

**STUDI EKSPLORASI *Rattus norvegicus* YANG DIINDUKSI
STREPTOZOTOSIN DAN *Staphylococcus aureus*
TERHADAP KADAR RELATIF IL-6 DAN
IL-8 LIMPA**

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Oleh:

**ADDIN NAUFALISA FARIZQI
155130107111035**



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**STUDI EKSPLORASI *Rattus norvegicus* YANG DIINDUKSI
STREPTOZOTOSIN DAN *Staphylococcus aureus*
TERHADAP KADAR RELATIF IL-6 DAN
IL-8 LIMPA**

Oleh:

ADDIN NAUFALISA FARIZQI

155130107111035

Setelah dipertahankan didepan Majelis Penguji
pada tanggal 22 Februari 2019
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Kedokteran Hewan

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc

NIP. 195807111992032002

drh. Indah Amalia Amri, M.Si

NIK. 2013048709252001

Mengetahui,
Dekan Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Brawijaya

Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc

NIP. 19631216 198803 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Addin Naufalisa Farizqi

NIM : 155130107111035

Program Studi : Kedokteran Hewan

Penulis Skripsi berjudul :

Studi Eksplorasi *Rattus norvegicus* yang Diinduksi Streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* terhadap Kadar Relatif IL-6 dan IL-8 Limpa

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 saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, 22 Februari 2019

Yang menyatakan,

(Addin Naufalisa Farizqi)

NIM. 155130107111035

**Studi Eksplorasi *Rattus norvegicus* yang Diinduksi Streptozotosin dan
Staphylococcus aureus terhadap Kadar Relatif IL-6
dan IL-8 Limpa**

ABSTRAK

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik yang disebabkan karena gangguan sekresi insulin dan sensitivitas insulin. Infeksi *Staphylococcus aureus* pada penderita diabetes dapat memperparah kondisi DM dengan menghambat fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi sel-sel inflamasi, sehingga akan menghambat respon imun ketika ada antigen masuk. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh kombinasi streptozotosin dan *S. aureus* terhadap kadar relatif IL-6 dan IL-8 pada limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*). Penelitian ini bersifat eksperimental menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari lima kelompok, yaitu kontrol negatif, kontrol positif (diinfeksi *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/mL), dan tiga kelompok diabetes melitus dengan infeksi bakteri (diinduksi streptozotocin dengan dosis 45mg/kgBB dan diinfeksi *S. aureus* bertingkat yaitu 10^5 , 10^6 , dan 10^7 CFU/mL). Induksi streptozotocin *single high dose* secara intraperitoneal pada hari kedelapan, pengukuran kadar glukosa darah pada hari kesepuluh yang dilanjutkan dengan induksi *S. aureus* secara intraperitoneal. Pengukuran kadar relatif IL-6 dan IL-8 limpa dengan metode *flowcytometry*. Data dianalisis menggunakan Uji *One Way* ANOVA dengan taraf kepercayaan 95% dan dilanjutkan Uji Tukey. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kondisi DM dengan infeksi *S. aureus* dapat menurunkan produksi sitokin IL-6 dan IL-8. Kesimpulan penelitian ini adalah kondisi DM dengan infeksi bakteri dapat menghambat sistem imun.

Kata kunci: Diabetes Melitus, Interleukin-6, Interleukin-8, *Staphylococcus aureus*.

Exploration Study of *Rattus norvegicus* Induced by Streptozotocin and *Staphylococcus aureus* against Relative Levels of IL-6 and IL-8 Spleen

ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disease caused by impaired insulin secretion and insulin sensitivity. *Staphylococcus aureus* infection in diabetics can aggravate the condition of DM by inhibiting phagocyte function in chemotaxis and immigration of inflammatory cells, thereby inhibiting the immune response when antigens enter. The purpose of this study was to determine the effect of combination streptozotocin and *S. aureus* infection on the relative levels of IL-6 and IL-8 in the spleen of *Rattus norvegicus*. This research was an experimental using Completely Randomized Design (CRD) consisting of five groups, which were negative control, positive control (infected with *Staphylococcus aureus* 10^8 CFU/mL), and three groups of diabetes mellitus with bacterial infection (streptozotocin induced at a dose of 45mg/kgBB and infected with multilevel *S. aureus* 10^5 , 10^6 , and 10^7 CFU/mL). Intraperitoneal injection of single high dose streptozotocin on the eighth day, measurement of blood glucose level on the tenth day followed by intraperitoneal injection of *S. aureus*. Measurement of relative levels of IL-6 and IL-8 spleen using flowcytometry. The data were analyzed using One Way ANOVA Test with a confidence level of 95% and continued by the Tukey Test. The results of this study indicate that the condition of DM with *S. aureus* infection can reduce the production of IL-6 and IL-8 cytokines. The conclusion of this study is the condition of DM with bacterial infection can inhibit the immune system.

Keywords: Diabetes mellitus, Interleukin-6, Interleukin-8, *Staphylococcus aureus*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas perkenaan-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Studi Eksplorasi *Rattus norvegicus* yang Diinduksi Streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* terhadap Kadar Relatif Il-6 dan Il-8 Limpa”** sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Kedokteran Hewan di Universitas Brawijaya.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada semua pihak yang secara langsung maupun tidak langsung telah membantu dalam penyusunan skripsi ini. Ucapan terima kasih terutama kepada:

1. Dr. Ir. Sudarminto Setyo Yuwono, M.App.Sc selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya
2. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc selaku dosen pembimbing 1 dan drh. Indah Amalia Amri, M.Si selaku dosen pembimbing 2 atas segala bantuan, kesempatan, nasihat, bimbingan, arahan serta dukungan yang diberikan kepada penulis.
3. drh. Dahliatul Qosimah, M.Kes selaku dosen penguji 1 dan Bu Dhita Evi Aryani, S.Farm., M.Farm.Klin., Apt. selaku dosen penguji 2 yang telah bersedia memberikan kritik dan saran demi perbaikan penulisan skripsi ini.
4. Seluruh Civitas Akademika (dosen dan karyawan) Fakultas Kedokteran Hewan yang telah membantu memfasilitasi penulisan skripsi ini.
5. Keluarga penulis, Ayah Triman Hariyanto, Ibu Erni Yuliati Nur, Nurunnisa Fadila, Brilliant Satrya, serta keluarga besar yang telah memberikan doa, kasih

sayang, dukungan, pengorbanan moril maupun materil kepada penulis selama belajar di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya Malang.

6. Seluruh rekan angkatan 2015 terutama kelas C, teman-teman penelitian Sofines, Gian, Hasan, Renaldi, dan Mas Riyyan atas segala perhatian, semangat, penghargaan, ajaran, motivasi, dukungan, kebersamaan, dan doa yang telah diberikan dalam meraih mimpi.
7. Seluruh rekan Asisten Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi atas segala motivasi, dukungan, bimbingan, dan kebersamaannya selama ini.
8. Semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian penulisan karya tulis ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih jauh dari kata sempurna, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Akhir kata penulis berharap semoga Allah SWT membalas segala kebaikan yang telah diberikan kepada penulis dan semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat baik bagi penulis maupun pembaca. Aamiin.

Malang, 22 Februari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PENYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR.....	vi
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	3
1.3 Batasan Masalah.....	4
1.4 Tujuan Penelitian	5
1.5 Manfaat Penelitian	5
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Hewan Coba Tikus.....	6
2.2 Diabetes Melitus.....	7
2.2.1 Definisi Diabetes Melitus.....	7
2.2.2 Klasifikasi Diabetes Melitus	8
2.3 Streptozotosin	9
2.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	10
2.4.1 Klasifikasi	10
2.4.2 Patogenitas	11
2.4.3 Struktur Antigen.....	12
2.4.4 Faktor Virulensi	12
2.5 Interleukin-6.....	15
2.7 Interleukin-8.....	15
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesis Penelitian.....	20
BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN.....	21
4.1 Waktu dan Tempat Penelitian.....	21
4.2 Alat dan Bahan.....	21



4.3 Sampel Penelitian.....	22
4.4 Rancangan Penelitian.....	22
4.5 Variabel Penelitian.....	23
4.6 Tahapan Penelitian.....	23
4.7 Prosedur Kerja	24
4.7.1 Persiapan Hewan Coba	24
4.7.2 Induksi Streptozotocin	24
4.7.3 Induksi <i>Staphylococcus aureus</i>	24
4.7.4 Euthanasia dan Preparasi Organ Limpa.....	25
4.7.5 Menentukan Kadar Relatif IL-6 dan IL-8 <i>Flowcytometry</i>	26
4.7.6 Analisis Data.....	27
BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	28
5.1 Gejala Klinis Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Streptozotosin dan <i>S. aureus</i>	28
5.2 Kadar Relatif IL-6 pada Limpa Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Streptozotosin dan <i>S. aureus</i>	34
5.3 Kadar Relatif IL-8 pada Limpa Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) yang Diinduksi Streptozotosin dan <i>S. aureus</i>	38
5.4 Hubungan IL-6 dan IL-8 pada yang diinduksi Streptozotosin dan <i>S. aureus</i>	42
BAB 6 PENUTUP	44
DAFTAR PUSTAKA.....	45
LAMPIRAN.....	49

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
4.1 Rancangan Penelitian.....	23
5.1 Rata-rata Berat Badan dan Gula Darah.....	31
5.2 Rata-rata temperatur, frekuensi respirasi, dan denyut jantung.....	32
5.3 Rata-rata kadar relatif IL-6.....	35
5.4 Rata-rata kadar relatif IL-8	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
2.1 Tikus Putih (<i>Rattus norvegicus</i>) strain Wistar.....	7
2.2 Struktur Kimia Streptozotocin.....	10
2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> yang dilihat dari mikroskop elektron.....	10
5.1 Grafik rata-rata Berat Badan dan Gula Darah	31
5.2 Grafik rata-rata Kadar Relatif IL-6.....	34
5.3 Grafik rata-rata Kadar Relatif IL-8.....	38
5.4 Mekanisme Aktivasi Makrofag.....	42



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Sertifikat Laik Etik.....	50
2. Kerangka Operasional.....	51
3. Pembuatan suspensi bakteri.....	52
4. Perhitungan Dosis Obat	53
5. Preparasi Organ Limpa dan <i>Running flowcytometry</i>	54
6. Data Hasil Pemeriksaan Nilai Fisiologis Tikus Putih Diabetes Melitus dengan Infeksi <i>S. aureus</i>	55
7. Keberadaan bakteri dalam organ.....	56
8. Identifikasi <i>S. aureus</i>	57
9. Kadar Relatif IL-6 dan IL-8 Hasil Uji <i>Flowcytometry</i>	59
10. Data Hasil Analisis Statistik IL-6.....	64
11. Data Hasil Analisis Statistik IL-8.....	66
12. Kadar Relatif TNF- α Hasil Uji <i>Flowcytometry</i>	67
13. Gambaran Histopatologi Pankreas.....	68
14. Dokumentasi.....	69



DAFTAR ISTILAH DAN LAMBANG

α	: alfa
β	: beta
$^{\circ}\text{C}$: derajat <i>celcius</i>
μl	: mikroliter
AGEs	: <i>Advanced Glycation End products</i>
ANOVA	: <i>Analysis of Variance</i>
APP	: <i>Acute Phase Protein</i>
BB	: Berat badan
CR	: <i>Complement Receptor</i>
DLA	: <i>Dog Leucocyte Antigen</i>
DM	: Diabetes Melitus
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
EDRF	: <i>Endothelium Derived Releasing Factor</i>
<i>et al.</i>	: <i>et alii</i> (dan lain-lain)
FCS	: <i>forward scatter</i>
IDDM	: Insulin Dependen Diabetes Melitus
Ig-	: Immunoglobulin
IL-	: Interleukin-
IP	: Intraperitoneal
kg	: kilogram
MAC	: <i>Membrane Attact Complex</i>
MCP	: <i>monocyte chemoattractant protein</i>
mg	: milligram
mL	: milliliter
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
NaCl	: Natrium Klorida
NAP	: <i>Nutrient Agar Plate</i>
NB	: <i>Nutrient Broth</i>
NO	: <i>Nitric Oxide</i>
PBS	: <i>Phosphat Buffer Saline</i>
PMN	: Polimorfonuklear
RAL	: Rancangan Acak Lengkap
RAGEs	: <i>Reseptor Advanced Glycation End products</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
SHD	: <i>Single high dose</i>
SSC	: <i>side scatter</i>
STZ	: Streptozotocin
TNF-	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

**STUDI EKSPLORASI *Rattus norvegicus* YANG
DIINDUKSI STREPTOZOTOSIN DAN
Staphylococcus aureus TERHADAP
KADAR RELATIF IL-6
DAN IL-8 LIMPA**

SKRIPSI

Oleh:
ADDIN NAUFALISA FARIZQI
155130107111035



**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN HEWAN
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pola hidup yang tidak sehat dapat menyebabkan berbagai penyakit, salah satunya adalah Diabetes Melitus (DM). Diabetes melitus merupakan salah satu penyakit kronik yang terjadi ketika pankreas tidak mampu memproduksi insulin atau dapat juga terjadi ketika tubuh tidak dapat menggunakan insulin secara efektif. Insulin merupakan suatu hormon yang meregulasi glukosa dalam darah. Kondisi hiperglikemia merupakan efek yang menimbulkan kerusakan yang serius pada banyak sistem dalam tubuh dan menyebabkan komplikasi pada organ lain seperti hepar, jantung, ginjal, mata, saraf, dan pembuluh darah lainnya (Tsai dkk, 2011).

Prevalensi penderita diabetes melitus menurut data *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2016 mencapai 8,5% dari total jumlah orang dewasa di dunia atau sekitar 422 juta orang. Diabetes melitus tidak hanya terjadi pada manusia namun juga terjadi pada hewan. Pada tahun 2015 telah dilakukan penelitian terhadap 10.000 anjing dan kucing dengan temuan 24 kasus positif DM pada anjing, dan 68 kasus pada kucing (Aja, 2016). Beberapa jenis anjing dan kucing yang lebih sering mengalami diabetes antara lain ras *Malamutes*, *Finnish Spitez*, *Miniature Schnauzers*, *Miniature Poodles*, *English Springer*, dan *Burmese*. Kasus diabetes terjadi pada hewan yang mengalami obesitas, berusia tua, dan yang sudah dilakukan sterilisasi (Hoenig, 2003).

Staphylococcus aureus dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya tersebar luas dalam jaringan dan memiliki berbagai zat ekstraseluler. Berbagai zat yang berperan sebagai faktor virulensi dapat berupa protein, termasuk enzim dan toksin, katalase, koagulase, hemolisin, leukosidin, toksin eksofoliatif, toksin sindrom syok toksik, dan enterotoksin (Jawetz dkk, 2008).

Hewan model diabetes melitus yang didapatkan dengan menggunakan agen diabetogenik seperti streptozotosin. Streptozotosin memiliki mekanisme kerja merusak DNA sel β pankreas yang dapat menyebabkan terjadinya gangguan produksi insulin sehingga metabolisme glukosa terganggu dan terjadi hiperglikemia. Kondisi ini dapat menyebabkan adanya gangguan fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi sel-sel inflamasi yang akan terakumulasi pada tempat peradangan, sehingga akan memperlambat respon imun ketika antigen yang masuk. Selain itu, individu dengan kondisi diabetes melitus terbukti memiliki respon abnormal, seperti gangguan kekebalan humoral, defek pada fungsi neutrofil, dan respon sel T (Campbell, 2004). Hal ini diperparah dengan adanya infeksi *S. aureus* yang dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya tersebar luas dalam jaringan karena memiliki berbagai zat yang berperan sebagai faktor virulensi (Jawetz dkk, 2008).

Pada kondisi diabetes melitus dengan infeksi *S. aureus* akan meningkatkan kadar relatif *interleukin-8* (IL-8) dan *interleukin-6* (IL-6) pada organ limpa. *Interleukin-8* merupakan sitokin proinflamasi yang dihasilkan oleh makrofag, IL-8 menyebabkan adanya agregasi dan aktivitas dari neutrofil pada jaringan

dan juga merupakan *chemoattractant* dan aktivator neutrofil yang kuat. Selain itu fagositosis, makrofag juga melepaskan bahan aktif seperti sitokin IL-1, IL-8, dan *tumor necrosis factor* (TNF) dan juga melepaskan faktor pertumbuhan seperti *transforming growth factor- β* (TGF- β) (Brat dkk, 2005). Proses fagositosis juga akan menginduksi sitokin IL-6, *matrix metalloproteinase* (MMP) dan radikal bebas. Sitokin IL-6 diproduksi fagosit mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblast, dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lain. Sitokin IL-6, MMP, dan radikal bebas dapat menyebabkan kerusakan jaringan jika proses inflamasi tidak cepat teralui (Naugler dan Karin, 2008).

Berdasarkan uraian diatas, maka penelitian ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* terhadap kadar relatif IL-6 dan IL-8 untuk keperluan penelitian lebih lanjut serta untuk mengetahui penanganan dan pengobatan yang tepat pada kondisi DM dengan infeksi *Staphylococcus aureus*.

1.2 Rumusan Masalah

- 1.2.1 Bagaimana pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* terhadap kadar relatif IL-6 pada limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*)?
- 1.2.2 Bagaimana pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* terhadap kadar relatif IL-8 pada limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*)?

1.3 Batasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang sudah disebutkan diatas, maka penelitian ini dibatasi pada:

1. Hewan model yang digunakan adalah tikus (*Rattus norvegicus*) strain Wistar jantan berumur 2,5-3 bulan dengan berat badan 150-250 gram yang didapatkan dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penggunaan tikus telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya nomor: 973-KEP-UB (**Lampiran 1**).
2. *Single high dose* Streptozotosin yang diinduksikan secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 45 mg/kgBB dengan penentuan kondisi diabetes diukur dengan Glukometer digital dan dinyatakan diabetes jika glukosa darah puasa >200 mg/dl (Anwer, 2014).
3. *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya selanjutnya dilakukan pembuatan suspensi bakteri dengan konsentrasi yang telah ditentukan nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan spektrofotometri, yaitu dengan nilai absorbansi 0,619 yang setara dengan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL. Selanjutnya dilakukan pengenceran suspensi bakteri menjadi 10^7 , 10^6 , 10^5 CFU/mL dengan pemberian 2 mL/ekor tikus melalui intraperitoneal dengan mempertahankan prinsip aseptik.
4. Variabel yang diamati pada penelitian ini adalah kadar relatif IL-6 dan IL-8 pada organ limpa dengan menggunakan *flowcytometry*.

1.4 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah yang telah diuraikan, maka tujuan dari penelitian ini adalah:

1.4.1 Mengetahui pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap kadar relatif IL-6.

1.4.2 Mengetahui pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) terhadap kadar relatif IL-6.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini bermanfaat untuk memberikan informasi ilmiah mengenai pengaruh infeksi *Staphylococcus aureus* terhadap kadar relatif sitokin Interleukin-6 (IL-6) dan Interleukin-8 (IL-8) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang selanjutnya diharapkan dapat mengetahui penanganan dan pengobatan yang tepat.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Hewan Coba Tikus

Menurut Rukmanasari (2010), tikus yang digunakan sebagai hewan coba dalam penelitian adalah *Rattus norvegicus* strain Wistar yang memiliki klasifikasi sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Famili	: Muridae
Genus	: <i>Rattus</i>
Spesies	: <i>Rattus norvegicus</i> .

Salah satu hewan coba yang dapat digunakan yaitu tikus putih (*Rattus norvegicus*). Ciri-ciri morfologi *Rattus norvegicus* (**Gambar 2.1**) antara lain memiliki hidung tumpul, panjang badan 18-25 cm, kepala dan badan lebih pendek dari ekornya, serta telinga relatif kecil dan tidak lebih dari 20-23 mm. *Rattus norvegicus* memiliki waktu hidup 2,5 tahun sampai 3,5 tahun, denyut jantung 330-480 kali permenit, frekuensi respirasi 85 kali permenit dan memasuki masa dewasa pada usia 40-60 hari (Armitage, 2004). Tikus putih memiliki beberapa galur dari hasil perkembangbiakan dan persilangan antar tikus yaitu *Wistar*, *Sprague*, *Dawley*, *Madison*, *Wicaoustin*, dan *Long Evans*.



Gambar 2.1 Tikus putih (*Rattus norvegicus*) strain Wistar (Agita, 2016)

2.2 Diabetes Melitus

2.2.1 Definisi Diabetes

Diabetes melitus merupakan penyakit metabolik dengan karakteristik seperti adanya kondisi hiperglikemia kronis, mengalami gangguan metabolisme karbohidrat, lemak, dan protein yang disebabkan oleh adanya gangguan sekresi insulin, kerja insulin, maupun keduanya. Kondisi hiperglikemia kronis pada diabetes melitus akan disertai dengan adanya kerusakan dan gangguan fungsi pada beberapa organ lainnya seperti mata, ginjal, saraf, jantung, dan pembuluh darah (Tsai dkk, 2011).

Glukosa memiliki peranan penting sebagai sumber energi bagi tubuh yaitu dengan mengekstraksi energi yang tersimpan dalam molekul glukosa. Metabolisme glukosa di dalam tubuh dipengaruhi oleh hormon insulin. Hormon insulin merupakan protein yang terdiri atas dua rantai polipeptida yang saling berhubungan. Insulin disintesis oleh sel β pankreas di pulau langerhans. Pulau langerhans merupakan kumpulan sel-sel endokrin dari sel β pankreas sebagai penghasil hormon insulin dan sel α yang mensekresikan hormon peptide glukagon. Hormon insulin dan glukagon bekerja secara antagonis untuk mengatur glukosa di dalam

darah. Dalam kondisi DM terjadi defisiensi insulin atau hilangnya respon insulin terhadap jaringan target sehingga glukosa tidak dapat dibawa masuk ke dalam sel sehingga terjadi hiperglikemia yang ditandai dengan tingginya kadar glukosa dalam plasma darah (Campbell, 2004).

2.2.2 Klasifikasi Diabetes Melitus

Diabetes melitus diklasifikasikan menjadi dua tipe, yaitu diabetes melitus tipe-1 dan diabetes melitus tipe-2. Diabetes melitus tipe-1 disebabkan karena defisiensi hormon insulin karena adanya kerusakan sel β pankreas, hal ini dapat terjadi karena adanya reaksi autoimun. Destruksi sel β pankreas dapat menyebabkan kadar insulin menjadi sangat rendah atau tidak ada sama sekali. Penderita diabetes tipe-1 bergantung pada insulin dari luar untuk bisa bertahan. Oleh karena itu, diabetes tipe ini biasanya disebut dengan Insulin Dependent Diabetes Melitus (IDDM) yang merupakan 5-10% dari keseluruhan kasus pada manusia (Tjokroprawiro, 2007). Diabetes melitus tipe-1 sering menyerang anjing karena adanya gen histokompatibilitas kompleks kelas II DLA (*Dog Leucocyte Antigen*) yang mengendalikan pengenalan antigen oleh sistem imun, memiliki haploid dan genotip yang sama dari spesies rentan seperti Keeshonds, Malamute, Finnish, Spitzes, Miniature Schnauzers, Miniature Poodle, dan English Springer Spaniels. Anjing yang terinfeksi tampak mengalami infiltrasi limfosit pada pulau langerhans dan tampak antibodi yang merusak sel pulau Langerhans, insulin, proinsulin, asam glutamik intraselular 65 dan antigen insulinoma 2 (Nelson and Claudia, 2014).

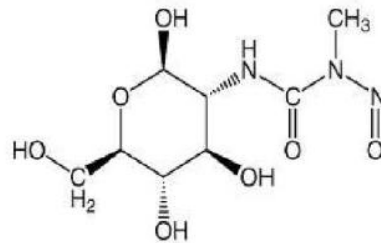
Diabetes melitus tipe-2 disebabkan karena adanya penurunan reseptor glukosa pada kelenjar pankreas sehingga menyebabkan insulin yang dihasilkan oleh sel β pankreas tidak dapat memenuhi jumlah yang dibutuhkan oleh tubuh, sehingga menyebabkan kondisi hiperglikemia. Defisiensi fungsi insulin pada penderita diabetes melitus tipe-2 hanya bersifat relatif dan tidak absolut (Tsai dkk, 2011). Diabetes melitus tipe-2 sering menyerang kucing dengan presentase 80%, dengan faktor resiko seperti obesitas, jenis kelamin jantan lebih rentan, dan peningkatan usia (Nelson and Claudia, 2014).

2.3 Streptozotosin

Streptozotosin merupakan antimikroba yang disintesis dari mikroorganisme tanah yaitu *Streptomyces achromogenes*. Streptozotosin (STZ) merupakan salah satu agen diabetogenik dengan kemampuan toksiknya yang dapat mendestruksi secara selektif toksik terhadap sel β pankreas namun tidak menyebabkan kerusakan pada sel endokrin lain (Aulanni'am, 2012).

Streptozotosin memiliki gugus metil yang akan berpindah ke DNA sel β pankreas dengan bantuan GLUT-2 sehingga menyebabkan kerusakan pada DNA tersebut. Streptozotosin memiliki gugus nitrosoamino (**Gambar 2.2**) sebagai donor nitrit oksida yang kemudian dapat menekan kerja mitokondria untuk menghasilkan ATP. Defosforilasi ATP dapat meningkatkan substrat xantin oksidase, substrat ini akan memproduksi hydrogen peroksida dan radikal hidroksil. Pada akhirnya gabungan antara penambahan metil dan macam-

macam zat oksigen reaktif tersebut mengakibatkan fragmentasi DNA (Szkudelski, 2001).



Gambar 2.2 Struktur kimia Streptozotocin (Lenzen, 2008)

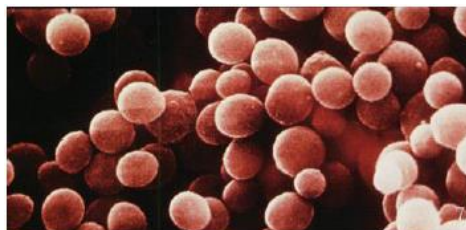
2.4 *Staphylococcus aureus*

2.4.1 Klasifikasi

Menurut Syahrurachman dkk (2010), klasifikasi *Staphylococcus aureus* yaitu:

Domain	: Bacteria
Kerajaan	: Eubacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Bacillales
Famili	: Staphylococcaceae
Genus	: Staphylococcus
Spesies	: <i>S. aureus</i>

Nama binomial : *Staphylococcus aureus*



Gambar 2.3 *Staphylococcus aureus* dilihat dari Mikroskop Elektron (Kenneth, 2008).

Staphylococcus aureus merupakan bakteri gram positif berbentuk bulat berdiameter 0,7-1,2 μm , tersusun dalam kelompok-kelompok yang tidak teratur seperti buah anggur, termasuk bakteri fakultatif anaerob yang tidak membentuk spora, dan tidak bergerak (**Gambar 2.3**). Bakteri ini tumbuh pada suhu optimum 37 °C, tetapi membentuk pigmen paling baik pada suhu kamar (20-25 °C). Koloni pada perbenihan padat berwarna abu-abu sampai kuning keemasan, berbentuk bundar, halus, menonjol, dan berkilau. Lebih dari 90% isolat klinik menghasilkan *S. aureus* yang mempunyai kapsul polisakarida atau selaput tipis yang berperan dalam virulensi bakteri (Jawetz dkk, 2008).

2.4.2 Patogenitas

Sebagian bakteri *Staphylococcus* merupakan flora normal pada kulit, saluran pernafasan, dan saluran pencernaan pada manusia. Bakteri ini juga ditemukan di udara dan lingkungan sekitar. Infeksi oleh *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses. *S. aureus* yang patogen bersifat invasif, mampu melisis sel darah, menghasilkan enzim koagulase yang dapat mengkoagulasi fibrin di sekitar lesi di dalam salur getah bening sehingga dapat membatasi proses dan diperkuat oleh penumpukan sel radang, dan dapat memfermentasikan manitol. Infeksi *S. aureus* ditandai dengan kerusakan jaringan yang disertai abses. Jika *S. aureus* menyebar dan terjadi bakteremia, maka kemungkinan dapat menyebabkan

endocarditis, osteomyelitis hematogenus akut, meningitis, dan infeksi paru-paru (Jawetz dkk, 2008).

2.4.3 Struktur Antigen

Protein A adalah komponen dinding sel pada banyak *Staphylococcus aureus* yang berikatan dengan berbagai Fc dari molekul IgG kecuali IgG₃. Bagian Fab dari IgG yang terikat dengan protein A bebas berikatan dengan antigen spesifik. Protein A menjadi reagen yang penting dalam imunologi dan teknologi laboratorium diagnostik. Beberapa strain *S. aureus* memiliki kapsul, yang menghambat fagositosis oleh leukosit polimorfonuklear kecuali terdapat antibodi spesifik. Sebagian besar strain *S. aureus* mempunyai koagulase atau faktor penggumpal, pada permukaan dinding sel terjadi koagulase dengan fibrinogen secara nonenzimatik, sehingga menyebabkan agregasi bakteri (Jawetz dkk, 2008).

2.4.4 Faktor Virulensi

Staphylococcus aureus membuat tiga macam metabolit, yaitu yang bersifat nontoksin, eksotoksin, dan enterotoksin. Metabolit nontoksin antara lain adalah antigen permukaan, koagulase, hialuronidase, fibrinolisin, gelatinosa, protease, lipase, tributirinase, fosfatase, dan katalase (Warsa, 1994). *S. aureus* dapat menimbulkan penyakit melalui kemampuannya tersebar luas dalam jaringan dan melalui pembentukan berbagai zat ekstraseluler. Berbagai zat yang

berperan sebagai faktor virulensi dapat berupa protein, termasuk enzim dan toksin, contohnya (Jawetz dkk, 2008):

a. Katalase

Katalase adalah enzim yang berperan pada daya tahan bakteri terhadap proses fagositosis. Tes adanya aktivitas katalase menjadi pembeda genus *Staphylococcus* dari *Streptococcus*.

b. Koagulase

Enzim ini dapat menggumpalkan plasma oksalat atau plasma sitrat, karena adanya faktor koagulase reaktif dalam serum yang bereaksi dengan enzim tersebut. Esterase yang dihasilkan dapat meningkatkan aktivitas penggumpalan, sehingga terbentuk deposit fibrin pada permukaan sel bakteri yang dapat menghambat fagositosis.

c. Hemolisin

Hemolisin merupakan toksin yang dapat membentuk suatu zona hemolisis di sekitar koloni bakteri. Hemolisin pada *S. aureus* terdiri dari α -hemolisin, β -hemolisin, dan δ -hemolisin. α -hemolisin adalah toksin yang bertanggung jawab terhadap pembentukan zona hemolisis di sekitar koloni *S. aureus* pada medium agar darah. Toksin ini dapat menyebabkan nekrosis pada kulit hewan dan manusia. β -hemolisin adalah toksin yang terutama dihasilkan *Staphylococcus* yang diisolasi dari hewan, yang menyebabkan lisis pada sel darah merah domba dan sapi. Sedangkan delta hemolisin adalah toksin yang

dapat melisisikan sel darah merah manusia dan kelinci, tetapi efek lisisnya kurang terhadap sel darah merah domba.

d. Leukosidin

Toksin ini dapat mematikan sel darah putih pada beberapa hewan. Tetapi perannya dalam patogenesis pada manusia tidak jelas, karena *Staphylococcus* patogen tidak dapat mematikan sel-sel darah putih manusia dan dapat difagositosis.

e. Toksin eksofoliatif

Toksin ini mempunyai aktivitas proteolitik dan dapat melarutkan matriks mukopolisakarida epidermis, sehingga menyebabkan pemisahan intraepithelial pada ikatan sel di stratum granulosum. Toksin eksofoliatif merupakan penyebab *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*, yang ditandai dengan melepuhnya kulit.

f. Toksin Sindrom Syok Toksik

Sebagian besar galur *S. aureus* yang diisolasi dari penderita sindrom syok toksik menghasilkan eksotoksin pirogenik. Pada manusia, toksin ini menyebabkan demam, syok, ruam kulit, dan gangguan multisistem organ dalam tubuh.

g. Enterotoksin

Enterotoksin adalah enzim yang tahan panas dan tahan terhadap suasana basa di dalam usus. Enzim ini merupakan penyebab utama dalam keracunan makanan, terutama pada makanan yang mengandung karbohidrat dan protein.

2.4 Interleukin-6

Sitokin merupakan salah satu komponen sistem imun yang berperan penting terhadap patogenitas dan progresivitas atau keparahan suatu penyakit. Interleukin-6 merupakan sitokin proinflamasi yang bersifat pleiotropik dan merupakan pengatur respon fase akut. Peranan IL-6 dalam aktivitas biologis termasuk pengaturan respon imun, inflamasi, dan hematopoiesis. Interleukin-6 dapat berperan dalam imunitas spesifik maupun non-spesifik. IL-6 diproduksi oleh fagosit mononuklear, sel endotel vaskuler, fibroblast, dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lainnya. Peran IL-6 dalam imunitas spesifik yaitu merangsang pertumbuhan dan diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Sedangkan peran IL-6 dalam imunitas non-spesifik yaitu merangsang hepatosit untuk memproduksi *Acute Phase Protein* (APP) dan bersama CSF merangsang progenitor di sumsum tulang untuk memproduksi neutrofil. IL-6 bersama dengan TNF- α dan IL-1 berperan dalam proses inflamasi, yaitu meningkat pada kondisi septik atau peradangan aseptik dengan keunikan memiliki modifikasi kekebalan jika dibandingkan dengan sitokin proinflamasi lainnya. Pada kondisi inflamasi akut, neutrofil membentuk komponen terbesar dari leukosit, sedangkan pada kondisi berubahnya peradangan akut terjadi perubahan jumlah leukosit dari neutrofil menjadi monosit (Naugler dan Karin, 2008).

2.5 Interleukin-8

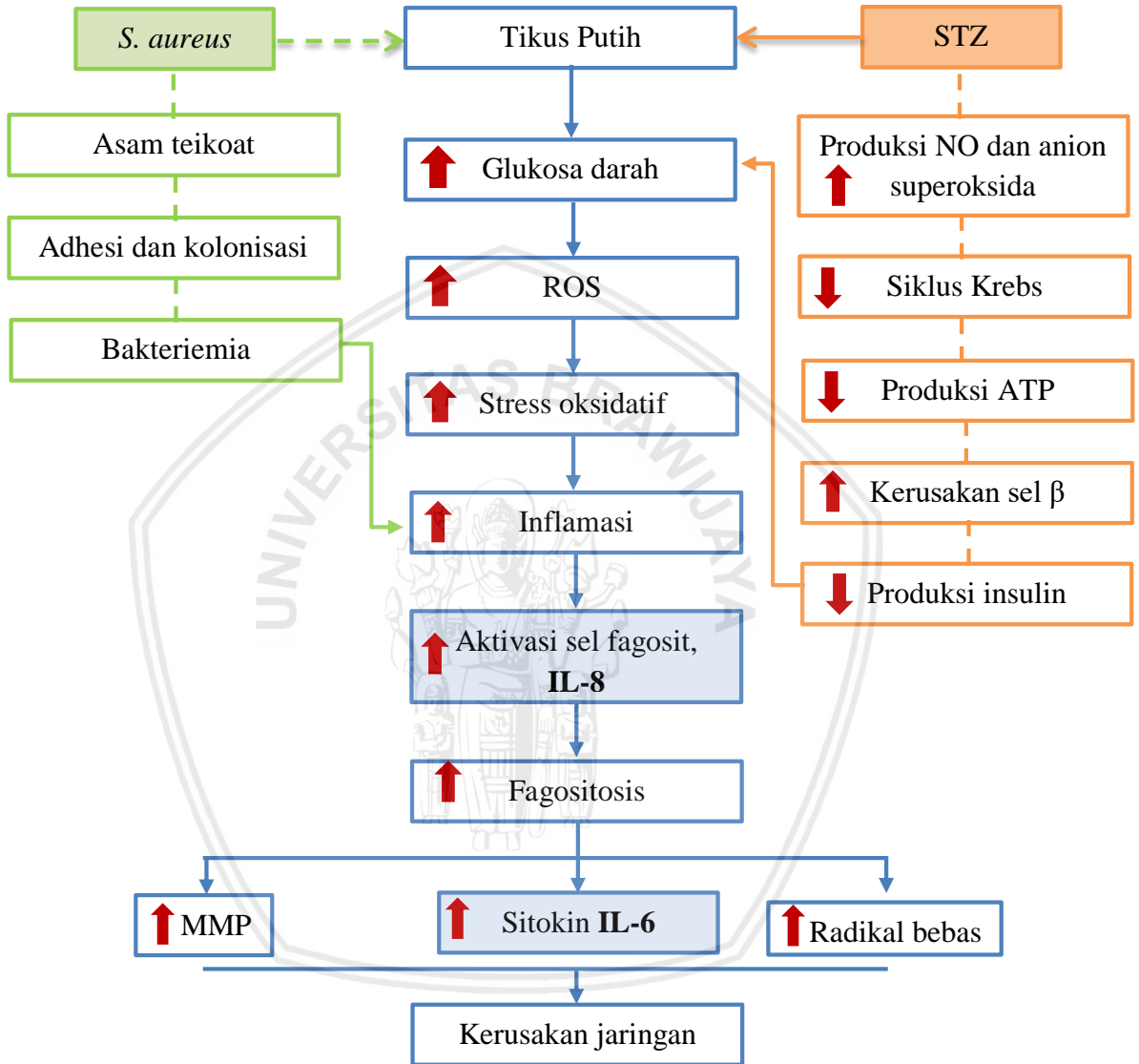
Interleukin-8 (IL-8) merupakan kemokin, *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), MIP-1a dan b MIP-2. IL-8 merupakan sitokin kemotaktik

yang bertanggung jawab terhadap aktivasi dan migrasi neutrofil dan sel-sel lainnya seperti monosit, limfosit, basofil, dan eosinofil pada lokasi inflamasi. Sitokin ini diproduksi oleh berbagai sel, termasuk fagosit mononuklear, pada saat sel T antigen diaktifkan, endotel, dan epitel sel (Strieter, 1996).

Infiltrasi neutrofil dalam proses inflamasi akut dipengaruhi karena adanya aktivasi kemotaktik lokal. Interleukin-8 merupakan kemotaktik yang dapat mengaktivasi sitokin atau kemokin yang diproduksi oleh berbagai jenis sel selama adanya stimulasi dari inflamasi, yaitu dengan adanya peningkatan fungsi leukosit khususnya neutrofil. Selain sebagai kemotaktik, IL-8 juga menginduksi neutrofil untuk melepaskan enzim lisosomal, untuk menginduksi ekspresi Mac-1 dan CR-1. Mac atau *Membrane attach complex* merupakan salah satu jenis komplemen aktif yang memiliki fungsi untuk mengenali dan berikatan dengan benda asing sebagai pertahanan imunitas innate atau non-spesifik. CR-1 atau *complement receptor* yang dikenal juga dengan C3b/C4b reseptor. *Complement receptor* memiliki fungsi untuk mengenali komplemen pada permukaan sel sasaran. CR-1 memiliki fungsi untuk merangsang fagositosis, dan transport eritrosit dari kompleks imun (Brat dkk, 2005).

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Keterangan:

- = Induksi Streptozotosin
- = Infeksi *Staphylococcus aureus*
- = Variabel yang diamati
- ↑
↓ = Efek Induksi dan Infeksi

Streptozotosin dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sel β pankreas, yaitu dengan memasuki sel β pankreas melalui transporter glukosa GLUT-2 dan menyebabkan alkilasi. Streptozotosin merupakan donor *Nitrit Oxide* (NO) yang memiliki kontribusi terhadap kerusakan sel tersebut melalui peningkatan aktivitas guanilil siklase dan pembentukan cGMP. *Nitrit Oxide* dihasilkan saat STZ mengalami metabolisme dalam sel. Selain itu, STZ juga mampu meningkatkan oksigen reaktif yang berperan dalam kerusakan sel β pankreas. Anion superoksida diproduksi karena adanya aksi STZ dalam mitokondria dan peningkatan aktivitas xantin oksidase. Dalam hal ini, STZ menghambat siklus Krebs dan menurunkan konsumsi oksigen mitokondria, sehingga terjadi penurunan produksi ATP yang dapat mengakibatkan pengurangan nukleotida sel β pankreas secara drastis diikuti dengan kerusakan sel β pankreas. Kerusakan sel β pankreas ini dapat menyebabkan penurunan produksi insulin dan sensitivitas insulin sehingga terjadi hiperglikemia.

Kondisi hiperglikemia dapat mengakibatkan adanya pembentukan AGEs (*Advanced glycation end products*) yang merupakan kelompok senyawa sangat oksidatif yang terlibat dalam kejadian diabetes dan penyakit kronik lainnya. Kelompok senyawa oksidatif ini akan berikatan dengan reseptor AGE (RAGE) pada endotel pembuluh darah dan cenderung membentuk *reactive oxygen species* (ROS). Peningkatan radikal bebas yang bersifat toksin dapat mengakibatkan terjadinya kerusakan lokal pada jaringan, disfungsi organ, dan inflamasi. Monosit, makrofag, dan sel-sel dendritik mensekresikan *nuclear protein amphoterin* yang dapat berikatan dan mengaktivasi serta menginduksi inflamasi lebih lanjut (Huebschmann dkk, 2006).

Staphylococcus aureus yang menginfeksi penderita diabetes melitus akan memperparah kerusakan jaringan karena *S. aureus* memiliki asam teikoat yang menyebabkan bakteri tersebut memiliki kemampuan adhesi dan dapat membentuk koloni pada pembuluh darah. Selain itu, *S. aureus* memiliki enzim koagulase dan enzim katalase yang berperan sebagai pertahanan bakteri di dalam tubuh, bakteri ini juga menghasilkan toksin antara lain hemolisin, leukosidin, toksin eksfoliatif, TSST, enterotoksin, serta toksin lainnya. Adanya *S. aureus* dalam aliran darah dapat menyebabkan bakteremia sehingga dapat mendukung proses inflamasi dan memperparah kondisi karena telah mengalami gangguan metabolisme.

Proses inflamasi yang terjadi pada jaringan akan direspon oleh sistem imun pada tempat yang terinfeksi, selanjutnya endotel akan menarik leukosit dan secara bersamaan leukosit polimorfonuklear (PMN) seperti neutrofil, basofil, dan eosinophil akan teraktivasi serta melepaskan molekul yang menyebabkan PMN berkumpul dan membatasi endotel pembuluh darah. Pelepasan leukosit PMN dari sumsum tulang diinduksi oleh endotoksin, sitokin, komplemen serta *granulocyte colony stimulating factor*. Selain itu terjadi stimulasi proses kemotaksis dan fagositosis oleh PMN. Dalam stimulasi leukosit PMN tersebut dilibatkan pula TNF- α , IL-1, IL-8, PAF, *endothelium derived releasing factor* (EDRF), metabolit asam arakidonat (prostaglandin dan leukotriene) serta komplemen C5a. Interleukin-8 merupakan kemotaktik yang terlibat dalam aktivasi sitokin atau kemokin yang diproduksi oleh sel fagosit mononuklear, endotel, dan epitel sel selama adanya stimulasi dari inflamasi, yaitu adanya peningkatan fungsi leukosit khususnya neutrofil. Proses fagositosis juga akan menginduksi sitokin IL-6, matriks

metalloproteinase (MMP) dan radikal bebas. Sitokin IL-6 diproduksi fagosit mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblast, dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lain. Akibat perlekatan leukosit pada endotel, leukosit PMN memulai proses fagositosis dan menghancurkan mikroorganisme patogen melalui degranulasi serta pelepasan beberapa enzim proteolitik, proses ini juga dapat menyebabkan kebocoran kapiler dan kerusakan jaringan sekitar.

3.2 Hipotesis

Dari rumusan permasalahan, maka hipotesis dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar relatif IL-6.
2. Pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar relatif IL-8.

BAB 4 METODOLOGI PENELITIAN

4.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 1 bulan, mulai Bulan Juli hingga Agustus 2018, dengan tempat penelitian di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya sebagai tempat pemeliharaan dan pembedahan tikus, Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya sebagai tempat pembuatan suspensi bakteri, dan Laboratorium Anatomi dan Fisiologi Hewan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Brawijaya sebagai tempat pengujian sampel dengan *flowcytometry*.

4.2 Alat dan Bahan

Alat digunakan dalam penelitian ini antara lain sentrifugator, cawan petri, *dissecting set*, mikroskop, timbangan, gelas ukur, tabung erlenmeyer, bunsen, vortex, tabung reaksi, rak tabung, *ice box*, inkubator media, *laminar air flow*, autoklaf, sentrifugator, mikropipet, stetoskop, thermometer, papan pembedahan hewan, glukometer digital *Nesco® Multicheck*, dan kandang tikus. Sedangkan untuk bahan yang digunakan antara lain tikus putih (*Rattus norvegicus*), *Staphylococcus aureus*, streptozotosin, *sputit* 1 mL, *sputit* 3mL, *sputit* 10 mL, *sentrifuge tube* 15 mL, pot sampel, *yellow tip*, *cover glass*, *object glass*, Normal Saline (NS) *Otsuka®*, pakan tikus *BR-1®*, sekam, pewarnaan gram, H₂O₂ 3%, antibodi anti-rat IL-6 dan IL-8, *Phospate Buffer Saline* (PBS), media *Nutrient Agar Plate* (NAP) *Merck®*, media *Nutrient Broth* (NB) *Merck®*, media *Mannitol Salt Agar* (MSA) *Oxoid®*, media *Mueller-Hilton Agar* (MHA)

Merck®, cakram antibiotik, aquades steril, alumunium foil, *plastic wrap*, *gloves*, masker, kapas, alkohol, *sprayer* alkohol, *ice gel*, dan tabung vacutainer.

4.3 Sampel Penelitian

Hewan model menggunakan tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur 2,5-3 bulan dengan bobot badan tikus antara 150-200 gram. Hewan coba diadaptasikan selama tujuh hari untuk menyesuaikan dengan kondisi di laboratorium. Estimasi besar sampel dihitung berdasarkan rumus (Montgomery and Kowalsky, 2011):

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

Keterangan:

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

t : Jumlah perlakuan

$$5n - 5 \geq 15$$

n : Jumlah ulangan yang diperlukan

$$5n \geq 20$$

$$n \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan tersebut maka setiap kelompok perlakuan diperlukan jumlah ulangan paling sedikit 4 kali dalam setiap kelompok, sehingga dibutuhkan 20 ekor hewan coba. Penggunaan hewan coba dalam penelitian sudah mendapatkan sertifikat laik etik dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor: 973-KEP-UB (**Lampiran 1**).

4.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratorik dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan eksperimental yang digunakan adalah rancangan eksperimen sederhana dengan subyek dibagi

menjadi 5 kelompok secara acak. Tiap kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

Kelompok perlakuan dalam penelitian ini antara lain adalah (**Tabel 4.1**):

Tabel 4.1 Rancangan Penelitian

Kelompok	Perlakuan
A (Kontrol Negatif)	Tikus sehat
B (Kontrol Infeksi)	Diinduksi <i>S. aureus</i> konsentrasi 10^8 CFU/ml
C (Perlakuan 1)	Diinduksi streptozotosin dosis 45mg/kgBB IP dan <i>S. aureus</i> konsentrasi 10^5 CFU/ml secara IP
D (Perlakuan 2)	Diinduksi streptozotosin dosis 45mg/kgBB IP dan <i>S. aureus</i> konsentrasi 10^6 CFU/ml secara IP
E (Perlakuan 3)	Diinduksi streptozotosin dosis 45mg/kgBB IP dan <i>S. aureus</i> konsentrasi 10^7 CFU/ml secara IP

4.5 Variabel Penelitian

Variabel yang diamati dalam penelitian ini adalah:

Variabel bebas : Dosis streptozotosin dan konsentrasi *S. aureus*

Variabel terikat : Kadar relatif IL-6 dan IL-8

Variabel kontrol : Tikus, jenis kelamin, berat badan, umur, suhu, pakan, minum, dan kandang

4.6 Tahapan Penelitian

1. Persiapan hewan coba
2. Induksi *Single High Dose* STZ
3. Induksi bakteri *S. aureus*
4. Euthanasi dan preparasi organ limpa
5. Menentukan kadar relatif IL-6 dan IL-8 dengan *flowcytometry*
6. Analisis data

4.7 Prosedur Kerja

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini terdapat 20 ekor tikus sebagai hewan coba. Sampel yang digunakan adalah tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar dengan berat badan 150-200 gram dalam kondisi sehat. Tikus diadaptasikan selama tujuh hari dengan kandang terpisah dan diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum* dengan perlakuan yang sama pada semua tikus. Tikus dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan dan masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor tikus.

4.7.2 Induksi Streptozotosin

Tikus DM diperoleh dengan cara induksi STZ *single high dose* secara intraperitoneal (IP) dengan dosis 45 mg/kgBB yang sebelumnya tikus dipuasakan selama 12 jam, kemudian penentuan kondisi diabetes diukur dengan Glukometer digital yaitu dengan memberi perlakuan pada *vena coccygea* tikus dengan cara ditusuk dengan *sputit* 1 mL, tetesan darah yang keluar diposisikan pada rangkaian glukometer dan stik sehingga memunculkan kadar glukosa darah pada layar glucometer. Tikus dengan kadar gula darah puasa lebih dari 200 mg/dL menandakan bahwa tikus tersebut mengalami hiperglikemia (Anwer, 2014).

4.7.3 Induksi *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan konsentrasi yang telah ditentukan nilai *Optical Density* (OD) dengan menggunakan

spektrofotometri dengan panjang gelombang 625 nm yaitu dengan nilai absorbansi 0,619 yang setara dengan konsentrasi bakteri 10^8 CFU/mL. Kemudian dilakukan pengenceran berseri dengan cara memasukkan 1 mL suspensi bakteri 10^8 CFU/mL dalam 9 mL media NB kemudian dihomogenkan, sehingga didapatkan suspensi bakteri *S. aureus* dengan konsentrasi 10^7 CFU/mL. Hal tersebut dilakukan kembali hingga didapatkan suspensi bakteri dengan konsentrasi 10^6 dan 10^5 CFU/mL (Mubarak dkk, 2016).

Selanjutnya diinokulasikan bakteri *S. aureus* pada tikus melalui intraperitoneal dengan pemberian sebanyak 2 mL/ekor tikus, dilakukan observasi selama 2 hari pasca infeksi dengan mengamati tanda klinisnya seperti suhu tubuh, respirasi, pulsus, berat badan.

4.7.4 Euthanasia dan Preparasi Organ Limpa

Euthanasi dan pengambilan organ limpa pada hewan coba tikus putih (*Rattus norvegicus*) dilakukan pada hari ke-12. Sebelum dilakukan euthanasia, hewan coba diinjeksi dengan ketamin dengan dosis 2 mg/kgBB sebagai anestesi umum untuk mengurangi rasa sakit, setelah itu dilakukan pengambilan darah dan dilakukan pembedahan serta preparasi organ limpa untuk pemeriksaan *flowcytometry* secara aseptik menggunakan gunting dan pinset. Jaringan dibersihkan dengan menggunakan NaCl fisiologis disimpan dalam wadah spesimen yang tertutup rapat, kemudian dilakukan pembilasan pada PBS sebanyak dua kali, lalu diletakkan cawan petri yang berisi 5mL PBS, digerus dengan

menggunakan pangkal *sprit*. Kemudian cawan petri dimiringkan, lalu diambil cairannya menggunakan *sprit* dan dimasukkan dalam tabung sentrifus, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit dengan suhu 4°C, kemudian diambil peletnya.

4.7.5 Menentukan Kadar Relatif IL-6 dan IL-8 dengan *Flowcytometry*

Organ limpa yang telah digerus dan dilakukan sentrifugasi didapatkan pelet yang kemudian ditambahkan PBS sebanyak 1 mL, kemudian dihomogenkan dengan cara *pipetting*. Selanjutnya suspensi diambil sebanyak 100 µl kemudian dimasukkan ke dalam tabung sentrifus yang baru dan dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 2500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C, kemudian cairan supernatan dibuang. Selanjutnya dilakukan pewarnaan intraseluler dengan menambahkan larutan fiksatif sebanyak 50 µl kemudian diinkubasi selama 20 menit pada suhu 4°C pada ruang gelap. Kemudian ditambahkan larutan permeabilitas sebanyak 500 µl dan dihomogenkan. Selanjutnya dilakukan sentrifugasi kembali, dibuang cairan supernatan, dan ditambahkan 50 µl larutan antibodi spesifik untuk IL-6 dan IL-8, kemudian diinkubasi. Selanjutnya ditambahkan 400 µl PBS kemudian dilakukan sentrifugasi kembali dan diambil bagian peletnya kemudian dimasukkan ke dalam kuvet *flowcytometry* untuk dilakukan *running flowcytometry*.

Prinsip dasar *flowcytometry* adalah analisis dengan pengukuran jumlah dan sifat setiap sel yang melalui suatu celah sempit kemudian

melewati berkas sinar laser. Apabila sel mengenai berkas cahaya tersebut maka berkas cahaya akan dibiaskan ke segala arah. Kemudian detektor pada sudut-sudut tertentu akan menangkap berkas cahaya tersebut dan mengubahnya menjadi sinyal listrik, kemudian sinyal-sinyal tersebut akan dikonversikan menjadi angka digital dan disajikan dalam histogram untuk memperoleh informasi karakteristik sel tersebut (Rifa'I, 2013).

4.7.6 Analisis Data

Data infeksi *S. aureus* didapatkan data kualitatif dari gejala klinis yang muncul seperti berat badan, temperatur, pulsus, dan keberadaan bakteri pada organ. Data diabetes didapatkan berupa data kuantitatif yaitu kadar gula darah. Kadar relatif IL-6 dan IL-8 berupa data kuantitatif yang dianalisis dengan menggunakan Uji *One Way Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf kepercayaan 95% kemudian dilanjutkan dengan Uji Tukey untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap pembuatan hewan model diabetes dengan infeksi *S. aureus*.

BAB 5 HASIL DAN PEMBAHASAN

5.1 Gejala Klinis Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptozotosin dan *Staphylococcus aureus*

Tikus putih model diabetes melitus hasil induksi *single high dose* streptozotosin secara intraperitoneal menunjukkan adanya gejala klinis yang mencirikan kondisi diabetes melitus ketika dilakukan pengukuran glukosa darah dengan menggunakan glukometer digital. Pengukuran berat badan dan pengukuran glukosa darah dilakukan pada saat sebelum diinduksi STZ dan dua hari setelah diinduksi STZ (**Lampiran 6**).

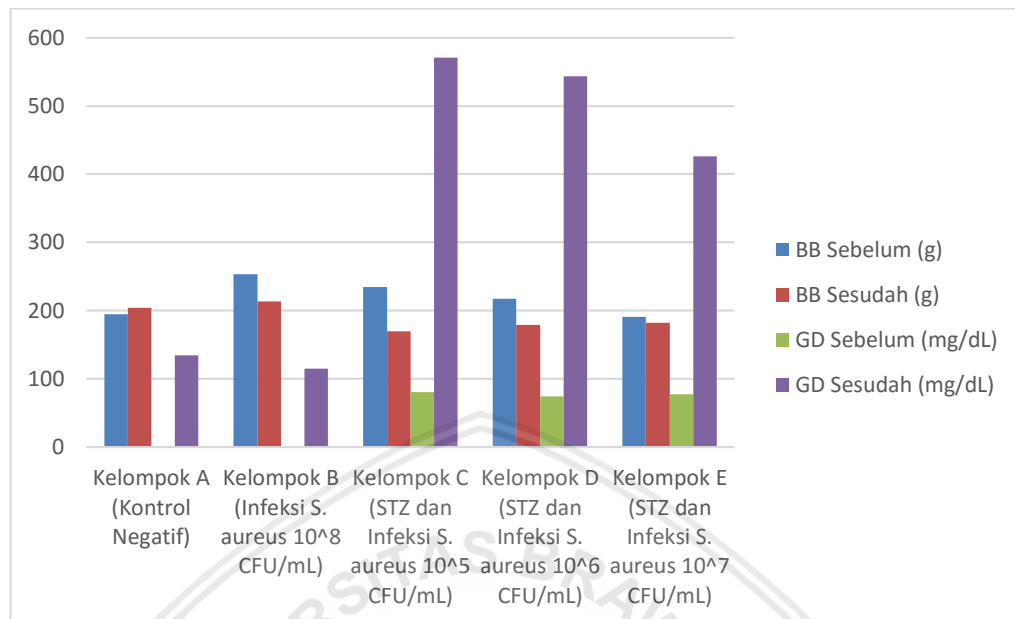
Menurut Wolfenshon *and* Lloyd (2013), menyatakan bahwa berat badan tikus putih jantan galur wistar yang berumur 6-8 minggu yaitu 150- 330 gram, tikus putih *overweight* memiliki berat badan yaitu lebih dari 500 gram, dan tikus putih obesitas memiliki berat badan lebih dari 700 gram. Tikus putih yang digunakan untuk penelitian ini memiliki berat badan normal.

Tikus putih diinjeksi agen diabetogenik berupa STZ dengan dosis 45 mg/kgBB secara intraperitoneal pada hari kedelapan, yang sebelumnya telah dipuaskan dan diukur kadar gula darahnya dengan menggunakan glukometer digital. Rata-rata kadar gula darah puasa sebelum diinjeksi dengan STZ menunjukkan kadar gula darah normal, yaitu antara 50-135 mg/dL (Wolfenshon *and* Lloyd, 2013). Kadar gula darah mengalami peningkatan pada dua hari setelah injeksi STZ. Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa injeksi STZ dengan dosis 35-65 mg/kgBB secara intraperitoneal dapat menginduksi tikus model diabetes melitus sehingga dapat

menyebabkan peningkatan kadar glukosa darah (Anwer, 2014). Peningkatan glukosa darah didukung dengan pengamatan histopatologi organ pankreas sebagai data penunjang untuk mengetahui kerusakan sel yang diamati secara kualitatif deskriptif dari sel beta pankreas (**Lampiran 13**).

Gambaran histopatologi pankreas pada **Lampiran 13** menunjukkan bahwa pada kelompok A dan B tidak terjadi nekrosis dan sel pada islet langerhans terlihat rapat, sehingga mengindikasikan bahwa islet langerhans dalam keadaan normal karena pada kelompok A dan B tidak diberi induksi STZ. Sedangkan pada kelompok C, D, dan E yang merupakan kelompok perlakuan DM dengan infeksi *S. aureus* mengalami nekrosis sel pada islet langerhans yang ditandai dengan adanya celah antar sel yang dapat disebabkan karena rusaknya sel beta pankreas sehingga hanya tersisa sitoplasma. Hal ini sesuai dengan penelitian Qosimah dan Dhita (2019) yang menyatakan bahwa preparat histologi pankreas pada kondisi sehat ditunjukkan dengan inti sel beta pankreas yang terlihat jelas dan merata, sedangkan pada kondisi DM menunjukkan gambaran histopatologi dengan inti sel beta pankreas yang mulai menghilang dan terlihat sitoplasma.

Pada kelompok A dan B tidak terjadi peningkatan rata-rata kadar gula darah karena kelompok tersebut tidak diberi perlakuan injeksi STZ, namun pada kelompok A mengalami peningkatan rata-rata berat badan dan kelompok B mengalami penurunan berat badan. Sedangkan pada kelompok C, D, dan E terjadi peningkatan rata-rata kadar gula darah yang merupakan kelompok dengan injeksi STZ yang disertai adanya penurunan rata-rata berat badan pada masing-masing kelompok perlakuan (**Gambar 5.1**).



Gambar 5.1 Grafik rata-rata Berat Badan dan Gula Darah Sebelum dan Sesudah Induksi STZ

Pada kelompok A (tikus sehat) mengalami peningkatan berat badan yang dapat disebabkan oleh asupan nutrisi dan penurunan aktivitas fisik pada tikus. Hal ini sesuai Ada (2015), asupan nutrisi yang terus menerus dapat dijadikan sebagai cadangan makanan pada otot dan hati sehingga terjadi peningkatan massa tubuh. Sedangkan pada kelompok B mengalami penurunan berat badan, hal ini dapat disebabkan oleh pemberian induksi bakteri *S. aureus* membutuhkan banyak energi untuk proses fagositosis, sehingga melibatkan cadangan makanan seperti protein dan lemak. Protein akan dipecah menjadi asam amino yang digunakan sebagai sumber energi melalui proses glukoneogenesis yang berperan penting terhadap metabolisme sel makrofag (Daslina dkk, 2015).

Berdasarkan **Tabel 5.1** yang menunjukkan adanya hubungan antara berat badan dan kadar gula darah pada tikus putih yang diinjeksi STZ. Pada kelompok

C, D, dan E mengalami peningkatan kadar gula darah yang disertai dengan penurunan berat badan. Hal tersebut sesuai dengan Rias dan Ekawati (2017) yang mengatakan bahwa tikus dengan kondisi diabetes melitus yang mengalami penurunan berat badan dapat disebabkan oleh induksi STZ dapat menyebabkan kerusakan pada DNA sel β pankreas melalui GLUT-2 sehingga produksi dan sensitivitas insulin mengalami penurunan yang menyebabkan hiperglikemia. Metabolisme dalam tubuh mengalami kekurangan glukosa untuk proses pembentukan energi, maka tubuh akan mengolah zat-zat lain seperti lemak atau protein untuk diubah menjadi energi. Penggunaan atau penghancuran lemak dan protein dapat menyebabkan adanya penurunan berat badan.

Tabel 5.1 Rata-rata Berat Badan dan Gula Darah Sebelum dan Sesudah Induksi STZ

Kelompok	Sebelum Induksi STZ		Sesudah Induksi STZ*	
	Berat Badan (g)	Gula Darah (mg/dL)	Berat Badan (g)	Gula Darah (mg/dL)
A	195	-	204	134,75
B	253	-	213,75	115
C	234,25	80,75	169,5*	570,75*
D	217,5	74	179*	543,75*
E	191	77,25	182*	426*

Identifikasi kemurnian *Staphylococcus aureus* dapat dilakukan pewarnaan gram sehingga didapatkan bakteri dengan warna ungu, berbentuk kokus, dan bergerombol (**Lampiran 8.1**). Selanjutnya dilakukan uji katalase untuk mengetahui kemampuan bakteri memecah H_2O_2 menjadi H_2O dan O_2 karena memiliki enzim katalase (**Lampiran 8.2**), dengan hasil uji koagulase negatif (**Lampiran 8.3**). Selain itu, dapat dilakukan dengan penanaman bakteri pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA), maka bakteri akan memfermentasi manitol dan menyebabkan perubahan warna pada media menjadi kuning (**Lampiran**

8.4). Bakteri *S. aureus* yang digunakan pada penelitian ini merupakan bakteri *Multidrug resistant* (MDR) yaitu bakteri mengalami resisten terhadap tiga atau lebih golongan atau kelas antibiotik yang berbeda, didapatkan hasil pada uji sensitivitas antibiotik bahwa bakteri mengalami resisten pada beberapa antibiotik (**Lampiran 8.5**). Resistensi terhadap antibiotik dapat mempersulit proses penyembuhan (Kurniawati dkk, 2015).

Bakteremia adalah suatu kondisi adanya bakteri yang mampu hidup dalam aliran darah dapat menyebabkan infeksi sistemik yang berbahaya karena dapat berlanjut menjadi sepsis yang angka kematiannya cukup tinggi (Sjahrurachman, 2004). Bakteremia dapat disebabkan oleh *S. aureus* yang merupakan bakteri gram positif yang memiliki kemampuan dapat tersebar luas dalam jaringan dan memiliki berbagai zat ekstraseluler yang berperan sebagai faktor virulensi (Jawetz dkk, 2008). Bakteremia dapat menyebabkan disfungsi organ atau ketidakmampuan organ untuk melakukan fungsi fisiologisnya seperti respirasi, kardiovaskuler, sistem saraf pusat, ginjal, dan hati (Zein, 2010). Hewan coba penelitian diamati gejala klinisnya seperti temperatur rektal, frekuensi respirasi, dan *heart rate* pada sebelum dan sesudah induksi bakteri (**Tabel 5.2**).

Tabel 5.2 Rata-rata temperatur rektal, frekuensi respirasi, dan denyut jantung

Kelompok	Sebelum Induksi <i>S.aureus</i>			Sesudah Induksi <i>S.aureus</i>		
	TR (°C)	RR (kali/menit)	HR (kali/menit)	TR (°C)	RR (kali/menit)	HR (kali/menit)
A	37,05	121	349	37,075*	144*	345*
B	36,4	127	351	37,25	150	451
C	36,35	127,5	400	36,125	130,5	340,5
D	36,725	120	410	36,1	148,5	459
E	36,825	118	433,5	36,9	147	471

Keterangan:

TR = Temperatur Rektal (°C)

RR = *Respiraton Rate* (kali/menit)

HR = *Heart Rate* (kali/menit)

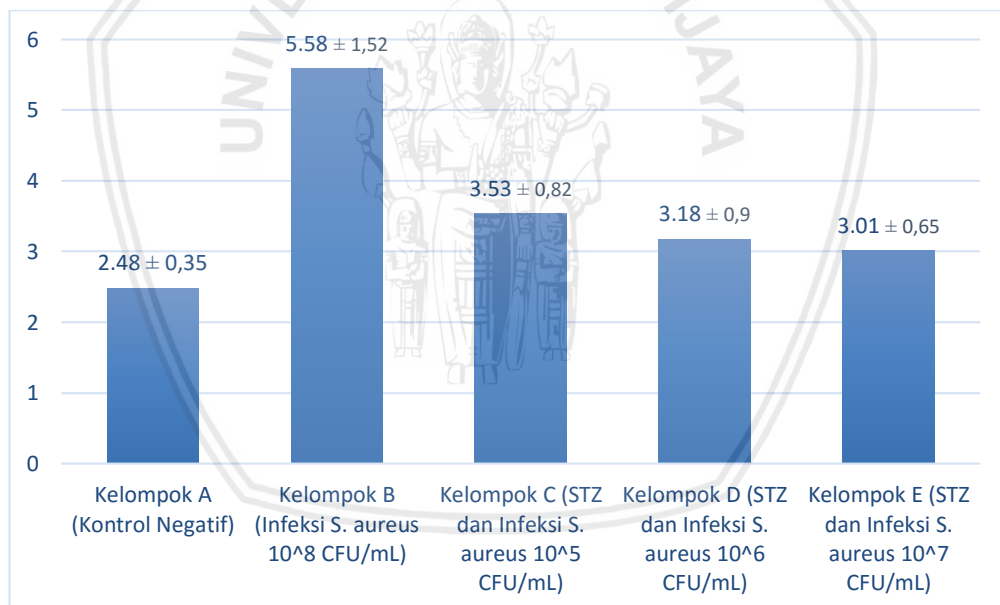
* tidak diinduksi *S. aureus*

Menurut Wolfenshon *and* Lloyd (2013), bahwa temperatur rektal normal pada tikus putih yaitu antara 36-37,5 °C, rata-rata frekuensi respirasi normal antara 70-115 kali/menit, dan rata-rata denyut jantung normal antara 250-450 kali/menit. Berdasarkan **tabel 5.2** yaitu pada masing-masing kelompok memiliki rata-rata temperatur dan rata-rata denyut jantung dalam rentangan normal, namun pada setiap kelompok mengalami peningkatan rata-rata respirasi. Peningkatan respirasi tertinggi terjadi pada kelompok B yang merupakan kelompok perlakuan infeksi *S. aureus* dengan konsentrasi 10⁸ CFU/mL, selain itu juga mengalami peningkatan temperatur rektal jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain yaitu 37,25°C. Peningkatan rata-rata respirasi pada kelompok B, C, D, dan E dapat disebabkan oleh adanya infeksi *S. aureus* atau merupakan gejala klinis dari bakteremia yang ditandai dengan adanya peningkatan atau penurunan suhu tubuh, peningkatan pulsus dan respirasi, serta adanya gangguan fisiologis lainnya (Zein, 2010).

Infeksi *S. aureus* dapat diketahui dari hasil pemeriksaan kultur organ pada media NAP yaitu didapatkan adanya koloni bakteri *S. aureus* pada kultur organ hepar, ginjal, dan jantung pada kelompok B, C, D, dan E (**Lampiran 7**) yang menunjukkan bahwa hewan coba telah mengalami bakteremia.

5.2 Kadar Relatif IL-6 pada Limpa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptozotosin dan *Staphylococcus aureus*

Hasil pengukuran kadar relatif IL-6 pada limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotosin dan *S. aureus* dan dianalisa dengan menggunakan *flowcytometry*. Data yang didapatkan dilakukan analisis sehingga diperoleh rata-rata IL-6 tertinggi terdapat pada kelompok B, terendah terdapat pada kelompok A, dan adanya peningkatan pada kelompok C, D, dan E jika dibandingkan dengan kelompok A. Grafik hasil rata-rata kadar relatif IL-6 berdasarkan *flowcytometry* ditunjukkan **Gambar 5.2**.



Gambar 5.2 Grafik rata-rata kadar relatif IL-6 berdasarkan *flowcytometry* pada masing-masing kelompok perlakuan

Selanjutnya dilakukan analisa statistika menggunakan SPSS 22.0 *for Windows* dengan uji normalitas (**Lampiran 10.1**) dan uji homogenitas (**Lampiran 10.2**) yang menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilanjutkan dengan uji statistik *One Way ANOVA* (**Lampiran**

10.4) diperoleh hasil nilai $p < 0,05$ kemudian dilanjutkan Uji Tukey (**Lampiran 10.5**). Hasil tersebut menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan pada setiap perlakuan. Hasil pengujian statistik disajikan pada **Tabel 5.3**.

Tabel 5.3. Kadar relatif IL-6 rata-rata pada tikus normal, diinduksi *S. aureus*, diinduksi STZ dan *S. aureus*

Kelompok	Perlakuan	Rata-rata Kadar Relatif IL-6 (%) \pm SD	Peningkatan terhadap Kontrol negatif
A	Kontrol negatif	2,48 \pm 0,35 ^a	-
B	Diinduksi <i>S. aureus</i> 10 ⁸ CFU/ml	5,58 \pm 1,52 ^b	3,1 %
C	Diinduksi STZ 45mg/kgBB dan <i>S. aureus</i> 10 ⁵ CFU/ml	3,53 \pm 0,82 ^{ab}	1,05 %
D	Diinduksi STZ 45mg/kgBB dan <i>S. aureus</i> 10 ⁶ CFU/ml	3,18 \pm 0,90 ^a	0,7 %
E	Diinduksi STZ 45mg/kgBB dan <i>S. aureus</i> 10 ⁷ CFU/ml	3,01 \pm 0,65 ^a	0,53 %

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

Berdasarkan analisis statistika yang dilakukan, terjadi peningkatan nilai rata-rata kadar relatif IL-6 jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Pada kelompok A didapatkan adanya rata-rata kadar relatif IL-6 sebesar 2,48%, hal ini dapat dikarenakan pada kondisi normal IL-6 tetap ditemukan di dalam tubuh dengan kadar yang sedikit, karena berperan pada proses hematopoiesis dan adanya aktivitas imun normal seperti merangsang progenitor di sumsum tulang untuk memproduksi neutrofil (Memoli dkk, 2007).

Pada penelitian ini, kelompok B memiliki rata-rata kadar relatif IL-6 paling tinggi jika dibandingkan dengan kelompok C, D, dan E. Hal ini dapat terjadi karena pada kelompok B diberi perlakuan berupa infeksi *S. aureus* dengan konsentrasi 10⁸ CFU/mL, maka tubuh akan merespon bakteri ini sebagai benda asing sehingga terjadi peningkatan sel fagosit seperti neutrofil dan makrofag

yang bergerak ke arah sumber infeksi, sehingga makrofag yang menuju tempat infeksi menjadi meningkat, selanjutnya makrofag akan menghasilkan sekresi sel seperti IL-1, IL-4, IL-6, dan TNF. Interleukin-6 merupakan salah satu interleukin yang berperan penting pada proses inflamasi dan menginduksi produksi antibodi (Silva dkk, 2007 dalam Memoli dkk., 2007).

Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar relatif IL-6 pada kelompok C, D, dan E yang merupakan kelompok perlakuan dengan kondisi diabetes melitus yang diinfeksi *S. aureus*. Menurut Campbell (2004), kondisi hiperglikemia pada diabetes melitus dapat mengalami gangguan fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi sel-sel inflamasi yang akan terakumulasi pada tempat peradangan, sehingga akan memperlambat respon imun ketika antigen yang masuk, hal ini dapat memperparah kondisi inflamasi sehingga respon imun terhambat ketika ada antigen seperti *S. aureus*. Selain itu, tingginya kadar glukosa dalam darah dapat menjadi sumber nutrisi bagi bakteri *S. aureus* sehingga bakteri dapat tumbuh dan berkembang di dalam darah (Waspadji, 2006). Faktor lain yang juga dapat berpengaruh adalah toksin leukosidin yang dimiliki oleh bakteri *S. aureus*, toksin ini dapat melisiskan leukosit. Leukosit dibagi menjadi granulosit dan agranulosit, yang mana granulosit terdiri dari neutrofil, basofil, dan eosinofil, sedangkan agranulosit terdiri dari monosit dan limfosit (Atmaja dkk, 2016). Infeksi bakteri akut dapat memicu produksi neutrofil, ketika leukosit dilisiskan oleh toksin leukosidin maka dapat menurunkan jumlah neutrofil yang merupakan komponen terbesar dari leukosit pada kondisi inflamasi akut (Naugler dan Karin, 2008). Neutrofil yang

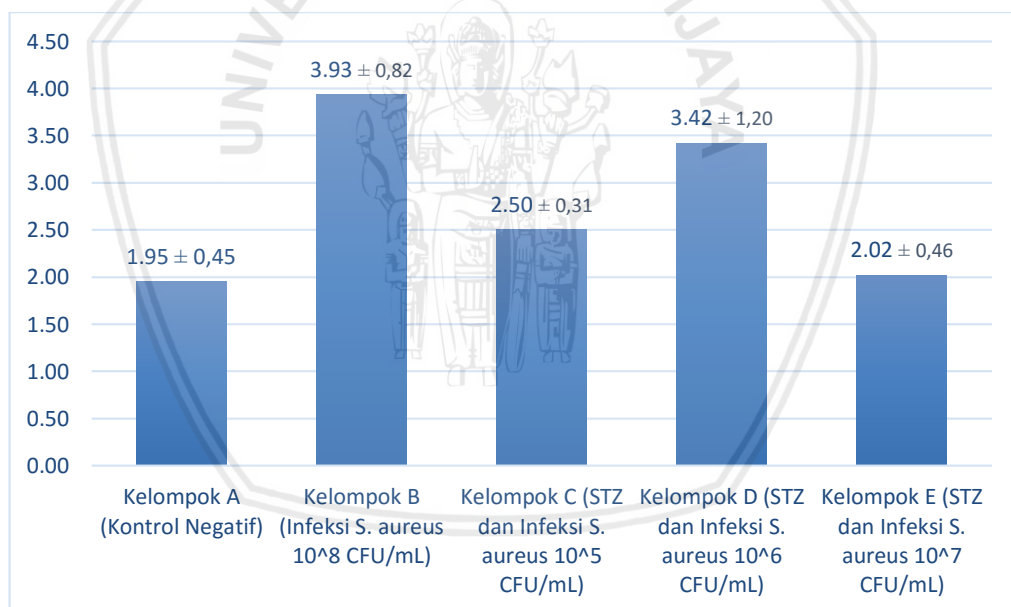
seharusnya berperan pada proses fagositosis mengalami lisis karena adanya toksin leukosidin yang merupakan salah satu faktor virulensi dari *S. aureus* sehingga tidak menghasilkan respon imun proinflamasi yang menyebabkan penurunan kadar relatif IL-6 pada kelompok D dan E.

Peningkatan IL-6 ini akan menginduksi diferensiasi sel B menjadi sel plasma yang menghasilkan imunoglobulin. Maeda dkk, (2009) membuktikan bahwa menurunnya kadar IL-6 akan berpengaruh pada hematopoiesis sel B yang masih berada di dalam sumsum tulang, sehingga berdampak menurunnya jumlah sel B yang beredar di dalam tubuh. Sebaliknya, meningkatnya IL-6 akan memacu diferensiasi sel B dan aktivasi sel T. Peningkatan jumlah sel B yang beredar dalam sirkulasi tubuh akan meningkatkan produksi antibodi (Tobian dkk, 2003).

Interleukin-6 merupakan salah satu komponen sistem imun yang berperan penting terhadap patogenitas dan progresivitas atau keparahan suatu penyakit. Interleukin-6 merupakan sitokin proinflamasi yang bersifat pleiotropik dan merupakan pengatur respon fase akut, inflamasi, dan hematopoiesis. Sitokin ini dihasilkan oleh fagosit mononuklear, sel endotel vaskuler, fibroblast, dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lainnya (Naugler dan Karin, 2008).

5.3 Kadar Relatif IL-8 pada Limpa Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Streptozotosin dan *Staphylococcus aureus*

Hasil pengukuran kadar relatif IL-8 pada limpa tikus putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotosin dan *S. aureus* dianalisa menggunakan *flowcytometry*. Data yang didapatkan dilakukan analisis sehingga diperoleh rata-rata IL-8 tertinggi terdapat pada kelompok B, terendah terdapat pada kelompok A, dan adanya peningkatan pada kelompok C, D, dan E jika dibandingkan dengan kelompok A. Grafik hasil rata-rata kadar relatif IL-8 berdasarkan *flowcytometry* ditunjukkan **Gambar 5.3**.



Gambar 5.3 Grafik rata-rata kadar relatif IL-8 berdasarkan *flowcytometry* pada masing-masing kelompok perlakuan

Selanjutnya dilakukan analisa statistika menggunakan SPSS 22.0 for Windows dengan uji normalitas (**Lampiran 11.1**) dan uji homogenitas (**Lampiran 11.2**) dengan hasil menunjukkan data terdistribusi normal dan homogen, selanjutnya dilanjutkan dengan uji statistik *One Way ANOVA* (**Lampiran 11.4**) diperoleh hasil nilai $p < 0,05$ kemudian dilanjutkan Uji Tukey

(Lampiran 11.5). Hasil analisa statistik menunjukkan bahwa terdapat perbedaan pada setiap perlakuan **tabel 5.4**.

Tabel 5.4. Kadar relatif IL-8 rata-rata pada tikus normal, diinduksi *S. aureus*, diinduksi STZ dan *S. aureus*

Kelompok	Perlakuan	Rata-rata Kadar Relatif IL-8 (%) \pm SD	Peningkatan terhadap Kontrol negatif
A	Kontrol negatif	1,95 \pm 0,45 ^a	-
B	Diinduksi <i>S. aureus</i> 10 ⁸ CFU/ml	3,93 \pm 0,82 ^b	1,98 %
C	Diinduksi STZ 45mg/kgBB dan <i>S. aureus</i> 10 ⁵ CFU/ml	2,50 \pm 0,31 ^{ab}	0,55 %
D	Diinduksi STZ 45mg/kgBB dan <i>S. aureus</i> 10 ⁶ CFU/ml	3,42 \pm 1,20 ^{ab}	1,47 %
E	Diinduksi STZ 45mg/kgBB dan <i>S. aureus</i> 10 ⁷ CFU/ml	2,02 \pm 0,46 ^a	0,07 %

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

Berdasarkan uji statistik yang dilakukan, dapat diketahui perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok A, B, C, D, dan E. Pada kelompok A didapatkan adanya rata-rata kadar relatif IL-8 sebesar 1,95 %, hal ini dapat dikarenakan adanya aktivitas dan migrasi sel PMN seperti neutrofil, basofil, dan eosinofil pada kondisi normal sehingga pada kondisi normal terdapat dalam tubuh dengan kadar yang sedikit (Memoli dkk, 2007).

Pada penelitian ini, peningkatan kadar relatif IL-8 paling tinggi terjadi pada kelompok B jika dibandingkan dengan kelompok C, D, dan E. Hal ini dikarenakan pada kelompok B diberi perlakuan berupa induksi *S. aureus* kemudian terjadi adanya respon imun adaptif yang teraktivasi ketika ada antigen berupa *S. aureus* masuk melalui induksi superantigen (Pandaleke dan Pandaleke, 2014). Superantigen bakteri selanjutnya berinteraksi dengan sel dan menginduksi produksi sitokin serta kemokin. Sitokin yang berperan penting

dalam proses inflamasi yaitu IL-1, TNF, dan IL-8, yang dihasilkan oleh makrofag dan akan teraktivasi karena adanya stimulasi dari beberapa faktor, seperti adanya infeksi dan perlakuan fisik. Infeksi bakteri berupa antigen dapat menstimulasi produksi IL-8 sebagai respon inflamasi (Suroto, 2001).

Penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan kadar relatif IL-8 pada kelompok C, D, dan E jika dibandingkan dengan kelompok A. Hal ini dapat terjadi karena pada kelompok C, D, dan E merupakan kelompok perlakuan dengan kondisi DM dan infeksi *S. aureus*. Pada kelompok C dan D terjadi peningkatan rata-rata kadar relatif IL-8 jika dibandingkan dengan kelompok A dan mengalami penurunan jika dibandingkan dengan kelompok B. Hal ini dapat terjadi karena pada kelompok C dan D dengan kondisi DM dapat mengalami gangguan sistem imunitas sehingga rata-rata kadar relatif menurun. Hal ini sesuai menurut Campbell (2004), kondisi hiperglikemia pada diabetes melitus dapat mengalami gangguan fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi sel-sel inflamasi yang akan terakumulasi pada tempat peradangan, sehingga akan memperlambat respon imun ketika antigen yang masuk, hal ini dapat memperparah kondisi inflamasi sehingga respon imun terhambat ketika ada antigen seperti *S. aureus*. Selain itu, tingginya kadar glukosa dalam darah dapat menjadi sumber nutrisi bagi bakteri *S. aureus* sehingga bakteri dapat tumbuh dan berkembang di dalam darah (Waspadji, 2006).

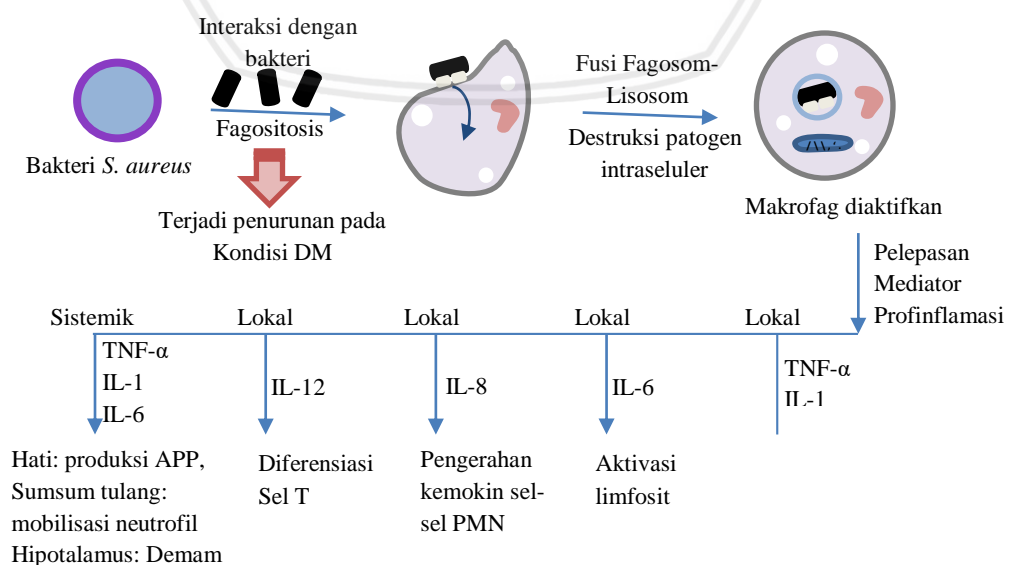
Pada kelompok E terjadi penurunan rata-rata kadar relatif IL-8 jika dibandingkan dengan kelompok C dan D. Hal ini dapat terjadi karena adanya gangguan fungsi fagosit dan kemotaksis pada kondisi DM yang diperparah

dengan infeksi *S. aureus* dengan 10^7 CFU/mL yang merupakan konsentrasi bakteri paling tinggi yang digunakan pada penelitian ini. Faktor lain yang juga dapat berpengaruh adalah toksin leukosidin yang dimiliki oleh bakteri *S. aureus*, toksin ini dapat melisis leukosit. Peningkatan jumlah bakteri yang masuk ke dalam pembuluh darah menyebabkan leukosit semakin banyak lisis oleh toksin leukosidin, sehingga neutrofil dan monosit yang seharusnya berperan pada proses fagositosis mengalami penurunan aktivitas fagositik sehingga menyebabkan kadar relatif IL-8 menurun.

Interleukin-8 merupakan salah satu sitokin proinflamasi yang memiliki peran penting pada proses inflamasi. Sitokin ini dapat dihasilkan oleh monosit, neutrofil, fibroblast, epitel sel, endotel sel dan sel T yang diaktifkan. Sitokin ini merupakan *chemoattractant* yang berperan menarik neutrofil ke tempat peradangan untuk meningkatkan aktivitas fagositik. Sitokin ini juga memiliki efek inflamasi yang luas, dan dapat menyebabkan kerusakan granula spesifik neutrofil dan dapat memperkuat perlekatan neutrofil ke sel endotel dan matriks subendotel (Suroto, 2001). Peningkatan produksi IL-8 dan sitokin lainnya menandakan bahwa jaringan mengalami fase inflamasi yang mengarah pada perbaikan jaringan, namun jika peningkatan terjadi secara terus menerus dapat menyebabkan kerusakan jaringan (Prabakti, 2005).

5.4 Hubungan IL-6 dan IL-8 pada Tikus Putih (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi streptozotosin dan *S. aureus*

Infeksi *S. aureus* dalam pembuluh darah akan menimbulkan respon imun yang diawali dengan meningkatnya sel fagosit ke arah sumber infeksi dengan adanya kemotaksis yang kemudian terjadi proses adhesi yaitu proses perlekatan membran plasma fagosit dengan permukaan antigen. Selanjutnya terjadi proses ingesti bakteri karena fagosit membentuk tonjolan pseudopodi pada membran plasmanya, kemudian membentuk kantung yang mengelilingi bakteri yang disebut fagosom (vakuola fagositik). Selanjutnya terjadi degranulasi yaitu masuknya fagosom pada sitoplasma yang kemudian akan mengalami fusi dengan lisosom dan membentuk fagolisosom, sehingga terjadi pembunuhan mikroba oleh enzim lisosom pada fagolisosom (**Gambar 5.4**). Makrofag teraktivasi dapat memicu inflamasi dengan mengeluarkan mediator inflamasi seperti sitokin TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, dan IL-12 (Baratawidjaya dan Rengganis, 2009).



Gambar 5.4 Mekanisme aktivasi fagositosis

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada kondisi DM terjadi penurunan sistem imun. Menurut Campbell (2004), kondisi hiperglikemia pada diabetes melitus dapat mengalami gangguan fungsi fagosit dalam kemotaksis dan imigrasi sel-sel inflamasi yang akan terakumulasi pada tempat peradangan, sehingga akan memperlambat respon imun ketika antigen yang masuk, hal ini dapat memperparah kondisi inflamasi sehingga respon imun terhambat ketika ada antigen seperti *S. aureus*. Hal ini didukung dengan data penelitian rata-rata kadar relatif TNF- α yang mengalami penurunan pada kelompok perlakuan C, D, dan E jika dibandingkan dengan kelompok B (**Lampiran 12**).

Tumor Necrosis Factor (TNF) merupakan mediator utama pada respon terhadap bakteri dan berbagai mikroorganisme penyebab infeksi yang dihasilkan oleh makrofag. Produksi TNF- α dapat menyebabkan pengarahannya neutrofil dan monosit ke tempat infeksi dan mengaktifkan sel-sel tersebut untuk proses fagositosis, selain itu juga dapat memacu ekspresi molekul adhesi sel vaskular leukosit, dan merangsang makrofag untuk mensekresikan kemokin dan menginduksi kemotaksis dan penggerakan leukosit, serta dapat menginduksi apoptosis sel inflamasi yang sama (Susilowati dkk, 2009).

Produksi TNF- α dapat mempengaruhi produksi sitokin lain yaitu IL-6 dan IL-8, yang mana setelah TNF- α diproduksi maka dapat merangsang makrofag untuk mensekresikan kemokin seperti IL-8 untuk mengerahkan neutrofil dan monosit ke tempat infeksi. Setelah itu, terjadi aktivasi sel limfosit oleh IL-6 untuk mengaktifkan makrofag lebih banyak, merangsang hepatosit untuk memproduksi APP dan bersama CSF merangsang progenitor di sumsum tulang untuk memproduksi neutrofil.

BAB 6 PENUTUP

6.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah disampaikan terkait dengan variabel yang diamati, maka dapat ditarik kesimpulan bahwa:

1. Pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar relatif IL-6
2. Pengaruh kombinasi streptozotosin dan *Staphylococcus aureus* pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) dapat menurunkan kadar relatif IL-8.

6.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai penanganan dan pengobatan serta penggunaan antibiotik yang tepat pada kondisi diabetes melitus dengan infeksi bakteri *S. aureus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agita, V.S. 2016. *Studi Ekspresi IL-1 pada Histopatologi Kulit Tikus (Rattus norvegicus) Model Diabetes Mellitus yang Diterapi Ekstrak Daun Krokot (Portulaca oleracea) [Skripsi]*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Brawijaya
- Aja, D.S. 2016. *Section One Diabetes Mellitus. In : State of Pet Health 2016 Report*. Banfielt Pet Hospital., California
- Armitage, D. 2004, *Rattus norvegicus, Animal Diversity Web*. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Rattus_norvegicus.html yang diakses pada tanggal 25 Juni 2017
- Anwer, T. 2014. *Melatonin Ameliorates Hyperinsulinemia, Glucose Intolerance and Insulin Resistance in STZ-Nicotinamide Induced Type 2 Diabetic Rats*. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Vol 6(2)
- Atmaja, S.A., Radius, K., Freddy, D. 2016. *Pemeriksaan Laboratorium untuk Membedakan Infeksi Bakteri dan Infeksi Virus*. Cermin Dunia Kedokteran. 2016; 43(6): 457-461. 2.
- Aulanni'am, D.W. Soeatmadji, F. Fatchiyah, dan B.S. Sumitro. 2005. *Detection of GAD 65 Auto Antibodies of Type 1 Diabetes Using GAD 65-abs Reagen Detection of GAD65 auto-antibodies* Vol 14 (4)
- Baqarizky, F. 2015. *Studi Awal: Gambaran Histopatologik Pankreas, Hepar dan Ginjal Tikus Diabetes Mellitus yang Diinduksi Streptozotosin dengan Pewarnaan Hemaktosilin Eosin [Skripsi]*. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan. UIN Syarif Hidayatulla
- Baratawidjaya KG, Rengganis I. 2009. *Imunologi Dasar, Edisi 8*. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia (57-93)
- Campbell, A. 2004. *Biology*. Edisi Kelima Jilid 3. Erlangga. Jakarta
- Caterino JM, Kahan S. 2012. *Master Plan Kedaruratan Medik*. Indonesia: Binarupa Aksara Publisher.
- Dahlan, M.S. 2011. *Statistik untuk Kedokteran dan Kesehatan*. Jakarta: Salemba Medika
- Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, Loscalzo J, et al. 2009. *Harrison Manual Kedokteran*. Indonesia: Karisma Publising Group; p. 99-104

- Huebschmann AG, Regensteiner JG, Vlassara H, Reusch JE. 2006. *Diabetes and Advanced Glycation End Products*. *Diabetes Care*. 29(6):1420-32
- Hoening, M. 2003. *Diabetes in pets*. *Diabetes Voice. Mol Cell Endocrinol* 29;197(1-2):221-9.
- Jawetz; Melnick; dan Adelberg's. 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Salemba Medika. Jakarta
- Kenneth, Todar., 2008. *Staphylococcus Aureus and Staphylococcal disease*. <http://textbookofbacteriology.net/staph.html>.
- Kurniawati, A F S., N. Arbianti dan P. Satyabakti. 2015. Perbedaan Risiko Multidrug Resistance Organisms (MDROS) Menurut Faktor Risiko dan Kepatuhan *Hand Hygiene* . *Jurnal Berkala Epidemiologi*, 3 (3) . 277–289.
- Lenzen, S. 2008. *The Mechanism of Alloxan and Streptozotosin Induced Diabetes*. *Diabetologia*
- Maeda, K., A. Malykhin, B.N. Teague-Weber, X.H. Sun, A.D. Farris, and K.M. Coggeshall. 2009. Interleukin-6 aborts lymphopoiesis and elevates production of myeloid cells in systemic lupus erythematosus-prone B6.Sle1.Yaa animals. *Blood*. 113:4534-4540.
- Memoli, B., A. Procino, P. Calabro, P. Esposito, G. Grandaliano, G. Pertosa, M.D. Prete, M. Anderucci, S.D. Lillo, G. Ferulano, C. CLillo, S. Savastano, A. Colano, B. Guida. 2007. *Inflammation May Modulate IL-6 and C-reactive Protein Gene Expression in the Adipose Tissue: The Role of IL-6 Cell Membrane Receptor*. *Am J Physiol Endocrinal Metab* 293.
- Montgomery, D., S. Kowalsky. 2011. *Design and Analysis of Experiment*. John Willey and Sains Inc.
- Mubarak, Z., S. Chismirina, H.H. Daulay. 2016. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Propolis Alami dari Sarang Lebah terhadap Pertumbuhan Enterococcus faecalis*. *Journal of Syiah Kuala Destistry Society* 1(2):175-186
- Naugler, W.E., Karin M. 2008. *The Wolf in Sheep's ClothingL The Role of Interleukin-6 in Immunity, Inflammation and Cancer*. *PubMed.gov* 14(3):109-119
- Nelson, R. W and Claudia. 2014. Classification and Etiology of Diabetes in Dogs and Cats. *Journal of Endocrinology* (2014) 222, T1-T9.
- Nugroho, A. E. 2006. *Animal Models of Diabetes Melitus: Pathology and Mechanism of Some Diabetogenics*. Yogyakarta: Fakultas Farmasi UGM.

- Pandaleke, T A dan H. E. J Pandaleke, 2014. *Etiopatogenesis Dermatitis Atopi*. Jurnal Biomedik (*JBM*), 6 (2): 76-83. Rifa'i, M. 2011. *Autoimun dan Bioregulator*. Malang: UB Press. Hal 29-164
- Prabakti, Y. 2005. Perbedaan Jumlah Fibroblas di Sekitar Luka Insisi pada Tikus yang diberi Infiltrasi Penghilang Nyeri Levobupivakain dan yang tidak diberi Levobupivakain [Thesis]. Program Pascasarjana dan Program pendidikan Dokter Spesialis I Anestesiologi Univeritas Diponegoro Semarang.
- Qosimah, D., dan Dhita E.A. 2019. *Model Hewan Coba Diabetes-Sepsis pada Tikus Wistar yang Diinduksi Streptozotosin dan Bakteri S. aureus*. Malang: Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Brawijaya.
- Rias, Y.A., E. Sutikno. 2017. *Hubunan antara Berat Badan dengan Kadar Gula Darah Acak pada Tikus Diabetes Mellitus*. Jurnal Wiyata, Vol. 4 (1)
- Root, Jacobs. *Septicemia and Septic Shock, in Principles of Internal Medicine*. 12th ed. New York: McGraw Hill, 1991:502-507
- Rukmanasari, R. 2010. *Efek Ekstrak Kulit Terong Ungu (Solanum melongena L.) terhadap Kadar LDL dan HDL Darah Tikus Putih [Skripsi]*. Fakultas Kedokteran. Universitas Sebelas Maret Surakarta
- Sjahrurachman A., Ikaningsih, Sudiro T.M. 2004. *Profil Etiologi Bakteremia dan Resistensinya terhadap Antibiotik di RSCM Jakarta tahun 1999-2002*. Dalam: Majalah Kedokteran Indonesia volume 54.
- Skudelski, T. 2001. *The Mechanism of Alloxan and Streptozotosin Action in B Cells of the Rat Pancreas*. *Physiol. Res.* 50:536-546
- Suroto. 2001. Peran Sitokin IL-1 beta, TNF alfa, IL-8, IL-4 dan TGF Beta-1 Pada Stroke Iskemik.[Disertasi]. Program Pasca Sarjana Universitas Airlangga
- Susilowati dkk. 2009. *Produksi NO dan Aktivitas Fagositosis Makrofag Mencit setelah Stimulasi dengan Lipopolisakarida*. Majalah Kedokteran Universitas Gajah Mada (92-98).
- Syahrurachman *et al.*, 2010. Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran. Edisi Revisi. Jakarta: Binarupa Aksara, 24-32.
- Tjokroprawiro, Askandar. 2007. *Ilmu Penyakit Dalam*. Surabaya : Airlangga University Press.
- Tobian, A.A., N.S. Potter, L. Ramachandra, R.K. Pai, M. Convery, W.H. Boom, and C.V. Harding. 2003. Alternate class I MHC antigen processing is inhibited by toll-like receptor signaling pathogen-associated molecular

patterns: Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein, CpG DNA, and lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 171(3):1413-1422.

Tsai, Shih-Tzer, Pathan, Faruque, Ji, Linong, Yeung, Vincent Tok Fai, Chadha, Manoj, Suastika, Ketut *et al.* 2011. First insulinization with basal insulin in patients with Type 2 diabetes in a real-world setting in Asia. *Journal of Diabetes* 3: 208–216.

Waspadji, S. 2006. *Kaki Diabetes*. Dalam: *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Jilid 3. Edisi IV. Jakarta: Departemen Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Hal: 1933

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

Warsa, U.C. 1994. *Staphylococcus dalam Buku Ajar Mikrobiologi Kedokteran*. Edisi Revisi. Penerbit Binarupa Aksara. Jakarta.

Yuniarti, E., D.H. Putri, S.Y.A.P.D. Sonata. 2018. *Correlation of Fasting Blood Glucose with IL-6 Levels in Type 2 Diabetes Mellitus Ethnic Minangkabau*. *Bioscience* Volume 2(1), 11-21. Padang

Zein, U. 2010. *Diare Akut Disebabkan Bakteri*. e-USU Repository. Sumatera Utara.