardiovascular Medicine, Vol 2. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996; 1420-1.
9. Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 1992; 257:

967-71.

10. Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Method of differential display. In: Adolph KW, ed. *Methods in molecular genetics*, Vol. 5. New York: Academic Press, 1994; 3-16.
11. Coulson AR, Staden R. DNA sequencing. In: Kendrew SJ, ed. *The Encyclopedia of Molecular Biology*. Oxford: Blackwell Science, 1994; 283- 6.
12. Sun Y, Hegamyer G, Colburn NH. Molecular cloning of five messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: One is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res* 1994; 54:1139-44.
13. Aiello LP, Robinson GS, Lin YW, Nishio Y, King GL. Identification of multiple genes in bovine retinal pericytes altered by exposure to elevated levels of glucose by using mRNA differential display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 6231- 5.
14. Spatafora M, Merendino A, Chiappara G, Gjomarkaj M, Melis M, Bellia V et al. Lung compartmentalization of increased TNF releasing ability by mononuclear phagocytes in pulmonary sarcoidosis. *Chest* 1989; 96:542-9.
15. Baughman RP, Strohofer SA, Buchsbaum J, Lower EF. Release of tumor necrosis factor by alveolar macrophages of patients with

- sarcoidosis. *J Lab Clin Med* 1990; 115:36-42.
16. Foley NM, Millar AB, Meager A, Johnson NM, Rook GAW. Tumor necrosis factor production by alveolar macrophages in pulmonary sarcoidosis and tuberculosis. *Sarcoidosis* 1992; 9:29-34.
 17. Terao I, Hashimoto S, Horie T. Effect of GM-CSF on TNF-alpha and IL-1-beta production by alveolar macrophages and peripheral blood monocytes from patients with sarcoidosis. *Int Arch Allergy Immunol* 1993; 102:242-8.
 18. Pueringer RJ, Schwartz DA, Dayton CS, Gilbert SR, Hunninghake GW. The relationship between alveolar macrophage TNF, IL-1, and PGE₂ release, alveolitis, and disease severity in sarcoidosis. *Chest* 1993; 103:832-8.
 19. Yamaguchi E, Itoh A, Furuya K, Miyamoto H, Abe S, Kawakami Y. Release of tumor necrosis factor- α from human alveolar macrophages is decreased in smokers. *Chest* 1993; 103:479-83.
 20. Steffen M, Petersen J, Oldigs M, Kermeier A, Magnussen H, Thiele HG et al. Increased secretion of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1-beta, and interleukin-6 by alveolar macrophages from patients with sarcoidosis. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 91:939-49.
 21. Bost TW, Riches DWH, Schumacher B, Carre PC, Khan TZ, Martinez JAB et al. Alveolar macrophages from patients with Beryllium disease

and sarcoidosis express increased levels of mRNA for tumor necrosis factor- α and interleukin-6 but not interleukin-1 β . *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 10:506-13.

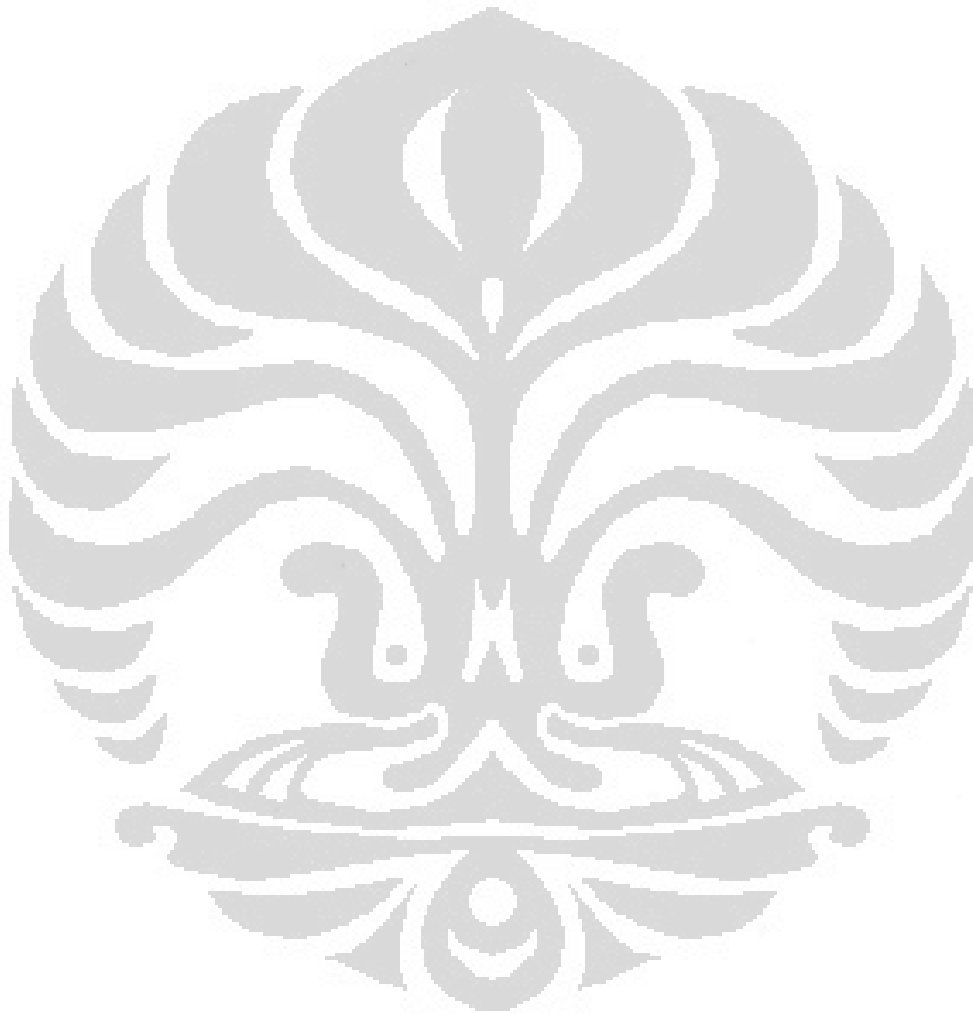
22. Ishioka S, Saito T, Hiyama K, Haruta Y, Maeda A, Hozawa S et al. Increased expression of tumor necrosis factor- α , interleukin-6, platelet-derived growth factor-B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA in cells of bronchoalveolar lavage fluid from patients with sarcoidosis. *Sarcoidosis* (in press)
23. Shakoor Z, Hamblin AS. Increased CD11/CD18 expression on peripheral blood leucocytes of patients with sarcoidosis. *Clin Exp Immunol* 1992; 90:99-105.
24. Ishii Y, Kitamura S. Elevated levels of soluble ICAM-1 in serum and BAL fluid in patients with active sarcoidosis. *Chest* 1995; 107:1636-40.
25. Michelson AM, Markham AF, Orkin SH. Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X chromosome-encoded phosphoglycerate kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 472- 6.
26. Sreaton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JL. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:12160-4.

27. Kinoshita T, Shimotohno K. Sensitive and linear quantitation of a wide range of gene expression by the polymerase chain reaction. *Protein, Nucleic Acid and Enzyme* 1992; 37:135-43 (In Japanese).
28. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB. Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer *versus* mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1992; 52: 6966-8.
29. Nedwin GE, Naylor SL, Sakaguchi AY, Smith D, Nedwin JJ, Pennica D et al. Human lymphotoxin and tumor necrosis factor genes: structure, homology and chromosomal localization. *Nucleic Acids Res* 1985; 13: 6361-73.
30. Harn HJ, Isola N, Cooper DL. The multispecific cell adhesion molecule CD44 is represented in reticulocyte cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 1127-34.
31. Kaneda S, Nalbantoglu J, Takeishi K, Shimizu K, Gotoh O, Seno T et al. Structural and Functional Analysis of the Human Thymidylate Synthase Gene. *J Biol Chem* 1990; 265: 20277-84.
32. Jalkanen S, Bargatze RF, de los Toyos J, Butcher EC. Lymphocyte recognition of high endothelium: antibodies to distinct epitopes of an 85-95-kD glycoprotein antigen differentially inhibit lymphocyte binding to lymph node, mucosal, or synovial endothelial cells. *J Cell Biol* 1987; 105: 983-90.

33. Shimizu Y, Van Seventer GA, Siraganian R, Wahl L, Shaw S. Dual role of the CD44 molecule in T cell adhesion and activation. *J Immunol* 1989; 143: 2457-63.
34. Denning SM, Le PT, Singer KH, Haynes BF. Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J Immunol* 1990; 144:7-15.
35. Knudson W, Bartnik E, Knudson CB. Assembly of pericellular matrices by COS-7 cells transfected with CD44 lymphocyte-homing receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 4003- 7.
36. Matsumura Y, Tarin D. Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet* 1993; 340:1053- 8.
37. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* 1993; 341:725- 6.
38. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61:1303-13.
39. Haynes BF, Liao HX, Patton KL. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells* 1991; 3:347- 50.
40. Eklund A, Hällgren R, Blaschke E, Laurent AE, Persson U, Svane B. Hyaluronate in bronchoalveolar lavage fluid in sarcoidosis and its

- relationship to alveolar cell populations. *Eur J Respir Dis* 1987; 71:30- 6.
- 41.Bjermer L, Engström-Laurent A, Thunell M, Hällgren R. Hyaluronic acid in bronchoalveolar lavage fluid in patients with sarcoidosis: relationship to lavage mast cells. *Thorax* 1987; 42: 933- 8.
- 42.Haynes BF, Telen MJ, Hale LP, Denning SM. CD44- A molecule involved in leukocyte adherence and T-cell activation. *Immunol Today* 1989; 10: 423-8.
- 43.Semenzato G. Immunology of interstitial lung disease: cellular events taking place in the lung of sarcoidosis, hypersensitivity pneumonitis and HIV infection. *Eur Respir J* 1991; 4: 94-102.
- 44.Sherry B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *J Cell Biol* 1988; 107:1269-77.
- 45.Cavender D, Saegusa Y, Ziff M. Stimulation of endothelial cell binding of lymphocytes by tumor necrosis factor. *J Immunol* 1987; 139:1855- 60.
- 46.Denis M, Cormier Y, Fournier M, Tardif J, Laviolette M. Tumor necrosis factor plays an essential role in determining hypersensitivity pneumonitis in a mouse model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991; 5: 477- 83.

47. Webb DSA, Shimizu Y, Van Seventer GA, Shaw S, Gerrard TL. LFA-3, CD44, and CD45: Physiologic triggers of human monocyte TNF and IL-1 release. *Science* 1990; 249:1295-7.



LAMPIRAN

PROSEDUR BAKU PEMERIKSAAN BAL

1. Penderita puasa mulai 10 jam sebelum dilakukan pemeriksaan
2. Setengah jam sebelum dilakukan bronkoskopi penderita diberikan suntikan Atropin Sulfat 0.125 mg intramuskular
3. Kemudian dilakukan anestesi lokal menggunakan Xylocaine 20 % semprot secukupnya di daerah farings, larings
4. Penderita terlentang dengan mata tertutup, dipasang oksimeter pada ujung jari tangan, dipasang *mouth piece* dan bila perlu diberikan kanul oksigen sebanyak 2 liter/ menit
5. Dimasukkan alat bronkoskop melalui *mouth piece* dan diobservasi keadaan farings, larings, karina, bronkus utama, orifisium tiap segmen kanan dan kiri, mukosa dan sekaligus diberikan cairan Xylocaine 2 % intra lumen seperlunya
6. Dicapai muara orifisium segmen 4 atau 5 kanan atau kiri dan ujung bronkoskop dipertahankan, kemudian hubungkan botol penampung cairan BAL dengan bronkoskop
7. Dimasukkan cairan NaCl 0.9 % steril dengan suhu kamar sebanyak 3 X 50 ml, tiap kali masuk 50 ml langsung dihisap menggunakan mesin penghisap dengan kekuatan penuh (sekitar minus 30 Cm H₂O) dan penderita diminta membatukkan sampai cairan BAL

dalam lumen yang diperiksa diyakinkan sudah habis

8. Setelah cairan BAL diperoleh, botol penampung dilepas dan dilanjutkan dengan pemeriksaan selanjutnya seperti biopsi paru lewat bronkus

HITUNG JUMLAH SEL BAL TOTAL

1. Cairan BAL kemudian dibagi dua volume sama banyak ke dalam dua tabung plastik 50 ml melalui kain kas bersih, dicatat jumlah volume cairan BAL yang ada di dalam kedua tabung tersebut kemudian ditutup
2. Kedua tabung tersebut kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1100 RPM atau 240 G selama 10 menit
3. Buang supernatant (bila perlu disimpan), sedimen kemudian dihentak-hentak dengan jari sampai terlepas dari dinding tabung ditambahkan 10 ml larutan HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
Bila tidak langsung digunakan, sedimen disimpan di freezer minus 80° C
4. Ambil 50 μ l dari 10 ml larutan supernatan di atas campur dengan 200 μ l larutan Turk, kemudian hitung jumlah sel total menggunakan kamar hitung sel

HITUNG JENIS SEL BAL

1. Ambil 50 μ l dari 10 ml larutan supernatan di atas campur dengan 4 ml larutan HBSS kemudian masukkan ke dalam alat sitospin masing- masing 1 ml. Sebelumnya kaca obyek diberi nama penderita dan tanggal pemeriksaan
2. Sentrifugasi dengan kecepatan 600 RPM selama 5 menit
3. Kaca obyek bersama endapan sel dikeringkan dengan hembusan alat pengering (dapat digunakan alat pengering rambut)
4. Setelah kaca obyek bersama endapan sel kering, pada posisi mendatar digenangi larutan Giemsa selama 45 detik
5. Kemudian larutan Giemsa ditambah air agar lebih encer dan ditunggu sampai 4 menit
6. Bagian bawah kaca obyek yang tidak ada endapan sel dialiri air keran sampai warna pekat larutan Giemsa menjadi terang dan tampak dengan jelas bayangan bulatan endapan sel pada kaca obyek, kemudian keringkan dengan alat pengering
7. Setelah kering bagian bulatan endapan sel ditetesi larutan minyak emersi secukupnya dan ditutupi kaca penutup, kemudian dilihat dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran besar

8. Hitung seluruh jenis sel yaitu makrofag alveolar, neutrofil, limfosit, eosinofil dan basofil di dalam endapan sel pada kaca obyek sampai jumlah sel total 100
9. Buat persentase tiap jenis sel

HITUNG POPULASI CD3, CD4 DAN CD8

1. Ambil tabung 5 ml sebanyak 4 buah, beri label tiap tabung dengan masing-masing Negatif, CD3, CD4 dan CD8
2. Masukkan 1 ml larutan supernatan di atas ke tiap tabung yang telah diberi label
3. Sentrifugasi dalam suhu 4° C selama 10 menit dengan kecepatan 1500 RPM
4. Supernatan dibuang dan sedimen dihentak-hentak dengan jari sampai terlepas dari dinding tabung
5. Sesuai dengan label masukkan tiap tabung larutan antibodi monoklonal CD3, CD4, CD8 dan kontrol negatif sebanyak 10 µl, kemudian tiap tabung digetarkan dengan alat vortex
6. Tabung- tabung tersebut kemudian diinkubasi dalam lemari es dengan suhu 4° C selama 30 menit
7. Setelah 30 menit tiap tabung dimasukkan larutan HBSS 1 ml, kemudian disentrifugasi dalam suhu 4° C dengan kecepatan 1500

RPM selama 10 menit

8. Buang supernatan, sedimen dihentak- hentakan dengan jari tangan sampai terlepas dari dinding tabung kemudian tiap- tiap tabung masukkan 400 μ l larutan HBSS
9. Tabung- tabung tersebut kemudian dibenam ke dalam es
10. Masing- masing tabung diperiksa menggunakan alat FACSorter (Becton Dickinson), prinsipnya alat secara otomatis akan menampakkan pada layar monitor sub populasi limfosit, makrofag dan neutrofil. Kemudian alat secara otomatis akan menghitung kandungan CD3, CD4 dan CD8 pada subpopulasi limfosit

Tabel Induk penelitian

Gambaran klinis dan profil BAL penderita sarkoidosis*

Kasus	Umur (thn)	Kelamin	Perokok**	Sel BAL ***			
				Total (x 10 ⁵ /ml)	MA(%)	Lim(%)	CD4/CD8
1	22	L	P	3.7	91	9	2.1
2	13	L	BP	1.7	59	35	1.0
3	69	L	P	1.8	87	13	3.6
4	17	L	P	2.0	61	34	1.3
5	36	W	BP	1.2	61	38	2.0
6	55	W	BP	2.4	53	47	2.4
7	26	L	P	3.2	35	65	2.9
8	13	W	BP	1.2	69	30	2.4
9	50	W	P	1.8	94	4	0.4
10	25	L	P	2.2	96	4	6.5
11	69	L	BP	0.5	70	28	7.6
12	19	L	P	3.0	83	16	9.7
13	28	L	P	3.4	91	9	4.6
14	28	L	P	2.0	70	29	5.0
15	22	W	BP	3.6	22	77	25.4
16	27	L	P	2.0	81	19	7.9
17	77	W	BP	0.6	61	38	4.2
18	30	W	BP	1.3	85	13	3.2

* Seluruh penderita tidak diterapi glukokortikoid
Kecuali kasus no.17, semua penderita didiagnosis sarkoidosis secara histopatologis

** P=perokok; BP=bukan perokok

*** MA=Makrofag alveolar; Lim=limfosit

Diagnosis dan profil BAL penderita penyakit paru lain sebagai kelola

Kasus	Umur	Kelamin	Diagnosis*	Steroid	Perokok**	Sel BAL §			
						Total (x 10 ⁵ /ml)	MA (%)	Lim (%)	CD4/CD8
1	47	L	PH	+	P	7.5	21	69	1.6
2	64	L	PH	+	BP	8.2	46	46	1.8
3	49	L	TM	+	P	0.9	52	47	0.2
4	64	L	PH	—	BP	5.2	38	54	0.8
5	68	W	FPI	—	BP	1.1	79	14	0.1
6	55	L	Pneumokoniosis	—	BP	1.2	94	5	TD
7	70	W	BOOP & AR	—	BP	5.0	44	51	3.2
8	54	W	SLE	—	BP	1.3	79	20	0.9

* PH=pneumonitis hipersensitif; TM=tuberkulosis milier; FPI=fibrosis paru idiopatik; SLE=pneumonitis lupus; BOOP & AR=bronchiolitis obliterans organizing pneumonia & artritis reumatoid

** P=perokok; BP=bukan perokok

SMA=makrofag alveolar; Lim=limfosit; TD=tidak diperiksa