

[illegible][illegible][illegible]

**LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI**

Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces Cerevisiae*) Pada Tikus Putih (*Rattus Norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia Coli* Berdasarkan Kadar Superokida Dismutase (Sod) Plasma Dan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal

Oleh:

Pandu Gumelar Subkhi

135130101111012

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji

pada tanggal 19 Juli 2017

dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh
gelar Sarjana Kedokteran Hewan

Dosen Pembimbing I

Dosen Pembimbing II

Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS.

NIP. 19480615197702 2001

Drh. Ajeng Erika PH, M. Si

NIP. 19890516 201504 2 001

Mengetahui,

Dekan Fakultas Kedokteran Hewan

Universitas Brawijaya

Prof. Dr. Aulanni'am, drh, DES

NIP. 19600903 198802 2 001



LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Pandu Gumelar Subkhi

NIM : 135130101111012

Program Studi : Pendidikan Dokter Hewan

Penulis Skripsi berjudul:

Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar SOD Plasma dan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal

Dengan ini menyatakan bahwa:

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar-benar karya saya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain 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, 28 Juli 2017

Yang menyatakan,

(Pandu Gumelar Subkhi)

NIM. 135130101111012



Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Plasma dan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal

ABSTRAK

Sepsis merupakan suatu sindroma klinik yang ditandai dengan keberadaan mikroorganisme atau toksin mikroorganisme dalam sistem sirkulasi, sehingga menyebabkan aktivasi respon inflamasi secara sistemik. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam meningkatkan kadar SOD plasma darah dan menurunkan nekrosis sel endotel aorta abdominal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis hasil induksi *Escherichia coli*. Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan terdiri dari lima kelompok, yaitu kontrol negatif, kontrol positif (diinduksi *Escherichia coli*) dan tiga kelompok terapi (diinduksi *Escherichia coli* dan diberi terapi dengan dosis bertingkat, yaitu 10, 20, dan 30 mg/kg BB). Sepsis diinduksi dengan biakan *Escherichia coli* standar Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) intraperitoneal pada hari ke-8 penelitian. Terapi ekstrak ragi diberikan *per-oral* enam jam pasca induksi, dan dilanjutkan setiap 24 jam selama lima hari. Analisis yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisis *One Way ANOVA* dengan uji lanjutan *BNT 5%* untuk kadar SOD plasma serta analisa deskriptif untuk gambaran histopatologi aorta abdominal. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak ragi memberikan pengaruh yang signifikan terhadap kenaikan kadar SOD plasma dan menurunkan nekrosis sel endotel aorta abdominal. Berdasarkan hasil penelitian ini, dosis terapi 30 mg/kg BB merupakan dosis optimum untuk terapi sepsis, dapat disimpulkan bahwa ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat digunakan sebagai terapi sepsis.

Kata Kunci: *Escherichia Coli*, Histopatologi aorta, Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), SOD



Effect of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Extract Against Sepsis Rats (*Rattus norvegicus*) Induced by *Escherichia coli* Based on Superoxide Dismutase (SOD) Plasma Level and Histopathology of Abdominal Aorta

ABSTRACT

Sepsis is a clinical syndrome characterized by the presence of microorganisms or the toxin of microorganisms in circulatory system. The purpose of this research is to determine the effect of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract in increasing the level of plasma SOD and histopathology of abdominal aorta of sepsis rat (*Rattus norvegicus*) model induced by *Escherichia coli*. This research is an experimental using Completely Randomized Design (CRD) and consist of five groups, negative control, positive control (induced with *Escherichia coli*), and three treatment groups (induced with *Escherichia coli* and treated with different doses yeast extract that are, 10 mg/kg BW, 20 mg/kg BW, and 30 mg/kg BW). Sepsis induced by *Escherichia coli* with a dose 1.5×10^8 cfu/ml injected intraperitoneally at the eighth day of the research. Yeast extract treatment was given orally six hours post induction, and continued every 24 hours for five days. Data were analyzed using One Way ANOVA with Least Significant Difference (LSD) 5% for SOD activity and descriptive analytic for aorta's histopathological appearance. The result of this research were therapeutizing of sepsis rat with yeast extract could give significant effect of SOD activity. Besides, it also capable for decreasing the necrotic endothelial cell of abdominal aorta. The conclusion of this research, the optimum dose of yeast extract for sepsis treatment is 30 mg/kg BW. Therefore, yeast extract had potential as therapeutizing for sepsis.

Key word: *Escherichia Coli*, Histopathology aorta, Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) extract, SOD



KATA PENGANTAR

Ucapan alhamdulillah penulis haturkan kehadirat Allah SWT karena atas limpahan rahmat, hidayah dan pertolongan-Nya lah sehingga penulis mampu menyelesaikan Skripsi yang berjudul **"Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cereviseae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* berdasarkan Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Plasma dan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal"** dengan lancar.

Selama penyusunan proposal ini penulis banyak mendapat bantuan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Dr. Pratiwi Trisunuwati, drh., MS. selaku dosen pembimbing I atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
2. drh. Ajeng Erika PH, M. Si selaku dosen pembimbing II atas bimbingan, saran, kesabaran, fasilitas serta waktu yang telah diberikan selama ini.
3. drh. Dodik Prasetyo, M.Vet dan drh. Beta Purnama Sari, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan kritik yang sangat membangun.
4. Prof. Dr. Aulanni'am, drh.. DES selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
5. Seluruh Jajaran Dekanat, Dosen dan Staff Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya atas dorongan semangat dan fasilitas yang diberikan.
6. Ibunda Suhar Yuliestin, Ayahanda Djoni Agus Subkhi, serta saudara saya yang tercinta Muhammad Abimanyu dan Arya Bima untuk doa, kasih sayang, dukungan serta pengorbanan baik moril maupun materi selama ini.
7. Teman-teman seperjuangan keluarga besar angkatan 2013 FKH UB khususnya kelas A atas cinta, persahabatan, semangat, inspirasi, keceriaan dan mimpi- mimpi yang luar biasa.
8. Teman-teman kelompok skripsi yang telah menemani dalam suka dan duka selama penelitian



9. Keluarga Besar Laboratorium Anatomi Veteriner yang telah memberikan semangat kepada penulis.

10. Keluarga Besar An-Nahl yang telah memberikan semangat kepada penulis.

11. Serta kepada semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan penyusunan yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa Skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, maka saran dan kritik yang membangun dari semua pihak sangat diharapkan demi penyempurnaan selanjutnya.

Akhir kata, penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga skripsi ini dapat memberikan manfaat serta menambah pengetahuan tidak hanya bagi penulis tetapi juga bagi pembaca. Amin Ya Robbalalamin.

Malang, 28 Juli 2017

Penulis



DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR ISTILAH DAN SINGKATAN	xiii
BAB 1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Batasan Masalah	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Sepsis	7
2.1.1 Pengertian dan Insidensi Sepsis	7
2.1.2 Etiologi Sepsis	8
2.1.3 Patofisiologi Sepsis	9
2.1.4 Gejala Klinis Sepsis	11
2.1.5 Diagnosa Sepsis	11
2.1.6 Terapi Sepsis	12
2.2 Radikal Bebas	12
2.3 Antioksidan	16
2.4 <i>Superoksida Dismutase</i> (SOD)	18
2.5 Histologi Aorta	19
2.6 Ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	23
2.7 Betaglukan	25
2.8 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	26
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN	29
3.1 Kerangka Konsep	29
3.2 Hipotesis Penelitian	33
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN	35
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian	35
4.2 Alat dan Bahan Penelitian	35
4.2.1 Alat	35
4.2.2 Bahan	36
4.3 Tahapan Penelitian	36
4.4 Prosedur Kerja	37



4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba.....	37
4.4.2 Pembuatan Sediaan dan Penentuan Dosis Ekstrak Ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	40
4.4.3 Perlakuan pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	41
4.4.4 Pengukuran Kadar <i>Superoksida Dismutase</i> (SOD) Plasma	41
4.4.5 Isolasi Aorta Abdominal	42
4.4.6 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Aorta Abdominal	42
4.5 Analisis Data	43
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN	44
5.1 Efek Pemberian Ekstrak Ragi pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Sepsis Induksi <i>Escherichia coli</i> Berdasarkan Kadar SOD Plasma	44
5.2 Efek Pemberian Ekstrak Ragi pada Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) Model Sepsis Induksi <i>Escherichia coli</i> Berdasarkan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal	49
BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN	55
6.1 Kesimpulan	55
6.2 Saran	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	60



DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

2.1 Data Biologis Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>).....	27
4.1 Rancangan Penelitian	39
5.1 Rata-rata Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Plasma Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	44



DAFTAR GAMBAR

Gambar

Halaman

2.1 Reaksi Dismutasi	18
2.2 Histologi Aorta dengan Potongan Melintang	21
2.3 Struktur Dinding Aorta	21
2.4 Endotel pada Kondisi Sepsis	23
2.5 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pada Perbesaran 10 x 40	24
2.6 Struktur Dinding Sel <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.7 Struktur beta-1,3-glukan	26
2.8 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	28
5.1 Histopatologi Aorta Abdominal Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>)	49



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Kerangka Operasional.....	60
2. Kultur Darah Sebagai Indikator Sepsis.....	61
3. Proses Ekstraksi Ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).....	62
4. Perhitungan Dosis.....	63
5. Pengukuran Kadar <i>Superoksida Dismutase</i> (SOD) plasma.....	64
6. Isolasi Aorta Abdominal.....	65
7. Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Aorta Abdominalis.....	66
8. Analisa Data.....	67
9. Gejala Klinis Sepsis.....	72
10. Hasil Kultur Darah.....	73
11. Data Hasil Pengukuran Nilai Fisiologis Tikus Putih Model Sepsis.....	77
12. Hasil Pemeriksaan Hematologi.....	78
13. Laik Etik.....	80
14. Dokumentasi Penelitian.....	81



DAFTAR SINGKATAN DAN LAMBANG

Simbol/singkatan

ANOVA
BB
CAT
CD 14
cfu/ml
cm
Cu
DNA
EDTA
ECM
EMBA
g
GPx
HE
H₂O₂
HCl
ICAM-1
IL-1
IL-1 β
IL-12
IL-6
kg
LPB
LPS
MF
mg
ml
Mn
MOF
NF- κ B
nm
PAF
PBS
PCT
PMN
Rpm
SOD
SOR
 μ m
TLR4
TNF- α
Zn

Keterangan

Analysis of variance
berat badan
Catalase
Cluster of Differentiation 14
colony forming unit/ml
centimeter
Cupro
Deoxyribonucleic Acid
Ethylenediaminetetraacetic Acid
Extracellular matrix
Eosin Methylene Blue Agar
gram
Glutation Peroxidase
Hematoksilin Eosin
Hydrogen Peroxide
Hydrogen Chloride
Intracellular Adhesion Molecule-1
Interleukin-1
Interleukin-1 Beta
Interleukin-12
Interleukin-6
kilogram
Lipopolysaccharide Binding Protein
Lipopolisakarida
Mc Farland
miligram
milliliter
Manganese
Multi Organ Failure
Nuclear Factor Kappa B
nanometer
Platelete Activating Factor
Phosphate Buffer Saline
Procalcitonin
Polymorphonuclear
Rotasi per menit
Superoksida Dismutase
Spesies Oksigen Reaktif
mikro meter
Toll Like Receptor 4
Tumor Necrosis Factor Alpha
Zinc



BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi, membuat sepsis dan syok septik menjadi salah satu masalah kesehatan serius di dunia. Insidensi sepsis di dunia kedokteran manusia dan kedokteran hewan cukup tinggi di berbagai belahan dunia. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Isola *et. al.*, (2013) tentang mortalitas akibat sepsis pada 19 ekor anjing, diketahui bahwa persentase mortalitas anjing pada kelompok sepsis parah (15 ekor) mencapai 33.33 %. Sementara itu, persentase mortalitas pada anjing kelompok syok septik (4 ekor) mencapai 100%, dengan kematian semua anjing dalam kurun waktu 24 jam.

Sepsis adalah suatu kondisi respon tubuh yang berlebihan akibat suatu infeksi mikroorganisme. Pada kondisi sepsis, terjadi respon inflamasi yang sistemik, sehingga terjadi aktivasi dan pelepasan mediator-mediator proinflamasi. Respon inflamasi yang berlebihan sangat berbahaya untuk pertahanan host melawan infeksi. Produksi mediator proinflamasi yang berlebihan akan menekan fungsi kekebalan tubuh bawaan (terutama PMN) sehingga tubuh akan semakin rentan terhadap infeksi (Riedemann *et al.*, 2003).

Pada kondisi sepsis, perbandingan antara sitokin proinflamasi dan sitokin antiinflamasi tidak seimbang. Produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan pada saat sepsis, dapat menyebabkan kerusakan pada endotel aorta. Beberapa sitokin proinflamasi yang berada di sistem sirkulasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan



IL-6 yang dihasilkan oleh makrofag berpotensi merusak struktur endotel aorta (Megasari, 2009).

Menurut Radin (2015), ketika terjadi sepsis didapatkan pula kondisi stres oksidatif yang berat. Stres oksidatif merupakan suatu keadaan jumlah antioksidan lebih rendah dibandingkan dengan radikal bebas, sehingga terjadilah proses oksidasi molekul-molekul penting. Radikal bebas merupakan atom, molekul, atau senyawa yang dapat berdiri sendiri yang mempunyai elektron tidak berpasangan, oleh karena itu bersifat sangat reaktif dan tidak stabil. Elektron yang tidak berpasangan akan mencari pasangan baru, sehingga mudah bereaksi dengan zat lain (protein, lemak, maupun DNA) didalam tubuh. Secara fisiologis, Spesies Oksigen Reaktif (SOR) berperan sebagai bakterisidal dan bakteriolisis. Pada kondisi sepsis, sel fagosit menghasilkan SOR untuk mengeliminasi bakteri. Akan tetapi, radikal bebas tidak menyerang target secara spesifik. Radikal bebas juga menyerang molekul-molekul penting didalam tubuh, seperti protein, lipid yang terdapat di membran sel, dan DNA. Untuk menekan aktivitas radikal bebas diperlukan suatu antioksidan. Salah satu contoh enzim antioksidan adalah Superoksida dismutase (SOD). Superoksida dismutase merupakan suatu antioksidan primer yang berperan dalam menanggulangi radikal bebas, yaitu anion superoksida.

Terapi yang umum diberikan ketika terjadi sepsis adalah dengan memberikan antibiotik dan obat antiinflamasi golongan steroid. Akan tetapi, pemberian antibiotik akan menyebabkan peningkatan sekresi endotoksin oleh bakteri. Bakteri yang lisis akibat antibiotik akan melepaskan endotoksin yang



akan memperparah kondisi sepsis. Obat antiinflamasi golongan steroid bersifat immunodepresan dan menyebabkan ulser pada mukosa lambung (Russel, 2006; Guntur, 2008).

Betaglukan merupakan suatu polisakarida yang dihasilkan oleh jamur, alga, khamir, dan bakteri. Betaglukan dapat diperoleh dari ekstrak *Saccharomyces cerevisiae* asal ragi roti. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati dkk., (2007), betaglukan memiliki berbagai manfaat sebagai antiseptik, antioksidan, aktivator sistem kekebalan tubuh, antiinflamasi, antikolesterol, dan antidiabetes. Dengan demikian betaglukan memiliki potensi untuk meningkatkan kadar SOD sehingga proses oksidasi radikal bebas yang berlebihan dapat ditekan. Penelitian yang dilakukan oleh Sandvik (2007) membuktikan bahwa betaglukan berpotensi menurunkan sekresi sitokin proinflamasi dan mencegah terjadi kerusakan jaringan pada tikus model sepsis. Kerusakan sel endotel aorta yang disebabkan oleh sitokin proinflamasi dapat dicegah.

Untuk membuktikan hal tersebut, peneliti ingin mengetahui hubungan pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kadar SOD plasma dan gambaran histopatologi aorta abdominal. Diharapkan pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) memiliki potensi sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam penatalaksanaan sepsis, sehingga dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas penderita sepsis.



1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka dapat dirumuskan beberapa permasalahan sebagai berikut:

1. Apakah terdapat peningkatan kadar SOD plasma darah pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis hasil induksi *Escherichia coli* yang diterapi dengan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)?
2. Apakah terdapat penurunan nekrosis sel endotel aorta abdominal tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis hasil induksi *Escherichia coli* yang diterapi dengan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*), berjenis kelamin jantan strain Wistar, umur 2-3 bulan, berat badan rata-rata 200 g, diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga (FK UA)
2. Pembuatan kondisi sepsis pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan melalui induksi *Escherichia coli* dengan dosis standar Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml), yang diinjeksikan *intra-peritoneal* sebanyak satu kali pada hari ke-8 perlakuan penelitian.
3. Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) yang digunakan dalam penelitian ini merupakan ragi roti kering dari salah satu merk dagang yang terdapat di pasaran.



4. Ragi roti diekstrak dengan metode Hunter *et. al.*, (2002). Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB.
5. Ekstrak ragi roti yang diberikan pada hewan coba model sepsis menggunakan dosis 10, 20, dan 30 mg/kgBB dan diberikan *per-oral* menggunakan sonde lambung. Pemberian terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dilakukan selama 5 hari pada hari ke-8 sampai hari ke-12 perlakuan penelitian.
6. Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah kadar SOD plasma darah yang diukur dengan menggunakan spektrofotometer dan gambaran histopatologi aorta abdominal yang diamati dibawah mikroskop cahaya dengan menggunakan perbesaran objektif 40 kali.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada kondisi sepsis terhadap kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis hasil induksi *Escherichia coli*.
2. Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada kondisi sepsis terhadap gambaran histopatologi aorta abdominal pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis hasil induksi *Escherichia coli*.



1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat sebagai penambah wawasan terkait dengan terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kondisi sepsis dan diharapkan hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai dasar penerapan terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap sepsis yang perlu diuji lebih lanjut melalui berbagai penelitian lanjutan.



BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sepsis

2.1.1 Pengertian dan Insidensi Sepsis

Sepsis merupakan suatu sindroma klinik yang disebabkan oleh respon tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme (Guntur, 2008). Sepsis adalah suatu respon sistemik *host* terhadap infeksi yang disebabkan oleh agen patogen atau toksin berada didalam sistem sirkulasi, sehingga terjadi aktivasi proses inflamasi (Chen *and* Pohan, 2006). Sepsis merupakan suatu sindroma klinik yang terjadi sebagai manifestasi proses peradangan karena respon tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme (Daniel *and* Remick, 2007). Sepsis merupakan sindrom yang ditandai dengan hiperinflamasi, kerusakan oksidatif, hiperkoagulasi, hipoperfusi jaringan, hipoksia, imunosupresi, dan disfungsi multiorgan (Biswal *and* Remick, 2007). Baik respon imun maupun karakteristik infeksi yang disebabkan oleh mikroorganisme, berpengaruh terhadap tingkat morbiditas sepsis. Sepsis disertai dengan kegagalan fungsi organ terjadi ketika sistem pertahanan tubuh tidak cukup kuat untuk melawan infeksi. Menurut Russell (2006), permasalahan sepsis yang paling besar terletak pada karakteristik dari mikroorganisme, seperti tingkat keparahan infeksi yang diakibatkan oleh mikroorganisme tersebut, serta superantigen dan agen toksik lain yang resisten terhadap fagositosis dan antibodi. Produksi sitokin proinflamasi yang berlebihan akan menyebabkan aktivasi respon sistemik terutama pada paru-paru, hati, ginjal, dan organ lain. Hal tersebut akan menyebabkan terjadi apoptosis, nekrosis



aringan, *Multi Organ Dysfunction* (MOD), syok septik, dan kematian (Nur, 2010).

Menurut Remick (2007), hingga saat ini sepsis menjadi penyebab kematian dan kegagalan fungsi organ. Sepsis dan syok septik dinilai sebagai masalah kesehatan serius di dunia. Hal ini disebabkan oleh angka morbiditas dan mortalitas sepsis dan syok septik yang tinggi (Radin, 2015). Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan oleh Isola *et al.*, (2013) tentang mortalitas akibat sepsis pada 19 ekor anjing, diketahui bahwa persentase mortalitas anjing pada kelompok sepsis parah (15 ekor) mencapai 33.33 %. Sementara itu, persentase mortalitas pada anjing kelompok syok septik (4 ekor) mencapai 100% dengan kematian semua anjing dalam kurun waktu 24 jam.

2.1.2 Etiologi Sepsis

Menurut penelitan yang dilakukan oleh Guntur (2008), sepsis paling banyak disebabkan akibat bakteri gram negatif dengan presentase kasus sekitar 60-70%. Sepsis maupun syok septik secara klasik telah diketahui disebabkan oleh bakteri gram negatif seperti *Escherichia coli*. Tetapi tidak menutup kemungkinan bahwa sepsis juga dapat disebabkan oleh infeksi mikroorganisme lain seperti bakteri gram positif, jamur, virus bahkan parasit. Ketika tubuh terinfeksi oleh mikroorganisme seperti bakteri, virus, dan jamur, tubuh akan melawan infeksi tersebut dengan jalan mengaktivasi sisitem imun (Hildreth *et al.*, 2009)

Mikroorganisme tersebut memiliki komponen antigen seperti Lipopolisakarida (LPS) yang dimiliki oleh bakteri gram negatif dan peptidoglikan yang dimiliki



oleh bakteri gram positif (Toussaint and Gerlach, 2009). Beberapa hal yang menjadi penyebab sepsis antara lain perforasi usus kedalam *cavum abdomen*, pneumonia, luka operasi, infeksi saluran kemih, meningitis, dan osteomyelitis (Hildreth *et. al.*, 2009).

2.1.3 Patofisiologi Sepsis

Sepsis sebagian besar disebabkan oleh infeksi bakteri. Pada bakteri gram negatif, LPS juga dikenal sebagai endotoksin memiliki peranan penting. Lipopolisakarida (LPS) tertanam pada membran luar, dan bagian molekul yang disebut sebagai lipid A terkait pada dinding sel bakteri. Bakteri gram positif tidak memiliki endotoksin, namun bakteri golongan tersebut memiliki kemampuan untuk memproduksi eksotosin poten. Eksotosin gram positif menunjukkan sifat sebagai superantigen, yang dapat berikatan secara aktif terhadap kompleks hisokompatibilitas mayor kelas 2 dan juga domain-domain Vb reseptor limfosit T. Sifat-sifat tersebut membuat bakteri gram positif dapat mengaktifasi sel T secara masif dan melepaskan limfokin-limfokin pro-inflamasi. Peptidoglikan dan asam lipoteikoat dari dinding sel bakteri gram positif dapat berikatan dengan permukaan sel dan bersifat pro-inflamatorik (Sumantri, 2012).

Setelah agen infeksi memasuki tubuh, terjadi aktivasi respon imun alami yang mengkoordinasikan respon pertahanan, baik komponen humoral maupun seluler. Sel-sel mononuklear akan melepaskan sitokin-sitokin proinflamasi klasik seperti (IL-1), (IL-6), dan (TNF α), namun juga melepaskan sitokin-sitokin pro-inflamasi lain seperti (IL-12), (IL-15), dan (IL-18). Sitokin proinflamasi seperti



TNF α dan IL-1 merupakan sitokin inflamasi yang memerantarai banyak fitur imunopatologis dari renjatan karena LPS. Sitokin proinflamasi TNF α dan IL-1 dilepaskan pada 30-90 menit setelah paparan terhadap LPS, mengaktifkan kaskade inflamasi derajat dua termasuk sitokin, mediator lipid, dan spesies oksigen reaktif, serta juga meningkatkan produksi molekul-molekul adhesi sel, yang kemudian menginisiasi migrasi sel inflamatorik kedalam jaringan (Sumantri, 2012).

Dalam kondisi sepsis, neutrofil mempunyai peran ganda. Di satu sisi, sel-sel ini berperan penting dalam mengontrol pertumbuhan bakteri. Pada sisi lain, neutrofil berperan dalam aktivasi endotel dan menimbulkan kegagalan organ. Kegagalan organ multipel merupakan penyebab kematian pada pasien yang mengalami sepsis. Mekanisme kegagalan organ ini melibatkan deposisi fibrin yang luas yang menyebabkan oklusi mikrovaskular, eksudat jaringan yang terbentuk, kemudian mengganggu oksigenasi adekuat dan gangguan hemostasis mikrovaskular yang muncul dari elaborasi zat-zat vasoaktif, seperti (PAF), histamin, dan prostanoïd. Infiltrat seluler terutama neutrofil, merusak jaringan secara langsung dengan melepaskan enzim lisozomal dan radikal-radikal bebas turunan superoksida. Sitokin proinflamasi seperti, TNF α dan sitokin-sitokin lain meningkatkan ekspresi sintase oksida nitrat terinduksi dan peningkatan produksi nitrat lebih lanjut, akan menyebabkan instabilitas vaskular dan juga berkontribusi terhadap depresi miokardial yang timbul pada sepsis (Sumantri, 2012).



2.1.4 Gejala Klinis Sepsis

Pada kondisi sepsis, dapat muncul beberapa gejala klinis yang bersifat tidak spesifik seperti demam dan menggigil. Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Nabeer *et. al.* (2000) pada tikus model sepsis dengan induksi *E. coli*, menyebutkan bahwa gejala klinis seperti demam, takikardi, dan takipnea dapat muncul 45 menit-24 jam post induksi. Dembovska *et. al.* (2008) menyatakan pemeriksaan temperatur, pulsus, dan respirasi dapat dilakukan 1,5 – 5 jam setelah induksi dengan *E. coli*. Sepsis akan menimbulkan beberapa gejala klinis, seperti demam, takikardi, takipnea, dan leukositosis pada awal infeksi dan berlanjut menjadi sepsis tahap awal (fase hiperdinamik) hingga menjadi sepsis tahap akhir (fase hipodinamik). Wesche *et. al.*, (2005) menyebutkan bahwa fase hiperdinamik ditandai dengan peningkatan curah jantung dan peningkatan perfusi ke jaringan. Sedangkan fase, hipodinamik ditandai dengan penurunan aliran darah vaskuler dan perifer. Penurunan aliran darah vaskuler dan perifer ini akan mengganggu proses presentasi antigen oleh sistem imun dan terjadi imunosupresi. Sel-sel imun akan kehilangan fungsi dalam sistem pertahanan tubuh.

2.1.5 Diagnosa Sepsis

Sepsis dapat didiagnosa berdasarkan gejala klinis yang muncul didukung dengan uji konfirmasi mikrobiologi. Uji konfirmasi mikrobiologi digunakan untuk menentukan etiologi dari infeksi. Pengujian tersebut dapat berupa kultur darah dan spesimen lain seperti cairan serebrospinal, urin, serta cairan lain, seperti abses dan lesi pada kulit. Prosentase kultur positif mikroorganisme pada sampel darah



sekitar 20-40% pada kasus sepsis dan 40-70% pada kasus syok sepsis. Dalam sebuah studi yang dilakukan oleh Hyde *et al.*, (1989) kultur positif mikroorganisme dari sampel darah pada media *MacConkey Agar* (MCA) sebesar 1.55×10^{10} CFU/ml. Pemeriksaan hitung sel darah, profil ginjal dan hati juga dapat dilakukan untuk menunjang diagnosa sepsis (Garna, 2012). Pemeriksaan lain yang dapat dilakukan untuk menegakkan diagnosa sepsis adalah pemeriksaan level *Procalcitonin* (PCT) serum. *Procalcitonin* (PCT) merupakan prohormon *calcitonin* dan kadar PCT akan mengalami peningkatan secara signifikan pada kondisi sepsis berat (Buchori dan Prihatini, 2006).

2.1.6 Terapi

Tindakan terapi pada pasien sepsis selama ini dengan memberikan antibiotik, terapi cairan untuk mencegah kegagalan organ, dan penggunaan obat-obatan antiinflamasi golongan steroid untuk menekan respon inflamasi sistemik (Guntur, 2008). Penggunaan antibiotik menyebabkan bakteri akan lisis dan melepaskan endotoksin yang akan memperparah kondisi sepsis. Pemberian steroid menekan sistem imun (imunodepresan) dan perdarahan saluran cerna. Menurut penelitian yang dilakukan oleh Aziz (2006), pemberian steroid pada pasien sepsis, meningkatkan mortalitas yang sebagai akibat dari perdarahan saluran cerna.

2.2 Radikal Bebas

Radikal bebas merupakan atom atau molekul (kumpulan atom) yang memiliki satu atau lebih elektron tidak berpasangan pada lapisan terluar (Clarkson and Thompson, 2000). Radikal bebas memiliki sifat reaktivitas yang tinggi karena



memiliki kecenderungan untuk menarik elektron dan mengubah suatu molekul menjadi molekul radikal (Suryohudoyo, 2010). Radikal bebas juga dapat bereaksi dengan cepat dengan atom lain untuk mengisi orbital yang tidak berpasangan (Simanjuntak, 2007).

Radikal bebas didalam tubuh merupakan bahan yang sangat berbahaya. Telah diketahui bahwa radikal bebas merupakan suatu molekul atau senyawa yang memiliki elektron tidak berpasangan. Hal tersebut menyebabkan radikal bebas selalu mencari pasangan dengan molekul lain. Radikal bebas secara umum berikatan dengan molekul-molekul besar seperti, lipid, protein, dan *Deoxyribonucleic Acid* (DNA). Apabila hal itu terjadi, akan menyebabkan kerusakan sel atau pertumbuhan sel yang tidak dapat dikendalikan karena mutasi DNA (Kesuma dan Rina, 2015).

Radikal bebas dapat terbentuk secara in-vivo dan in-vitro dengan cara; (1) pemecahan satu molekul normal secara hemolitik menjadi dua, hal ini memerlukan tenaga yang tinggi dari sinar ultraviolet, panas, dan radiasi ion; (2) kehilangan satu elektron dari molekul normal, dan; (3) penambahan elektron pada molekul normal (Kesuma dan Rina, 2015).

Radikal bebas dapat dihasilkan secara endogen dan eksogen. Secara endogen berasal dari reaksi reduksi dan oksidasi selama proses fisiologi normal didalam tubuh. Radikal endogen terbentuk sebagai sisa dari proses metabolisme protein, karbohidrat, dan lemak pada mitokondria, proses inflamasi, fagosit, xantin oksidase, peroksisom, dan pada kondisi iskemia (Kesuma dan Rina, 2015).



Dan secara eksogen berasal dari luar tubuh seperti, radiasi ionisasi dan polutan lain (Istri, 2016).

Radikal bebas dapat dikelompokkan menjadi SOR dan Spesies Nitrogen Reaktif (SNR). Spesies Oksigen Reaktif dihasilkan melalui proses oksidasi maupun reduksi molekul oksigen (O_2). Contoh dari SOR, yaitu radikal superoksida (O_2^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), dan radikal hidroksil ($OH^\cdot$). Contoh dari RNS adalah nitrit oksida (NO) (Istri, 2016).

Radikal bebas bersifat destruktif, sangat reaktif, dan mampu bereaksi dengan makromolekul sel seperti, lipid, protein, dan DNA (Rico, 2013). Beberapa dampak radikal bebas terhadap tubuh, antara lain:

a. Kerusakan DNA pada inti sel

Radikal bebas merupakan salah satu faktor penyebab kerusakan DNA.

Apabila sel melakukan pembelahan dan tidak terjadi proses perbaikan DNA akan mengakibatkan perubahan genetik secara permanen. Hal ini dikenal sebagai mutasi DNA. Ini menjadi awal dari proses karsinogenesis.

Proses oksidasi DNA oleh radikal bebas berpotensi menyebabkan kanker.

b. Kerusakan protein

Perubahan *Low Density Lipoprotein* (LDL) menjadi bentuk LDL teroksidasi yang disebabkan oleh radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan dinding dan bagian lain dari pembuluh darah. Peningkatan kadar LDL oleh radikal bebas menyebabkan aterosklerosis.

c. Kerusakan lipid peroksida



Radikal bebas menyebabkan kerusakan oksidatif pada ikatan lemak tak jenuh. Lemak tak jenuh merupakan komponen penyusun membran sel. Peroksidase lipid pada membran merusak struktur membran dan menyebabkan kehilangan fungsi dari organel sel.

Secara fisiologis, radikal bebas memiliki peranan yang sangat penting. Radikal bebas juga memiliki efek positif dalam proses fisiologis tubuh (Kesuma dan Rina, 2015). Beberapa efek positif radikal bebas, antara lain:

- a. Spesies oksigen reaktif (SOR) berperan dalam proses bakterisidal dan bakteristatik. Spesies oksigen reaktif (SOR) disintesis oleh sel fagosit sebagai mekanisme untuk membunuh bakteri. Spesies oksigen reaktif (SOR) yang berperan sebagai bakterisidal yaitu radikal O_2^- dan H_2O_2 .
- b. Radikal superoksida (O_2^-) mempunyai sifat sebagai vasokonstriktor pada otot polos atau dalam fibroblas

Radikal bebas yang dihasilkan dalam jumlah normal, sangat penting untuk proses biologis, seperti mekanisme fagosit menghasilkan SOR untuk membunuh bakteri. Akan tetapi, radikal bebas tidak menyerang target secara spesifik. Radikal bebas juga menyerang molekul-molekul penting dalam tubuh, seperti protein, DNA, dan asam lemak tak jenuh yang terdapat di membran sel, hal ini menyebabkan kerusakan struktur dan fungsi sel (Rico, 2013).



2.3 Antioksidan

Antioksidan merupakan suatu senyawa atau komponen kimia yang dalam kadar tertentu mampu menghambat kerusakan akibat proses oksidasi. Secara kimia senyawa antioksidan adalah senyawa pemberi elektron (elektron donor). Secara biologis, antioksidan merupakan senyawa yang dapat menangkal dampak negatif dari oksidan atau radikal bebas. Antioksidan bekerja dengan cara mendonorkan satu elektron kepada senyawa yang bersifat oksidan dengan demikian aktifitas oksidan tersebut dapat dihambat. Tubuh membutuhkan antioksidan sebagai perlindungan terhadap radikal bebas. Menurut Chapple *et. al.*, (2007), keseimbangan antara antioksidan dan radikal bebas menjadi kunci utama pencegahan stress oksidatif.

Antioksidan dapat diklasifikasikan, menjadi antioksidan primer, antioksidan sekunder, dan antioksidan tersier (Perez *and* Aguilar, 2013).

a. Antioksidan Primer

Antioksidan primer bekerja dengan cara mencegah terbentuk radikal bebas baru.

Antioksidan primer mengubah radikal bebas menjadi molekul yang lebih stabil sebelum radikal bebas tersebut bereaksi. Yang termasuk antioksidan primer antara lain:

- 1) Enzim SOD yang mengubah molekul radikal superoksida (O_2^-) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2).



2) Enzim *glutathione peroksidase* (GPx) yang mengubah H_2O_2 dan lipid peroksida menjadi molekul yang lebih stabil.

3) *Catalase* (CAT) yang mengubah H_2O_2 menjadi molekul H_2O dan O_2

b. Antioksidan Sekunder

Antioksidan sekunder bekerja dengan cara menangkap molekul radikal bebas, mencegah terjadi reaksi berantai. Yang termasuk kedalam antioksidan sekunder antara lain, vitamin E, Vitamin C, beta karoten, dan albumin.

c. Antioksidan Tersier

Antioksidan tersier memperbaiki biomolekul mengalami kerusakan oleh radikal bebas. Contoh dari antioksidan tersier antara lain, *DNA repair enzymes* dan *methionin sulfoxide reductase*.

Antioksidan dapat diklasifikasikan berdasarkan sumber dan fungsi. Berdasarkan sumber, antioksidan dibagi menjadi antioksidan endogen dan antioksidan eksogen (Simanjuntak, 2007). Antioksidan endogen dihasilkan oleh tubuh dan terbagi atas enzimatik dan non-enzimatik. Yang termasuk kedalam antioksidan enzimatik adalah SOD, GPx, dan CAT. Contoh antioksidan non-enzimatik adalah transferin. Antioksidan eksogen merupakan antioksidan yang berasal dari luar tubuh seperti senyawa-senyawa flavonoid, vitamin C, vitamin E, dan karotenoid (Simanjuntak, 2007).

Chapple *et al.*, (2007) menyatakan, antioksidan dapat diklasifikasikan berdasarkan fungsi. Berdasarkan fungsi, antioksidan terbagi menjadi antioksidan



preventif dan antioksidan *scavenging* (pemutus rantai). Yang termasuk antioksidan preventif adalah kelompok enzim SOD, GPx, CAT, dan DNA *repair enzymes*. Antioksidan preventif bekerja dengan cara mencegah pembentukan radikal OH. Antioksidan *scavenging* (pemutus rantai) terdiri dari asam askorbat, karotenoid, asam urat, polifenol, bilirubin, albumin, dan thiols. Antioksidan *scavenging* bekerja dengan cara menyumbangkan elektron ke molekul radikal sehingga, molekul radikal menjadi stabil dan reaksi berantai dapat terhenti.

2.4 Superoksida Dismutase (SOD)

Superoksida dismutase (SOD) merupakan enzim yang berperan mengkatalis dismutase radikal anion superoksida ($O_2^{\cdot -}$) menjadi hidrogen peroksida (H_2O_2) dan oksigen (O_2). *Superoksida dismutase* merupakan metaloenzim, aktivitas antioksidan tersebut dipengaruhi oleh keberadaan logam Cu, Zn, dan Mn (Kesuma dan Rina, 2015).



Gambar 2.1: Reaksi Dismutasi (Kesuma dan Rina, 2015).

Superoksida dismutase (SOD) berfungsi melindungi sel-sel tubuh dan mencegah terjadi inflamasi yang disebabkan oleh radikal bebas. Enzim SOD dihasilkan oleh tubuh, akan tetapi enzim tersebut memerlukan mineral seperti, Mangan (Mn), seng (Zn), dan tembaga (Cu) untuk menunjang aktivitas. Dengan demikian, mineral-mineral tersebut harus tersedia dalam jumlah yang cukup agar enzim SOD dapat bekerja secara optimal. Aktivitas enzim SOD memiliki peran



penting dalam sistem pertahanan tubuh, terutama terhadap aktivitas senyawa-senyawa reaktif yang dapat menyebabkan terjadi stres oksidatif (Kesuma dan Rina, 2015). Pada kondisi sepsis, aktivitas enzim SOD plasma akan mengalami penurunan diakibatkan oleh stres oksidatif (Bossman and Ward, 2013).

2.5 Histologi Aorta

Berdasarkan ukuran dan struktur, pembuluh darah dibagi menjadi tiga (Rahmawati, 2015), yaitu:

- a Arteri besar atau elastik, seperti aorta dan cabang dari aorta (karotis komunis, subklavia, iliaka), serta arteri pulmonalis.
- b Arteri ukuran sedang atau muskular, seperti arteri koronaria dan arteri renalis.
- c Arteri kecil (garis tengah kurang dari 2 mm) dan arteriol (ukuran diameter 20-100 μ m).

Secara anatomis, dinding pembuluh darah terdiri atas tiga lapisan konsentris atau tunika. Tiga lapisan tersebut akan sangat jelas pada pembuluh darah besar, seperti aorta. Komponen dasar dari dinding pembuluh darah adalah sel (sel otot polos dan sel endotel), dan matriks ekstrasel (termasuk elastin, kolagen, dan glukosaminoglikan). Berikut merupakan gambaran struktur mikroskopis dinding aorta dari arah dalam keluar (Rahmawati, 2015):

a Tunika Intima

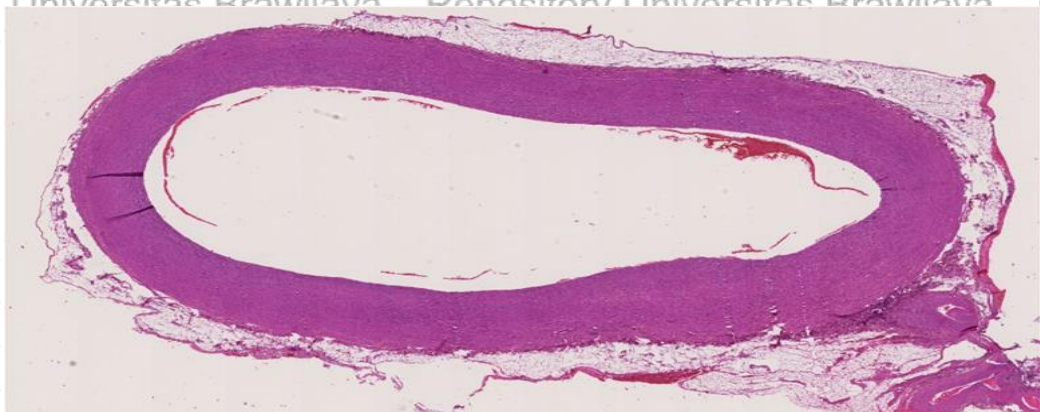
Lapisan paling dalam dari dinding aorta adalah tunika intima yang terdiri atas selapis sel-sel endotelial. Sel endotel berbentuk pipih, poligonal berukuran 10



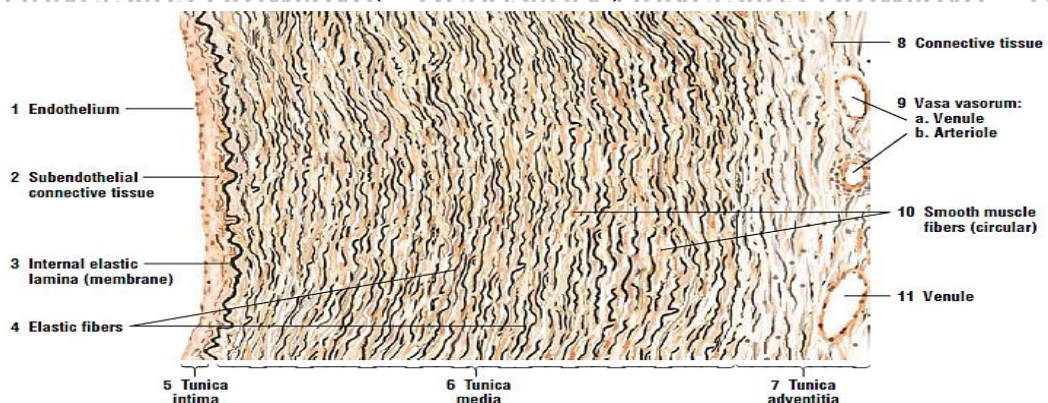
x 50 μm dan memiliki ketebalan 1-3 μm . Sel endotel berfungsi untuk mengatur aliran darah yang dipompa oleh jantung menuju ke seluruh tubuh (Sandoor *et. al.*, 2010). Ketika endotel mengalami kerusakan, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) akan meregenerasi endotel tersebut. Secara umum sel endotel memiliki 3 fungsi dasar, pertama, endotel berfungsi sebagai garis pertahanan utama terhadap elemen asing yang akan menginvasi suatu organ; kedua, endotel berfungsi sebagai tempat metabolisme dan katabolisme senyawa-senyawa tertentu; dan ketiga, endotel berfungsi melakukan sintesis berbagai senyawa vasoaktif yang diperlukan untuk mempertahankan tonus pembuluh darah, yaitu dengan mensintesis berbagai mediator inflamasi, mediator proliferasi sel-sel subendotel dan berbagai faktor hemostasis. Megasari (2009) menyatakan bahwa berbagai sitokin yang beredar di dalam sistem sirkulasi seperti $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan IL-6 dapat menyebabkan stres pada endotel pembuluh darah. Respon sel yang mengalami stres berlangsung dalam beberapa fase yaitu, fase *alarm*, *adaptation*, dan *exhaustion*. Apabila fase *adaptation* tidak terlalui, maka sel endotel tidak mengalami kerusakan. Namun jika sel endotel tidak mampu beradaptasi, maka akan berlanjut ke proses *exhaustion* yang pada akhirnya akan menyebabkan kematian sel endotel. Dibawah lapisan endotel terdapat jaringan ikat yang sangat tipis yang disebut dengan lamina subendotelial. Pada batas antara tunika intima dengan tunika media terdapat lamina elastika interna (Rahmawati, 2015).

b Lapisan tengah adalah tunika media yang tersusun atas sel-sel otot polos yang mempunyai arah sirkuler dengan susunan serabut-serabut yang rapat dan diantara serabut otot tersebut, terdapat metriks ekstrasel yang terdiri atas serabut elastin. Lapisan tunika media lebih tebal apabila dibandingkan dengan tunika intima (Rahmawati, 2015).

c Lapisan paling luar adalah tunika adventisia yang tersusun atas serabut penghubung elastin dan kolagen sebagai komponen utama (terutama kolagen tipe 1). Pada tunika adventisia juga terdapat venule dan arteriol. Sebagai batas antara tunika media dengan tunika adventisia adalah lamina elastika eksterna (Rahmawati, 2015).



Gambar 2.2 Histologi Aorta dengan Potongan Melintang (pewarnaan HE) (Eroschenko, 2008)



Gambar 2.3: Struktur Dinding Aorta (Pewarnaan *Elastic Stain*) (Eroschenko, 2008)



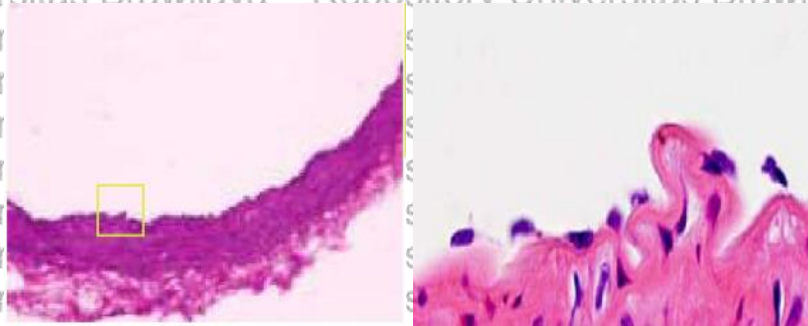
Pada kondisi sepsis, terjadi ketidaksetimbangan antara sitokin pro-inflamasi dengan sitokin anti inflamasi (Radin, 2015). Menurut Megasari (2009), sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan IL-6 dapat menyebabkan kematian sel-sel endotel.

Mekanisme kematian sel-sel endotel pada kondisi sepsis, diawali dari peningkatan produksi sitokin proinflamasi seperti, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan IL-6 oleh makrofag. Sitokin-sitokin tersebut akan menyebabkan penarikan neutrofil dan monosit ke lokasi infeksi dengan cara menginduksi sel-sel endotel untuk mensekresikan *Intracellular Adhesion Molecul-1* (ICAM-1). Produksi ICAM-1 menyebabkan neutrofil melakukan adhesi dan mengeluarkan enzim lisozim yang menyebabkan dinding sel endotel lisis, sehingga terjadi nekrosis sel endotel (Guntur, 2008). Makrofag dan neutrofil juga menghasilkan molekul radikal superoksida. Molekul radikal berikatan dengan lipid yang terdapat pada membran sel menyebabkan gangguan permeabilitas sel (Guntur, 2008).

Ketika membran sel mengalami kerusakan yang diakibatkan oleh lisozim dan molekul radikal, endotel tidak dapat mempertahankan struktur sel. Pada kondisi tersebut, lisosom mengeluarkan enzim lisozim kedalam sitoplasma menyebabkan kerusakan organel sel. Isi sel keluar ketika sel lisis dikarenakan kerusakan membran sel (Guntur, 2008). Gambaran histopatologi endotel yang mengalami nekrosis, nukleus mengalami piknotik (terlihat lebih bundar, ukuran lebih kecil, dan gelap) dan lapisan tunika intima tampak tidak teratur (Matsuda *et*



al., 2009). Dengan demikian, proses nekrosis sel endotel pada kondisi sepsis diakibatkan oleh infeksi.

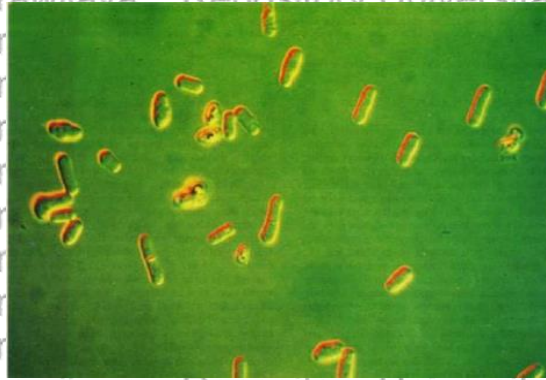


Gambar 2.4 Endotel pada Kondisi Sepsis (Matsuda *et al.*, 2009)

2.6 Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)

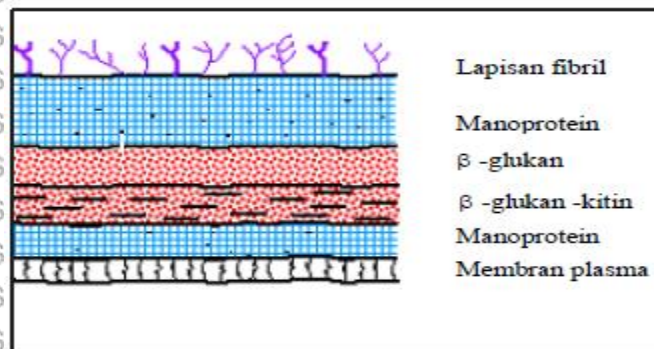
Menurut studi yang dilakukan oleh Sanger (2004), taksonomi ragi adalah sebagai berikut:

- Super Kingdom : Eukaryota
- Phylum : Fungi
- Subphylum : Ascomycota
- Class : Saccharomycetes
- Order : Saccharomycetales
- Family : Saccharomycetaceae
- Genus : *Saccharomyces*
- Species : *Saccharomyces cerevisiae*



Gambar 2.5 *Saccharomyces cerevisiae* Pada Perbesaran 10 x 40
(Sanger, 2004)

Morfologi dari *Saccharomyces cerevisiae* antara lain berbentuk datar, halus, lembab, dan memiliki warna krim. *Saccharomyces cerevisiae* memiliki dinding sel yang dapat mensintesis betaglukan. Dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* mengandung banyak beta-1,3-glukan dan beta-1,6-glukan (Kusmiati dkk., 2007). Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Kusmiati dkk., (2007), struktur dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* (**Gambar 2.4**) mengandung protein yang terikat dengan gula sebagai glikoprotein dan manoprotein, serta mengandung manan, kitin, dan polisakarida jenis beta-1,3-glukan dan beta-1,6-glukan yang memiliki fungsi memperkuat struktur sel dan sebagai cadangan makanan.



Gambar 2.6 Struktur Dinding Sel *Saccharomyces cerevisiae*
(Kusmiati dkk., 2007)



2.7 Betaglukan

Saat ini, bidang bioteknologi mengalami kemajuan yang pesat. Kemajuan di bidang bioteknologi membuka terobosan baru dalam memperoleh obat alternatif dan betaglukan menjadi salah satu penemuan penting dalam bidang suplemen nutrisi. Betaglukan merupakan suatu polisakarida kompleks yang disintesis oleh jamur, alga, khamir, dan bakteri. Berbagai penelitian telah melaporkan manfaat dari betaglukan, yaitu sebagai, antiseptik, antioksidan, aktivator sistem kekebalan tubuh, antiinflamasi, dan antidiabetes. Betaglukan dapat dihasilkan dari *Saccharomyces cerevisiae* asal ragi roti dan ragi tape, khamir merupakan komponen utama yang terkandung didalam ragi roti dan ragi tape tersebut (Andriani, 2007).

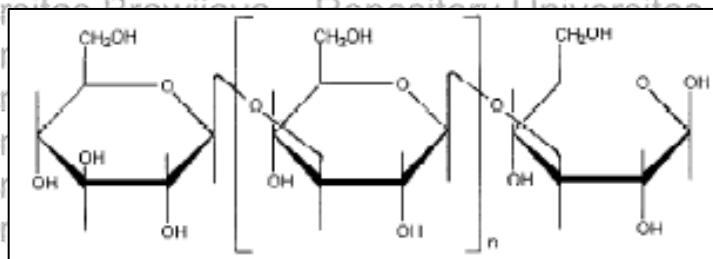
Senyawa betaglukan dibedakan berdasarkan struktur rantai samping yang spesifik pada tiap spesies jamur. Dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* mengandung banyak beta-1,3-glukan dan beta-1,6-glukan. Dengan demikian, ada bermacam-macam betaglukan dengan aktivitas yang berbeda, namun yang paling aktif adalah beta-1,3-glukan yang terdapat di dinding sel *Saccharomyces cerevisiae* (Kusmiati dkk., 2007).

Betaglukan memiliki aktivitas antioksidan karena memiliki gugus hidroksil. Atom hidrogen dari gugus hidroksil tersebut berfungsi sebagai elektron donor dan membuat molekul radikal bebas menjadi lebih stabil dan tidak reaktif.

Betaglukan juga akan meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan seperti SOD, GPx, dan CAT (Andriani, 2007). Aktivitas antiinflamasi yang dimiliki oleh



betaglukan memiliki potensi untuk menekan derajat inflamasi yang tidak terkontrol pada kondisi sepsis. Betaglukan yang terdapat pada ragi dapat berikatan dengan reseptor spesifik *dectin-1* pada makrofag. Ikatan antara betaglukan dan reseptor *dectin-1* akan memodulasi makrofag untuk meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi, sehingga terjadi penurunan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-12 (Du et. al., 2014).



Gambar 2.7 Struktur beta-1,3-glukan (Kusmiati dkk., 2007)

2.8 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*). Tikus putih termasuk hewan laboratorium yang sering digunakan di berbagai macam penelitian. Hal itu dikarenakan memiliki sifat yang mudah berkembang biak, mudah dipelihara, mudah *dihandling* dan *direstraint*, memiliki gen yang homolog dengan manusia, serta karakter anatomi dan fisiologi yang telah diketahui dengan cukup baik (Juriah, 2010). Taksonomi tikus putih (*Rattus norvegicus*) menurut Russel dkk., (2008) adalah sebagai berikut:

Kingdom : Animalia

Filum : Chordata

Kelas : Mamalia



Ordo : Rodentia
Sub ordo : Myomorpha
Famili : Muridae
Genus : Rattus
Spesies : *Rattus norvegicus*

Tabel 2.1: Data Biologis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

No	Nilai Fisiologis	Kadar
1	Berat tikus dewasa	Jantan 450-520 g Betina 250-300 g
2	Kebutuhan makan	5-10 g/100g BB
3	Kebutuhan minum	10 ml/100g BB
4	Jangka hidup	3-4 tahun
5	Temperatur rektal	36-37,5 C
6	Detak jantung	250-450 kali/menit
7	Frekuensi respirasi	70-115 kali/menit
8	Total leukosit (sel/ul)	4.000-12.000
9	Eritrosit (sel/ul)	500.0000-1000.000
10	Kebutuhan lemak/kg pakan	5%
11	Kebutuhan protein/kg pakan	5%
12	Kebutuhan mineral/kg pakan • Kalsium • Magnesium • Fosfor	0.5% 0.05% 0.3%
13	Kebutuhan vitamin/kg pakan	0.025%

(Wolfenshon and Lloyd, 2013)

Baik tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dan betina mengalami kematangan seksual pada umur 2-3 bulan. Ukuran maksimal kepadatan pemeliharaan tikus sebesar 3 ekor tikur per 2 meter persegi. Suhu lingkungan yang dibutuhkan, 20-28 °C dan kelembaban 50%. Hewan ini adalah jenis omnivor dan sering digunakan dalam penelitian pengaruh pakan. Keseimbangan nutrisi dijaga dengan mekanisme coprofagia 10-50% dari fesesnya sendiri (Koolhaas, 2010). Kebutuhan minum sebanyak 10-12 mL/100 g BB/hari dan pakan sebanyak



10 g/100 g BB/hari. Berat jantan 450-550 g dan betina 250- 300 g (University Animal Care Committee, 2009). Jumlah darah yang dapat diambil sebesar 6 ml/kg (Institutional Animal Care and Use Committee, 2014).



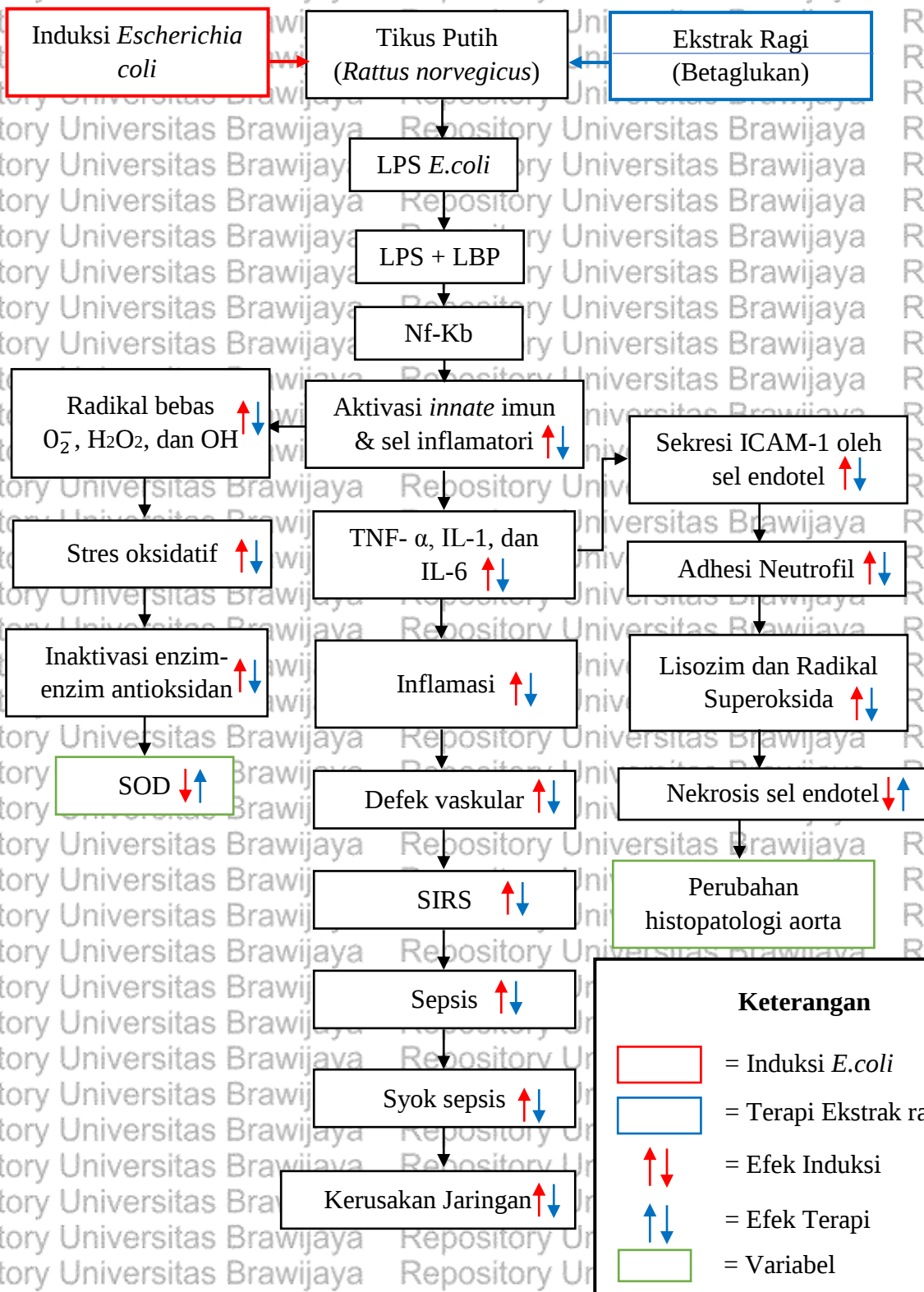
Gambar 2.8 Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (Institutional Animal Care and Use Committee, 2014).

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang paling proporsional untuk dijadikan hewan model sepsis adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) dengan jenis kelamin jantan. Hal ini disebabkan oleh keberadaan hormon androgen yang dihasilkan oleh tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dalam kondisi tersupresi pada saat sepsis. Berbeda dengan tikus putih (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin betina yang menghasilkan hormon reproduksi yang memberikan efek protektif pada kondisi sepsis (Angele *et al*, 2014).



BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konseptual



Berdasarkan kerangka konsep, sepsis pada hewan coba diinduksi dengan menginjeksikan *Escherichia coli* secara intraperitoneal. Bakteri yang masuk ke dalam rongga peritoneal akan menstimulasi respon imun, secara umum di mediasi melalui sel-sel inflamatori pada sirkulasi dan jaringan, seperti monosit atau makrofag dan neutrofil. Dalam kondisi normal, sel-sel ini dapat ditemukan baik di dalam sirkulasi maupun jaringan yang secara cepat teraktivasi sebagai respon terhadap bakteri. Sel-sel inflamatori akan menghasilkan mediator-mediator inflamasi, sehingga dapat melakukan fungsi fagosit dan menghasilkan radikal bebas untuk mengeliminasi bakteri, sel-sel tersebut juga turut berperan dalam menimbulkan kerusakan pada jaringan yang disebabkan oleh mediator-mediator inflamasi yang dihasilkan oleh sitokin, serta kerusakan akibat radikal bebas (Radin, 2015). Mekanisme fagositosis dan pelepasan radikal bebas berfungsi sebagai pertahanan awal terhadap infeksi bakteri yang menjadi etiologi awal terjadi peritonitis yang akan berlanjut ke sepsis.

Escherichia coli merupakan bakteri gram negatif dan memiliki LPS pada membran sel. Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin akan disekresikan oleh *Escherichia coli* ketika bakteri tersebut lisis. Lipopolisakarida (LPS) kemudian akan berikatan dengan LBP membentuk kompleks LPS-LBP. Lipopolisakarida terikat pada spesifik reseptor CD14 dan TLR4 pada makrofag. Kompleks LPS-LBP mentransfer LPS ke CD14 yang terdapat di permukaan sel makrofag. Setelah berikatan dengan LPS, CD14 akan berinteraksi dengan TLR4 menyebabkan aktivasi dari NF- κ B (Hongwei *et. al.*, 2005). Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) merupakan salah satu faktor transkripsi pada makrofag yang akan meningkatkan



produksi dari sitokin dan mediator inflamasi. *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) merupakan faktor transkripsi yang penting bagi fungsi normal sel imun. *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) mengatur aktivasi dari gen-gen yang diperlukan untuk menghasilkan respon yang dibutuhkan secara cepat. Namun, peningkatan dan durasi aktivasi yang memanjang dari NF- κ B ini akan menyebabkan ekspresi yang berlebihan dari protein mediator dan akan menghasilkan efek yang merusak selama periode sepsis (Radin, 2015).

Mekanisme nekrosis sel endotel diawali dari peningkatan produksi sitokin atau mediator inflamasi seperti TNF α , IL-1, dan IL-6 oleh makrofag. Makrofag diinduksi oleh NF- κ B untuk meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi. Peningkatan TNF α , IL-1, dan IL-6 akan menyebabkan penarikan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi dengan cara menginduksi sel endotelial untuk mensekresikan *Intracellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1). Neutrofil melakukan adhesi ke endotel dan mengeluarkan lisozim yang menyebabkan dinding sel endotel lisis, sehingga menyebabkan nekrosis sel endotel. Makrofag dan neutrofil juga menghasilkan molekul radikal superoksida. Molekul radikal berikatan dengan lipid yang terdapat pada membran sel menyebabkan gangguan permeabilitas sel, gangguan permeabilitas menyebabkan sel endotel lisis (Guntur, 2008).

Radikal bebas yang terbentuk berperan dalam eliminasi bakteri. Pada kondisi fisiologis, selalu terdapat keseimbangan antara radikal bebas atau SOR dengan antioksidan. Pada saat sepsis, terjadi aktivasi berbagai macam sel seperti makrofag, neutrofil, sel endotel maupun epitelial yang akan melepaskan sejumlah



mediator, termasuk antara lain sitokin, kemokin, PAF, interferon- γ , komplemen prostanoid, leukotriene, dan protease. Kejadian ini akan menyebabkan aktivasi dari sel imun yang disertai dengan pelepasan SOR. Namun, keseimbangan tersebut akan terganggu oleh produksi SOR berlebih. Produksi SOR tersebut tidak diikuti oleh peningkatan adekuat dari zat-zat antioksidan, sehingga menyebabkan terjadi stress oksidatif. Ketika terjadi stress oksidatif, akan terjadi inaktivasi enzim-enzim antioksidan, sehingga terjadi penurunan antioksidan endogen seperti SOD (Radin, 2015).

Kerusakan vaskuler akibat inflamasi akan meningkatkan potensi bakterimia. Bakteri yang masuk kedalam sistem sirkulasi akan melepaskan LPS dalam jumlah yang besar. Lipopolisakarida (LPS) dalam jumlah yang besar didalam sistem sirkulasi akan menginduksi *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) (Guntur, 2008). *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) adalah reaksi inflamasi masif yang diakibatkan oleh pelepasan berbagai mediator dan sitokin proinflamasi secara sistemik. Tahapan setelah terjadi SIRS adalah sepsis. Sepsis merupakan reaksi inflamasi masif yang ditandai dengan keberadaan mikroorganisme penyebab sepsis didalam sistem sirkulasi. Keberadaan mikroorganisme dibuktikan dengan kultur darah yang memberikan hasil positif. Tahap lebih lanjut setelah sepsis adalah *severe sepsis* (sepsis parah) yang ditandai dengan disfungsi organ, hipotensi, dan hipoperfusi. Tahap akhir adalah syok sepsis yang dapat diikuti oleh kematian penderita sepsis (Russel, 2006)



Betaglukan yang terkandung didalam ekstrak ragi, diharapkan dapat mengurangi resiko sepsis melalui efek antiinflamasi dan antioksidan yang dimiliki, sehingga dapat menekan derajat inflamasi dan mengurangi jumlah radikal bebas yang dihasilkan pada kondisi sepsis. Betaglukan memiliki reseptor spesifik *dectin-1* yang terdapat di makrofag. Ikatan antara betaglukan dengan reseptor spesifik *dectin-1* akan memodulasi makrofag dalam meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi, sehingga terjadi penurunan sitokin proinflamasi seperti $TNF\ \alpha$, IL-1, IL-6, dan IL-12 (Du *et. al.*, 2014). Betaglukan juga memiliki aktivitas antioksidan dengan cara menangkap molekul radikal bebas menggunakan atom hidrogen yang berasal dari gugus hidroksil. Atom hidrogen berperan sebagai elektron donor dan mengubah molekul radikal menjadi molekul yang lebih stabil. Betaglukan juga melakukan fungsi proteksi sel dari molekul radikal dengan meningkatkan aktivitas enzim-enzim antioksidan seperti, SOD, GPx, dan CAT (Andriani, 2007). Dengan aktivitas antiinflamasi dan antioksidan tersebut, diharapkan pemberian terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat menurunkan derajat inflamasi parah, akibat sepsis, sehingga angka mortalitas akibat sepsis dapat diminimalisir.

3.2 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan kerangka konsep diatas, maka hipotesis yang dapat diajukan adalah:



1. Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat digunakan sebagai terapi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis yang diinduksi oleh *Escherichia coli* berdasarkan peningkatan kadar SOD plasma.
2. Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat digunakan sebagai terapi pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis yang diinduksi oleh *Escherichia coli* berdasarkan penurunan nekrosis sel endotel aorta abdominal.



BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2017. Proses ekstraksi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB. Perawatan, perlakuan, dan eutanasi dilakukan di Laboratorium Epidemiologi FAPET UB. Pelaksanaan kultur darah tikus sepsis (Lampiran 1) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB. Pengukuran kadar SOD plasma dilakukan di Laboratorium Faal FK UB. Pembuatan preparat histopatologi aorta dilakukan di Laboratorium Patologi Anatomi FK UB. Pengamatan preparat histopatologi dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi FKH UB.

4.2 Alat dan Bahan Penelitian

4.2.1 Alat

Alat yang digunakan dalam pemeliharaan hewan coba berupa kandang tikus putih (*Rattus norvegicus*) beserta tempat pakan dan air minum, lampu, dan sonde lambung. Persiapan *Escherichia coli* yang akan diinjeksikan *intra-peritoneal* menggunakan alat berupa tabung reaksi dan *disposable syringe*. Uji konfirmasi kultur menggunakan alat yang terdiri dari cawan petri, gelas ukur, erlenmeyer, *strirrer*, *aluminium foil*, kapas, bunsen, ose, masker, sarung tangan, *sprayer* alkohol, dan autoklaf. Pengambilan darah menggunakan alat berupa *disposable syringe*, *vacutainer* tutup ungu (EDTA), *sprayer* alkohol, *icebox*, dan



icepack. Alat untuk mengukur kadar SOD plasma yaitu, *disposable syringe*, tabung *vacutainer EDTA*, mikropipet, sentrifus, vortex, dan spektrofotometer.

Alat untuk pembuatan dan pengamatan sediaan histopatologi aorta adalah mikrotom, *object glass* dan *cover glass*, mikrotom potong beku, dan mikroskop cahaya.

4.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan untuk ekstraksi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) berupa ragi roti kering, NaOH, HCL, H₂O₂, *acetone*, dan *aquadest*. Bakteri *Escherichia coli* (ATCC 25922) standar Mc-Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) untuk induksi sepsis diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi FK UB. Pelaksanaan kultur darah tikus putih (*Rattus norvegicus*) model sepsis menggunakan bahan berupa media *Eosin Methylene Blue Agar* (EMBA) dan *aquadest*. Bahan yang dibutuhkan untuk mengukur kadar SOD plasma terdiri dari plasma darah, xantin, xantin oksidase, (NBT), dan (PBS). Bahan yang diperlukan untuk pembuatan sediaan histopatologi aorta adalah *buffer formalin* 4%, alkohol bertingkat, alkohol absolut, polilisin, larutan xilol, paraffin cair, pewarna HE, dan balsam *canada*.

4.3 Tahapan Penelitian

Tahapan penelitian yang dilakukan, yaitu:

1. Rancangan penelitian dan persiapan hewan coba
2. Pembuatan sediaan dan penentuan dosis terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)



3. Perlakuan pada tikus putih (*Rattus norvegicus*)
4. Pengukuran kadar SOD plasma
5. Isolasi aorta abdominal
6. Pembuatan dan pengamatan preparat histopatologi aorta abdominal

4.4 Prosedur Kerja

4.4.1 Rancangan Penelitian dan Persiapan Hewan Coba

Penelitian ini bersifat eksperimental laboratorik dengan *Post Test Control Only Design* dan rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL)-Non Faktorial. Hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dibagi menjadi lima kelompok, yaitu kontrol negatif yang terdiri dari tikus putih sehat yang tidak diberi induksi dan terapi, kontrol positif yang diberi induksi tetapi tidak diberi terapi, dan kelompok terapi yang diberi induksi dan diberi terapi dengan dosis terapi bertingkat 10, 20, 30 mg/kg BB yang dapat dilihat di **Tabel 4.1**. Tikus putih yang digunakan dalam penelitian ini berjenis kelamin jantan, strain *Wistar*, berumur 2-3 bulan. Berat badan tikus putih (*Rattus norvegicus*) rata-rata 200 g. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

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

$$5n-5 \geq 15$$

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$



Keterangan

P: Jumlah kelompok

n: Jumlah ulangan yang diperlukan

Berdasarkan perhitungan di atas, hewan coba dibagi menjadi lima kelompok dan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit empat kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba.

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diadaptasikan untuk menyesuaikan kondisi laboratorium selama tujuh hari. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dikandangkan pada kandang lengkap dengan pakan dan air minum *ad libitum*, berlokasi pada tempat yang bebas polusi, serta bersuhu 27°C. Pakan standar merk Broiler 1 (BR 1) (kandungan: protein kasar 20-22%, lemak kasar 5-7%, serat kasar 3-5%, abu 5-7%, kalsium 9-11%, dan fosfor 0,6-0,8%).

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dan dosis induksi *Escherichia coli*.

Variabel bergantung : Kadar SOD plasma dan gambaran histopatologi aorta

Variabel kontrol : Jenis kelamin, umur, berat badan, strain, suhu ruang, pemberian pakan, dan air minum.



Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Keterangan
Kontrol negatif (A)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang tidak diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan tidak diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).
Kontrol positif (B)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> tetapi tidak diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>).
Dosis terapi 10 mg/kg BB (C)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dengan dosis 10 mg/kg BB.
Dosis terapi 20 mg/kg BB (D)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dengan dosis 20 mg/kg BB.
Dosis terapi 30 mg/kg BB (E)	Tikus putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang diberi induksi <i>Escherichia coli</i> dan diberi terapi ekstrak ragi (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) dengan dosis 30 mg/kg BB.



4.4.2 Pembuatan Sediaan dan Penentuan Dosis Terapi Ekstrak Ragi Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)

Ekstraksi ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dalam penelitian ini menggunakan metode Hunter *et al.*, (2002) yang dimodifikasi. Ragi roti kering 100 g ditambahkan dengan 600 ml NaOH konsentrasi 1 M/l, kedua campuran dihomogenkan hingga rata. Campuran dipanaskan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 115°C tekanan 0,6 kg/cm² selama 45 menit dan dibiarkan selama tiga jam, dilanjutkan dengan proses sentrifugasi pada kecepatan 3300 rpm selama 15 menit. Endapan pelet yang terbentuk dari proses tersebut diambil dan disuspensikan dalam 600 ml *aquadest* dan dicuci sebanyak tiga kali. Endapan pelet ditambahkan dengan 500 HCl (3%), disentrifus selama 15 menit dan dicuci kembali menggunakan *aquadest* sebanyak tiga kali. Endapan pelet kemudian dicuci dengan 120 ml H₂O₂ (3%) sebanyak tiga kali, dan disentrifus. Endapan pelet dicuci kembali menggunakan acetone 100% sebanyak dua kali. Endapan yang terakhir dikeringkan pada suhu 60 °C. Sebelum digunakan, hasil ekstraksi terlebih dahulu disuspensikan kedalam larutan PBS.

Berdasarkan studi yang dilakukan oleh Sandvik *et al.*, (2006) tentang efek pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kondisi syok sepsis, dosis terapi ekstrak ragi yang digunakan adalah sebesar 20 mg/kg BB. Dosis terapi bertingkat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 10, 20, dan 30 mg/kg BB. Penggunaan dosis bertingkat tersebut bertujuan untuk mengetahui efek optimal pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) terhadap kondisi sepsis pada tikus putih (*Rattus norvegicus*).



4.4.3 Perlakuan pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*)

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan sebanyak 20 ekor dengan berat rata-rata 200 g diaklimatisasi selama tujuh hari. Setelah 1 minggu proses adaptasi, dilakukan induksi *Escherichia coli* standar Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ cfu/ml) secara intraperitoneal pada 16 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari 4 kelompok perlakuan (kelompok B, C, D, dan E) (Budak *et. al.*, 2009). Injeksi *E. coli* dilakukan pada hari ke-8 penelitian. Pada 4 ekor tikus putih (*Rattus norvegicus*) dari kelompok A tidak diinduksi *Escherichia coli* sebagai kontrol negatif. Untuk mengetahui keberhasilan induksi sepsis, dilakukan pengamatan gejala klinis dan kultur darah (Garna, 2012).

Pemberian terapi dilakukan enam jam pasca induksi, dan dilanjutkan setiap 24 jam sekali selama 5 hari (Yamanel *et. al.*, 2011). Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) diberikan *per-oral* menggunakan sonde lambung. Dosis ekstrak ragi (*Rattus norvegicus*) yang diberikan berbeda untuk masing-masing kelompok perlakuan. Kelompok C diberikan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan dosis 10 mg/kg BB, kelompok D diberikan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dosis terapi 20 mg/kg BB, dan kelompok E diberikan ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dosis terapi 30 mg/kg BB.

4.4.4 Pengukuran Kadar Superoksida Dismutase (SOD) Plasma

Semua tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieutanasi pada hari ke-13 perlakuan penelitian. Eutanasi hewan coba dilakukan dengan dislokasi os *cervicalis*. Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diposisikan rebah ventral. Dilakukan pengambilan darah dengan rute intra-vena menggunakan *disposable syringe*



ukuran 5 ml. Sampel darah dimasukkan ke dalam vacutainer EDTA. Sampel darah yang telah terkumpul disentrifus selama 10 menit dengan kecepatan 3000 rpm. Dari proses sentrifugasi, akan terpisah antara plasma dan korpuskula, plasma dan korpuskula yang terbentuk dipisahkan pada tabung mikrosentrifus yang berbeda. Pengukuran SOD dilakukan dengan cara sebanyak 100 μ l plasma direaksikan dengan campuran yang terdiri atas 100 μ l xantin, 100 μ l xantin oksidase, 100 μ l NBT, dan 1,6 ml PBS. Dilanjutkan dengan proses inkubasi selama 30 menit pada suhu 30 °C Absorbansi yang dihasilkan setelah 30 menit diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 580 nm. (Kotan *et. al.*, 2011, Wrasianti, 2011).

4.4.5 Isolasi Aorta Abdominalis

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) dieutanasi dan diposisikan rebah dorsal. Dilakukan pembedahan untuk mengisolasi aorta abdominalis. Aorta abdominalis terletak di bagian dorsal dari organ viscera dan menempel di bagian ventral dari *vertebrae lumbalis*.

4.4.6 Pembuatan dan Pengamatan Preparat Histopatologi Aorta Abdominal

Pembuatan preparat histopatologi (**Lampiran 7**) menggunakan pewarnaan HE berdasarkan studi yang dilakukan oleh Muntiha (2001). Jaringan aorta abdominalis dengan panjang 5 cm dicuci dengan NaCl fisiologis, dilanjutkan fiksasi dengan menggunakan buffer formalin 4% selama 18-24 jam. Dilanjutkan dengan dehidrasi menggunakan alkohol bertingkat dengan konsentrasi 30%, 50%, 70%, 80%, dan 90%. Jaringan dimasukkan kedalam alkohol xilol selama 1 jam

untuk proses impregnasi, kemudian dimasukkan kedalam larutan xilol murni selama 2 x 2 jam. Proses selanjutnya adalah *embedding*, yaitu memasukkan jaringan kedalam paraffin cair selama 2 x 2 jam. Dilanjutkan ke proses pemotongan blok paraffin dengan menggunakan mikrotom setebal 4 mikron., secara *cross section* atau melintang. Irisan diletakkan *object glass* yang telah diolesi dengan polilisin. Diinkubasi untuk pembuangan paraffin. Preparat diwarnai dengan menggunakan pewarna HE. Oleskan *canada balsam* setelah preparat kering. Preparat diamati menggunakan mikroskop cahaya perbesaran lensa objekif 40 kali.

4.5 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah *OneWay Analysis of Varians* ANOVA (ANOVA) terhadap kadar SOD plasma. Analisa *OneWay* ANOVA didahului dengan uji distribusi data menggunakan uji *Saphiro-wilk* karena jumlah sampel < 50 (Dahlan, 2011). Analisa data dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan untuk mengetahui varians data *Levene Test*. Apabila data terdistribusi normal dan homogen, maka dilakukan uji *OneWay* ANOVA, kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan $\alpha = 5\%$.

Gambaran histopatologi aorta abdominalis dianalisa secara deskriptif dengan membandingkan nekrosis sel endotel aorta abdominalis dari masing-masing kelompok.



BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cereviseae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* Berdasarkan Kadar SOD Plasma

Hasil pengukuran aktivitas SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) dianalisa menggunakan SPSS 16.0 berdasarkan uji statistik *OneWay ANOVA* dan uji BNT pada tingkat signifikansi $p < 0,05$, didapat data seperti pada Tabel 5.1.

Data pengujian statistik dijelaskan pada Lampiran 8

Tabel 5.1. Rata-rata Kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*)

Perlakuan	Rata-rata Kadar SOD $\mu\text{g/mL}$
Kontrol negatif (A)	$6,997 \pm 0,67^b$
Kontrol positif (B)	$5,483 \pm 0,64^a$
Dosis terapi 10 mg/kg BB (C)	$5,650 \pm 0,60^{ab}$
Dosis terapi 20 mg/kg BB (D)	$6,192 \pm 0,80^{ab}$
Dosis terapi 30 mg/kg BB (E)	$6,539 \pm 0,24^b$

Keterangan: notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan nyata antar perlakuan ($p < 0,05$)

Hasil penelitian (Tabel 5.1) menunjukkan kadar SOD plasma tikus model sepsis yang diterapi dengan ekstrak ragi (*Saccharomyces cereviseae*) kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB ($5,650 \pm 0,60$) (C) dan 20 mg/kg BB ($6,192 \pm 0,80$) (D) tidak berbeda nyata ($p > 0,05$) terhadap kelompok kontrol positif. Nilai rata-rata kadar SOD plasma kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol positif.

Rata-rata kadar SOD plasma pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol negatif (A) adalah $6,997 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$. Nilai tersebut menunjukkan standar nilai rata-rata kadar SOD plasma pada tikus dalam kondisi normal. *Superoksida dismutase* (SOD) termasuk kedalam antioksidan enzimatis



bersama dengan CAT dan GPx. Enzim-enzim antioksidan tersebut dapat memberikan atom hidrogen secara cepat kepada senyawa radikal dan merubah senyawa radikal menjadi lebih stabil melalui ikatan radikal-antioksidan. Antioksidan enzimatis bekerja dengan cara mencegah pembentukan senyawa radikal bebas baru, atau mengubah senyawa radikal yang telah terbentuk menjadi senyawa yang kurang reaktif (Chevion *et al.*, 2003). *Superoksida dismutase* (SOD) merupakan enzim yang berperan mengkatalis dismutase radikal O_2^- menjadi H_2O_2 dan O_2 . Cara kerja SOD merubah O_2^- menjadi O_2 dan H_2O_2 adalah melalui mekanisme reduksi dan oksidasi pada ion logam terhadap superoksida dan asam konjugasi (peroksihidril) secara bersamaan. Enzim tersebut memerlukan mineral, seperti Mn, Zn, dan Cu untuk menunjang aktivitas. Mineral-mineral tersebut harus tersedia dalam jumlah yang cukup agar enzim SOD dapat bekerja secara optimal (Abreu dan Diane, 2010). Rata-rata kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) kelompok kontrol positif (B) menunjukkan nilai paling rendah yaitu $5,483 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$.

Nilai rata-rata aktivitas SOD plasma pada kelompok kontrol positif (B) ($5,483 \pm 0,64 \mu\text{g/mL}$) berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan kelompok kontrol negatif (A) ($6,997 \pm 0,67 \mu\text{g/mL}$) dan juga terjadi penurunan kadar SOD plasma sebesar 22%. Hal tersebut membuktikan bahwa induksi *Escherichia coli* yang diberikan pada perlakuan tersebut mampu menyebabkan penurunan aktivitas SOD pada kondisi sepsis berdasarkan pemeriksaan kadar SOD plasma.

Kondisi sepsis menyebabkan fungsi SOD terganggu, terjadi peningkatan produksi SOR yang menyebabkan stres oksidatif (Sumardika dan I Made, 2012).



Pada kondisi fisiologis, selalu terdapat keseimbangan jumlah antara radikal bebas dengan antioksidan. Keseimbangan tersebut akan terganggu apabila produksi SOR berlebihan. Pada keadaan sepsis, terdapat berbagai sumber potensial dari SOR, antara lain transport elektron pada mitokondria, aktivasi XO sebagai hasil dari iskemia dan reperfusi, pembakaran yang berhubungan dengan aktivasi sel imun, dan juga dari metabolisme asam arachidonat (Radin, 2015). Aktivasi dari sel imun akan menghasilkan radikal O_2^- yang merupakan agen sitotoksik. Radikal O_2^- yang sangat reaktif akan diubah oleh enzim SOD menjadi H_2O_2 dan O_2 . Hidrogen peroksida (H_2O_2) kemudian diubah oleh enzim CAT dan GPx menjadi molekul air. Aktivasi sel imun yang masif pada saat sepsis menyebabkan produksi radikal O_2^- menjadi berlebihan. Produksi SOR yang tidak diikuti dengan peningkatan jumlah antioksidan menyebabkan stres oksidatif. Kondisi stres oksidatif ini ditandai dengan inaktivasi enzim antioksidan seperti SOD (Comhair *et al.*, 2005).

Hasil rata-rata kadar SOD plasma pada kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB(C) dan 20 (D) mg/kg BB, tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (B). Hal ini menunjukkan bahwa terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) perlakuan dosis 10 dan 20 mg/kg BB belum cukup untuk meningkatkan kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi sepsis. Nilai rata-rata kadar SOD plasma kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB (E) berbeda nyata dengan kelompok kontrol positif (B), hal tersebut membuktikan bahwa terapi ekstrak ragi dosis 30 mg/kg BB cukup untuk meningkatkan kadar SOD plasma tikus putih (*Rattus norvegicus*) pada kondisi sepsis. Nilai rata-rata



kadar SOD plasma pada kelompok terapi C dan kelompok terapi D tidak berbeda nyata dengan kelompok E. Dari ketiga kelompok terapi yang berbeda, hanya kelompok terapi E yang berbeda nyata terhadap kelompok kontrol positif. Hasil terbaik ditunjukkan pada perlakuan dosis terapi 30 mg/kg BB yaitu aktivitas SOD yang paling mendekati kontrol negatif dibandingkan dengan kelompok terapi dosis 10 (C) dan kelompok terapi dosis 20 mg/kg BB (B). Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian terapi ekstrak ragi dengan dosis 10, 20, dan 30 mg/kg BB selama lima hari, menyebabkan peningkatan enzim SOD plasma. Hal ini dapat terjadi dikarenakan senyawa atau bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) berperan sebagai antioksidan. Kandungan bioaktif berupa betaglukan yang terdapat di dalam ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), mampu meningkatkan aktivitas SOD plasma karena betaglukan memiliki aktivitas antioksidan dengan cara mendonorkan elektron kepada radikal bebas dan menekan produksi radikal bebas hasil aktivasi sel-sel imun. Pemberian terapi ekstrak ragi pada kondisi sepsis dapat dilakukan mulai pada dosis 10 mg/kg BB. Dengan dosis terapi 10 mg/kg BB sudah terdapat peningkatan aktivitas SOD plasma walaupun tergolong kecil. Berdasarkan hasil penelitian ini, ekstrak ragi yang diberikan untuk terapi sepsis disarankan menggunakan dosis 30 mg/kg BB.

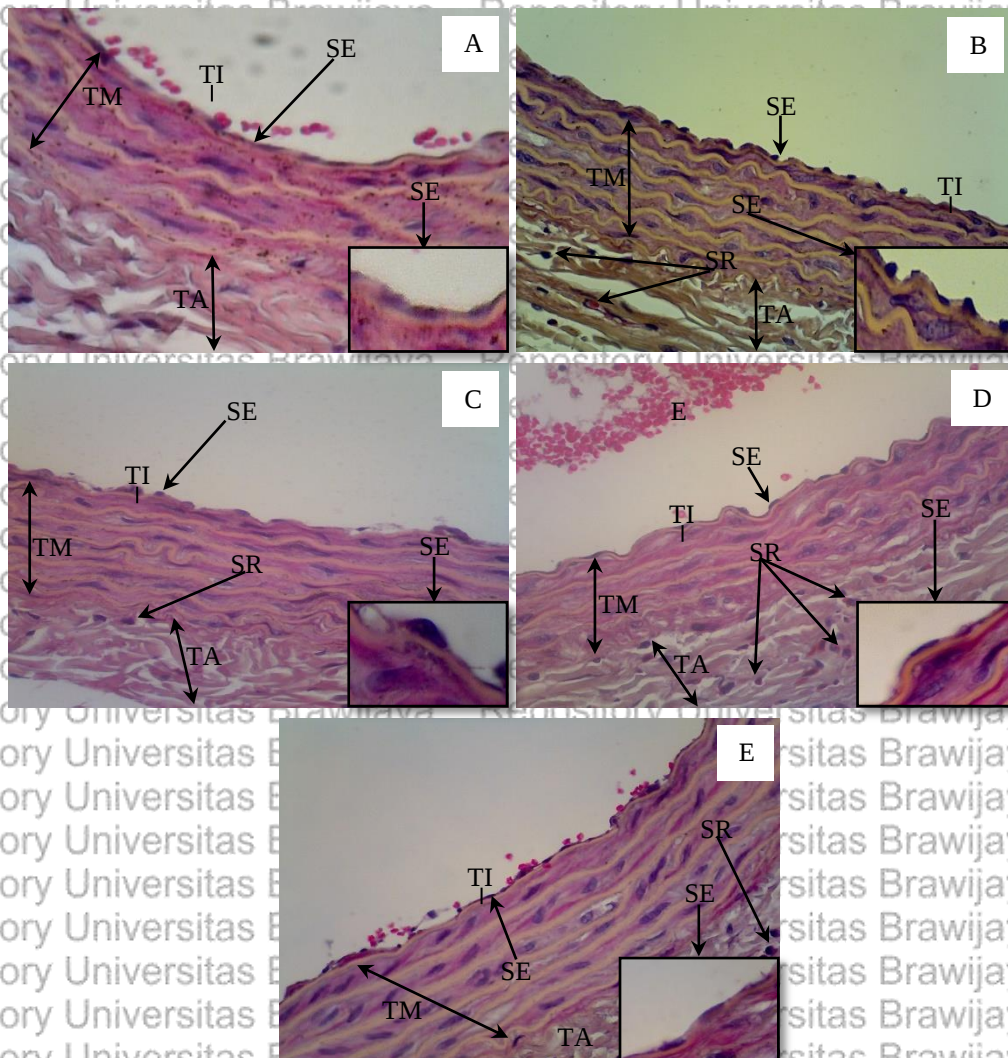
Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian yang dilakukan oleh Andriani (2007), betaglukan mampu meningkatkan aktivitas antioksidan endogen seperti SOD, GPx, dan CAT. Aktivitas betaglukan sebagai antioksidan disebabkan karena betaglukan memiliki gugus hidroksil. Atom hidrogen yang terdapat didalam gugus



hidroksil tersebut berperan sebagai elektron donor dan mengubah molekul radikal menjadi molekul yang lebih stabil.

Sandvik *et al.*, (2006) menyatakan bahwa betaglukan berpotensi menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi yang menyebabkan aktivasi sel imun secara sistemik. Aktivasi sel imun merupakan salah satu sumber potensial dari SOR pada kondisi sepsis. Betaglukan memiliki reseptor spesifik *dectin-1* yang terdapat di makrofag. Seperti diketahui bahwa makrofag memiliki peran sentral dalam aktivasi sel-sel imun. Ikatan antara betaglukan dengan reseptor spesifik *dectin-1* akan memodulasi makrofag meningkatkan sitokin antiinflamasi dan menurunkan produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF α , IL-1, IL-6, dan IL-12 (Du *et al.*, 2014). Aktivasi sel imun yang berlebihan perlahan akan mengalami penurunan dengan produksi sitokin proinflamasi yang berkurang, sehingga radikal bebas yang dihasilkan dari proses aktivasi sel imun akan mengalami penurunan. Jumlah radikal bebas dengan antioksidan akan kembali seimbang, sehingga aktivitas enzim SOD akan kembali normal. Penurunan jumlah radikal bebas dapat diketahui dari peningkatan kadar SOD plasma.

5.2 Efek Pemberian Ekstrak Ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) Model Sepsis Induksi *Escherichia coli* Berdasarkan Gambaran Histopatologi Aorta Abdominal



Gambar 5.1 Histopatologi Aorta Abdominal Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) (HE, 400x)

- A. Kontrol negatif, sel endotel normal
- B. Kontrol positif
- C. Kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB, masih ditemukan sel endotel yang mengalami nekrosis
- D. Kelompok terapi dosis 20 mg/kg BB, terjadi penurunan sel endotel yang mengalami nekrosis, struktur sel endotel mengalami perbaikan
- E. Kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB, terjadi penurunan sel endotel yang mengalami nekrosis dan perbaikan struktur sel endotel mendekati kontrol negatif

Keterangan: (E): Eritrosit; (SE): Sel Endotel; (SR): Sel Radang; (TA): Tunika Adventisia; (TI): Tunika intima (TM): Tunika Media

Gambaran histopatologi kelompok kontrol negatif (A) menunjukkan sel endotel yang terletak pada tunika intima terlihat normal. Struktur sel endotel normal berbentuk pipih poligonal dan nukleus normal tidak mengalami perubahan bentuk. Tidak ditemukan sel endotel yang mengalami nekrosis dan struktur lapisan tunika intima tampak teratur, pada lapisan tunika adventisia tidak dijumpai sel-sel radang.

Kelompok kontrol positif (B), secara histopatologi terlihat sel endotel yang mengalami nekrosis, nukleus sel tampak piknotik, dan struktur dari tunika intima menjadi tidak teratur. Pada lapisan tunika adventisia terdapat infiltrasi sel-sel radang berupa makrofag. Matsuda *et. al.*, (2009) menunjukkan bahwa induksi sepsis dengan *Escherichia coli* menyebabkan nekrosis sel endotel. Gambaran histopatologi endotel yang mengalami nekrosis, yaitu nukleus mengalami piknotik (terlihat lebih bundar, ukuran lebih kecil, dan gelap) dan struktur tidak jelas. Radin (2015) menjelaskan bahwa pada kondisi sepsis terjadi peningkatan sitokin-sitokin proinflamasi seperti, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, dan IL-6 yang dapat menyebabkan kematian sel-sel endotel. Sitokin-sitokin tersebut akan menyebabkan penarikan neutrofil dan monosit ke lokasi infeksi dengan cara menginduksi sel-sel endotel untuk mensekresikan ICAM-1. Produksi ICAM-1 menyebabkan neutrofil melakukan adhesi dan mengeluarkan enzim lisozim yang menyebabkan nekrosis sel endotel. Guntur (2008) juga menyebutkan bahwa makrofag dan neutrofil juga mensekresikan molekul radikal O_2^- , molekul radikal berikatan dengan lipid yang terdapat pada membran sel menyebabkan gangguan permeabilitas sel. Ketika membran sel mengalami kerusakan yang diakibatkan oleh lisozim dan molekul

radikal, endotel tidak dapat mempertahankan struktur sel. Pada kondisi tersebut, lisosom mengeluarkan enzim lisozim kedalam sitoplasma menyebabkan kerusakan organel sel. Isi sel keluar ketika sel lisis dikarenakan kerusakan membran sel. Infiltrasi sel radang pada lapisan tunika adventisia disebabkan oleh kerusakan pembuluh darah (venule dan arteriol) akibat proses inflamasi. Pada kondisi sepsis, sitokin proinflamasi dengan jumlah besar dalam sistem sirkulasi menyebabkan inflamasi pada pembuluh darah kecil seperti venule dan arteriol.

Inflamasi yang terjadi menyebabkan defek vaskuler sehingga sel-sel radang menginfiltrasi lapisan tunika adventisia (Guntur, 2008).

Pada kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB (C), secara histopatologi masih terdapat nekrosis pada sel endotel. Sel endotel dengan struktur yang normal lebih sukar ditemukan dibandingkan dengan sel endotel yang mengalami nekrosis.

Struktur lapisan tunika intima tidak teratur, terdapat sel radang yang menginfiltrasi lapisan tunika adventisia. Struktur tunika intima yang tidak teratur disebabkan oleh nekrosis endotel akibat inflamasi, yang diperantarai oleh jumlah sitokin proinflamasi yang tinggi dalam sistem sirkulasi (Matsuda *et al.*, 2009).

Kerusakan jaringan yang masih ditemukan pada kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB (C), mengindikasikan bahwa terapi ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan dosis 10 mg/kg BB selama 5 hari, belum memberikan hasil terhadap perbaikan jaringan pada aorta abdominal.

Pada kelompok terapi dosis 20 mg/kg BB (D), mulai terlihat ada perbaikan pada gambaran histopatologi aorta abdominal. Hasil pengamatan menunjukkan terjadi penurunan nekrosis sel endotel, sel endotel tampak normal berbentuk pipih



poligonal. Struktur dari lapisan tunika intima mulai teratur, hal ini berhubungan dengan penurunan sel endotel yang mengalami nekrosis. Pada lapisan tunika adventisia terdapat infiltrasi sel-sel radang. Hal tersebut didukung oleh penelitian Sandvik *et al.*, (2006) tentang efek preventif ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada kondisi sepsis dengan dosis 20 mg/kg BB mampu menurunkan level sitokin proinflamasi dan mencegah kerusakan jaringan. Hal tersebut mengindikasikan bahwa terapi ekstrak ragi dengan dosis 20 mg/kg BB selama 5 hari, mulai memberikan hasil terhadap perbaikan jaringan pada aorta abdominal.

Pada kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB (E), menunjukkan gambaran histopatologi aorta abdominal yang mendekati gambaran aorta abdominal normal (**Gambar A**). Hasil pengamatan menunjukkan penurunan nekrosis sel endotel, sel endotel terlihat normal (berbentuk pipih poligonal dan nukleus normal), jarang ditemukan sel endotel yang tampak piknotik. Struktur lapisan tunika intima juga tampak mendekati normal. Jarang ditemukan sel-sel radang pada lapisan tunika adventisia, penurunan infiltrasi sel-sel radang pada lapisan tunika adventisia disebabkan oleh penurunan jumlah sitokin proinflamasi dalam sirkulasi (**Gambar E**). Dengan penurunan jumlah sitokin proinflamasi dalam sistem sirkulasi, akan meminimalisir kerusakan pembuluh darah kecil (venule dan arteriol) yang disebabkan oleh inflamasi, sehingga infiltrasi sel radang mengalami penurunan (Guntur, 2008).

Kerusakan jaringan pada kondisi sepsis dapat ditekan dengan pemberian bahan aktif yang memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan. Betaglukan yang terdapat dalam ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) memiliki aktivitas biologi,

dapat bertindak sebagai antioksidan dan antiinflamasi. Menurut Du *et al.*, (2014), betaglukan berpotensi menekan derajat inflamasi pada kondisi sepsis. Betaglukan yang terdapat pada ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat berikatan dengan reseptor spesifik *dectin-1* pada makrofag dan memodulasi makrofag untuk meningkatkan sekresi sitokin antiinflamasi, sehingga terjadi penurunan sitokin proinflamasi seperti TNF- α , IL-1, IL-6, dan IL-12. Dengan penurunan level sitokin proinflamasi, maka kerusakan jaringan dapat dicegah.

Andriani (2007) menyebutkan, aktivitas antioksidan betaglukan berasal dari gugus hidroksil yang terdapat di rantai samping betaglukan. Atom hidrogen dari gugus hidroksil tersebut bertindak sebagai elektron donor. Pada kondisi sepsis, makrofag dan neutrofil menghasilkan molekul radikal O_2^- dengan jumlah berlebih dan berpotensi merusak jaringan. Molekul radikal O_2^- yang dihasilkan oleh makrofag dan neutrofil, akan diubah menjadi molekul yang lebih stabil, sehingga kerusakan jaringan akibat radikal O_2^- dapat ditekan.

Gambaran histopatologi paling baik ditunjukkan oleh kelompok terapi dosis 30 mg/kg BB (E), terjadi perbaikan struktur endotel yang diketahui dari penurunan nekrosis sel endotel dan struktur tunika intima yang teratur dan utuh apabila dibandingkan dengan kelompok terapi dosis 10 mg/kg BB (C) dan 20 mg/kg BB (D). Maka dapat dikatakan bahwa betaglukan yang berasal dari ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat menurunkan nekrosis sel endotel dan memperbaiki jaringan aorta abdominal pada kondisi sepsis.

Beta 1,3-glukan murni memiliki toksistas yang rendah (Sandvik, 2007). Namun, beberapa penelitian menyebutkan efek samping dari pemberian



betaglukan terutama berhubungan dengan pemberian betaglukan yang tidak murni secara parenteral. Yoshioka *et al.*, (1998) menyebutkan bahwa obat antiinflamasi non steroid (NSAID) yang dikombinasikan dengan betaglukan dengan pemberian parenteral meningkatkan mortalitas pada beberapa strain tikus. Obat anttinflamasi non steroid yang dikombinasikan dengan betaglukan dengan dosis 250 ug/hewan coba meningkatkan mortalitas hingga 100%. Hal tersebut didukung oleh penelitian Takahashi *et al.*, (2001) yang menyebutkan bahwa kombinasi NSAID/betaglukan meningkatkan produksi sitokin proinflamasi menyebabkan inflamasi akut, SIRS, dan berakhir dengan kematian. Kerusakan mukosa pencernaan yang disebabkan oleh pemberian NSAID, akan semakin parah jika ditambah dengan administrasi betaglukan, kombinasi keduanya menyebabkan peritonitis dan dapat berakhir dengan kematian.



BAB 6 KESIMPULAN DAN SARAN

6.1 Kesimpulan

Keimpulan dari penelitian ini antara lain:

1. Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat digunakan sebagai terapi pada sepsis. Dalam penelitian ini, dosis terapi 30 mg/kg BB adalah dosis optimum untuk terapi sepsis berdasarkan peningkatan kadar SOD plasma.
2. Ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dapat digunakan sebagai terapi pada sepsis. Dalam penelitian ini, dosis 30 mg/kg BB adalah dosis optimum untuk terapi sepsis berdasarkan penurunan nekrosis sel endotel aorta abdominal.

6.2 Saran

Saran yang dapat diajukan dalam penelitian ini:

1. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji toksisitas dari ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*), sehingga dapat digunakan sebagai bahan pertimbangan dalam penentuan dosis terapi ekstrak ragi yang lebih tepat pada kondisi sepsis.
2. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji dosis letal dari ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*)
3. Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengkaji aplikasi pemberian ekstrak ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) pada pasien sepsis.



DAFTAR PUSTAKA

Andriani, Yosie. 2007. Uji Aktivitas Antioksidan Ektrak Betaglukan dari *Saccharomyces cerevisiae*. *Jurnal Gradien* Vol. 3 No. 1: 226-230

Angele, M. K., Sebastian P., William J. H., Irshad H. C. 2014. *Gender Differences in Sepsis: Cardiovascular and Immunological Aspects*. Birmingham: University of Alabama.

Aryana IS dan Biran SI. 2006. Konsep Baru Kortikosteroid Pada Penanganan Sepsis. *Dexa Media* 19 (4): 177.

Azis A. L. 2006. *Penggunaan Steroid di Klinik*. Medan: Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara.

Biswal S and Remick DG. 2007. Sepsis Redox Mechanisms and Therapeutic Opportunities. *Pubmed* 9(11) : 1959-1961.

Bossmann, M and Ward, Peter. 2013. The Inflammatory Response in Sepsis. *Trends of Immunology*. 10(10): 8-10.

Buchori dan Prihatini. 2006. *Diagnosis Sepsis Menggunakan Procalcitonin*. Surabaya: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Budak, E. T., Husyein S., Gunalp U., Ertan T., Osman M. I., Senol Y., Kamer D., Gunner D. 2009. *The Effects and Timing of Hyperbaric Oxygen Treatment in Gram Negative Sepsis in Rats*. Turkey: Research Gate.

Chapple, Iain L., Matthews C., John B. 2007. The Role of Ractive Oxygen and Antioxidant Species in Periodontal Tissue Destruction. *J. Compilation. Periodontology*, Vol 43, 160-232

Chen K and Pohan HT. 2006. *Penatalaksanaan Syok Sepsis*. Dalam: Sudoyo A W, Setiyohadi B, Alwi I, Simadibrata M, dan Setiati S. (Eds). Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam. Jilid I. Edisi IV. Jakarta: Pusat Penerbitan Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal: 187.

Clarkson, P. M. and Thompson, H. S. 2000. Antioxidants: What Role Do They Play in Physical Activity and Health. *Am J Clin Nutr*. 72: 46-73.

Dahlan, M. S. 2011. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika.



Daniel G., and Remick, M.D. 2007. Pathophysiology of Sepsis. *The American Journal of Pathology* Vol 120, No. 5, pp :1435-8.

Dembovska, K., Svodoba, P., Scheer, P., Kantorova, I., Tomendalova, J., Rehakova, K. And Doubel, J. 2008. Model of Septic Shock Induced by Live *E. coli* in a Laboratory Rat. *Veterinarni Medicina*. 53(3): 153-163.

Du, B., Chengyuan L., Zhaoxiang B., Baojun X. 2014. *An Insight Into Anti Inflammatory Effects of Fungal Beta-Glucans*. Guangdong: Elsevier Ltd.

Eroschenko, V. P. 2008. *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlation*. Philladelphia: Lippincott Williams & Wilkins

Garna, H. H. 2012. *Buku Ajar Infeksi dan Penyakit Tropis Universitas Padjajaran*. Jakarta: Sagung Seto.

Guntur HA. 2008. *SIRS, SEPSIS dan SYOK SEPTIK (Imunologi, Diagnosis dan Penatalaksanaan)*. Surakarta: Sebelas Maret University Press

Hidreth CJ, Lynn C, and Glass RM. 2009. Sepsis. *JAMA* 301(23):2516

Hongwei, Q., Cynthia A. W, Sun J. L, Xueyan Z., and Etty N. B. 2005. LPS Induces CD40 Genes Expression Through The Activation of NF-Kb and STAT-1 α in Macrophage and Macrogia. *Blood* 106(9): 3114-3122.

Hunter, K. W., R. A. Gault., M. D. Boerner. 2002. Preparation on Microparticulate B-Glucan from *Saccharomyces cereviseae* for Use in Immune Potentiation. *Lett Appl Microbiol.*, 35: 267-271.

Hyde, R., Stith, D., Roderick, McCallum. 1989. Mortality and Bacteriology of Sepsis Following Cecal Ligation and Puncture in Aged Mice. *Infection and Immunity* 58: 619-624.

Institutional Animal Care and Use Comitte. 2014. Blood Collection. Emory University.

Isola, JGMP, Ae Santana, Gb Pereira-Neto, Rodrigo C Pabelo. 2013. Severe Sepsis and Septic Shock Survival in A Clinical Canine Model. Brazil: Critical Care, Volume 17 Suppl 4, p. 110.

Istri, Puspita, S. D. 2016. *Uji Aktivitas Antioksidan Biji Melinjo (Gnetum genmon L.) Terhidrolisis terhadap Radikal Superoksida Neutrofil In Vitro*. Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.



Juriah. 2010. *Pemberian L-Arginine Oral Mencegah Penurunan Nitrite Oxide (NO) dan Jumlah Endotel Aorta pada Tikus (Rattus norvegicus) Jantan Yang Dipapar Asap Rokok*. Denpasar: Universitas Udayana.

Kesuma, Sayuti dan Rina, Yennina. 2015. *Antioksidan Alami dan Sintetik*. Padang: Andalas University Press.

Koolhaas, Jaap M. 2010. *The UFAW Handbook on The Care and Management of Laboratory and Other Research Animals: Eighth Edition*. Universities Federation for Animal Welfare.

Kotan, E., Alpsoy, L., Anar, M., Aslan, A., and Agar, G. 2011. Protective Role of Methanol Extract of *Cetraria islandica* (L) Against Oxidative Stress and Genotoxic Effects of AFB in Human Lymphocytes In Nitro. *Toxicology and Industrial Health* 27(7): 599-605.

Kusmiati, Swasono R. T., S. Nuswantara., Nita I. 2007. Produksi dan Penetapan Kadar β -glukan dari Tiga Galur *Saccharomyces cerevisiae* dalam Media Mengandung Molase. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* Vol. 5, No. 1, hlm 7-16.

Matsuda, N., Hiroki, T., Seiji, Y., Takano, K., Yasuo, T., and Yuichi, H. 2009. Increased Death Receptor Pathway Signaling in Septic Mouse Aorta: Effect of Systemic Delivery of FADD siRNA. *Am J Physiol Heart* 10(11): 298-304.

Megasari, Noor Lianti. 2009. Pengaruh lama Stres dan Diet Athrogenik terhadap Pembentika Foam Cell pada Arteri Koroner Jantung Tikus Putih (*Rattus norvegicus* galur Sprague Dawley) Jantan. Malang: Fakultas MIPA Universitas Islam Negeri Malang.

Montgomery, D., S and Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Willey and Sains Inc.

Muntiha, M. 2001. *Teknik Pembuatan Preparat Histopatologi Dari Jaringan Hewan Dengan Pewarnaan Hematoksin dan Eosin (HE)*. Bogor: Balai Penelitian Veteriner.

Naaber, P., Smidt, I., Tamme, K., Tapper, H., Mikelsaar, M. and Talvik, R. 2000. Translocation of Indigenous Microflora in An Experimental Model of Sepsis. *Journal of Med. Microbiol.* 49: 431-439.



Perez, J. A. and Aguilar, Thomas, A. 2013. *Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico*. Mexico City: INTECH Open Science.

Radin, Intan E. S. 2015. *Pengaruh Pemberian Vitamin C terhadap Diameter Arteriol pada Tikus Wistar Model Sepsis*. Surakarta: Sebelas Maret University Press

Rahmawati, Yuniar Wahyu. 2015. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Metanol Daun Kayu Kuning (Arcangelisa flava (L) Merr) terhadap Histopatologi Aorta Tikus Wistar Hiperlipidemia*. Jember: Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Remick DG. 2007. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol* 170 (5): 1435-1444.

Rico, Irawan. 2013. Hubungan Obesitas terhadap Kadar Malondialdehid (MDA) Plasma pada Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter UIN Syarif Hidayatullah Jakarta 2013. Jakarta: Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan UIN Syarif Hidayatullah

Russel JA. 2006. Review of Management of Sepsis. *N Engl J Med* 355: 1699-713

Russel, J.C., Towns, D.R., Clout, M.N. 2008. *Review of rat invasion biology*. Science & Technical Publishing, Department of Conservation, New Zealand, p. 20.

Sandoo, A., van Zanten, J. J. C., Metsios, G. S., Carroll, D., Kitas, G. D. 2010. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*; 4: 302-312

Sandvik, A., Y. Y. Wang, H. C. Morton, A. O. Aasen, J. E. Wang, F. E. Johansen. 2007. *Oral and Systemic Administration of B-Glucan Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Shock and Organ Injury in Rats*. Norway: University of Oslo.

Sanger. 2004. *Peptidase of Saccharomyces Cerevisiae*. <http://merops.sanger.ac.uk/speccards/peptidase/spOO0895>. [diakses tanggal 10 Februari 2017].

Simanjuntak, K. 2007. Radikal Bebas Dari Senyawa Toksik Karbon Tetraklorida (CCL4). *Bina Widya*. Vol. 18 (1): 25-31.

Sumantri, Stephent. 2012. *Tinjauan Imunopatogenesis dan Tatalaksana Sepsis*. Jakarta: Fajultas Kedokteran Universitas Indonesia



Suryohudoyo, P. 2010. *Oksidan, Antioksidan, dan Radikal Bebas*. Surabaya: Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Takahashi, H., Naohito, O., Adachi, Y., Yadomae, T. 2001. Association of Immunological Disorders in Lethal Side Effect of NSAIDs on B-glucans administered mice. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 31: 1-14.

Toussaint S and Gerlach H. 2009. Activated Protein C for Sepsis. *NEJM* 361:2646-2652.

University Animal Care Committee. 2009. *The Laboratory Rat: Handling And Restraint*. McGill.

Wesche E. D., Joanne L., Lomas-Neira, Perl M., Chung C., Ayala A. 2005. Leukocyte Apoptosis and Its Significance in Sepsis and Shock. *Journal of Leukocyte Biology* 78:325-337.

Wolfensohn, S., Lloyd M. 2013. *Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare*. WileyBlackwell, Oxford, UK, 390 pp.

Wrsiati, L. P. 2011. *Karakteristik dan Toksisitas Ekstrak Bubuk Simplisia Bunga Kamboja Cendana (Plumeria alba) dan Peranannya dalam Meningkatkan Aktivitas Antioksidan Enzimatis pada Tikus Sparague Dawley*. Disertasi. Denpasar: Universitas Udayana.

Yamamel, L., Umit K., Yesim O., Omer C., Yavuz P., Murat D., Tuncer C., Ahmet O., Seref D., Mehmet Y., Orhan C., Salim K. T., Yusuf E. E., Bulent U., Turgut T., Sukru O., Ahmet K. 2011. *Ozone Therapy and Hyperbaric Oxygen Treatment in Lung injury in Septic Rats*. Turkey: Ivyspring International Publisher.

Yoshioka, S., Naohito, O., Miura T., Adachi, Yoshiyuki, Toshihiro, Y. 1998. Immunotoxicity of Soluble B-glucans Induced by Indomethacin Treatment. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 21: 171-179.