

## PENGARUH PEMBERIAN PRISTANE TERHADAP KADAR *Antinuclear Antibody* PADA SERUM HEWAN COBA MENCIT BALB/C

Prof.Dr.dr. KUSWORINI, M.Kes, Sp.PK, dr. INDRIATI DWI RAHAYU, M.Kes

FAUZAN KURNIAWAN DHANI

### ABSTRAK

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan suatu penyakit autoimun sistemik yang bersifat kronis dan melibatkan kerusakan multi organ. Penyakit ini terutama menyerang wanita usia produktif dengan perbandingan wanita:laki-laki yaitu 9:1. Penderita LES di seluruh dunia diperkirakan sekitar 5 juta orang di mana terdiagnosis 200.000 diantaranya ada di Indonesia. Faktor genetik, imunologik dan hormonal serta lingkungan diduga berperan dalam patofisiologi LES. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui perbedaan peningkatan kadar ANA pada mencit balb/c yang sudah diinduksi pristane pada minggu ke-8, ke-16, ke-24, ke-32. Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* untuk membuat suatu standar hewan coba lupus menggunakan mencit Balb/c yang diinduksi oleh pristane dan untuk melihat pengaruhnya terhadap presentase ANA. Sampel dari penelitian ini adalah mencit betina strain Balb/c yang diinduksi oleh pristane sebanyak 35 ekor dibagi menjadi 5 kelompok masing-masing 7 ekor. Mencit balb/c diinduksi 0,5 ml pristane secara intraperitoneal lalu dilakukan pengamatan perkembangan LES dan kadar ANA pada serum mencit mulai minggu ke-8,16,24 sampai dengan minggu ke-32. Pengukuran kadar ANA pada mencit dilakukan menggunakan *mouse ELISA kit* di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Hasil uji kruskal-wallis pengukuran kadar ANA mengalami peningkatan yang signifikan pada minggu ke-8 hingga minggu ke-32 dan meningkat secara signifikan terhadap kontrol. Berdasarkan percobaan diatas, dapat disimpulkan bahwa induksi pristane pada mencit balb/c secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar ANA serum. Peningkatan kadar ANA secara signifikan terjadi pada minggu ke-8,16,24 dan ke-32 terhadap kontrol.

**Kata kunci :** Lupus eritematosus sistemik; Pristane; ELISA; ANA test

Dhani, Fauzan. 2016. *The Effect Between Exposure of Pristane and the Percentage of Antinuclear Antibody in Serum of Balb/c Mice*. Final Assignment, Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisor: (1) Prof.Dr.dr. Kusworini, M.Kes,Sp.PK (2) dr. Indriati Dwi Rahayu M.Kes.

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is systemic autoimmune disease which is chronic and involves multiple organ damage. This disease primarily affects women of childbearing age with a ratio of female: male is 9: 1. SLE sufferers worldwide is estimated at about 5 million people where diagnosed with 200,000 of them in Indonesia. Genetic factors, immunologic and hormonal and environmental alleged role in the pathophysiology of SLE. The purpose of this study was to determine the differences and improvement in levels of ANA in balb/c mice serum which already pristane induced at week 8, the 16th, 24th, 32nd. This study uses a true experimental design in the laboratory in vivo by using a design randomized controlled post test only group design This study was conducted in vivo to create a standard lupus experimental animals using balb / c mice induced by pristane and to see its effect on the percentage of ANA. The sample used is a sample of this research is the female mice strain Balb / c were induced by pristane as many as 35 were divided into five groups of 7 each tail. BALB / c mice induced by 0.5 ml pristane intraperitoneally then observation LES development and levels of ANA in the serum of mice started weeks 8,16,24 until week 32. Measurement levels of ANA in mice was performed using mouse ELISA kit in Biomedical Laboratory Faculty of Medicine, University of Brawijaya. Kruskal-Wallis test results measuring the levels of ANA experienced a significant improvement at week 8 to week 32 and increased significantly to controls. Based on the above experiment, it can be concluded that pristane induced in mice Balb/c intraperitoneally may increase serum levels of ANA. Increased levels of ANA were significantly occurred at weeks 8,16,24 and 32nd against a control.

**Keywords: Systemic Lupus Erythematosus; Pristane; ELISA; ANA test**

## PENDAHULUAN

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan suatu penyakit autoimun sistemik yang bersifat kronis dan melibatkan kerusakan multi organ. Prevalensi LES diperkirakan berkisar 12.2 per 100.000 penduduk dengan angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi terutama di negara berkembang seperti Indonesia.<sup>1</sup> Namun di Indonesia, angka harapan hidup pada penderita LES masih cukup rendah yaitu 70% untuk jangka waktu 5 tahun dan 50% untuk jangka waktu 10 tahun.<sup>2</sup>

Pato-etologi LES tetap sulit dipahami. Adanya disregulasi sistem imun, pembersihan sel apoptosis dan kompleks imun serta pembentukan berbagai autoantibodi, merupakan kontributor penting untuk pengembangan LES. Hilangnya toleransi kekebalan tubuh, meningkatkan beban antigenik, kelebihan sel *T helper*, dan pergeseran *T helper* 1 (Th1) ke arah respon imun Th2 mengakibatkan ke sel B hiperaktif dan produksi autoantibodi seperti *Antinuclear Antibodies* (ANA) dan *Double Stranded DNA* (dsDNA). Akhirnya, faktor lingkungan tertentu mungkin diperlukan untuk memicu penyakit.<sup>3</sup>

Berbagai hewan model telah banyak dikembangkan di laboratorium untuk mempelajari patogenesis suatu penyakit. Hewan coba atau hewan model adalah hewan yang sengaja dipelihara dan dikembangbiakkan untuk mempelajari berbagai macam bidang ilmu dalam skala penelitian atau pengamatan laboratorium.<sup>4</sup> Sekarang ini terdapat beberapa jenis hewan model lupus yang telah dikembangkan oleh banyak peneliti, yaitu hewan model lupus spontan dan terinduksi.<sup>5</sup>

*Pristana-induced* lupus (PIL) dapat diinduksi dalam berbagai strain mencit seperti Balb/c dan C57BL/6.<sup>6</sup> Hewan coba yang terinduksi pristane tampak lebih mirip dengan lupus pada manusia dibandingkan dengan hewan coba spontan dan cenderung menghasilkan autoantibodi spesifik pada lupus seperti artritis, alopecia, proteinuria, dan glomerulonephritis.<sup>7</sup>

Untuk mengetahui apakah hewan coba sudah terinduksi LES salah satunya dengan pengukuran tes kadar ANA. Tes kadar ANA merupakan penapisan awal yang efektif pada pasien dengan gambaran klinis LES. Meskipun demikian, hingga saat ini patogenesis dari pristane yang dapat menginduksi LES pada mencit masih belum dimengerti oleh banyak peneliti di dunia. Selain itu, onset perkembangan LES pada mencit yang diinduksi oleh pristane juga masih belum banyak diteliti. Oleh karena itu, perlu dilakukan suatu penelitian untuk mencari patogenesis, *natural history of disease* atau perkembangan penyakit pada mencit model LES

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan desain eksperimen murni (*true experimental design*) di laboratorium secara *in vivo* dengan menggunakan rancangan *randomized post test only controlled group design*.

Sampel dari penelitian ini adalah mencit betina strain Balb/c yang diinduksi pristane untuk menjadi mencit lupus eritematosus sistemik (LES) yang kemudian diukur beberapa marker. Mencit betina dipilih dikarenakan prevalensi penyakit lupus banyak pada populasi

wanita dibandingkan pria. Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah 5 perlakuan.

**Tabel 4.2 Pembagian Kelompok Mencit Kontrol dan Perlakuan**

Nama Kelompok	Perlakuan yang Diberikan
Kontrol Sehat	tidak diberikan perlakuan apapun
Perlakuan 1	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-8
Perlakuan 2	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-16
Perlakuan 3	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-24
Perlakuan 4	Injeksi pristane dan dianalisis pada minggu ke-32

Pada penelitian ini, dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok yang bertujuan untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Perhitungan besarnya pengulangan pada sampel adalah menggunakan rumus sebagai berikut:

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

$n$  : jumlah ulangan

$p$  : jumlah perlakuan

Pada penelitian ini terdapat lima kelompok sehingga didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

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

$$n(5-1) \geq 15$$

$$4n \geq 15$$

$n \geq 3,75$  dibulatkan keatas menjadi 4

Untuk 5 kelompok, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak empat kali. Namun untuk mencegah adanya kehilangan data akibat mati setelah perlakuan maka setiap kelompok mencit ditambahkan tiga sampel sehingga masing-masing kelompok didapatkan tujuh mencit yang dikali lima kelompok maka total mencit yang dipakai menjadi 35 ekor mencit Balb/c. Penambahan jumlah sampel tersebut bertujuan untuk memenuhi data minimal.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakologi untuk pemeliharaan hewan coba mencit, pembedahan hewan coba. Setelah itu pemeriksaan kadar ANA dilakukan di Laboratorium Kawi. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2014 sampai bulan Maret 2015.

### PROSEDUR PENELITIAN

Pristane yang didapatkan dari pabrik diinjeksikan ke mencit sesuai dengan prosedur yang telah dideskripsikan pada penelitian-penelitian sebelumnya. Mencit dibagi menjadi dua kelompok, yaitu mencit yang diinjeksikan pristane dan mencit yang tidak diinjeksikan pristane sebagai kontrol.

Pristane diinjeksikan sebanyak 0.5 ml secara intraperitoneal. Injeksi hanya dilakukan satu kali setelah itu dilakukan pengamatan berkala pada mencit. Pengambilan sampel untuk pengukuran variabel dilakukan pada minggu ke-8, 16, 24, dan 32.<sup>8</sup>

Pengambilan sampel untuk pengukuran variabel dilakukan pada minggu ke-2, ke-4, ke-6, dan ke-8. Sebelum dilakukan pembedahan, mencit dimasukkan ke dalam toples yang sudah berisi kapas dan *cloroform*. Setelah mencit tidak

sadar kemudian mencit diposisikan terlentang di papan bedah, tangan dan kakinya ditusuk jarum pentul agar tidak bergeser saat proses pembedahan berlangsung. Sampel darah mencit berasal dari darah jantung mencit diambil menggunakan Spuit 1cc.

Pengukuran kadar ANA serum diukur menggunakan metode ELISA. Serum diambil pada minggu ke-8, 16, 24, dan 32 paska injeksi pristane untuk menilai tren perkembangan ANA serum setelah injeksi pristane. Tes kadar ANA diperiksa melalui sampel darah yang diambil di jantung. Selanjutnya kemudian dilakukan *pipeting* 100 $\mu$ l sampel darah untuk didilusi. Sampel yang sudah didilusi kemudian diletakkan pada *plate*, tambahkan 50 $\mu$ l *Biotin-conjugated Coating* permukaan *plate* lalu inkubasi selama 2 jam pada suhu ruangan dengan kecepatan 400 rpm. *Washing plate* sebanyak 5 kali dengan *wash buffer* kemudian tambahkan 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP dan lapis permukaan. Inkubasi kembali setelah itu *washing plate* sebanyak 5 kali. Tambahkan 100 $\mu$ l *TMB Substrate Solution* lalu inkubasi selama 30 menit. Tambahkan 100 $\mu$ l *Stop Solution* dan dibaca pada panjang gelombang 450nm.

Data diperoleh pada minggu ke-8, 16, 24, dan 32 paska injeksi pristane setelah dilakukan pembedahan pada periode waktu tersebut. Setiap periode akan dikumpulkan darah dari jantung mencit untuk dilakukan pengukuran variabel. Data akan dibandingkan hasilnya pada setiap periode waktu untuk menentukan perjalanan penyakit LES pada tiap periodenya.

Data dianalisis dengan cara membandingkan setiap periode waktu dan antar perlakuan. Uji homogenitas dan normalitas data. Serta uji

perbandingan dilakukan dengan uji Kruskal Wallis dan uji Man Whitney. Analisa data menggunakan program *SPSS 16 for Windows*.

## HASIL PENELITIAN

Penelitian yang dilaksanakan di laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya ini bertujuan untuk mengetahui efek pemberian pristane terhadap kadar ANA pada serum hewan coba mencit Balb/c. Mencit yang digunakan dalam penelitian ini strain Balb/c betina yang mendapat sertifikat dari Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Surabaya. Sebelum penelitian dilaksanakan aklimatisasi dilakukan untuk mengadaptasikan mencit dengan lingkungan laboratorium agar hewan coba tidak stress saat dilakukan perlakuan. Aklimatisasi dilakukan selama tujuh hari di Laboratorium Farmakologi FKUB. Selama proses penelitian mencit diberikan pakan, minum, dan penggantian sekam secara rutin sesuai standar laboratorium Farmakologi FKUB.

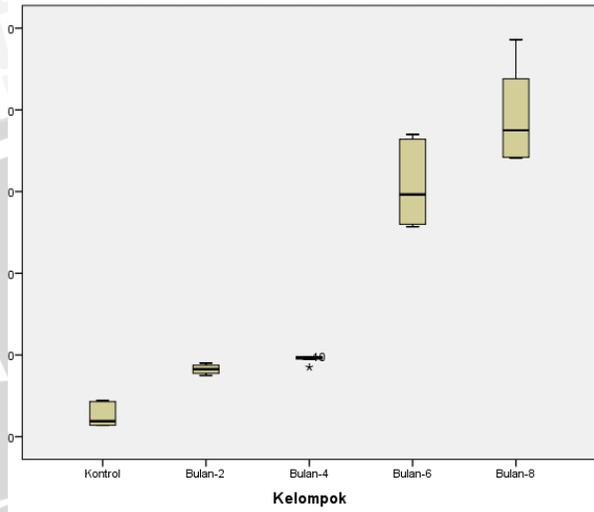
Selama pengamatan delapan bulan di Laboratorium, terdapat beberapa mencit yang mati, dan tidak memenuhi kriteria inklusi, yaitu mencit yang tidak mau makan dan terlalu kurus. Sehingga mencit yang terlibat pada penelitian ini adalah 24 mencit. Pengelompokan mencit diberi kode P0, untuk kelompok mencit sehat atau tanpa induksi pristane sedangkan, P1 untuk mencit yang diobservasi selama 8 minggu setelah injeksi pristane 0,5 ml intraperitoneal, P2 untuk mencit yang diobservasi selama 16 minggu setelah injeksi pristane 0,5 ml intraperitoneal, P3 untuk mencit yang diobservasi selama 24 minggu setelah injeksi pristane 0,5 ml intraperitoneal, P4 untuk mencit yang diobservasi selama 32 minggu setelah injeksi pristane 0,5 ml intraperitoneal,

Selama pengamatan, terdapat dua mencit yang mengalami gejala klinis bulu rontok, yaitu satu mencit pada kelompok induksi pristane empat bulan dan satu mencit pada kelompok induksi pristane enam bulan. Mencit ini dimasukkan ke dalam populasi sampel, karena masih memenuhi kriteria inklusif. Selain itu ditemukan juga satu mencit yang mengalami deformitas sendi pada kaki belakang bagian kiri.

**Tabel 5.1 Manifestasi Klinis Sampel Penelitian**

Manifestasi Klinis	Presentase N=24
Ruam Kulit	5/24 (20.8%)
Artritis	18/24 (75%)
Proteinuria (>500mg/dl)	5/24 (20.8%)
Ascites	5/24 (20.8%)
Alopesia (Bulu Rontok)	2/24 (8.3%)

Pemeriksaan kadar ANA serum mencit dilakukan untuk menentukan apakah mencit yang diinduksi pristane memiliki penanda terjadinya LES, karena kadar ANA merupakan salah satu penanda terjadinya autoimun pada manusia, dimana LES merupakan salah satu penyakit autoimun. Serum mencit dikumpulkan dan dilakukan pemeriksaan ELISA di Laboratorium Kawi dengan didapatkan hasil seperti tabel berikut:



**Gambar 5.4 Perbandingan Kadar Serum ANA**

Uji normalitas kadar ANA pada mencit Balb/c setelah diinduksi oleh pristane dilakukan menggunakan Kolmogorov-Smirnov. Diketahui bahwa pengujian normalitas menghasilkan statistik *Kolmogorov-Smirnov* sebesar 1.513 dengan probabilitas sebesar 0.018. Hal ini dapat diketahui bahwa pengujian tersebut menghasilkan probabilitas < alpha (0,05) sehingga data kadar ANA pada mencit Balb/c setelah diinduksi oleh pristane dinyatakan tidak normal.

Pengujian homogenitas data kadar ANA pada mencit Balb/c setelah diinduksi oleh pristane dilakukan menggunakan *Levene Test*. Bahwa pengujian kehomogenan data menghasilkan statistik *Levene* sebesar 9.826 dengan probabilitas sebesar 0.000. Hal ini dapat dikatakan bahwa pengujian tersebut menghasilkan probabilitas < alpha (0,05), sehingga data kadar ANA pada mencit Balb/c setelah diinduksi oleh pristane dinyatakan memiliki ragam yang tidak homogen.

Pengujian pengaruh pemberian pristane pada mencit Balb/c terhadap kadar ANA dilakukan menggunakan *Kruskal Wallis* dengan hipotesis berikut ini:

H0 : Tidak ada perbedaan pengaruh yang signifikan pristane pada mencit Balb/c terhadap kadar ANA

H1 : Minimal ada satu pasang pemberian pristane pada mencit Balb/c terhadap kadar ANA yang berbeda signifikan.

Kriteria pengujian menyebutkan apabila probabilitas  $\leq$  level of significance ( $\alpha=0,05$ ) maka H0 ditolak, sehingga dapat dinyatakan bahwa minimal ada satu pasang kelompok dengan perlakuan pemberian pristane pada mencit Balb/c terhadap kadar ANA yang berbeda signifikan.

Dari hasil pengujian pengaruh pemberian pristane pada mencit Balb/c terhadap kadar ANA menghasilkan statistik uji *Chi-Square* sebesar 23.106 dengan probabilitas sebesar 0.000. Hal ini dapat diketahui bahwa probabilitas  $<$   $\alpha$  (0,05), sehingga H0 ditolak. Oleh karena itu, dapat dinyatakan bahwa minimal ada satu pasang pemberian pristane pada mencit Balb/c terhadap kadar ANA yang berbeda signifikan.

Hasil pengukuran kadar ANA dari darah mencit model lupus yang diinduksi dengan pristane. Secara keseluruhan hasil pengukuran kadar ANA mengalami peningkatan yang signifikan pada minggu ke-8 hingga minggu ke-32 dan meningkat secara signifikan terhadap kontrol. Kadar ANA pada minggu ke-8 lebih tinggi terhadap kontrol ( $2.68 \pm 1.54$  ng/ml vs  $8.25 \pm 0.65$  ng/ml;  $p=0.014$ ), lebih tinggi pada minggu ke-16 ( $9.48 \pm 0.49$  ng/ml;  $p=0.006$ ), semakin tinggi pada minggu ke-24 ( $30.80 \pm 4,95$  ng/ml;  $p=0.006$ ), dan minggu ke-32 ( $39.64$

$\pm 6.37$  ng/ml;  $p=0.009$ ) (Tabel 5.3). Hasil analisis di atas menginformasikan bahwa pemberian pristane pada mencit Balb/c dapat meningkatkan kadar ANA dibuktikan dengan peningkatan kadar ANA dimulai dari pembedahan minggu ke-8 hingga minggu ke-32.

## PEMBAHASAN

Pengamatan perubahan kondisi pada hewan coba ditemukan mengalami bulu rontok (*alopecia*), deformitas sendi, ruam kulit, proteinuria (500mg/dl) yang semakin meningkat pada minggu ke-32. Ditemukan beberapa hewan coba yang mengalami *ascites* atau penumpukan cairan di rongga peritoneum saat dilakukan pembedahan minggu ke-16 dan ke-32. Cairan kental yang keluar berwarna putih kekuningan dengan volume kurang lebih 5cc, sehingga pada saat sebelum pembedahan hewan coba tampak seperti sedang hamil.

Pada penelitian ini, gejala klinis artritis mulai tampak pada minggu ke-8 setelah injeksi *pristane* dan mengalami peningkatan yang signifikan sampai minggu ke-32. Serta ditemukan 75% mencit mengalami artritis selama penelitian. Pengamatan arthritis pada mencit dapat dilakukan dengan metode visual arthritis skor, dengan total skor 60 untuk tiap mencitnya. Dengan rincian, skor 5 diberikan apabila sendi *wrist* dan *ankle* mengalami pembengkakan dan skor 1 diberikan di setiap interphalangeal yang mengalami pembengkakan.<sup>9</sup> Pada penelitian terdahulu telah dijelaskan bahwa gejala klinis artritis mulai tampak pada minggu ke-12 setelah injeksi *pristane* intraperitoneal.<sup>10</sup> Hasil penelitian tersebut tidak jauh berbeda dengan penelitian yang saat ini dilakukan. Jika dibandingkan

dengan penelitian terdahulu, gejala klinis artritis muncul lebih awal pada penelitian ini.

Pada penelitian lain menggunakan hewan coba *strain* mencit *New Zealand Mixed Mice* (MRL), didapatkan pada *strain* MRL/Mp-lpr/lpr presentasi manifestasi klinis artritis yaitu 75% , dermatitis 50%, vaskulitis 56%. Pada mencit *strain* MRL/Mp-+/+ presentasi manifestasi klinis artritis yaitu 75%, vaskulitis 8%.<sup>11</sup> Pada mencit *strain* BXSB dan *New Zealand Mice* (NZB/BL) didapatkan manifestasi klinis nefritis yang lebih dominan. Jika dibandingkan dengan penelitian terdahulu, presentasi manifestasi klinis artritis sama pada penelitian ini.

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun kronis dan kompleks.<sup>12</sup> Ditemukan banyak macam autoantibodi yang terdapat pada pasien LES, *antinuclear antibody* (ANA) adalah autoantibody yang sering ditemukan pada pasien LES.<sup>13</sup> ANA merupakan salah satu kriteria imunologis yang menunjukkan keparahan (*severity*) LES. Pengujian kadar ANA bersifat sensitif tetapi tidak spesifik. Kadar ANA yang tinggi menandakan tingkat keparahan LES juga tinggi.

Pada penelitian ini, pengukuran kadar ANA dilakukan mulai minggu ke-8 setelah induksi pristane hingga minggu ke-32. Didapatkan hasil kadar ANA mengalami peningkatan signifikan pada minggu ke-8,16,24,32 dengan kelompok kontrol sehat ( $p=0.014$ ,  $p=0.006$ ,  $p=0.006$ , dan  $p=0.009$  secara berurutan). Berdasarkan hal diatas, dapat dikatakan bahwa induksi pristane mampu meningkatkan kadar ANA yang juga mempengaruhi peningkatan keparahan LES. Sehingga, induksi pristane pada mencit BALB/c telah dapat membuat mencit mengalami lupus.

Pada penelitian lain juga menyebutkan terjadi peningkatan kadar ANA mencit balb/c dengan induksi pristane 0,5ml intraperitoneal mulai minggu ke-12 dan ke-16. Selanjutnya pada minggu ke-32 tingkat kejadiannya mencapai 87,5%.<sup>14</sup>

Induksi pristane secara intraperitoneal memiliki hubungan dengan peningkatan kadar ANA di serum mencit. Kadar pristane dengan jumlah signifikan yang bertahan lama dalam rongga peritoneal menyebabkan apoptosis pada sel-sel pada berbagai organ di peritoneal.<sup>15</sup> Proses tersebut menghasilkan autoantigen/*apoptotic body* yang menginduksi sinyal pembentukan sitokin-sitokin inflamasi yang menandai pembentukan suatu sindrom imunitas.<sup>16</sup> Autoantigen yang ditangkap oleh *Antigen Presenting Cell* (APC) tersebut menginduksi aktivasi sel B dan sel T. Hal ini menginduksi APC menghasilkan *Toll Like Receptor* (TLR) 7/8 dan 9 yang menginduksi peningkatan ekspresi gen IFN tipe 1. Peningkatan ekspresi IFN tipe 1 tersebut meningkatkan ekspresi IFN  $\alpha$  dan  $\beta$ . Hal ini menyebabkan sel B menjadi autoreaktif secara langsung maupun tidak langsung. Sel B yang autoreaktif tersebut membentuk suatu kompleks imun yang akhirnya akan menyebabkan kerusakan jaringan dan menyisakan debris. Debris tersebut akan kembali ditangkap oleh APC dan kembali menginduksi aktivasi sel B, ini terjadi secara terus menerus.

Pada penyakit LES terjadi akumulasi *apoptotic body* yang memicu sekuel dari fenomena autoimun.<sup>17</sup> Hal ini diperberat dengan terjadinya gangguan proses *clearance* terhadap adan apoptosis jaringan. Makrofag merupakan salah satu APC yang memiliki peranan penting terhadap proses *clearance* tersebut. Telah diketahui pada penelitian sebelumnya bahwa pada pasien LES didapatkan peningkatan sel

*Polymorphonuclear* (PMN) apoptosis dan makrofag namun peningkatan tersebut tidak diikuti dengan kemampuan makrofag dalam mekanisme *clearance* dengan baik.<sup>18</sup> Beberapa penelitian lain juga ditemukan penurunan kemampuan makrofag atau monosit tersebut melibatkan ekspresi protein permukaan, produksi sitokin dan kapasitas fagositosis namun mekanisme yang mendasari hal-hal tersebut belum sepenuhnya diketahui.<sup>19</sup> Berdasarkan hal diatas, dapat dikatakan bahwa induksi pristane mampu mempengaruhi tingginya kadar ANA yang juga mempengaruhi peningkatan keparahan LES melalui sel B yang autoreaktif serta penurunan fungsi dari makrofag.

Setelah berhasil menguji hipotesis dengan taraf signifikansi tertentu, maka bahasan selanjutnya adalah ukuran efek (*Effect Size*). Ukuran efek adalah besarnya efek yang ditimbulkan oleh parameter yang diuji di dalam pengujian hipotesis.

Rumus Cohen's d type effect size :

$$\frac{\text{Rerata kelompok kontrol} - \text{Rerata kelompok perlakuan}}{\text{Standar Deviasi kelompok kontrol}}$$

Interpretasi Cohen's d type effect size :

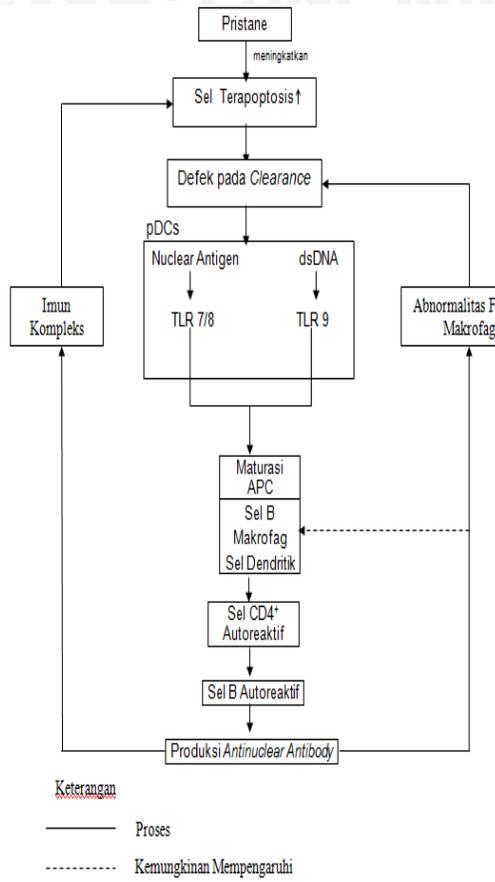
0.2-0.5 : Kecil

0.5-0.8 : Sedang

> 0.8 : Besar

Hasil data statistik menyebutkan bahwa data sampel yang didapat tidak homogen karena jumlah sampel penelitian (n) yang sedikit. Dari hasil interpretasi *Cohen's d type effect size* didapatkan bahwa  $d > 0.8$  sehingga hasil penelitian bermakna. Didukung dengan adanya manifestasi klinis pada mencit balb/c yang diinjeksikan dengan pristane.

Induksi pristane secara intraperitoneal pada mencit mengakibatkan apoptosis sel di mesenkim pada organ peritoneal. Akumulasi dari badan apoptosis mengandung berbagai macam *self antigen*. Makrofag merupakan salah satu sel yang berperan dalam proses *clearance* dari badan apoptosis di jaringan. Oleh karena itu makrofag memiliki peranan penting terhadap patogenesis penyakit LES. Pada orang penderita LES mengalami gangguan dari jumlah dan fungsi makrofag. Beberapa penelitian menyebutkan bahwa terdapat peningkatan jumlah makrofag namun hal ini diikuti dengan penurunan fungsi dari makrofag terhadap proses *clearance* itu sendiri (Gambar 6.1). Namun penelitian terbaru belum mengetahui secara pasti bagaimana proses penurunan fungsi dari makrofag terhadap proses *clearance* itu sendiri.<sup>20</sup> Pengaruh dari banyaknya hasil pembentukan imun kompleks yang diproduksi oleh sel B autoreaktif meningkatkan sel terapoptosis di mesenkim pada organ peritoneal yang memperberat proses *clearance* oleh makrofag (Gambar 6.1). Dengan adanya abnormalitas dari fungsi makrofag itu sendiri dan meningkatnya jumlah sel terapoptosis hal tersebut menyebabkan peningkatan yang sangat signifikan dari kadar ANA di serum mencit dari minggu ke-4 hingga minggu ke-32. Proses inilah yang berlangsung secara terus menerus sehingga membentuk suatu siklus tanpa akhir yang memperberat manifestasi klinis dari patogenesis LES dari waktu ke waktu.



**Gambar 6.1 Bagan Mekanisme Pristane Dalam Menginduksi Pembentukan ANA**

**KESIMPULAN**

1. Induksi pristane pada mencit balb/c secara intraperitoneal dapat meningkatkan kadar ANA serum.
2. Peningkatan kadar ANA secara signifikan terjadi pada minggu ke-8,16,24 dan ke-32 terhadap kontrol.

**SARAN**

1. Untuk penelitian selanjutnya, sebaiknya dilakukan pengamatan pada sel Th 2, sel Th17, Treg dan

sel B bahwa induksi pristane dapat menyebabkan mencit Balb/C model LES pada waktu yang tepat.

2. Melakukan penelitian lain dengan membandingkan klinis imunologis pada hewan coba model induksi pristane dan induksi senyawa, serum, atau antigen lainnya.

**DAFTAR PUSTAKA**

1. Shakra, M.A. 2008. Do improved survival rates of patients with systemic lupus erythematosus reflect a global trend?. *The Journal of Rheumatology*. 35: 1906-1908
2. Kalim, H. 2000. Gambaran Klinik dan Harapan Hidup Penderita Lupus Eritematosus Sistemik (SLE). *Majalah Kedokteran Indonesia*, 46: 383-384.
3. Mok, C.C., Lau, C.S, 2003. *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *J ClinPathol*, 56:481-490
4. Hau, J. dan Hoosier, G.I. 2003. *Handbook of Laboratory Animal Science Second Edition*. Boca Raton: CRC Press. p.539-542
5. Perry, D., Sang, A., Vin, Y., Zheng, Y., dan Morel, L. 2011. Murine Models Of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, ID 271694: 1-9
6. Leiss H<sup>1</sup>, Niederreiter B, Bandur T, Schwarzecker B, Blüml S, Steiner G, Ulrich W, Smolen JS, Stummvoll GH. Pristane-Induced Lupus As A Model Of Human Lupus Arthritis: Evolvment Of Autoantibodies, Internal Organ And

- Joint Inflammation. NCBI, *Lupus*. 2013 Jul;22(8):778-92. doi:10.1177/0961203313492869.
7. Minhas, U; P Das dan A Bhatnagar. 2011. Role of reactive intermediates in the immunopathogenesis of the pristane-induced Balb/c model of lupus 20, 1421–1425.
  8. Chowdhary, V.R., Grande, J.P., Luthra, H.S., David, C.S. 2007. *Characterization of haemorrhagic pulmonary capillaritis: another manifestation of Pristane induced lupus*. *Rheumatology*, 46(9): 1405-1410
  9. Bas DB, Sue J, Sandor K, Agalave NM, Lundberg J, Codeluppi S, et al. 2012. Collagen Antibody-Induced Arthritis Evokes Persistent Pain With Spinal Glial Involvement and Transient Prostaglandin Dependency. *American College of Rheumatology*, vol. 64 No. 12 Desember 2012, pp 3886-3896
  10. Leiss H<sup>1</sup>, Niederreiter B, Bandur T, Schwarzecker B, Blüml S, Steiner G, Ulrich W, Smolen JS, Stummvoll GH. Pristane-Induced Lupus As A Model Of Human Lupus Arthritis: Evolvement Of Autoantibodies, Internal Organ And Joint Inflammation. NCBI, *Lupus*. 2013 Jul;22(8):778-92. doi: 10.1177/0961203313492869.
  11. Wallace, Daniel J. 2006. The Clinical Presentation of Systemic Lupus Erythematosus; Differential Diagnosis and Disease Association. In: Wallace, Daniel J, Hahn, Bebra Hannahs. *Dubois' Lupus Erythematosus 7th ed*. California: Lippincott Williams & WalkinsYang et al., 2011
  12. Zhou, H., Beevers, C.S., Huang, S. 2011. Targets Of Curcumin. *Curr Drug Targets*, 12(3): 332-47
  13. Wallace J. and Hannah Bevra.,2013. *Dubois' Lupus Erythematosus And Related Syndromes*, Volume 8, Elsevier Saunders, Philadelphia, p.281.
  14. Cui, G.M., Liu, G., Liu, W., Kan, B., Mao, Y.Q., Wei, Y.Q. Experimental Study Of Pristane-Induced Murine Lupus Model. *Sichuan Da XueXueBao Yi Xue Ban*, 2006,37(2): 309-312
  15. Calvani N<sup>1</sup>, Caricchio R, Tucci M, Sobel ES, Silvestris F, Tartaglia P, Richards HB. 2005, Induction Of Apoptosis By The Hydrocarbon Oil Pristane: Implications For Pristane-Induced Lupus. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4777-82.
  16. Calvani N<sup>1</sup>, Caricchio R, Tucci M, Sobel ES, Silvestris F, Tartaglia P, Richards HB. 2005, Induction Of Apoptosis By The Hydrocarbon Oil Pristane: Implications For Pristane-Induced Lupus. *J Immunol*. 2005 Oct 1;175(7):4777-82.
  17. Rottman, J.B. Willis, C.R. 2010. *Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis*. *Veterinary Pathology*, 47(4): 4664-4676
  18. Cui, G.M., Liu, G., Liu, W., Kan, B., Mao, Y.Q., Wei, Y.Q. Experimental Study Of Pristane-Induced Murine Lupus Model. *Sichuan Da XueXueBao Yi Xue Ban*, 2006,37(2): 309-312
  19. Lee YH, Woo JH, Choi SJ, Ji JD, Song GG. Induction And Maintenance Therapy For Lupus Nephritis: A Systematic Review And Meta-Analysis. *Lupus*. 2010;19:703–710

20. Westley H., Pui Y., dan Wes Y.  
Monocyte and Macrophage  
Abnormalities in Systemic Lupus  
Erythematosus. *Arch Immunol Ther  
Exp (Warsz)*. 2010 October ; 58(5):  
355–364.

Pembimbing I

Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, SpPK

NIP. 195603311988022001

