

**STUDI EKSPLORASI TIKUS PUTIH INDUKSI STREPTOZOTOCIN  
YANG DIINFEKSI *Staphylococcus aureus* TERHADAP  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL DAN  
JUMLAH SEL RELATIF IFN- $\gamma$  LIMPA**

**SKRIPSI**

Oleh:  
**RENALDI LINTANG DWI UTOMO**  
155130100111059



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2019**

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

**STUDI EKSPLORASI TIKUS PUTIH INDUKSI STREPTOZOTOCIN  
YANG DIINFEKSI *Staphylococcus aureus* TERHADAP  
GAMBARAN HISTOPATOLOGI GINJAL DAN  
JUMLAH SEL RELATIF IFN- $\gamma$  LIMPA**

Oleh:

**RENALDI LINTANG DWI UTOMO  
155130100111059**

Pembimbing I

Pembimbing II

**Edwin Widodo, S.Si, M. Sc, P.hd**  
NIP. 19810504 20050 1 001

**drh. Dahliatul Qosimah, Mkes**  
NIP. 19820127 2015 04 2 001

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan  
Universitas Brawijaya

**Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App., Sc**  
NIP. 19631216 198803 1 002

## LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Renaldi Lintang Dwi Utomo

NIM : 155130100111059

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulisan Skripsi berjudul:

Studi Eksplorasi Tikus Putih Induksi Streptozotocin Yang Di infeksi *Staphylococcus aureus* Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$  Limpa.

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, ain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini.
2. Apabila dikemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya akan bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 30 April 2019

Yang menyatakan,

(Renaldi Lintang Dwi Utomo)

NIM. 155130100111059

## Studi Eksplorasi Tikus Putih Induksi Streptozotocin Yang Di infeksi *Staphylococcus aureus* Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan Jumlah sel relatif IFN- $\gamma$ Limpa

### ABSTRAK

Diabetes Mellitus (DM) adalah gangguan metabolisme yang disebabkan karena sel beta dalam pulau langerhans pankreas tidak dapat menghasilkan insulin atau mengalami defisiensi insulin sehingga gula darah meningkat (hiperglikemia). Kondisi DM yang berlangsung lama dapat menyebabkan komplikasi ke berbagai organ akibat hiperglikemia yang muncul dan peningkatan radikal bebas. Infeksi *S. aureus* pada penderita diabetes dapat memperparah kondisi DM dengan menghambat fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi-inflamasi, sehingga akan menghambat respon imun ketika ada antigen masuk. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi streptozotocin dan *S. aureus* terhadap gambaran histopatologi ginjal dan jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  limpa pada tikus putih. Tikus (*Rattus norvegicus*) model DM dihasilkan dengan pemberian *single high-dose* streptozotocin 45 mg/kg BB sebanyak satu kali secara intraperitoneal. Dua puluh ekor tikus dibagi menjadi lima kelompok tikus, yaitu kontrol negatif (kelompok sehat), kontrol positif (tikus induksi *S. aureus*  $10^8$  CFU/mL), dan kelompok perlakuan 1, perlakuan 2, perlakuan 3 yang diinduksi STZ dan *S. aureus* dengan konsentrasi masing-masing  $10^5$ ,  $10^6$  dan  $10^7$  CFU/mL melalui intraperitoneal. Parameter yang digunakan adalah gambaran histopatologi ginjal dengan pewarnaan *hematoksin-eosin* dan jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  limpa dengan uji *flowcytometer*. Analisis data gambaran histopatologi ginjal dilakukan secara diskritif kualitatif yaitu glomelurus dan tubulus proksimal, sedangkan analisis data jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  dengan uji *One Way ANOVA* dan uji lanjutan *Tukey* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi DM dengan infeksi *S. aureus* dapat dapat merusak gambaran histopatologi ginjal dan meningkatkan produksi sitokin IFN- $\gamma$  limpa. Kesimpulan penelitian ini adalah kondisi DM dengan infeksi bakteri dapat meningkatkan kerusakan histopatologi ginjal dan menghambat sistem imun.

**Kata kunci** : Diabetes Mellitus, *Staphylococcus aureus*, Sitokin Proinflamasi, Ginjal

**Studi Eksplorasi Tikus Putih Induksi Streptozotocin Yang Diinfeksi  
*Staphylococcus aureus* Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan  
Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$  Limpa**

**ABSTRACT**

Diabetes Mellitus (DM) is a metabolic disorder caused by beta cells in the island of cell langerhans failed to produce insulin, which lead to insulin deficiency and increasing of blood sugar level (hyperglycemia). Prolonged condition of DM can lead to various organs complications due to hyperglycemia and increased production of Reactive Oxygen Species (ROS). *S. aureus* infection in diabetics can aggravate the condition of DM by inhibiting the immune response when antigens enter. The purpose of this study was to determine the effect of combination streptozotocin and *S. aureus* infection on the liver histopathology and the relative levels of IFN- $\gamma$  in the of *Rattus norvegicus*. This research was an experimental using Completely Randomized Design (CRD) consisting of five groups, which were negative control, positive control (infected with *Staphylococcus aureus*  $10^8$  CFU/mL), and three groups of diabetes mellitus with bacterial infection (streptozotocin induced at a dose of 45mg/kg BW and infected with multilevel *S. aureus*  $10^5$ ,  $10^6$ , and  $10^7$  CFU/mL). Intraperitoneal injection of single high dose streptozotocin on the eighth day, measurement of blood glucose level on the tenth day followed by intraperitoneal injection of *S. aureus*. Renal histopathology stained using Hematoxylin-Eosin (HE) and measurement relative levels of IFN- $\gamma$  using flowcytometry. Data analysis of renal histopathology was carried out in a qualitative discrete manner, namely glomerulus and proximal tubules, while data analysis of relative cell numbers of IFN- $\gamma$  with One Way ANOVA test and Tukey advanced test with a confidence level of 95% ( $\alpha = 0.05$ ). The results of this study indicate that DM conditions with *S. aureus* infection can damage the renal histopathological and increase the production of IFN- $\gamma$  splenic cytokines. The conclusion of this study is that DM with bacterial infection can increase renal histopathological damage and inhibit the immune system.

**Keywords :** Diabetes Mellitus, *Staphylococcus aureus*, Proinflammatory Cytokines, Renal histopatology

## KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan yang Maha Esa atas berkat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyusun laporan tugas akhir yang berjudul **“Studi Eksplorasi Tikus Putih Induksi Streptozotocin Yang Diinfeksi *Staphylococcus aureus* Terhadap Gambaran Histopatologi Ginjal Dan Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$  Limpa”** sebagai syarat kelulusan menjadi Sarjana Kedokteran Hewan.

Laporan skripsi ini disusun berdasarkan diskusi dengan berbagai pihak serta literatur yang penulis baca dari beberapa referensi. Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

1. Edwin Widodo S.Si, M.Sc, Ph.D dan drh. Dahliatul Qosimah, M.kes selaku dosen pembimbing yang telah menyisihkan waktunya untuk membimbing penulis pada saat penulisan proposal ini.
2. drh. Rahadi Swastomo, M. Biomed, Dhita Evi Aryani, S.Farm, Apt., M.Farm.Klin dan drh. Nofan Rickyawan, M.Sc selaku dosen penguji atas segala ilmu, dukungan, serta saran dan masukan dalam penyempurnaan penulisan tugas akhir ini.
3. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.
4. Ayah, Ibu, Kaka, Adik, Budhe, Nenek, dan keluarga besar tercinta yang selalu memberi kasih sayang, dorongan, dukungan dan doa untuk

menyelesaikan studi penulis serta perhatiannya akan kebutuhan penulis baik secara moril maupun materi.

5. Keluarga besar Utomo yang telah menjadi keluarga untuk selamanya.
6. Rekan seperjuangan skripsi Hasan, Sofines, Adin, dan Gian untuk waktu dan inspirasi yang diberikan untuk penulis.
7. Seluruh dosen dan civitas akademika yang telah membimbing, memberikan ilmu, dan mewadahi penulis selama menjalankan studi di Program Studi Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.

Penulis sadar bahwa penelitian ini masih jauh dari sempurna. Penulis berharap penelitian ini dapat bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi pembaca untuk itu saran yang membangun sangat penulis harapkan.

Penulis



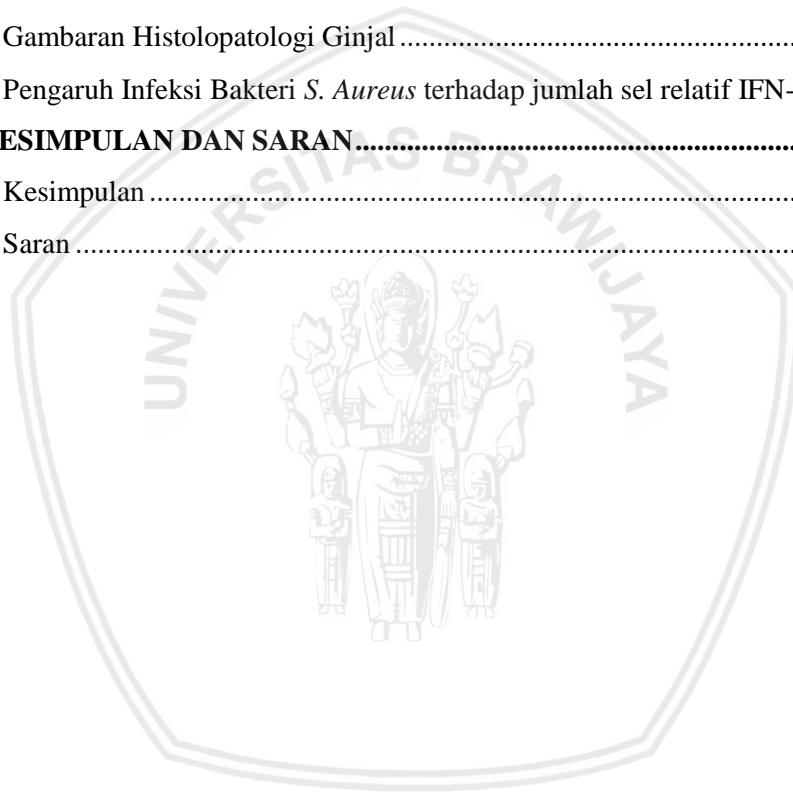
## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN JUDUL .....</b>	<b>i</b>
<b>LEMBAR PENGESAHAN .....</b>	<b>ii</b>
<b>LEMBAR PERNYATAAN .....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRAK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR ISI .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL.....</b>	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>	<b>xii</b>
<b>BAB 1 PENDAHULUAN .....</b>	<b>1</b>
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah .....	4
1.4. Tujuan Penelitian .....	5
1.5. Manfaat Penelitian .....	5
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA .....</b>	<b>6</b>
2.1 <i>Rattus norvegicus</i> Galur Wistar.....	6
2.2 Diabetes Melitus .....	7
2.3 Streptozotocin (STZ) .....	8
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
2.5 Histologi Ginjal.....	11
2.6 Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ).....	13
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN .....</b>	<b>15</b>
3.1. Kerangka Konsep.....	15
3.2. Hipotesis Penelitian .....	18
<b>BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....</b>	<b>19</b>
4.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	19
4.2. Alat dan Bahan.....	19
4.3. Rancangan Penelitian.....	20
4.4. Prosedur Penelitian .....	21
4.4.1 Rancangan Penelitian.....	21
4.4.2 Persiapan Hewan Coba .....	22





4.4.3	Induksi Streptozotocin .....	22
4.4.4	Induksi <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
4.4.5	Nekropsi.....	23
4.4.6	Flowcytometry .....	23
4.4.7	Pembuatan Histopat Ginjal .....	25
4.4.8	Analisis Data.....	26
<b>BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>		<b>27</b>
5.1.	Hasil Penelitian Tikus Putih Induksi STZ dan Infeksi <i>S. aureus</i> .....	27
5.2.	Gambaran Histopatologi Ginjal .....	28
5.3.	Pengaruh Infeksi Bakteri <i>S. Aureus</i> terhadap jumlah sel relatif IFN- $\gamma$ .....	34
<b>BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>		<b>38</b>
6.1.	Kesimpulan .....	38
6.2.	Saran .....	38



## DAFTAR GAMBAR

<b>Gambar</b>	<b>Halaman</b>
2.1 <i>Rattus norvegicus</i> .....	7
2.2 Struktur streptozotocin.....	8
2.3 Struktur histologi ginjal.....	11
3.1 Kerangka konseptual penelitian .....	15
5.1 Gambaran histopatologi ginjal.....	29



## DAFTAR TABEL

<b>Tabel</b>	<b>Halaman</b>
5.1 Perbedaan Jumlah Sel Antar Kelompok Perlakuan.....	29
5.2 Rata-rata Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$ .....	34



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran		Halaman
1	Laik etik .....	44
2	Kerangka Operasional.....	45
3	Pembuatan Preparat Histopatologi Ginjal.....	46
4	Prosedur <i>Flowcytometry</i> .....	47
5	Perhitungan Dosis.....	48
6	Pembuatan Suspensi Bakteri <i>S. aureus</i> .....	49
7	Identifikasi <i>Staphylococcus aureus</i> .....	50
8	Data Hasil Pemeriksaan Nilai Fisiologis.....	53
9	Hasil Streak Organ pada Media NAP.....	61
10	Uji Statistika Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$ .....	62
11	Perhitungan Presentase IFN- $\gamma$ .....	64
12	Gambaran Histopatologi Pankreas.....	65

## DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN

<b>Simbol/Singkatan</b>	<b>Keterangan</b>
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
DM	Diabetes Mellitus
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
GLUT	<i>Glucose Transporter</i>
IFN- $\gamma$	<i>Interferon Gamma</i>
NO	<i>Nitrit Oxide</i>
O <sub>2</sub>	Oksigen
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>
RAGEs	<i>Receptor for Advanced Glycation End-products</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
STZ	<i>Streptozotocin</i>

## BAB 1 PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Diabetes mellitus (DM) merupakan salah satu penyakit degeneratif yang prevalensinya terus meningkat setiap tahunnya. Penderita DM diproyeksikan akan mengalami peningkatan dari 171 juta pada tahun 2000 menjadi 366 juta pada tahun 2030. Indonesia sendiri memiliki tingkat prevalensi DM tertinggi ke empat setelah India, Cina, dan Amerika Serikat. DM ditandai dengan peningkatan kadar glukosa darah (hiperglikemia) yang disebabkan oleh kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau keduanya (Canivell, 2014)

Selain pada manusia, DM juga dapat menyerang pada hewan peliharaan seperti anjing dan kucing. DM pada kucing menunjukkan karakteristik klinis dan patologis yang sama seperti diabetes tipe-2 pada manusia, sedangkan DM pada anjing banyak ditemukan pada anjing yang telah tua disebabkan karena  $\beta$  yang tidak responsif sehingga produksi insulin tidak maksimal (Niaz dkk., 2018). Terjadi kenaikan laporan kasus DM pada tahun 2011 di Amerika Serikat, pada anjing sebanyak 32% dan kucing sebanyak 16% jika dibandingkan dengan tahun 2006 (Banfield, 2016).

Menurut (Behrend, 2018) faktor risiko terjadinya DM pada anjing dan kucing adalah: obesitas, penyakit lain (misalnya: penyakit ginjal, hyperadrenocorticism, hypertriglyceridemia, hipotiroidisme, pankreatitis),

kehamilan/diestrus dan terapi obat-obatan (misalnya: steroid, progestin, siklosporin).

Kondisi hiperglikemia pada kasus DM disebabkan oleh kelainan regulasi hormon insulin dan glukagon. Kondisi hiperglikemia mengakibatkan terbentuknya AGEs yang dapat meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) sehingga timbul keadaan stres oksidatif. Radikal bebas menginduksi kerusakan jaringan pada ginjal (Wang dkk., 2014).

Pada kasus diabetes melitus, keadaan angiopati menyebabkan penyempitan dan penyumbatan pembuluh darah, termasuk pembuluh darah yang menuju ke ginjal. Plasma darah penderita diabetes mempunyai kekentalan (viskositas) yang tinggi, sehingga aliran darah menjadi lambat. Hal tersebut menyebabkan hantaran oksigen dan nutrisi ke jaringan berkurang dan selanjutnya menyebabkan nekrosis atau kematian sel berbagai organ termasuk ginjal (Kamaliani dkk., 2019).

Infeksi *S. aureus* merupakan salah satu penyebab terjadinya kerusakan ginjal akut. Bakteri *S. aureus* memiliki beragam faktor virulensi, yang mencakup protein-protein permukaan yang berperan dalam perlekatan kuman, enzim-enzim yang menguraikan protein, dan toksin yang merusak sel. Diantara faktor virulensi yang dilepaskan *S. aureus* adalah leukosidin. Leukosidin dihasilkan oleh sebagian besar strain *S. aureus* yang mampu menempel pada leukosit PMN dan makrofag. Leukosidin berperan untuk menginduksi lisinya leukosit. Leukosit dibagi menjadi granulosit dan agranulosit, yang mana granulosit terdiri dari



neutrofil, basofil, dan eosinofil, sedangkan agranulosit terdiri dari monosit dan limfosit (Husna dkk., 2018). Kondisi hiperglikemia dan infeksi *S. aureus* menyebabkan terjadinya inflamasi yang ditandai dengan adanya sitokin proinflamasi. Salah satu sitokin yang muncul akibat kerusakan ginjal adalah IFN- $\gamma$ .

Berdasarkan penelitian yang akan dilakukan diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh infeksi bakteri *S. aureus* terhadap gambaran histopatologi ginjal dan jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  limpa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) hewan induksi streptozotocin sebagai bahan penelitian lanjutan.

### **1.2.Rumusan Masalah**

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan beberapa masalah sebagai berikut:

- 1) Bagaimana pengaruh kombinasi streptozotocin dan *S. aureus* pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*) terhadap perubahan histopat ginjal?
- 2) Bagaimana pengaruh kombinasi streptozotocin dan *S. aureus* pada tikus putih (*Rattus Norvegicus*) terhadap jumlah sel relatif IFN-  $\gamma$  limpa?

### 1.3. Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah dipaparkan, maka penelitian ini dibatasi pada :

- 1) Hewan coba yang digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar 20 ekor, usia 2,5 – 3 bulan dengan berat badan 150- 200 gram yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penggunaan hewan coba telah lolos sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya (KEP-UB) dengan no. 973-KEP-UB. **(Lampiran.1)**
- 2) Pembuatan tikus diabetes melitus menggunakan *single high dose* Streptozotocin yang diberikan secara intraperitoneal dengan dosis 45 mg/kg BB.
- 3) *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selanjutnya dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan konsentrasi yang telah ditentukan nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometri, yaitu dengan nilai absorbansi  $0,6 \times 10^8$  CFU/mL. selanjutnya dilakukan pengenceran suspensi bakteri menjadi  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$  CFU/mL dengan dosis yang diberikan 0,2 mL/ekor tikus melalui intraperitoneal dengan mempertahankan prinsip aseptik.
- 4) Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah histopatologi ginjal dengan menggunakan pewarnaan *hematoxyline eosin* dan jumlah sel relatif IFN-  $\gamma$  pada organ limpa dengan menggunakan *flowcytometry*.

#### 1.4. Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang penelitian, maka tujuan penelitian ini adalah:

- 1) Mengetahui pengaruh infeksi *S. aureus* pada tikus putih induksi streptozotocin terhadap gambaran histopatologi ginjal pada tikus putih.
- 2) Mengetahui pengaruh infeksi *S. aureus* pada tikus putih induksi streptozotocin terhadap jumlah sel relatif IFN-  $\gamma$  limpa pada tikus putih.

#### 1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian yang akan dilakukan adalah mampu memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh infeksi *Staphylococcus aureus* terhadap gambaran histopatologi ginjal dan jumlah sel relatif Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ ) limpa pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin.

## BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Rattus norvegicus* Galur Wistar

Tikus Wistar adalah salah satu hewan coba yang paling banyak digunakan sebagai model dalam penelitian. Taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) adalah sebagai berikut (Sharp, 2013). :

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mamalia
Ordo	: Rodentia
Subordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i>

Terdapat tiga galur tikus putih yang untuk digunakan sebagai hewan percobaan antara lain *wistar*, *long evans* dan *sprague dawley*. Tikus putih memiliki berat 140-500 gram, rata-rata 400 gram. Pejantan biasanya lebih besar dari betina, dengan ciri-ciri moncong tumpul, telinga dan mata kecil, kotoran berbentuk kapsul dengan ukuran 2 cm, usia hidup 5-12 bulan, bahkan hingga 3 tahun, dewasa dalam usia 2-3 bulan, tiap kelahiran anak 8-12 ekor (Dian, 2010).

Tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus putih galur *wistar* (**Gambar 2.1**) berjenis kelamin jantan dengan berat badan sekitar 150-250 gram.



**Gambar 2.1** *Rattus norvegicus* (Adiyati, 2011)

## 2.2 Diabetes Melitus

DM merupakan suatu kelompok penyakit metabolik dengan karakteristik hiperglikemia yang terjadi karena kelainan sekresi insulin, kerja insulin, atau kedua-duanya (ADA, 2010).

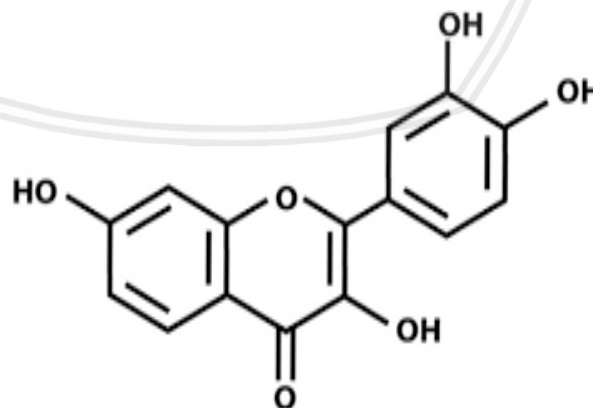
Berdasarkan dari etiologi, DM dikategorikan menjadi tiga tipe, yaitu :

- a. DM tipe 1 disebabkan oleh destruksi sel beta pankreas, umumnya menjurus pada defisiensi insulin absolut, dapat terjadi karena autoimun.
- b. DM tipe 2 disebabkan oleh resistensi insulin, defisiensi insulin relatif, serta defek sekresi insulin disertai resistensi insulin.
- c. DM tipe lain yang antara lain disebabkan oleh defek genetik fungsi beta, defek genetik kerja insulin, penyakit eksokrin pankreas, endokrinopati, pengaruh obat dan zat kimia, infeksi, sebab imunologi yang jarang, dan sindrom genetik lain yang berkaitan dengan DM.

Gejala klinis DM meliputi polifagia, polidipsia, poliuria, dan penurunan berat badan. Gejala klinis hiperglikemia dan glikosuria akan menyebabkan tekanan osmotik di tubuli meningkat dan menghambat reabsorpsi air. Reabsorpsi yang terhambat akan menyebabkan penderita DM mengalami poliuria dan dehidrasi tingkat jaringan. Penderita DM tidak dapat memecah glukosa dalam darah, sehingga akan menggunakan lemak tubuh untuk mengganti energi atau makanan bagi, sehingga akan terjadi ketonemia dan ketonuria serta terlihat kurus (DiPiro, 2005).

### 2.3 Streptozotocin (STZ)

Streptozotocin dari isolasi kultur bakteri *Streptomyces achromogenes*, senyawa ini awalnya digunakan sebagai antibakteri dan antitumor, namun diketahui bahwa Streptozotocin memiliki efek diabetik yang baik (Pathak, 2008).



Gambar 2.2. Struktur streptozotocin (Lenzen, 2008)

Streptozotocin digunakan sebagai induksi diabetes melitus baik tipe I maupun tipe II pada hewan uji karena efektif merusak sel beta pankreas.

Streptozotocin (**Gambar 2.2.**) bekerja langsung pada sel beta pankreas dengan aksi sitotoksiknya dan dimediasi oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS) sehingga dapat digunakan sebagai induksi diabetes melitus. Dosis yang digunakan untuk menginduksi diabetes melitus tipe I adalah 40-60 mg/kg BB secara intravena sedangkan dosis intraperitoneal adalah lebih dari 40 mg/kg BB. Streptozotocin juga dapat diberikan secara berulang, pemberian berulang dapat menggunakan dosis 20 mg/kg BB dengan induksi selama 5 hari berturut-turut (Aulanni'am dkk., 2005).

#### 2.4 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2  $\mu\text{m}$ , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, fakultatif anaerob, tidak membentuk spora, dan tidak bergerak. Bakteri *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida yang berperan dalam virulensi bakteri. Pada mikroskopi bakteri ini terlihat bergerombol seperti buah anggur, warna koloninya kuning keemasan dalam pengamatan pada mikroskop (Karimela, 2017).

Menurut Syahrurachman (2010) klasifikasi *Staphylococcus aureus* adalah:

Domain : Bacteria

Kingdom : Eubacteria

Ordo : Eubacteriales

Famili : Micrococcaceae



Genus : *Staphylococcus*

Spesies : *Staphylococcus aureus*

Bakteri *S. aureus* bersifat koagulasi-positif, yang membedakan dari spesies lainnya. Bakteri *S. aureus* menghasilkan koagulase, suatu protein mirip enzim yang dapat menggumpalkan plasma yang mengandung oksalat atau sitrat. Bakteri *S. aureus* juga memiliki toksin yaitu leukosidin yang dapat membunuh darah putih pada manusia (Jawetz, 2016).

Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri yang terdistribusi secara global yang berpotensi menyebabkan penyakit yang serius dan fatal. Bakteri *S. aureus* dapat menyebabkan penyakit baik melalui kemampuannya untuk berkembang biak dan menyebar luas di jaringan serta dengan cara menghasilkan berbagai substansi ekstraseluler (Jawetz, 2016). Bakteri *S. aureus* memiliki faktor virulensi yang kuat, kemampuan bertahan, dan resistensi antimikrobal (Simor, 2009).

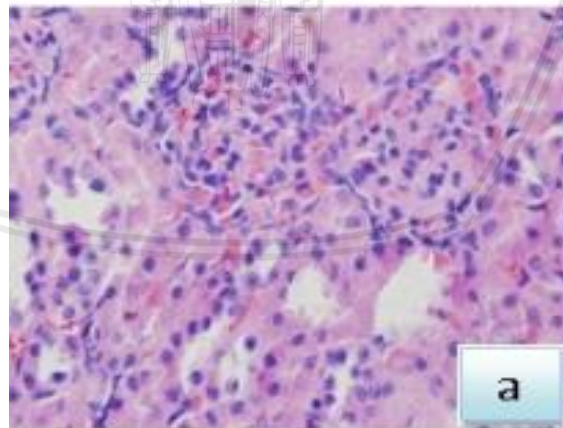
Infeksi *S. aureus* dapat menyebar ke bagian tubuh lain melalui pembuluh getah bening dan pembuluh darah, sehingga terjadi peradangan pada vena, trombosis, bahkan bakterimia. Ginjal merupakan organ penyaring darah, maka apabila terjadi bakterimia, ginjal menjadi salah satu organ yang terkena dampak toksin *S. aureus*. Toksin yang dihasilkan *S. aureus* berupa eksotoksin yang juga menyebabkan kerusakan dengan cara mengganggu membran biologik sel inang. Apabila membran biologik terganggu, maka sel ginjal akan mengalami kerusakan sehingga keseimbangan pengeluaran  $K^+$  dan pemasukan ion  $Na^+$ ,  $Ca_2^+$ , dan air akan

terganggu. Kerusakan membran sel menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah air ke dalam sel sehingga menyebabkan sitoplasma menjadi bengkak (De Leo, 2009).

Kondisi hiperglikemia pada penyakit DM juga dapat menginduksi *imunopresif* dengan mengganggu fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi sel-sel inflamasi yang akan terakumulasi di tempat peradangan (Alves, 2012).

## 2.5 Histologi Ginjal

Unit kerja fungsional ginjal disebut sebagai nefron. Setiap nefron terdiri atas dua komponen, yaitu korpuskulum renal dan tubuli distal (tubulus kontortus proksimal, ansa henle, tubulus kontortus distal dan tubulus koligentes) (Eroschenko, 2010).



Gambar 2.3 Histologi ginjal (Wati dkk, 2013)

Ginjal merupakan organ ekskresi utama, semua proses metabolisme di tubuh akan berakhir dengan proses ekskresi di ginjal. **Gambar 2.3.** menunjukkan gambaran histologi ginjal yang normal, dimana glomerulus dan

jaringan atau di sekitarnya masih bagus yang ditunjukkan dengan banyak epitel yang masih berinti. Seluruh peredaran darah dalam tubuh akan melalui penyaringan di ginjal, zat-zat hasil metabolisme akan mengalami filtrasi di glomerulus dan reabsorpsi di tubulus proksimal, ansa Henle, dan tubulus distal, yang kemudian akan berlanjut ke tubulus kolektivus untuk dikeluarkan sebagai urin (Kardena, 2017).

Tubulus proksimal merupakan bagian nefron yang paling mudah terluka akibat zat toksik, dikarenakan pada tubulus proksimal terjadi proses absorpsi, sehingga zat toksik terkonsentrasi lebih tinggi (Kamaliani, 2019).

Menurut Junqueira (2007) berikut merupakan karakteristik masing-masing bagian ginjal:

Bagian ginjal	Karakteristik
Korpuskulum renal	Korpuskulum renal bergaris tengah kira-kira 200 $\mu\text{m}$ , terdiri atas seberkas kapiler yaitu glomerulus, dan dikelilingi oleh kapsula epitel berdinding ganda yang disebut kapsula bowman.
Tubulus kontortus proksimal	Tubulus kontortus proksimal dilapisi oleh sel lapis kuboid atau silindris. Sel ini memiliki sitoplasma asidofilik yang disebabkan oleh adanya mitokondria panjang besar, apeks memiliki banyak mikrovili dengan panjang kira-kira satu $\mu\text{m}$ .
Lengkung henle	Lengkung henle merupakan struktur yang berbentuk lengkungan yang terdiri atas ruas tebal desenden, ruas

	tipis desenden, ruas tipis asenden dan ruas tebal asenden.  Lumen ruas nefron ini lebar karena dindingnya terdiri atas epitel gepeng yang intinya hanya sedikit menonjol ke dalam lumen.
Tubulus kontortus distal	Tubulus kontortus distal merupakan bagian terakhir dari nefron yang dilapisi oleh epitel kuboid selapis. Tubulus distal lebih gepeng dan lebih kecil dibandingkan dengan tubulus proksimal, maka tampak lebih banyak dan inti pada tubulus distal
Tubulus koligentes	Tubulus koligentes dilapisi epitel kuboid dan bergaris tengah lebih kurang 40 $\mu\text{m}$ , sewaktu tubulus masuk lebih dalam ke dalam medula, epitelnya meninggi sampai menjadi silindris.

## 2.6 Interferon Gamma (IFN- $\gamma$ )

Interferon (IFN) merupakan sitokin yang berperan penting sebagai pertahanan tubuh, merupakan bagian dari sistem imun non-spesifik yang dihasilkan oleh limfosit T. Sitokin merupakan kelompok protein regulator dengan berat molekul rendah dan disekresikan oleh darah putih dan beberapa lain di dalam tubuh akibat adanya suatu rangsangan. Sitokin berikatan pada reseptor spesifik dari membran target. Berdasarkan perannya IFN dibagi menjadi dua tipe, yaitu yaitu IFN tipe 1 (IFN- $\alpha$  dan IFN- $\beta$ ) dan IFN tipe 2

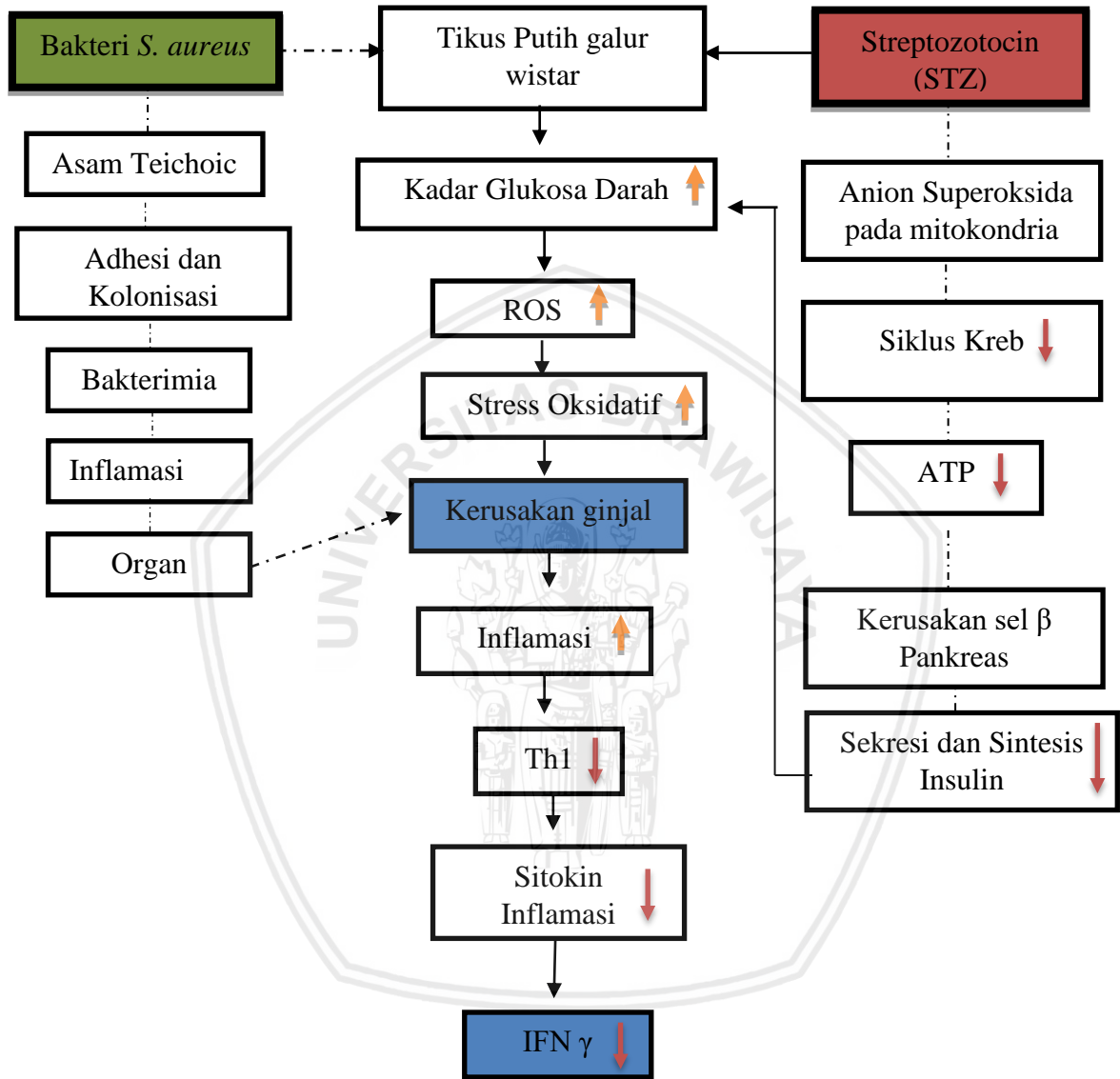
(IFN- $\gamma$ ). IFN tipe 1 berperan dalam infeksi virus, sedangkan IFN tipe 2 berperan dalam infeksi oleh bakteri.

IFN- $\gamma$  dihasilkan secara endogen oleh limfosit T (CD4+ dan CD8+), *natural killer* (NK) yang telah teraktivasi akibat adanya respon terhadap stimulus antigen spesifik. Interleukin-12 adalah sitokin kunci yang memulai respon Th1 dengan memicu produksi IFN- $\gamma$  dari *natural killer* (NK) dan CD4 sel T, sekresi interleukin-12 diinduksi oleh berbagai agen infeksi, termasuk virus, bakteri dan parasit. IFN- $\gamma$  merupakan sitokin utama yang berperan dalam aktivasi makrofag dan memiliki fungsi yang sangat penting dalam *cell mediated immunity* terhadap mikroba intraseluler (Wahyuniati, 2018).

IFN- $\gamma$  merupakan sitokin yang berperan dalam respon imun bawaan maupun respon imun spesifik. Dalam imunitas bawaan IFN- $\gamma$  memacu fungsi mikrobisidal makrofag melalui pembentukan oksida nitrit (NO) dan intermediate oksigen, sedangkan dalam imunitas spesifik IFN- $\gamma$  menstimulasi ekspresi MHC kelas I dan II dan sebagai molekul kostimulator pada APC, IFN- $\gamma$  mempromosi diferensiasi sel T helper naive menjadi sel Th1, IFN- $\gamma$  mengaktifkan PMN dan meningkatkan sitotoksitas NK (Kak dkk, 2018).

**BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN**

**3.1. Kerangka Konsep**



**Gambar 3.1.** Mekanisme kerja induksi STZ dan infeksi *S. aureus*

Keterangan :

- : Induksi Streptozotocin
- : Infeksi *S. aureus*
- : variabel yang diamati
- ↑ ↓ : efek induksi dan infeksi

Streptozotocin merupakan zat diabetogenik yang dapat digunakan sebagai pembuatan hewan coba diabetes. Struktur streptozotocin sangat mirip dengan molekul glukosa sehingga akan ditranspor ke dalam pankreas oleh *glucose transporter 2* (GLUT2). Sedangkan GLUT2 itu sendiri akan memperantarai sel  $\beta$  langerhans pankreas dalam mengambil glukosa dalam darah, sehingga streptozotocin akan ikut diambil melalui proses pengambilan glukosa tersebut. Streptozotocin dapat menimbulkan kerusakan pada sel  $\beta$  langerhans pankreas. Streptozotocin bekerja dengan cara membentuk radikal bebas sangat reaktif yang dapat menimbulkan kerusakan pada membran sel, protein, dan *deoxyribonucleic acid* (DNA), sehingga menyebabkan gangguan produksi insulin oleh beta langerhans pankreas. Hal ini didahului oleh pembatasan pembentukan adenosin trifosfat pada mitokondria akibat pembentukan radikal bebas dan penghambatan siklus krebs. Kerusakan sel  $\beta$  langerhans pankreas ini dapat menyebabkan penurunan produksi insulin dan sensitivitas insulin sehingga terjadi hiperglikemia. Tikus dengan kondisi hiperglikemia akan memicu terjadinya gangguan pada beberapa organ seperti ginjal.

Meningkatnya konsentrasi glukosa dalam jangka panjang juga dapat memicu proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs (*Advanced Glycation End-products*). Interaksi antara AGEs dalam sirkulasi dengan RAGEs (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) akan meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) intraseluler. Peningkatan ROS pada kondisi hiperglikemia dapat memicu terjadinya ikatan



ROS dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada *fosfolipid bilayer* sehingga terjadi peroksidasi lipid dan merusak struktur membran pada ginjal serta terjadinya inflamasi pada ginjal.

Bakteri *S. aureus* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan infeksi apabila pasien mengalami penurunan sistem kekebalan tubuh. Bakteri *S. aureus* yang menginfeksi penderita diabetes melitus akan memperparah kondisi tubuh karena *S. aureus* memiliki asam teikoat yang menyebabkan bakteri tersebut memiliki kemampuan adhesi dan dapat membentuk koloni pada pembuluh darah. Adanya *S. aureus* dalam aliran darah dapat menyebabkan bakteremia sehingga dapat mendukung proses inflamasi dan memperparah kondisi, karena telah mengalami gangguan metabolisme. Bakteremia memungkinkan bakteri menyebar luas ke dalam tubuh dan mencapai jaringan yang cocok untuk multiplikasinya.

Bakteri *S. aureus* sebagai antigen ketika masuk ke dalam tubuh akan dieliminasi oleh neutrofil dan makrofag sebagai perannya pada sistem imun innate. Selain itu makrofag juga dapat berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC). Di dalam makrofag, bakteri akan difagositosis dan juga akan dikenali oleh MHC II, kemudian akan dipresentasikan dalam bentuk antigen peptida. Ikatan antigen pada T-helper CD4 menyebabkan proliferasi dan diferensiasi menjadi 2 turunan, yaitu Th 1 dan Th 2. Th1 ini akan mengeluarkan IFN- $\gamma$  yang akan mengaktivasi makrofag dan membunuh organisme intraseluler, terutama melalui pembentukan *oksigen reaktif intermediat* (ROI) dan *nitrit oxide* (NO) (Kak dkk, 2018).

IFN- $\gamma$  yang dihasilkan akan memacu proses inflamasi yang menyebabkan kerusakan gagal organ multipel dan berakhir dengan kematian. Ginjal yang telah rusak oleh kondisi hiperglikemia akan diperparah oleh adanya infeksi *S. aureus*, sehingga akan berpengaruh terhadap kondisi histopatologi ginjal.

### 3.2. Hipotesis Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengaruh pemberian *Staphylococcus aureus* pada tikus putih induksi streptozotocin pada jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  limpa.
2. Pengaruh pemberian *Staphylococcus aureus* pada tikus putih induksi streptozotocin dapat berpengaruh terhadap gambaran histopatologi ginjal.

## BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian Penelitian ini akan dilaksanakan pada bulan Juli-Agustus 2018. Penelitian dilakukan Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya. Pengujian *flow cytometry* dilakukan di Fakultas MIPA (Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam) Universitas Brawijaya.

### 4.2. Alat dan Bahan

Alat pemeliharaan hewan coba terdiri dari kandang dari kotak plastik dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm, tutup kandang, botol air. Alat untuk pemeriksaan diabetes mellitus terdiri dari spuit 1 cc, alat pengukur diabetes melitus, timbangan, pot sampel sebagai tempat streptozotocin, dan spidol untuk memberi tanda pada tikus dalam setiap kandang. Alat untuk membuat suspensi bakteri *S. Aureus* terdiri dari cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, erlenmeyer, rak tabung reaksi, ose bulat, ose lurus, kapas, aluminium foil, autoklaf, bunsen, masker, glove, plastik wrap, sprayer alkohol, ice box, es gel, inkubator, laminar air flow, sentrifugator, dan mikropipet serta yellow tip. Alat untuk pemeriksaan dan pembedahan tikus terdiri dari termometer, stetoskop, gunting tajam-tumpul, gunting tajam-tajam, scaple dan blade, pinset anatomis, pinset sirugis, pot sample, spuit 1 ml, spuit 3 ml, tabung vacuntainer EDTA dan serum, papan pembedah hewan, dan tabung falcon.

Preparasi organ limfa untuk uji flowcytometry membutuhkan alat yang terdiri dari cawan petri, spuit 3 ml, yellow tip, tabung endof, sentrifuge tube, rak endof, masker, glove, tissue, sentrifuge, dan ice box beserta es gel. Sedangkan alat pada pengujian *flowcytometry* terdiri dari kuvet, endorf, BD FACS Calibur TM flowcytometer, Micro tube 1,5 mL, FCM tube, dan mikropipet.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari tikus putih (*Rattus novergicus*) jantan galur wistar dengan berat 150-200 gram di dapat dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Alkohol 70 %, pakan tikus, air, aquades, serbuk gergaji sebagai alas kandang tikus, bakteri *S. Aureus*, alkohol 70%, NaCL fisiologis, *sterile phosphate-buffered saline* (PBS), formalin, PBS steril, antibodi ekstraseluler staining IFN- $\gamma$  dan pewarnaan *Hematoxylin-eosin*.

#### 4.3.Rancangan Penelitian

Tahapan penelitian ini yaitu :

- 1) Persiapan hewan coba
- 2) Induksi Single High Dose streptozotosin
- 3) Induksi *Staphylococcus aureus*
- 4) Nekropsi dan preparasi organ ginjal dan limpa
- 5) Mengamati gambaran histopat ginjal
- 6) Menentukan jumlah sel relatif IFN- $\gamma$
- 7) Analisis data

#### 4.4. Prosedur Penelitian

##### 4.4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan yaitu kelompok 1 adalah tikus yang tidak diberi perlakuan (kontrol negatif), kelompok 2 adalah tikus yang diinduksi *Staphylococcus aureus*  $10^8$  CFU/mL (kontrol positif infeksi *Staphylococcus aureus*), kelompok 3 adalah tikus yang diinduksi streptozotosin 45 mg/kg BB dan *Staphylococcus aureus*  $10^5$  CFU/mL, kelompok 4 adalah kelompok adalah tikus yang diinduksi streptozotosin 45 mg/kg BB dan *Staphylococcus aureus*  $10^6$  CFU/mL, dan kelompok 5 adalah kelompok tikus yang diinduksi adalah tikus yang diinduksi streptozotosin 45 mg/kg BB dan *Staphylococcus aureus*  $10^7$  CFU/mL (**Lampiran 2**). Banyaknya ulangan yang digunakan berdasarkan rumus:

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

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

$$5n - 5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Keterangan :

t : Jumlah sel relatif kelompok perlakuan

n : Jumlah sel relatif ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka untuk lima kelompok perlakuan diperlukan jumlah sel relatif ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok perlakuan sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba dalam penelitian sudah mendapatkan sertifikat laik

etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor: 973-KEP-UB (**Lampiran 1**).

#### **4.4.2 Persiapan Hewan Coba**

Persiapan pemeliharaan hewan coba mulai dari kandang pemeliharaan hewan coba yaitu kandang berupa kotak plastik dengan ukuran 35 x 27,5 x 12 cm, anyaman kawat sebagai tutup kandang, sekam, botol minum, alat semprot, pemberian pakan berupa pelet, alkohol 70%, hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur wistar dengan berat badan 150-200 gram. Sebelumnya tikus putih diadaptasi selama satu minggu di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan coba dibagi dalam lima kelompok perlakuan. Setiap kelompok perlakuan terdiri dari lima ekor tikus putih selama adaptasi, tikus diberi minum dan pakan secara *ad libitum*.

#### **4.4.3 Induksi Streptozotocin**

Pemberian Streptozotocin (STZ) dilakukan pada hari kedelapan setelah dilakukan adaptasi selama 7 hari. Setiap kelompok perlakuan dilakukan penimbangan berat badan serta pemeriksaan gula darah. Streptozotocin diberikan pada kontrol positif dan kelompok perlakuan 1,2, dan 3 yang diberikan secara intraperitoneal. Streptozotocin diberikan dengan sekali pemberian dengan dosis 45 mg/kg BB. Pengukuran kadar gula darah tikus dilakukan sebanyak 2 kali yaitu sebelum dan sesudah pemberian streptozotocin yaitu pada hari ke 8 penelitian.

#### 4.4.4 Induksi *Staphylococcus aureus*

Tikus putih jantan strain wistar diberikan bakteri *S. aureus* pada hari ketiga setelah diinjeksikan STZ. Pemberian bakteri *S. aureus* dilakukan pada tikus kontrol positif dan kelompok perlakuan 1,2, dan 3 dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Tikus kontrol positif diinokulasi dengan  $0,6 \times 10^8$  CFU/ml, kelompok perlakuan 1 diinokulasi dengan  $0,6 \times 10^5$  CFU/ml, kelompok perlakuan 2 diinokulasi dengan  $0,6 \times 10^6$  CFU/ml dan kelompok perlakuan 3 diinokulasi dengan  $0,6 \times 10^7$  CFU/ml.

#### 4.4.5 Nekropsi

Nekropsi pada tikus dilakukan dengan cara pemberian anasthesi terlebih dahulu dengan menggunakan ketamin  $0,2$  ml/kg BB kemudian dilakukan euthanasi serta dilakukan insisi pada bagian abdomen tengah tepat pada linea alba menggunakan gunting. Kemudian dicari organ ginjal kemudian diangkat, dibilas dengan PBS sebanyak dua kali, kemudian disimpan dalam pot sampel yang berisi NaCl fisiologis. Selanjutnya dilakukan preparasi pada organ ginjal, yang selanjutnya diletakkan pada pot sample yang telah berisi formalin 10%.

#### 4.4.6 Flowcytometry

Organ limpa diambil dari pot sampel kemudian diletakkan dalam cawan petri yang berisi 5 ml PBS, digerus organ limpa menggunakan pangkal spuit, disaring menggunakan spuit kemudian dimasukkan dalam tabung sentrifus, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit. Kemudian diambil bagian supernatan dibuang dengan



menggunakan mikropipet. Pelet organ limpa kemudian ditambahkan dengan PBS 1 ml, dihomogenkan dengan cara pipeting, diambil 100  $\mu$ l dimasukkan kedalam mikrotube baru, ditambahkan 50  $\mu$ l PBS, disentrifugasi kembali dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4  $^{\circ}$ C. Selanjutnya dilakukan pewarnaan intraseluler dengan menambahkan larutan fiksatif (*Cytofix*) sebanyak 50  $\mu$ l kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4 $^{\circ}$ C pada ruang gelap. Kemudian ditambahkan larutan permeabilitas (*Cytoperm*) sebanyak 500  $\mu$ l dan dihomogenkan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali, dibuang cairan supernatant dan ditambahkan 50  $\mu$ l larutan antibodi spesifik untuk IFN- $\gamma$  kemudian diinkubasi. Selanjutnya ditambahkan 400  $\mu$ l PBS kemudian dilakukan sentrifugasi kembali dan diambil bagian peletnya kemudian dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometry* untuk dilakukan *running flowcytometry*.

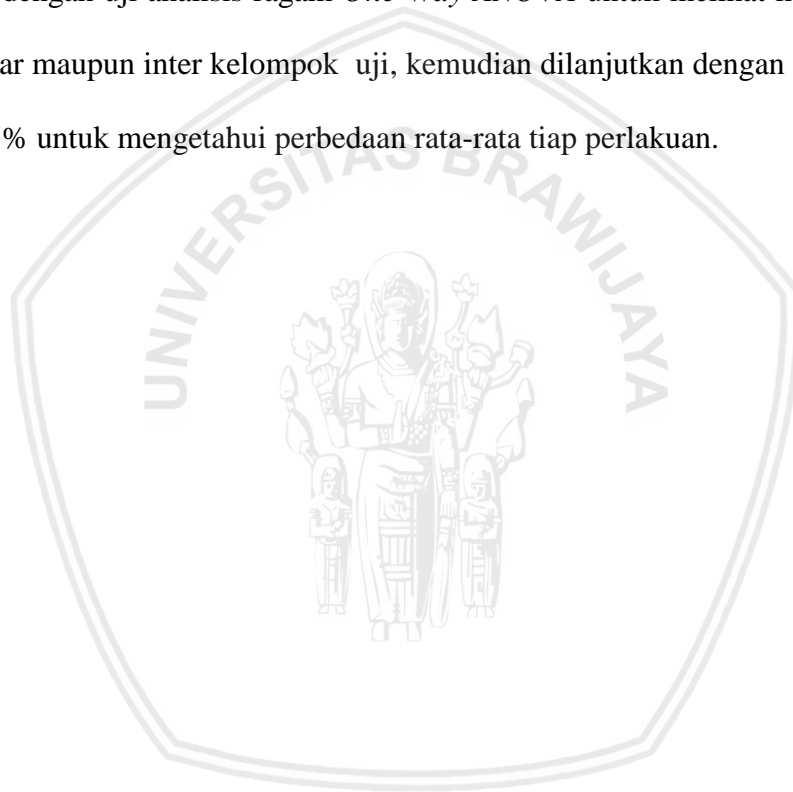
Sitokin relatif dapat diakses menggunakan larutan fiksasi dan permeabilisasi yang dilakukan oleh *Cytofix* / *Cytoperm*. Perekasi fiksasi dan permeabilisasi (*Cytofix* dan *Cytoperm*) telah ditunjukkan untuk mengidentifikasi secara akurat sebagai biomarker intraseluler yang sebelumnya tidak terdeteksi. Tidak seperti pereaksi fiksasi dan permeabilisasi lain yang tersedia di pasaran, protokol *Cytofix* dan *Cytoperm* membuat karakteristik penyebaran morfologis sel tetap utuh (Biosciences, 2000)

#### 4.4.7 Pembuatan Histopat Ginjal

Pewarnaan *Hematoxylin Eosin* (HE) digunakan untuk mewarnai jaringan. Pemberian warna bertujuan untuk memberi warna biru pada inti dan eosin digunakan untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma dengan tahapannya. Pertama yang dilakukan adalah dengan deparafinisasi, deparafinisasi adalah proses untuk menghilangkan dan melarutkan parafin yang terdapat pada jaringan, kemudian dilakukan rehidrasi yang bertujuan untuk memasukan air kedalam jaringan, larutan akan memasuki rongga-rongga jaringan yang kosong lalu preparat dimasukan ke dalam etanol absolute 95%,90%,80% dan 70% selama 5 menit dan dibilas dengan air mengalir selama 1 menit. Setelah itu dilakukan pewarnaan I untuk memberikan warna biru pada inti sitoplasma jaringan dengan memasukan preparat kedalam *hematoxylin* selama 5 menit dan dicuci menggunakan air mengalir selama 5 menit, Pewarnaan II yaitu dengan cara memasukan preparat kedalam eosin selama 3 menit yang bertujuan untuk memberikan warna merah muda pada sitoplasma, setelah dilakukan pewarnaan I dan II dilakukan dehidrasi yang bertujuan untuk menghilangkan kadar air pada jaringan, setelah itu dilakukan *clearing* yang bertujuan membuat jaringan menjadi trasparan, preparat dimasukan ke dalam xylol I dan II selama 5 menit dan didiamkan sampai kering. Proses terakhir dari pewarnaan HE adalah dengan proses mounting, yang bertujuan untuk mengawetkan jaringan yang telah diwarnai, preparat diberikan entellan dan ditutup menggunakan *cover glass* (Junquiera, 2005).

#### 4.4.8 Analisis Data

Gambaran histopatologi ginjal dianalisis secara kualitatif yaitu pada bagian glomerulus dengan menggunakan mikroskop. Sedangkan analisis data jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  menggunakan analisis kuantitatif statistik. Analisis kuantitatif statistik dilakukan dengan menggunakan program SPSS 16 dengan uji analisis ragam *One-Way ANOVA* untuk melihat keseragaman antar maupun inter kelompok uji, kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey  $\alpha = 5\%$  untuk mengetahui perbedaan rata-rata tiap perlakuan.



## BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil Penelitian Tikus Putih Infeksi Bakteri *Staphylococcus aureus* dan

#### Induksi Streptozotocin

Penelitian ini menggunakan tikus putih (*Rattus norvegicus*) galur wistar jantan sebagai model hewan coba diabetes melitus yang diinfeksi *S. aureus*. Pada tikus kelompok K+ di injeksikan bakteri *S. aureus* ( $6 \times 10^8$  CFU/ml) untuk membuat tikus mengalami bakterimia. Hewan model tikus syok sepsis dibuat dengan injeksi intraperitoneal *S. aureus* ( $6 \times 10^8$  CFU / ml). Injeksi *S. aureus* ( $2 \times 10^8$  CFU/ml) menyebabkan 0-25% tingkat kematian pada hewan coba pada hari ke-15 setelah injeksi. Penambahan injeksi bakteri *S. aureus* ( $5 \times 10^8$ - $7 \times 10^8$  CFU/ml) menyebabkan tingkat kematian sebesar 50-70% pada 24 jam pertama setelah injeksi. Injeksi bakteri *S. aureus* ( $6 \times 10^9$  CFU/ml) menyebabkan tingkat kematian sebesar 95% pada 12 jam pertama setelah injeksi ( Rauch *et al*, 2012).

Tikus sebagai hewan coba diabetes melitus infeksi *S. aureus* diinduksi streptozotocin dengan dosis 45 mg/kg BB dan *S. aureus* dengan volume 0,2 ml secara intraperitoneal. Pada tikus kelompok P1,P2 dan P3 mengalami DM yang ditandai dengan gejala klinis berupa peningkatan kadar gula darah. Pada tikus kelompok K- kadar gula darah menunjukkan nilai <120 mg/dl, sedangkan pada tikus kelompok P1, P2 dan P3 yang diinduksi streptozotocin kadar gula darah meningkat menjadi >270 mg/dl. Hal ini dapat di dukung dengan gambaran histologi pankreas yang

mengalami kerusakan (**lampiran 12**). Kerusakan yang terjadi pada organ pankreas tikus kelompok P1, P2 dan P3 adalah nekrosis sel pada pulau langerhans yang ditunjukkan dengan adanya celah antar sel. Kadar glukosa darah pada diabetes berat mencapai (200/300 mg / dl) dan pada diabetes ringan kadar gula darah berkisar antara (120-200/300 mg/dl). Induksi streptozotocin dapat mengakibatkan nekrosis pada sel beta pankreas *Rattus Norvegicus* (Qosimah *et al.*, 2009).

Pada hari ke-11 penelitian dilakukan pemeriksaan fisik antara lain berat badan, pulsus, laju respirasi, suhu tubuh dan glukosa darah. Dari hasil pemeriksaan fisik didapat hasil peningkatan laju respirasi, kadar glukosa darah sedangkan laju respirasi menurun dan suhu masih dalam kondisi normal. Data hasil pemeriksaan fisik dapat dilihat pada (**Lampiran 12**). Menurut Qosimah *et al.* (2019) bakteri yang diinduksi secara IP pada tikus menunjukkan peningkatan pulsus (diatas 450 kali/menit), laju respirasi menurun (dibawah 130 kali/menit) sedangkan suhu pada batas normal (36,07-37,32°C)

## **5.2 Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih yang diinduksi STZ dan *Staphylococcus aureus*.**

Tikus (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotocin dan *S. aureus* mengakibatkan kerusakan jaringan ginjal yang diamati melalui gambaran histopatologi. Pengamatan gambaran histopatologi dilakukan pada glomerulus dan tubulus ginjal. Glomerulus yaitu simpul pembuluh darah dengan ukuran sangat kecil yang terletak dibagian nefron ginjal yang

berfungsi sebagai alat penyaring atau filtrasi air, garam asam amino, glukosa dan urea untuk menghasilkan urin (Dallman *et al.*, 2006).

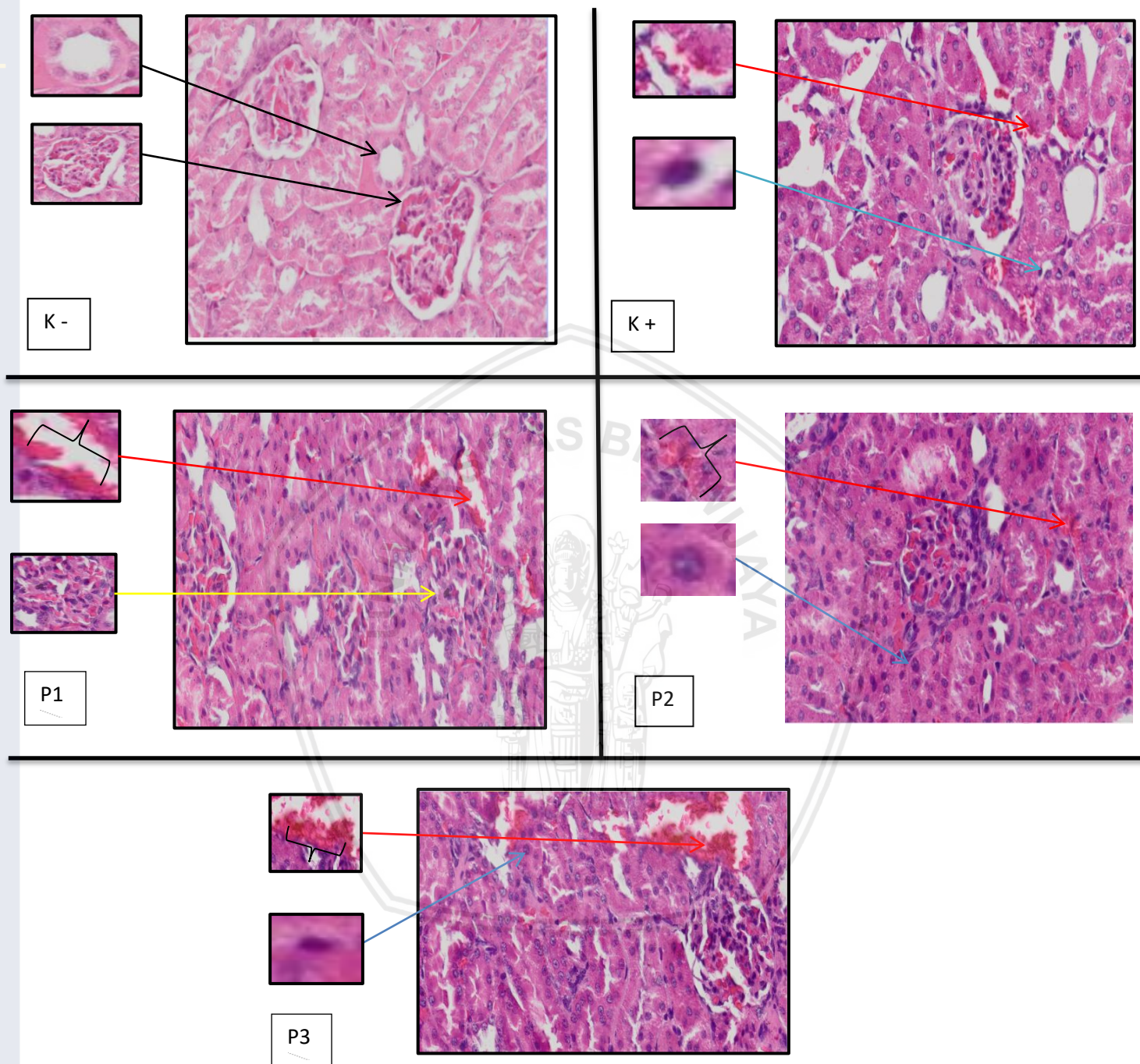
Pada (**Tabel 5.1.**) dapat dilihat terdapat perbedaan tingkat kerusakan histologi ginjal antar kelompok K-, K+, P1, P2 dan P3. Pada kelompok tikus P3 mengalami kerusakan histopatologi paling parah apabila dibandingkan dengan tikus kelompok lainnya

**Tabel 5.1** Hasil Perbandingan kerusakan histopatologi ginjal

	Hipertropi Glomerulus	Hemoragi Tubulus	Piknosis Tubulus	Keterangan
K-	-	-	-	Tidak mengalami kerusakan
K+ injeksi bakteri				
K+	-	+	++	Sedikit hemoragi, banyak piknosis
P1,P2,P3 infeksi bakteri + Dm				
P1	+	++	++	Sedikit hipertropi, banyak hemoragi dan piknosis
P2	++	+	++	Sedikit hemoragi, banyak hipertropi dan piknosis
P3	++	++	++	Banyak hipertropi, hemoragi dan piknosis

Keterangan : tanda (-) menunjukkan tidak ada perubahan, tanda (+) menunjukkan ada sedikit perubahan, tanda (++) menunjukkan ada banyak perubahan histopatologi ginjal.





**Gambar 5.1** Gambaran histopatologi ginjal dengan pewarnaan HE pada kontrol negatif (K-), kontrol positif (K+), perlakuan 1 (P1), perlakuan 2 (P2) dan perlakuan 3 (P3) dengan perbesaran 200 x, sel normal (↗), hemoragi sel tubulus (↖), nekrosis sel tubulus (⌋) hipertropi sel glomerulus (↘).

Hasil pengamatan histopatologi pada sel ginjal menunjukkan adanya perubahan pada glomerulus maupun pada tubulus (**Gambar 5.1**). Perubahan yang pada glomerulus meliputi hipertrofi, sedangkan pada tubulus terjadi degenerasi hidropik, hemoragi dan nekrosis pada epitel tubulus. Gambaran mikroskopik ginjal tikus kelompok K- (tidak diinduksi streptozotocin dan *S. aureus*) menunjukkan struktur glomerulus dan tubulus normal. Menurut Eroschenko (2007), kondisi ginjal normal pada glomerulus terlihat dari jaringan sel epitel pipih selapis yang tersusun beraturan dengan bentuk sel yang terlihat normal dan mempunyai batas yang jelas. Sel epitel tubulus proksimal ginjal secara normal berbentuk kuboid selapis dengan batas sel yang tidak jelas, sitoplasma eosinofilik bergranula dan inti sel besar, bulat, berbentuk sferis di tengah sel. Puncak-puncak sel yang menghadap ke lumen tubulus mempunyai mikrovili cukup panjang yang disebut *brush border*, sedang sel epitel tubulus distal berukuran lebih kecil dan tidak mempunyai mikrovili (Gartner *et al.*, 2007).

Gambaran mikroskopik ginjal tikus kelompok K+ (infeksi *S. aureus*  $10^8$  CFU/mL) menunjukkan adanya degenerasi hidropik dan nekrosis sel pada tubulus, sedangkan glomerulus masih terlihat normal. Degenerasi hidropik merupakan kerusakan sel yang *reversible* yang ditandai dengan adanya kebengkakan sel, adanya ruang-ruang kosong (vakuola), sel membesar dan merapat. Pada penelitian ini degenerasi hidropik ditandai dengan sel-sel epitel tubulus yang membesar sehingga menyebabkan lumen tubulus menjadi lebih sempit. Sedangkan nekrosis sel



tubulus ditandai dengan adanya inti yang lebih piknotik. Nekrosis diawali dengan perubahan morfologi inti sel yaitu piknosis. Tahap berikutnya inti pecah (karioreksis) dan inti menghilang (kariolisis). Inti piknotik merupakan keadaan dimana kromosom di dalam inti sel mengalami perubahan warna menjadi gelap, mengecil, mengalami pengisutan, dan kromatin menggumpal. Proses reabsorpsi terjadi di tubulus proksimal, maka pada pengamatan mikroskopis ginjal, inti piknosis ini sering terlihat pada tubulus proksimal (Adinata, 2012).

Kerusakan sel yang terjadi pada tikus kelompok K+ disebabkan oleh adanya antigen berupa infeksi *S. aureus*. Hal ini didukung dengan hasil uji kualitatif pada organ ginjal (**Lampiran 9**) ditemukan adanya bakteri *S. aureus* yang diinokulasi pada media NAP (*Nutrient Agar Plate*).

Gambaran mikroskopik ginjal tikus kelompok P1,P2 dan P3 (induksi streptozotocin dan infeksi *S. aureus*  $10^5, 10^6, 10^7$  CFU/mL) menunjukkan adanya kerusakan sel yang mengalami hipertofi sel glomerulus, degenerasi hidropik dan nekrosis dan hemoragi pada sel tubulus, hal ini disebabkan karena tikus kelompok P1,P2 dan P3 di induksi streptozotocin yang disertai infeksi *S. aureus*.

Seperti yang telah disebutkan kondisi DM mengakibatkan peningkatan kadar gula darah (hiperglikemia). Hiperglikemia memicu terjadinya kerusakan ginjal melalui perubahan hemodinamik. Perubahan hemodinamik diperantari oleh produksi angiotensin II yang meningkat. Angiotensin II menstimulasi *podocyte derived* VEGF yang mengakibatkan

VEGF meningkat. Peningkatan VEGF akan merubah sinyal-sinyal intra dan interseluler, yang menyebabkan peningkatan proliferasi sel-sel podosit, sel-sel endotel dan sel-sel mesangial. Proliferasi sel-sel ini menyebabkan ukuran gelung glomerulus (*glomerular-tuft*) meningkat. Area *glomerular-tuft* dibentuk oleh epitel sel podosit, sel-sel endotel, sel-sel mesangial dan matriks mesangial glomerulus. Peningkatan ukuran *glomerular-tuft* ini akan menyebabkan hipertrofi glomerulus (Sourris *et al.*, 2008).

Selain itu hiperglikemia juga dapat memicu proses glikasi lipid dan protein yang mengakibatkan peningkatan AGEs. Adanya interaksi antara AGEs dalam sirkulasi dengan RAGEs (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) akan meningkatkan produksi ROS (*Reactive Oxygen Species*). Setelah terjadi peningkatan ROS maka akan memicu terjadinya ikatan ROS dengan *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) pada *fosfolipid bilayer* sehingga terjadi peroksidasi lipid dan merusak struktur membran sel ginjal, kerusakan membran sel akan mengakibatkan sel mengalami degenerasi hidropik dan berlanjut menjadi nekrosis.

Diabetes mellitus menyebabkan dinding-dinding arteri dan arteriol dalam ginjal dan jaringan lainnya mengalami kerusakan. Kerusakan ini menyebabkan penebalan dan penyempitan dalam dinding pembuluh darah yang mengalir terus dari lumen. Akhirnya, oksigen yang sampai ke jaringan tidak cukup sehingga menyebabkan luka pada jaringan (hemoragi) pada semua jaringan, termasuk ginjal. Hemoragi merupakan adanya darah di

luar pembuluh darah yang secara mikroskopik akan tampak sel-sel darah yang berada di dalam jaringan (Cintari, 2008).

Eksotoksin yang dihasilkan *S. aureus* juga menyebabkan kerusakan dengan cara mengganggu membran biologik sel inang. Apabila toksin yang dihasilkan antigen mengganggu membran biologik maka sel tubulus dan glomerulus ginjal akan mengalami kerusakan sehingga keseimbangan pengeluaran  $K^+$  dan pemasukan ion  $Na^+$ ,  $Ca_2^+$ , dan air akan terganggu. Kerusakan membran sel menyebabkan terjadinya peningkatan jumlah air ke dalam sel sehingga menyebabkan sitoplasma menjadi bengkak. Bahan-bahan yang bersifat toksik akan mudah menyebabkan kerusakan jaringan ginjal dalam bentuk perubahan struktur dan fungsi ginjal (Eidi, 2006).

### **5.3 Pengaruh Infeksi Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Tikus Diabetes Mellitus Terhadap Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$**

Data jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  yang diperoleh dari uji *flowcytometry* kemudian dianalisis secara statistika menggunakan *one way analysis of variant* (ANOVA). Rata - rata jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  ditunjukkan pada **Tabel 5.2**. Hasil uji statistika jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  selengkapnya dapat dilihat pada **Lampiran 10**.

Kelompok	Rata-rata ± standar deviasi IFN- $\gamma$	% Peningkatan IFN- $\gamma$ terhadap K-
Kontrol negatif (K-)	3,36±0,67 <sup>a</sup>	-
Kontrol positif (K+)	9,33±6,21 <sup>e</sup>	177,68
Perlakuan 1	3,78±3,11 <sup>b</sup>	12,5
Perlakuan 2	4,12±1,43 <sup>c</sup>	22,62
Perlakuan 3	7,12±2,86 <sup>d</sup>	111,90

**Tabel 5.2** Rata-rata jumlah sel relatif IFN- $\gamma$

Berdasarkan analisis data statistik yang dilakukan, terjadi peningkatan nilai rata-rata jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Kelompok tikus K- didapatkan hasil data rata-rata jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  sebesar 3,36 hal ini dapat dikarenakan pada kondisi normal IFN- $\gamma$  tetap ditemukan didalam tubuh dengan jumlah yang sedikit sebagai pengaturan sel induk hematopoietik. Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) adalah sitokin proinflamasi yang berpartisipasi dalam regulasi *hematopoietic stem cells* (HSC) selama kondisi homeostatis. IFN- $\gamma$  dapat memengaruhi homeostasis HSC secara langsung dengan mengubah ekspresi gen dalam HSC dan secara tidak langsung dengan mengubah peran pengaturan sel-sel *niche* yang didekatannya.

Pada penelitian ini, tikus kelompok K+ memiliki rata-rata jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  paling tinggi jika dibandingkan dengan tikus kelompok P1, P2, dan P3. Hal ini dapat terjadi karena pada tikus kelompok K+ diberi perlakuan berupa infeksi *S. aureus* dengan konsentrasi 10<sup>8</sup> CFU/ml. Bakteri *S. aureus* yang masuk ke dalam tubuh akan dilawan oleh sistem

imun innate salah satunya makrofag. Selain itu makrofag juga dapat berperan sebagai *antigen presenting cells* (APC). Didalam makrofag, bakteri akan difagositosis dan juga akan dikenali oleh MHC II, kemudian akan dipresentasikan dalam bentuk antigen peptida. Ikatan antigen pada *T-helper naive* menyebabkan proliferasi dan diferensiasi menjadi 2 turunan, yaitu Th 1 dan Th 2. Setelah itu sel Th1 akan mengeluarkan sitokin IFN- $\gamma$  yang akan mengaktivasi makrofag, melalui pembentukan *oksigen reaktif intermediat* (ROI) dan *nitrit oxide* (NO). IFN- $\gamma$  merupakan sitokin pro-inflamasi yang berperan dalam imunitas innate dan imunitas spesifik. Dalam imunitas innate IFN- $\gamma$  memacu fungsi mikrobisidal makrofag melalui pembentukan oksida nitrit (NO) dan *intermediate oksigen reaktif* (ROI), sedangkan pada imunitas spesifik IFN- $\gamma$  menstimulasi ekspresi MHC kelas I dan II dan sebagai molekul kostimulator pada sel APC, IFN- $\gamma$  mempromosi diferensiasi sel *T-helper naive* menjadi sel Th1, IFN- $\gamma$  mengaktifkan PMN dan sel sitotoksik dan meningkatkan sitotoksisitas sel NK. Menurut Wahyuniati (2017) IFN- $\gamma$  terutama dihasilkan secara endogen oleh sel limfosit T (CD4+ dan CD8+) dan sel *Natural Killer* (NK) yang telah teraktivasi akibat adanya respon terhadap stimulus antigen. Bakteri *S. aureus* melepaskan eksotoksin yang dapat memicu pelepasan mediator proinflamasi. Jaringan yang rusak, toksin bakteri dan komponen bakteri LPS (*lipopolisakarida*), dapat menyebabkan munculnya berbagai trombin, histamin dan sitokin pro-inflamasi seperti Interleukin (IL)-1, 6, 12, 18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  dan TNF- $\beta$  (Calder *et al.*, 2013).

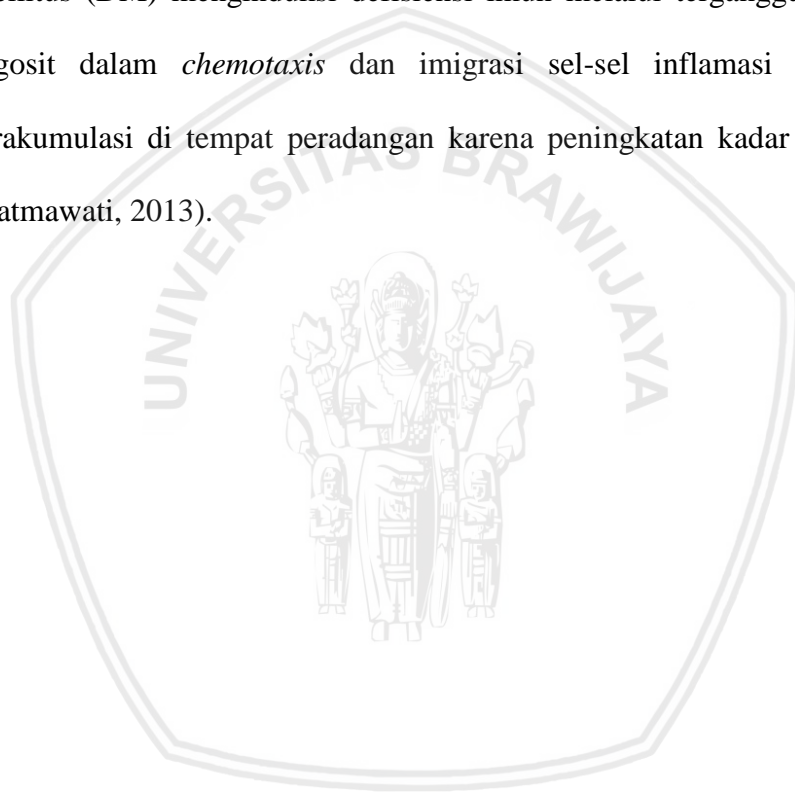
Makrofag akan membunuh bakteri di didalam tubuh dan fungsi makrofag akan ditingkatkan dengan memacu makrofag untuk *killing* melalui *respiratory burst*. Makrofag yang teraktivasi akan melepaskan *reactive oxygen species* (ROS). ROS berperan penting dalam *killing* serta merupakan salah satu *lethal chemical* yang dapat membunuh dan mengeliminasi bakteri. Makrofag mampu menghancurkan bakteri yang terfagosit dengan membentuk fagolisosom. Bersamaan dengan itu, adanya ikatan antara mikroba dengan reseptor fagosit, maka reseptor akan mengirim sinyal yang mengaktivasi beberapa enzim dalam fagolisosom yang penting untuk terjadinya *respiratory burst* (Kaufmann, 2001).

Hiperglikemia akan meningkatkan pembentukan ROS. ROS yang terbentuk akan meningkatkan pembentukan ekspresi IFN- $\gamma$  sehingga dapat memperparah stres oksidatif pada penderita DM dan selanjutnya akan terjadi komplikasi pada penyakitnya. Stres oksidatif adalah keadaan dimana terjadi ketidakseimbangan jumlah radikal bebas yang ada di dalam tubuh dengan antioksidan yang dihasilkan oleh tubuh sendiri. Stress oksidatif pada penderita DM terjadi karena perubahan metabolisme karbohidrat dan lipid yang meningkatkan produksi ROS dari hasil samping reaksi glikasi dan oksidasi lipid (Widowati, 2007).

Kondisi stress oksidatif yang di sebabkan oleh kondisi infeksi *S. aureus* dan hiperglikemia menyebabkan tubuh tidak bisa menangkap atau menetralsir keseluruhan radikal bebas. Kelebihan radikal bebas ini

mengakibatkan intensitas reaksi oksidasi sel-sel normal semakin tinggi dan mengakibatkan kerusakan jaringan sel akan semakin parah.

Pada tikus kelompok P1, P2, dan P3 juga terjadi peningkatan jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  tetapi tidak setinggi pada tikus kelompok K+. Hal ini diakibatkan karena pada DM terjadi penurunan sistem imun. Diabetes mellitus (DM) menginduksi defisiensi imun melalui terganggunya fungsi fagosit dalam *chemotaxis* dan imigrasi sel-sel inflamasi yang akan terakumulasi di tempat peradangan karena peningkatan kadar gula darah (Fatmawati, 2013).





## BAB 6 PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan maka didapatkan kesimpulan yaitu:

1. Pemberian induksi STZ dan infeksi bakteri *S. aureus* mengakibatkan kerusakan histopatologi pada organ ginjal tikus putih (*Rattus norvegicus*).
2. Pemberian induksi STZ dan infeksi bakteri *S. aureus* mengakibatkan terjadinya peningkatan jumlah sel relatif IFN- $\gamma$  pada organ limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*).

### 6.2 Saran

Untuk penelitian selanjutnya sebaiknya dibuat hewan coba dengan perlakuan yang sama dan dilakukan pengujian pada organ lain, selain organ ginjal dan perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui terapi yang tepat pada penyakit diabetes melitus dengan infeksi *Staphylococcus aureus*.



## DAFTAR PUSTAKA

- Adinata, M.A., Sudira, I.W., dan Berata, I.K. 2012. Efek ekstrak daun Ashitaba (*Angelica keiskei*) terhadap gambaran histopatologi ginjal mencit (*Mus musculus*) jantan. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 4: 55-62.
- Adiyati, P. N. 2011. *Ragam Jenis Ektoparasit Pada Hewan Coba Tikus Putih (Rattus Norvegicus) Galur Sprague Dawley*.
- Alves, C, Casqueiro, J., & Casqueiro, J. 2012. Infections In Patients With Diabetes Mellitus: A Review Of Pathogenesis. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 16(7), 27
- American Diabetes Association. 2010. Standards Of Medical Care In Diabetes. *Turkish Journal of Endocrinology and Metabolism*, 14(SUPPL.), 11–16.
- Banfield Pet Hospital. 2016. *State of Pet Health 2016 Report*. Banfield Pet Hospital. USA. 2-13
- BDBiosciences. 2000. Introduction to flow cytometry:A Learning Guide. In *Becton, Cicknson and Company*
- Behrend, E, Holford, A., Lathan P, Rucinsky, R, & Schulman,R.2018. Diabetes Management Guidelines for Dogs and Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*
- Calder P, Ahluwalia N, Albers R, Bosco N, Bourdet S, Haller D, Holgate ST, Jonsson LS, Latulippe ME, Marcos A, Moreines J. 2013. A Consideration of biomarkers to be used for evaluation of Inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr* . 109(1):S1-34.
- Canivell, S., & Gomis, R. 2014. Diagnosis And Classification Of Autoimmune Diabetes Mellitus. *Autoimmunity Reviews*, 13(4–5), 403–407.
- Cintari, L. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Air Daun Ceplikan (*Ruellia tuberosa* L) terhadap Kadar Kreatinin dan Ureum dalam Serum serta Gambaran Histologis Ginjal Tikus Putih (*Rattus novergicus*) Diabetes Melitus. *Thesis*. Program Studi Ilmu dan Kesehatan Masyarakat.UGM, Yogyakarta.
- Dahliatul Qosimah, Dhita Evi A.2019.Diabetes sepsis on Wistar rat strain (*Rattus noevegicus*) induced by sterptozotocin and bacteria *Staphylococcus aureus.v Journal of Veterinary World*, 12 (6) :849-854
- Dallman MF *et al.*, 2006. Glucocorticoids, chronic stress, and obesity. *Prog Brain Res.*;153:75–105
- Dian Indra Dewi. 2010. Tikus Riul (*Rattus norvegicus* Berkenhout,1769). *Balaba*, 6(02), 22–23.

- DeLeo FR, Diep BA, Otto M. 2009. Host Defense And Pathogenesis In Staphylococcus Aureus Infections. *Infect Dis Clin North Am.* (1):17-34.
- DiPiro, J. T. 2005. A Pathophysiologic Approach. In *Pharmacotherapy. A pathophysiologic approach.*
- Eidi A, Eidi M, Esmaili. 2006. Antidiabetic effect of garlic (*Allium sativum* L) in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Phytomedicine* 2006;13:624-629.
- Fatmawati N, Lyrawati D, and Yurina V. 2013. Effect of Alpha Lipoic Acid on Oxidative Stress in Heart of Male Wistar Rats with Type I Diabetes Mellitus Model Induced by Streptozotocin. 6th Asian Association of Schools of Pharmacy Conference Program and Abstracts Book. Singapore, 14-17; 183.
- Gartner L.P., Hiatt J.L. 2006 : Atlas of Histology. 3rd ed. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 351-357.
- Ilery, T., Sumual, V., & Rares, L. 2014. Prevalensi Retinopati Diabetik Pada Poliklinik Ilmu Kesehatan Mata Selang Satu Tahun. *E-CliniC*, 2(1). Retrieved from Jawetz. *Selected Medically Important Microorganisms.*
- Kak, G., Raza, M., & Tiwari, B. K. 2018. Interferon-Gamma (IFN- $\Gamma$ ): Exploring Its Implications In Infectious Diseases. *Biomolecular Concepts*, 9(1), 64–79.
- Karimela, E. J., Ijong, F. G., & Dien, H. A. 2017. Karakteristik Staphylococcus Aureus Yang Di Isolasi Dari Ikan Asap Pinekuhe Hasil Olahan Tradisional Kabupaten Sangihe. *Jphpi*, 20(1), 1–11.
- Kamaliani, B. R., Setiasih, N. L. E., & Winaya, I. B. O. 2019. Histopathological Kidney Overview of Experimental Diabetes Mellitus Wistar Rats Given Ethanol Extract of Moringa Leaf. *Buletin Veteriner Udayana*, (21), 71.
- Kaufman HE. 2001. Immune Response to Intracellular Bacteria. *Clinical Immunology Principles and Practice*. St. Louis: Mosby
- Lagho, E. E., Kardena, I. M., & Jayawardhita, A. A. G. 2017. *Gambaran Histopatologi Ginjal Tikus Putih ( Rattus norvegicus ) yang Diberi Amoxicillin Dikombinasikan dengan Deksametason dan Asam Mefenamat Pasca Operasi.* 6(4), 262–269.
- Lenzen, S. 2008. The Mechanisms Of Alloxan- And Streptozotocin-Induced Diabetes. *Diabetologia*, 51(2), 216–226.
- Niaz, K., Maqbool, F., Khan, F., Hassan, F. I., Momtaz, S., & Abdollahi, M. 2018. Comparative Occurrence Of Diabetes In Canine, Feline, And Few Wild Animals And Their Association With Pancreatic Diseases And Ketoacidosis With Therapeutic Approach. *Veterinary World*, 11(4), 410–422.

- Novita Fahrianti P. 2015. Efek Asam Alfa Lipoat pada Kadar MDA dan Histologi Ginjal Tikus Wistar Diabetes Melitus Tipe 1. Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang
- Pathak, S., Dorfmüller, H. C., Borodkin, V. S., & van Aalten, D. M. F. 2008. Chemical Dissection Of The Link Between Streptozotocin, O-GlcNac, And Pancreatic Cell Death. *Chemistry and Biology*, 15(8), 799–807.
- PB. PERKENI. 2015. *Pengelolaan dan Pencegahan Diabetes Melitus Tipe 2 di Indonesia*. PB. PERKENI.
- Sabine Rauch *et al.* 2012. Abscess Formation and Alpha-Hemolysin Induced Toxicity in a Mouse Model of Staphylococcus aureus Peritoneal Infection. *Infection and Immunity* volume 80. Department of Microbiology and Department Rauch of Pediatrics, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA
- Sharp P, Villano J. 2013. The Laboratory Rat. Second edition. Boca Raton: CRC Press
- Sourris KC and Forbes JM. 2008. Pathology RAGE Drives the Development of Glomerulosclerosis and Implicates Podocyte Activation in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy Interactions Between Advanced Glycation End-Products (AGE) and their Receptors in the Development and Progression of Diabetic Nephropathy. *American Journal of Pathology*, Vol. 162, No. 4, 2008
- Sudiono, J. 2014. *Sistem Kekebalan Tubuh Manusia*. (January 2014), 86 hlm.
- Wahyuniati, N. 2018. Peran Interferon Gamma Pada Infeksi Mycobacterium Tuberculosis. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 17(2), 126–132. <https://doi.org/10.24815/jks.v17i2.8992>
- Wang, C., Zhang, Y., Zhang, L., Hou, X., Lu, H., Shen, Y., Jia, W. 2014. Prevalence Of Type 2 Diabetes Among High-Risk Adults In Shanghai From 2002 To 2012. *PLoS ONE*, 9(7), 3–11.
- Wati, I. P., Aulanni'am, A., & Mahdi, C. 2013. Aktivitas Protease Dan Gambaran Histologi Ginjal Tikus Putih (Rattus). *Kimia Student Journal*, 1(2), 257–263.
- Wegner, C., Iking-Konert, C., Hug, F., Stegmaler, S., Heppert, V., Wentzensen, A. & Hansch, G.M. 2005. Cellular Inflammatory Response To Persistent Localized Staphylococcus Aureus Infection: Phenotypical And Functional Characterization Of Polymorphonuclear Neutrophils (PMN). *Clinical experimental immunology*. 143. 70-77.
- Widowati, I., M. Zainuri, H. P. Kusumaningrum, R. Susilowati, Y. Hardivillier, V. Leignel, N. Bourgougnon & Jean-Luc Mouget. 2017. Antioxidant activity of three microalgae *Dunaliella salina*, *Tetraselmis chuii* and *Isochrysis galbana* clone Tahiti. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. 55(012067): 1-6.



# LAMPIRAN

## Lampiran 1. Sertifikat Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No: 973-KEP-UB

**KOMISI ETIK PENELITIAN (ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE)  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
TELAH MEMPELAJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN YANG  
DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA:**

**PENELITIAN BERJUDUL** : STUDI EKSPLORASI ( *Rattus norvegicus*) MODEL HEWAN COBA DIABETES SEPSIS MELALUI KOMBINASI STREPTOZOTOSIN DAN *Staphylococcus aureus* TERHADAP EKSPRESI ICAM, IL1- $\beta$ . C-REACTIVE PROTEIN DAN HISTOPATOLOGI PANKREAS

**PENELITI** : DAHLIATUL QOSIMAH

**UNIT/LEMBAGA/TEMPAT** : UNIVERSITAS BRAWIJAYA

**DINYATAKAN** : LAIK ETIK

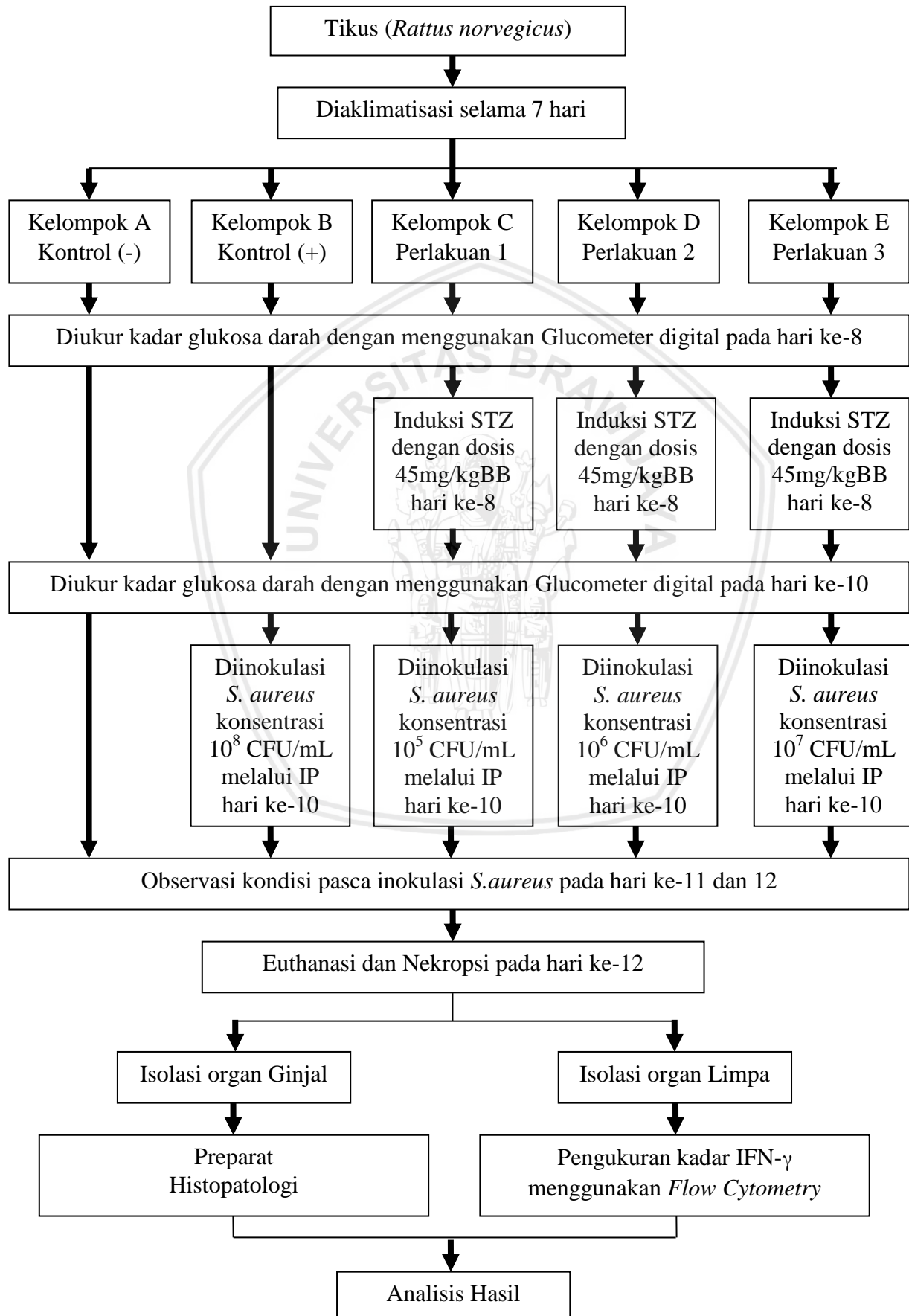
Malang, 27 April 2018  
Ketua Komisi Etik Penelitian  
Universitas Brawijaya



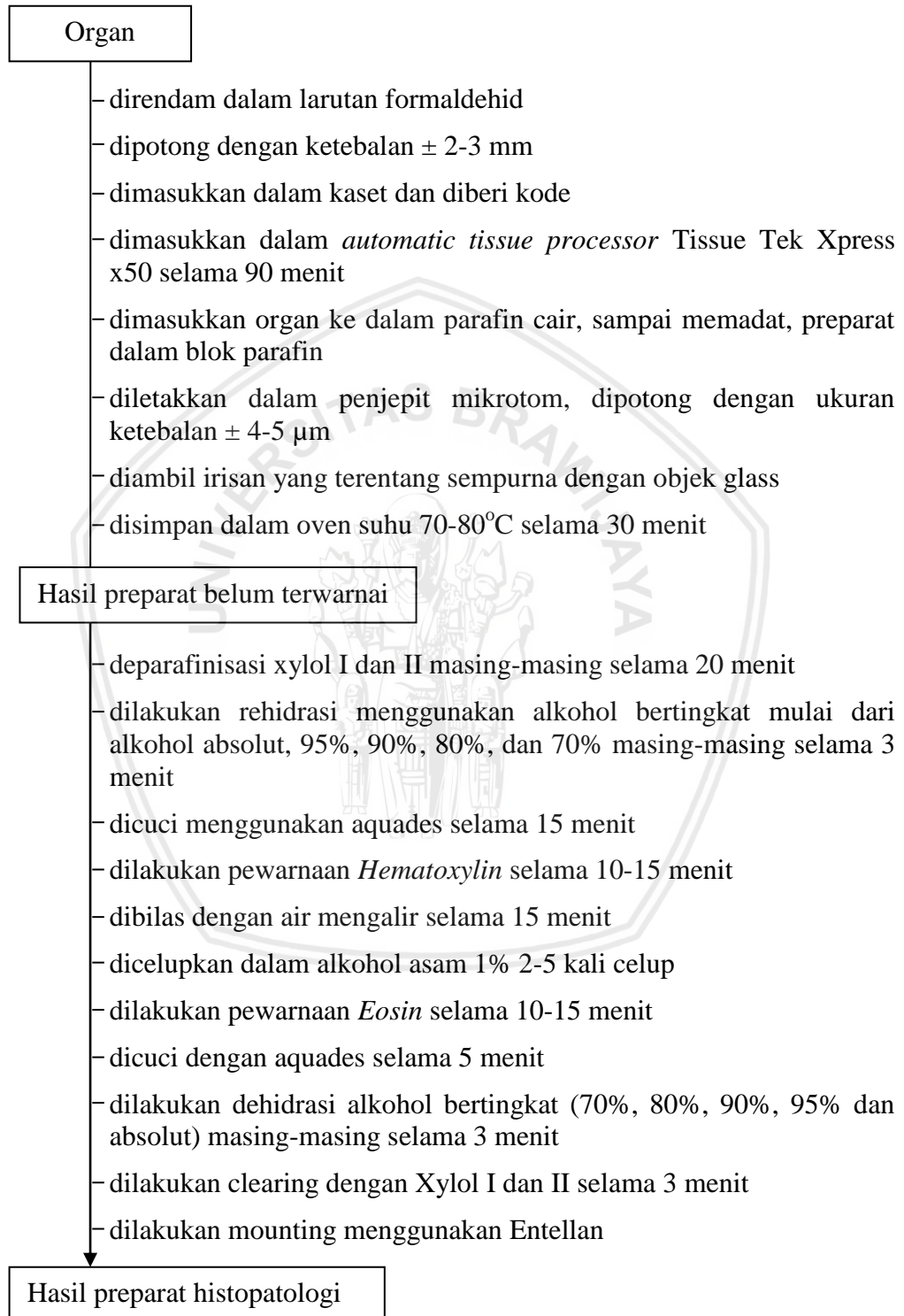
**Prof. Dr. drh. Aulanni'am, DES.**  
NIP. 19600903 198802 2 001



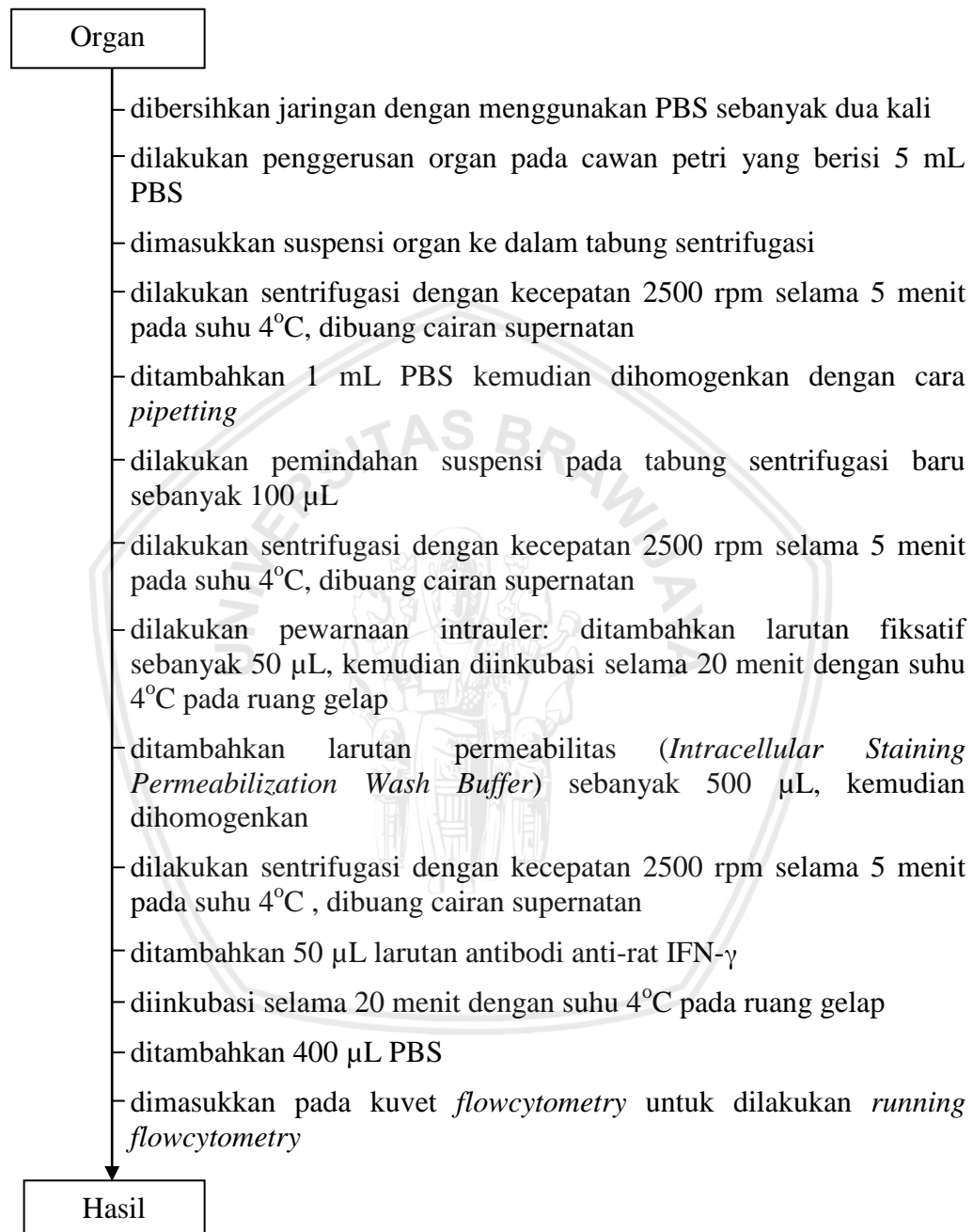
## Lampiran 2. Kerangka operasional



### Lampiran 3. Pembuatan Preparat Histopatologi Organ Ginjal



#### Lampiran 4. Prosedur *flowcytometry*





## Lampiran 5. Perhitungan Dosis

### Perhitungan dosis ketamin

Rumus : Volume obat = BB (g) x dosis (mg/kg BB)

Dosis ketamin : 0,2 mg/kg BB

### Perhitungan Dosis STZ

Rumus : Volume obat = BB (gram) x dosis (mg/kg BB)

$$= \text{BB (gram)} \times \text{dosis (mg/1000g BB)}$$

Dosis STZ : 45 mg/kg BB

Volume pemberian larutan 0,01 M buffer sitrat (pH 4,5) = 0,5 mL

Rata rata STZ = rata-rata BB (gram) x dosis (mg/1000g BB)

$$\text{Volume STZ} = \frac{\text{BB x dosis}}{\text{rata-rata STZ x 0,5 mL}}$$

**Lampiran 6. Pembuatan Suspensi Bakteri *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus*

- dilakukan penanaman pada 10 mL media NB
- diinkubasi 37°C selama 24 jam
- dilakukan uji spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm, didapatkan nilai absorbansi 0,619 yang setara dengan konsentrasi bakteri  $10^8$  CFU/mL
- diambil 1 mL bakteri konsentrasi  $10^8$  CFU/mL kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL NB kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^7$  CFU/mL
- diambil 1 mL bakteri konsentrasi  $10^7$  CFU/mL kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL NB kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/mL
- diambil 1 mL bakteri konsentrasi  $10^6$  CFU/mL kemudian dimasukkan ke dalam 9 mL NB kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan bakteri dengan konsentrasi  $10^5$  CFU/mL

Hasil

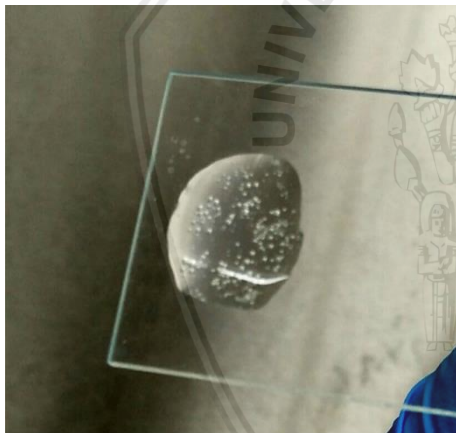
## Lampiran 7. Identifikasi *Staphylococcus aureus*

### a. Uji Mannitol



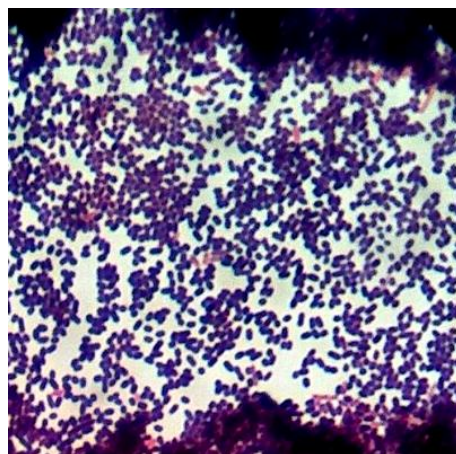
Hasil: Bakteri *S. aureus* mampu memfermentasi mannitol yang terdapat dalam media Mannitol Salt Agar (MSA)

### b. Uji Katalase



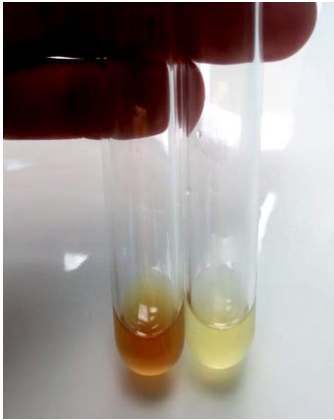
Hasil: Bakteri *S. aureus* mampu merubah  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$  dan  $O_2$  yang ditandai dengan adanya gelembung setelah bakteri ditetesi dengan  $H_2O_2$

### c. Pewarnaan Gram



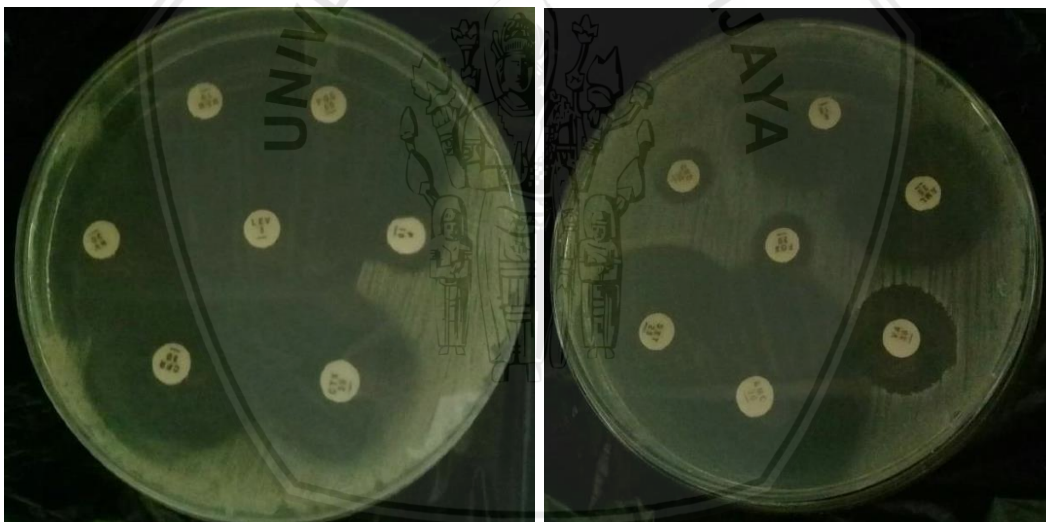
Hasil: Bakteri berwarna ungu  
Bakteri termasuk gram positif yang ditunjukkan dengan warna ungu karena terwarnai kristal violet.

## d. Uji Koagulase



Hasil: Bakteri *S. aureus* tidak mampu menggumpalkan (koagulase) plasma darah

## e. Uji Sensitivitas Antibiotik



Hasil Uji Sensitivitas Antibiotik Strain *Staphylococcus aureus*

No.	Jenis Antibiotik	Zona Hambat	Interpretasi Hasil
1	Amxyceillin	25 mm	Resisten
2	Vancomycin	17 mm	Resisten
3	Cefoxitine	13 mm	Resisten
4	Ceftriaxone	10 mm	Resisten
5	Penicillin	10 mm	Resisten
6	Amoxycillin clavulanat	34 mm	Sensitif

No.	Jenis Antibiotik	Zona Hambat	Interpretasi Hasil
7	Erythromycin	32 mm	Sensitif
8	Cotrimoxazole	30 mm	Sensitif
9	Cefadroxile	27 mm	Sensitif
10	Cefotaxime	24 mm	Sensitif
11	Fosfomycin	38 mm	Sensitif
12	Levofloxacin	33 mm	Sensitif
13	Meropenem	36 mm	Sensitif
14	Novobiosin	25 mm	Sensitif



**Lampiran 8. . Data Hasil Pemeriksaan Nilai Fisiologis Tikus Putih Model  
Hewan Coba Diabetes Infeksi *Staphylococcus aureus***

K	U	Sebelum Perlakuan					Sesudah Perlakuan				
		BB	HR	RR	TR	GD	BB	HR	RR	TR	GD
K(-)	1	187	320	112	37,1	-	204	320	174	37,2	167
	2	171	420	144	37,2	-	183	380	126	37,1	128
	3	174	316	104	36,5	-	179	360	120	36,7	110
	4	248	340	124	37,4	-	250	320	156	37,3	134
Rata – rata		195	349	121	37,1		204	345	144	37,1	135
P1	1	269	340	124	36,5	-	189	480	150	36,2	110
	2	293	420	144	36,6	-	207	328	174	36,9	110
	3	184	320	112	36,4	-	223	516	108	39	128
	4	266	324	128	36,1	-	236	480	168	36,9	112
Rata – rata		253	351	127	36,4		214	451	150	37,3	115
P2	1	218	420	132	36,5	69	168	296	108	36,2	483
	2	221	396	114	36,4	80	168	248	144	35,4	600
	3	226	404	140	36,2	92	170	438	150	36,6	600
	4	272	380	124	36,3	82	172	380	120	36,3	600
Rata – rata		234	400	128	36,4	80,8	170	341	131	36,1	571
P3	1	192	396	144	36,5	65	179	420	120	36,3	600
	2	221	420	132	36,3	89	193	456	150	35,5	499
	3	226	404	112	37	69	160	480	156	35,9	561
	4	231	420	92	37,1	73	184	480	168	36,7	515
Rata – rata		218	410	120	36,7	74	179	459	149	36,1	544
P4	1	159	456	126	36,3	80	144	480	162	36,4	300
	2	162	420	126	36,6	85	155	468	168	36,6	321
	3	209	438	108	37	73	213	456	120	37,2	600
	4	234	420	112	37,4	71	216	480	138	37,4	483
Rata – rata		191	434	118	36,8	77,3	182	471	147	36,9	426

Keterangan:

K = Kelompok

TR = *Temperature Rate*

U = Ulangan

GD = Glukosa Darah

BB = Berat Badan

HR = *Heart Rate*

RR = *Respiratory Rate*

**Lampiran 9. Hasil *Streak* Organ pada Media NAP**

Kelompok	Ulangan	Jantung	Ginjal	Hepar
K (-) (Kontrol negatif)	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-
	4	-	-	-
P1 (Perlakuan 1)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	+	-
P2 (Perlakuan 2)	1	+	+	+
	2	+	+	-
	3	+	+	-
	4	+	+	-
P3 (Perlakuan 3)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	-
	4	+	+	+
P4 (Perlakuan 4)	1	+	+	-
	2	+	+	+
	3	+	+	+
	4	+	-	-

Keterangan:

(+) = Terdapat bakteri dalam organ

(-) = Tidak terdapat bakteri dalam organ



## Lampiran 10. Uji Statistika Jumlah Sel Relatif IFN- $\gamma$

### 10.1 Uji Normalitas

**Descriptive Statistics**

	N	Percentiles		
		25th	50th (Median)	75th
PERLAKUAN	20	2.0000	3.0000	4.0000
IFN	19	2.95	5.05	7.42

### 10.2 Uji Deskriptif

**Descriptives**

IFN	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
					K-	4		
P1	4	9.33	6.208	3.104	-.55	19.21	5	18
P2	4	3.78	3.110	1.555	-1.16	8.73	1	7
P3	4	4.12	1.432	.716	1.84	6.40	3	6
P4	4	7.12	2.858	1.429	2.57	11.66	4	11
Total	20	5.54	3.862	.864	3.74	7.35	1	18

### 10.3 Uji Homogenitas

**One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test**

		PERLAKUAN	IFN
N		20	19
Normal Parameters <sup>a</sup>	Mean	3.0000	5.65
	Std. Deviation	1.45095	3.939
Most Extreme Differences	Absolute	.155	.171
	Positive	.155	.171
	Negative	-.155	-.122



Kolmogorov-Smirnov Z	.692	.744
Asymp. Sig. (2-tailed)	.725	.637
a. Test distribution is Normal.		

10.4 Uji Anova

**ANOVA**

IFN	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	106.734	4	26.683	2.266	.110
Within Groups	176.624	15	11.775		
Total	283.358	19			



**Lampiran 11.** Perhitungan Presentase Peningkatan dan penurunan Ekspresi

IFN- $\gamma$  limpa

$$\text{Penurunan/ Peningkatan (\%)} = \frac{A-B}{B} \times 100\%$$

A. [ K(-) diasumsikan sebagai rata-rata nominal ekspresi IFN-  $\gamma$  limpa

$$\text{Peningkatan (\%)} = \frac{3,36-3,36}{3,36} \times 100\% = 0$$

B. [ P1 dibandingkan dengan K (-)]

$$(\%) = \frac{9,33-3,36}{3,36} \times 100\% = 177,68\%$$

C. [ P2 dibandingkan dengan K (-) ]

$$(\%) = \frac{3,78-3,36}{3,36} \times 100\% = 12,5\%$$

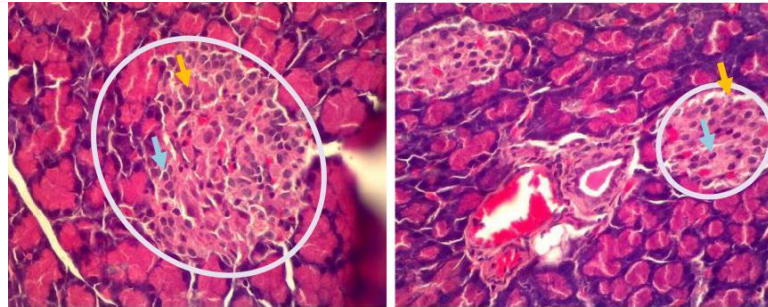
D. [ P3 dibandingkan dengan K(-) ]

$$(\%) = \frac{4,12-3,36}{3,36} \times 100\% = 22,62\%$$

E. [P4 dibandingkan dengan K(-) ]

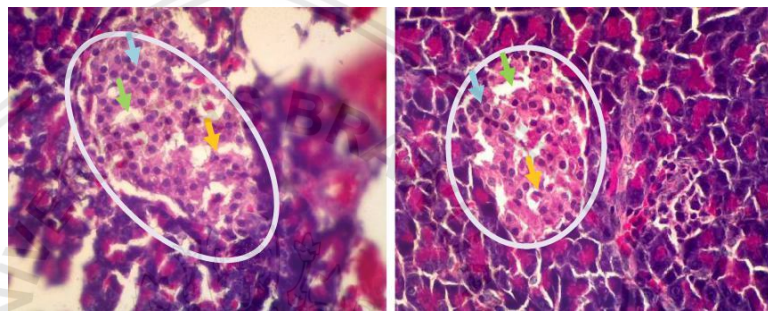
$$(\%) = \frac{7,12-3,36}{3,36} \times 100\% = 111,90\%$$

### Lampiran 12. Gambaran Histopatologi Pankreas



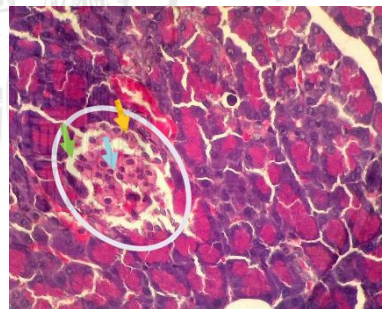
Kelompok K-

Kelompok 1



Kelompok 2

Kelompok 3



Kelompok 4

#### Keterangan:

- : Sel alfa (memiliki inti sel tidak beraturan)
- : Sel beta (memiliki inti sel besar dan bulat)
- : Pulau Langerhans
- : Ruang kosong akibat nekrosis