UJI KETAHANAN INFEKSI *Salmonella* Typhimurium PADA ORGAN USUS HALUS MENCIT BALB/C BETINA MODEL LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK TERINJEKSI *SELF ANTIGEN DSDNA*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh:
Joshua Tande Jayapratama
NIM. 165070107111036

PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL i
HALAMAN PENGESAHAN ii
SK DEKAN iii
SERTIFIKAT LOMBA vii
KATA PENGANTAR viii
ABSTRAK xi
DAFTAR ISI xiii
DAFTAR TABEL xvi
DAFTAR GAMBAR xvii
DAFTAR LAMPIRAN xviii
BAB I 1
PENDAHULUAN 1
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Rumusan masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Manfaat Penelitian 3
1.4.1 Manfaat Akademik 3
1.4.2 Manfaat Praktis 4
BAB II 5
TINJAUAN PUSTAKA 5
2.1 Lupus Eritematosus Sistemik 5
2.1.1 Definisi 5
2.1.2 Patofisiologi dan Aktivasi Respon Imun pada Pasien LES 6
2.1.3 Neutrophil Extracellular Traps 6
2.1.4 Disfungsi sel Treg pada LES 7
2.1.5 Manifestasi Klinis 9
2.1.6 Diagnosis 10
2.2 Bakteri *Salmonella enterica* Typhimurium 11
2.3 Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid (dsDNA) 12
2.4 Antibodi anti-dsDNA 12
2.5 Mencit Model Lupus 13
2.6 Kerentanan Infeksi Pada Penyakit LES 13
2.7 Metode Escalating Dose Immunotherapy dalam Menurunkan Progesivitas Penyakit Autoimun 14
BAB III 16

KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN 16
3.1 Kerangka Konsep Penelitian 16
3.2 Hipotesis Penelitian 17
BAB IV 18
4.1 Rancangan Penelitian 18
4.2 Populasi dan Sampel 20
4.3 Variabel Penelitian 21
4.3.1 Variabel Bebas 21
4.3.2 Variabel Tergantung 21
4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian 22
4.5 Alat dan Bahan 22
4.5.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit 22
4.5.2 Injeksi Pristane 22
4.5.3 Alat dan Bahan Isolasi dsDNA 22
4.5.4 Alat dan Bahan Preparasi dan Injeksi dsDNA 22
4.5.5 Alat dan Bahan Sonde Salmonella Typhimurium 22
4.5.6 Alat dan Bahan Pengukuran Kolonisasi Bakteri 22
4.6 Definisi Operasional 23
4.7 Prosedur Penelitian 24
4.7.1 Persiapan Hewan Coba 24
4.7.2 Injeksi Pristane 25
4.7.3 Isolasi dsDNA 25
4.7.4 Preparasi dan injeksi dsDNA 25
4.7.5 Pengukuran Kolonisasi Pada Organ Usus Halus 26
4.7.6 Prosedur Analisis Data 27
BAB V 28
HASIL PENELITIAN 28
5.1 Hasil Pengukuran Kolonisasi Bakteri *Salmonella* Typhimurium 28
5.2 Analisis Data 29
5.2.1 Uji Normalitas 29
5.2.2 Uji Homogenitas 29
5.2.3 Uji Nonparametrik 30
BAB VI 32
PEMBAHASAN 32
6.1 Perbedaan Jumlah Koloni Antar Kelompok 32
6.2 Perbedaan Jumlah Koloni Mencit Sehat dan Mencit Terinduksi LES 33

6.3 Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri Setelah Terapi 34
BAB VII 36
PENUTUP 36
7.1 Kesimpulan 36
7.2 Saran 36
7.2.1 Diperlukan studi yang membandingkan terapi konvensional dengan terapi metode *escalating dose self-antigen dsDNA.* 36
7.2.2 Diperlukan studi lebih lanjut mengenai pengaruh terapi metode ini terhadap regulasi sistem imun dalam lingkup infeksi. 36
7.2.3 Diperlukan studi lebih lanjut mengenai mekanisme-mekanisme sistem imun dalam mengatasi infeksi 36
DAFTAR RUJUKAN 37
LAMPIRAN 41
Lampiran 1. Pernyataan keaslian tulisan 41
Lampiran 2. Analisis Data 42
Lampiran 3. Surat Kelaikan Etik 45
Lampiran 4. Dokumentasi Penelitian 46
Lampiran 5. Dokumentasi Lomba 47

repository.ub.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI KETAHANAN INFEKSI *Salmonella* Typhimurium PADA ORGAN USUS HALUS MENCIT BALB/C BETINA MODEL LUPUS ERITEMATOSUS SISTEMIK TERINJEKSI *SELF ANTIGEN DSDNA*

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran

Oleh :
Joshua Tande Jayapratama
NIM. 165070107111036

Telah dikutsertakan dalam

Research Paper Competition Medical Fiesta 2018

26 Oktober 2018

Pembimbing I

Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes., Sp.PK
NIP/NIK. 195603311988022001

Pembimbing II

dr. Catur Ari Setianto, Sp.S
NIP/NIK. 2016098101291001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

Scanned by CamScanner

Jayapratama, Joshua Tande. 2019. **Uji Ketahanan Infeksi *Salmonella* Typhimurium Pada Organ Usus Halus Mencit Balb/c Betina Model Lupus Eritematosus Sistemik Terinjeksi *Self Antigen DsDNA***. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK (2) dr. Catur Ari Setianto, Sp.S

ABSTRAK

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun sistemik yang disebabkan reaksi imun yang abnormal. Pengobatan LES saat ini yaitu kortikosteroid dan imunosupresan menimbulkan efek samping kerentanan terhadap infeksi. Metode lainnya yang sedang dikembangkan yaitu *escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy*. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui pengaruh metode *escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy* pada LES terhadap kerentanan infeksi. Mencit Balb/c betina diinjeksi 0.5 ml pristane intraperitoneal. Sejumlah 24 mencit Balb/c betina dibagi menjadi 2 kelompok: 16 mencit diinjeksi 0.5 ml pristane intraperitoneal untuk menginduksi lupus dan 8 mencit dijadikan kontrol negatif. Dua belas minggu setelah injeksi, 8 mencit terinduksi lupus diberi dosis dsDNA 0,005 µg, 0,05 µg, dan 0,5 µg secara bertahap dengan selang waktu 1 minggu. dsDNA dikompleksikan dengan *polyethylenimine* (PEI). Ketiga kelompok mencit kemudian diberi sonde bakteri *Salmonella* Typhimurium 10^8 cfu/mL sebanyak 2 kali dengan selang waktu 3 hari. Tujuh hari setelah sonde kedua, dilakukan kultur bakteri pada organ usus halus seluruh mencit menggunakan media BSA. *Escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy* tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada usus halus dibandingkan dengan kontrol positif (942.500 vs 78.250, p=0,081), namun masih terdapat perbedaan signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif (942.500 vs 0, p=0,014). Dapat disimpulkan pemberian s*elf-antigen* dsDNA dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara bertahap tidak berpengaruh terhadap jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus mencit Balb/c model lupus.

Kata Kunci: *Lupus Eritematosus Sistemik, dsDNA, escalating dose,* Salmonella *Typhimurium*

repository.ub.ac.id

Jayapratama, Joshua Tande. 2019. **Resistance Test for *Salmonella* Typhimurium Infection in Small Intestine Organs of Balb/c Female Mice Model of Systemic Lupus Erythematosus Injected with Self-Antigen dsDNA**. Final Project, Medical Study Program, Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya. Advisor: (1) Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK (2) dr. Catur Ari Setianto, Sp.S

ABSTRACT

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is a systemic autoimmune disease caused by abnormal immune reactions. Current SLE treatments, namely corticosteroids and immunosuppressants, cause side effects of susceptibility to infections. Another method that is being developed is escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy. The purpose of this study was to determine the effect of the escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy method on susceptibility to infection in SLE. Female Balb/c mice were injected 0.5 ml intraperitoneal pristane. A total of 24 female Balb/c mice were divided into 2 groups: 16 mice were injected 0.5 ml pristane intraperitoneally to induce lupus and 8 mice were negative controls. Twelve weeks after injection, 8 lupus-induced mice were given an escalating dose of 0.005 µg, 0.05 µg, and 0.5 µg dsDNA with an interval of 1 week. dsDNA is complexed with polyethylenimine (PEI). The three groups of mice were then given oral administration of *Salmonella* Typhimurium 10^8 cfu/mL 2 times with an interval of 3 days. Seven days after the second administration, bacterial culture was carried out from the small intestine of all mice using BSA media. Escalating dose of self-antigen dsDNA immunotherapy had no significant effect on the number of Salmonella Typhimurium colonies in the small intestine compared with positive controls (942,500 vs 78,250, $p = 0.081$), but there were still significant differences compared with negative controls (942,500 vs 0, $p = 0.014$). It can be concluded that the administration of self-antigen dsDNA dose 5x10-2µg, 5x10-1µg, 5µg gradually has no effect on the number of *Salmonella* Typhimurium colonies in the small intestine of Balb/c mice lupus model.

Keywords: *Systemic Lupus Erythematosus, dsDNA, escalating dose,* Salmonella *Typhimurium*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB I
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lupus eritematosus sistemik (LES) adalah penyakit autoimun yang menyerang secara sistemik. Ciri utama dari penyakit LES yaitu terjadinya reaksi imun yang abnormal khususnya berupa produksi antibodi antinuclear. Pola paling umum dari penyakit ini adalah campuran keluhan di kulit, musculoskeletal, dan keluhan yang terkait hematologi dan serologi. Beberapa pasien juga memiliki manifestasi pada ginjal, sistem saraf pusat, dan hematologis (Gladman, 2017).

Penyakit lupus eritematosus sistemik lebih banyak terjadi pada wanita dibandingkan laki-laki dengan perbandingan kejadian 10:1 (Jarukitsopa, *et al*., 2015). Meskipun secara umum angka harapan hidup 10 tahun penderita LES meningkat hingga mencapai 90% pada tahun 2000 di negara maju, penelitian Kalim *et al* pada tahun 2000 menunjukkan bahwa penderita LES di Indonesia mempunyai harapan hidup yang masih rendah, yakni 70% untuk 5 tahun dan 55% untuk 10 tahun. Bahkan, manifestasi klinis yang ditunjukkan oleh pasien Indonesia lebih berat disertai tingginya frekuensi temuan antibodi anti dsDNA dan gambaran fotosensitif dibandingkan pasien ras Kaukasia (Kalim, *et al*., 2015). Hal ini menunjukkan bahwa LES merupakan penyakit yang memiliki konsekuensi berat dan dapat menyebabkan kerugian khususnya bagi wanita dalam usia produktif di Indonesia.

Patogenesis LES hingga saat ini belum dapat diketahui dengan jelas. Telah lama diketahui bahwa pada LES hipereaktivitas sel-sel imun dan produksi autoantibodi patogen menyebabkan kerusakan jaringan dan keradangan sistemik. Defek klirens dari mekanisme *Neutrofil Extracellular Traps* (NET) diduga menjadi

penyebab permasalahan terkait hiperaktivitas sel imun terhadap antigen diri akibat terbentuknya kompleks DNA–peptida mikroba. Mekanisme NET juga dapat menjelaskan munculnya ketidakseimbangan sitokin, terutama IL-17, yang dapat berakibat pada manifestasi klinis LES (Bouts, *et al.* 2012).

Saat ini belum ada terapi definitif untuk LES, sehingga penanganan untuk mengontrol disfungsi dan kecacatan menjadi penting. Salah satu metode terapi imunologi terbaru yang sedang dikembangkan untuk mencapai hal ini adalah *antigen specific immunotherapy* yang menerapkan konsep mengembalikan toleransi imun melalui pemberian antigen dengan dosis meningkat bertahap. Penelitian oleh Burton et al membuktikan bahwa metode ini dapat meningkatkan toleransi sistem imun pada penyakit *experimental autoimmune encephalomyelitis* (Burton, *et al*, 2014). Penelitian yang telah dilakukan pada tahun pertama menggunakan metode *escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy* membuktikan bahwa pemberian (injeksi*) self dsDNA* dengan dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara bertahap memiliki efikasi terapi yang baik karena berhasil menurunkan kadar autoantibodi ANA, dsDNA, jumlah maturasi sel dendritik, dan jumlah sel Thelper 17 (Th17) dan meningkatkan aktivitas Treg berdasar jumlah sel Tregulator (Treg) dan kadar TGF- β.

Pengobatan LES yang direkomendasikan saat ini, antara lain pemberian kortikosteroid dan imunosupresan (Perhimpunan Reumatologi Indonesia, 2013), menimbulkan efek samping timbulnya kerentanan terhadap infeksi (Kang dan Park, 2003). Aktivitas sel Treg pada individu normal menekan respon imun sel Th17 sehingga respon berlebihan dari sistem imun dapat dicegah (Abbas, *et al*, 2014). Pada penggunaan metode *escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy*, penekanan respon sel T efektor yang tidak spesifik dikhawatirkan

dapat memiliki efek yang serupa dengan obat imunosupresan. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa penggunaan obat imunosupresan meningkatkan risiko infeksi bakteri pada pasien LES (Kang dan Park, 2003). Untuk itu diperlukan penelitian lanjutan pada tahun kedua untuk menguji keamanan/*safety* dalam bentuk ketahanan infeksi hewan coba mencit model lupus terinduksi *pristane* yang telah diterapi menggunakan metode *escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy*.

1.2 Rumusan masalah

Apakah metode pemberian self-antigen dsDNA dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara bertahap berpengaruh terhadap jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus mencit Balb/c model lupus?

1.3 Tujuan Penelitian

Mengetahui pengaruh pemberian self-antigen dsDNA dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara bertahap terhadap jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus mencit Balb/c model lupus.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

1.4.1.1 Memberikan gambaran informasi mengenai ketahanan infeksi dari pasien LES yang telah diterapi dengan self-antigen dsDNA

1.4.1.2 Mendapatkan pengetahuan tentang mekanisme imunologis dari sel Treg dan Thelper individu pasien LES terhadap infeksi bakteri.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini dapat digunakan sebagai referensi dalam pengembangan lebih lanjut metode *escalating dose self-antigen* dsDNA *immunotherapy*.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Lupus Eritematosus Sistemik

2.1.1 Definisi

Lupus eritematosus sistemik (LES) merupakan penyakit autoimun yang disebabkan oleh gagalnya pengenalan sistem imun terhadap autoantigen. Kegagalan ini menyebabkan sel-sel tubuh mengalami kerusakan akibat terbentuknya kompleks imun autoantigen-autoantibodi. Pada sebagian besar kasus, autoantibodi dapat dideteksi beberapa tahun sebelum kemunculan gejala klinis LES. Walaupun penyakit LES dapat terjadi pada semua golongan jenis kelamin, usia, dan suku bangsa, 90% dari pasien LES adalah wanita pada usia subur (Naureckas, *et al.* 2015). Di Indonesia, pada tahun 2016 Perhimpunan Lupus Indonesia (PESLI) menyatakan bahwa rata-rata insiden LES di 8 rumah sakit di Indonesia adalah 10,5% (Pusdatin, 2017). Prevalensi penyakit SLE di Amerika Serikat adalah 20-50 kasus per 100.000 wanita tergantung ras dan gender (Naureckas, *et al.* 2015).

Penyebab dari prevalensi LES yang dominan terhadap wanita masih belum dapat dipastikan. Penjelasan yang memungkinkan antara lain adalah aktivasi abnormal dari gen milik kromosom X inaktif yang bertanggung jawab akan respon imun. Salah satu jenis gen ini, CD40LG, bertanggung jawab mengkode molekul kostimulator sel B milik sel T aktif pada wanita, yang menunjukkan kerentanan wanita untuk mengalami LES. Teori lainnya menyebutkan bahwa faktor hormone estrogen yang dimiliki wanita dalam jumlah besar memperberat perjalanan penyakit LES itu sendiri (Strickland, *et al,* 2012).

2.1.2 Patofisiologi dan Aktivasi Respon Imun pada Pasien LES

Lupus Eritematosus Sistemik dapat disebabkan terutama oleh interaksi antara faktor lingkungan dan *susceptibility genes*, kelainan gen tertentu yang dapat menjadi pencetus respon imun abnormal. Salah satu bentuk respon imun abnormal tersebut adalah berkurangnya klirens kompleks imun dan sel yang mengalami apoptosis. Antigen diri berupa DNA, RNA, maupun phospholipid di permukaan sel yang mengalami apoptosis dan tidak mengalami klirens dikenali oleh sistem imun sebagai antigen asing. Aktivasi sel imun yang memperantarai perkembangan proses autoimunitas ditandai dengan peningkatan sekresi sitokin proinflamasi seperti interferon tipe 1 dan 2, *tumor necrosis factor* α, interleukin 17, dan sitokin maturasi/*survival* limfosit B (Naureckas, *et al.* 2015).

Pada kasus LES terjadi pula berkurangnya produksi sitokin *transforming growth factor beta* (TGF-β) dan IL-2 yang menyebabkan sistem imun tak dapat mempertahankan fungsi sel T CD4+ dan CD8+ regulator. Hal ini menyebabkan autoantigen, autoantibodi, dan kompleks imun menetap dalam waktu yang lama dan menyebabkan perkembangan proses inflamasi. Pada inflamasi yang sudah menjadi kronik, terjadi kerusakan jaringan ireversibel yang dapat menyebabkan komplikasi klinis seperti fibrosis/sclerosis di glomeruli, paru, pembuluh darah, dan organ lainnya (Naureckas, *et al.* 2015).

2.1.3 Neutrophil Extracellular Traps

Studi terkini menemukan bahwa neutrofil memiliki peran krusial dalam pathogenesis LES melalui rilis *Neutrophil Extracellular Traps.* Salah satu strategi tubuh untuk membunuh bakteri melibatkan rilis NET ke lingkungan yang disebut dengan NETosis. Pada NETosis, struktur kromatin yang berisi peptida antimikroba seperti LL37 dan HNP dieksternalisasi oleh neutrophil yang aktif. NET yang dirilis

ke ruang ekstraselular memiliki kompleks DNA-peptida antimikroba yang dapat mengaktifkan *plasmacytoid dendritic cell* (pDC) untuk memproduksi IFN-α melalui jalur TLR-9 *dependant*. Serum dari pasien LES mengandung antibodi anti-LL37, anti-HNP, dan anti-DNA yang membuktikan bahwa kompleks peptide DNA-antimikroba dapat dikenali sel B sebagai autoantigen. Autoantibodi tersebut dapat membentuk kompleks imun dengan konten dari NET yang akhirnya mengamplifikasi kembali produksi IFN-α oleh pDC (Bouts, *et al.* 2012).

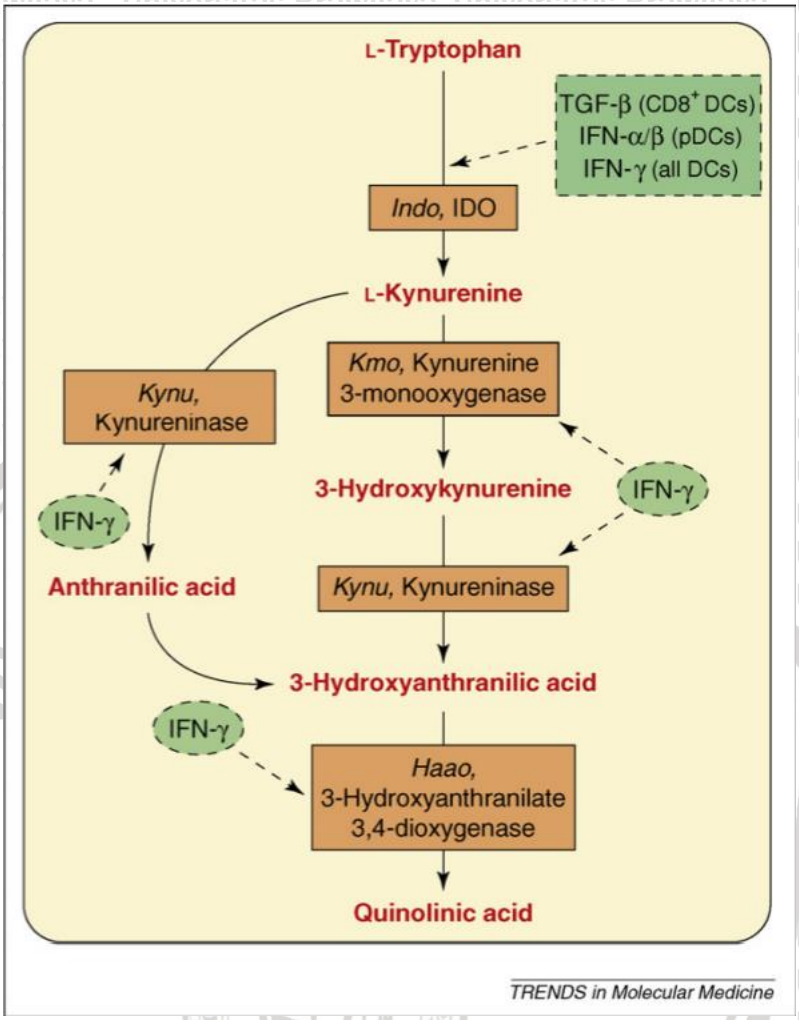
2.1.4 Disfungsi sel Treg pada LES

Derajat dan gejala penyakit LES yang beragam membuat patofisiologi molekuler dari penyakit ini menjadi kompleks dan melibatkan banyak komponen. Disfungsi jumlah dan/atau fungsi dari sel T regulator (Treg) menjadi temuan yang paling sering dilaporkan. Sel T regulator merupakan subset sel T yang berfungsi meregulasi aktivitas dari sel T efektor dan sel B (Giang, *et al.* 2016). Penanda utama dari sel T regulator diantaranya CD25, CTLA-4, TGF-β, dan FOXP3 (Abbas, *et al*, 2014). Disfungsi dari sel Treg yang ditandai dengan penurunan jumlah penanda tersebut menyebabkan kegagalan homeostasis sel imun yang menjadi pencetus penyakit autoimun.

Pada pasien LES, penurunan aktivitas sel Treg dapat berpengaruh terhadap aktivitas sel B, sel T efektor, dan *Antigen Presenting Cell* khususnya sel dendritic. Penelitian yang dilakukan Hadaschik et al menemukan bahwa hiperaktivitas sel B yang memproduksi autoantibodi disebabkan oleh kegagalan supresi sel Treg terhadap sel B melalui mekanisme sitotoksisitas maupun apoptosis. Modulasi fungsi sel dendritic oleh sel Treg dimediasi oleh peningkatan maupun penurunan regulasi CD80/CD86 di sel dendritic. Regulasi sel dendritic dilakukan sel Treg melalui hubungan CD80/CD86 dengan CTLA-4 yang dimiliki sel

Treg, sehingga apabila terjadi penurunan jumlah CTLA-4 akan terjadi hiperaktivasi dari sel dendritic (Giang, *et al.* 2016). Peran dari sitokin TGF-β juga terdapat pada regulasi sel dendritic. Pada jaringan perifer, TGF-β menghambat proliferasi, aktivasi, dan maturasi sel T efektor dan mempertahankan sel Treg (Li, *et al*, 2007).

Kerja dari sitokin TGF-β pada *subset* sel T sangat tergantung pada tipe sel dan konteks stimulasi oleh sitokin ini. Salah satu mekanisme kerja dari sitokin TGF-β dalam meregulasi sistem imun menurut Belladonna et al adalah lewat katabolisme dari *L-tryptophan* menjadi *kynurenine*. Dengan katabolisme ini, proliferasi dari sel T dapat ditekan dan *kynurenine* yang terbentuk dapat mencetuskan efek toleransi langsung pada sel T efektor (Belladonna, *et al,* 2009).



Gambar 2.1 Katabolisme *L-tryptophan* menjadi *kynurenine* (Belladonna, *et al*, 2009).

2.1.5 Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis dari LES merupakan hasil dari inflamasi berbagai organ yang bersifat beragam dan seringkali kompleks (Fernando, *et al.* 2005). Tujuh puluh lima persen pasien lupus mengalami manifestasi klinis di organ kulit. Manifestasi tersebut dapat berupa *Acute Cutaneous Lupus Erythematosus* yang muncul sebagai *butterfly rash* atau exanthema maculopapular generalisata, *Chronic Cutaneous Lupus Erythematosus* atau *Discoid Lupus Erythematosus*, *alopecia*, dan *Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus* yang dapat berupa lesi kulit tanpa scarring di daerah kulit yang sering terpapar sinar matahari.

Keterlibatan organ musculoskeletal dialami 90% pasien LES. Manifestasi musculoskeletal dapat berupa myalgia, arthralgia, dan arthritis sendi besar maupun kecil. Sekitar 50% pasien LES juga mengalami manifestasi pada ginjal berupa lupus nefritis yang dideteksi lewat adanya proteinuria dan erythrocytouria. Manifestasi lainnya yang dapat terjadi yaitu endocarditis Libman-Sacks, pericarditis, myocarditis, dan arteritis coroner pada organ jantung dan pembuluh darah, dan radang pleura, lupus pneumonitis, maupun fibrosis pada organ paru (Kuhn, *et al.* 2015).

2.1.6 Diagnosis

Diagnosis LES dapat ditegakkan berdasarkan gambaran klinis dan imunologis. *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* pada tahun 2012 mengajukan 11 kriteria klinis dan 6 kriteria imunologis untuk klasifikasi LES, dimana bila didapatkan minimal 4 kriteria yang didalamnya terdapat minimal 1 kriteria klinis dan 1 kriteria imunologis maka diagnosis LES sudah dapat di tegakkan. Kriteria tersebut adalah:

Tabel 2.1 Kriteria Diagnosis LES berdasar SLICC 2012 (Petri, *et al.* 2012)

Kriteria	**Definisi**
Kriteria Klinis	
Acute atau *Subacute Cutaneous Lupus*	Termasuk *malar rash*, SLE varian *toxic epidermal necrolysis, maculopapular lupus rash,* dan *photosensitive lupus rash*
Chronic cutaneous lupus	Termasuk ruam diskoid klasik baik lokal maupun generalisata, *hypertrophic lupus, lupus panniculitis, mucosal lupus, lupus erythematosus tumidus, chilblains lupus, discoid lupus/lichen planus overlap*
Ulkus oral	Luka pada mulut
Alopecia tipe *nonscarring*	Kerapuhan atau penipisan rambut yang difus

Sinovitis	Pembengakan atau efusi atau nyeri tekan pada 2 atau lebih sendi dan *morning stiffness* minimal 30 menit
Serositis	Inflamasi pada sepanjang tepi luar paru (pleuritis), efusi pleura, *pericardial rub*, gambaran EKG
Kelainan ginjal	Proteinuria >0.5g/hari atau RBC *cellular cast* yang menetap pada urin
Neurologis	Adanya bangkitan, psikosis, myelitis, neuropati kranial maupun perifer, mononeuritis multiplex, dan *acute confusional state* yang tidak dapat dijelaskan oleh penyebab lain
Kelainan eritrosit	Anemia hemolitik tanpa penyebab lainnya yang diketahui
Kelainan leukosit	Leukopenia (<4000/mm^3) atau limfopenia (<1000/mm^3) tanpa penyebab lainnya yang diketahui
Kelainan trombosit	Trombositopenia (<100.000/mm^3) tanpa penyebab lainnya yang diketahui
Kriteria imunologis	
Anti Nuclear Antibody	diatas nilai referensi laboratoris
Anti-dsDNA	diatas nilai referensi laboratoris, kecuali ELISA: dua kali diatas nilai referensi laboratoris
Anti-Sm	Positif
Antibodi antifosfolipid	Terdapat *lupus anticoagulant*, *false positive* RPR, *anticardiolipin* titer sedang atau tinggi, atau *anti- β2 glycoprotein I*
Nilai komplemen	C3, C4, atau CH50 rendah
Direct Coombs test	Positif tanpa adanya anemia hemolitik

2.2 Bakteri *Salmonella enterica* Typhimurium

Spesies bakteri *Salmonella enterica* merupakan pathogen penting dari manusia dan hewan. Pada mencit, infeksi *Salmonella* Typhimurium meningkatkan kejadian demam tifoid dengan gejala menyerupai infeksi *Salmonella* Typhii pada manusia. Karena itu, infeksi *Salmonella* Typhimurium diterima sebagai model

eksperimental untuk demam tifoid pada manusia (Mittrücker, *et al.* 2000). Pada organ usus halus, bakteri *Salmonella* Typhimurium dapat bertumbuh subur dengan kemampuannya menggunakan sumber daya energi yang terdapat dalam organ usus halus dan resistensi terhadap protein antimicrobial yang disekresikan pada organ tersebut (Deriu, *et al*. 2013). Infeksi *Salmonella* sering dijumpai pada pasien dengan penyakit LES. Kemungkinan penyebab kerentanan infeksi dari pasien LES antara lain aktivitas penyakit, faktor genetic, dan akibat dari terapi menggunakan agen imunosupresan (Zandman-Goddard dan Shoenfeld. 2003).

2.3 Double-Stranded Deoxyribonucleic Acid (dsDNA)

DNA adalah polinukleotida yang terbentuk dari unit-unit deoksiribonukleotida yang berikatan secara kovalen. Sekuens dari DNA membawa informasi genetik. Informasi genetic tersebut berfungsi sebagai instruksi untuk pembentukan protein oleh sel dan organisme itu sendiri. Tiap molekul DNA berbentuk *double helix/double stranded* dari dua buah nukleotida yang bersifat saling komplementer dan memiliki ikatan hidrogen. Pada organisme eukariot, DNA berada didalam nukleus sel (Alberts, *et al*, 2003).

2.4 Antibodi anti-dsDNA

Antibodi anti-dsDNA merupakan antibodi yang bersifat spesifik terhadap *double-stranded* DNA yang merupakan antigen *nuclear* spesifik (Kavanaugh, *et al. 2*000). Antibodi ini telah dibuktikan dapat menimbulkan reaksi patogenik yang mengarah ke LES. Antibodi anti-dsDNA ditemukan pada organ ginjal pasien lupus dan berkaitan dengan peningkatan proteinuria pada mencit terinfeksi LES. Mekanisme timbulnya proses inflamasi dan kerusakan jaringan yang menjadi ciri khas LES akibat antibodi anti-dsDNA masih belum diketahui secara pasti. Terdapat teori bahwa kemampuan antigen diri dsDNA untuk masuk kedalam

area intrasel secara *Fab dependant* menjadi sumber timbulnya antibodi terhadap dsDNA. Teori lainnya menyebutkan bahwa patogenisitas dsDNA terletak pada kemampuannya merekrut sel-sel inflamasi lewat aktivasi komplemen (Isenberg, *et al*. 2007).

2.5 Mencit Model Lupus

Pada penelitian ini, mencit yang digunakan adalah mencit *strain* Balb/C betina. Mencit ini dipilih karena paling baik dalam meneliti respon imun. Mencit strain ini pada keadaan normal tidak memiliki kerentanan imunologis terhadap LES, namun ketika diinjeksi pristane, muncul karakteristik autoantibodi dari lupus yang bisa dibandingkan dengan strain mencit MRL/*lpr.* Model LES akibat induksi pristane juga memiliki deposisi kompleks imun di ginjal yang mengakibatkan proteinuria dan nefritis (Perry *et al,* 2011). Patogenesis LES akibat induksi pristane diduga adalah akibat dari stress oksidatif yang mendorong terbentuknya sitokin proinflamasi dan NO. NO yang terakumulasi berlebihan mendorong terjadinya abnormalitas aktivitas sel limfosit yang menjadi penyebab penyakit autoimun (Minhas, *et al*, 2011)

2.6 Kerentanan Infeksi Pada Penyakit LES

Pasien LES memiliki peningkatan kerentanan terhadap infeksi. Hal ini utamanya disebabkan oleh disfungsi sistem imun (Navarra dan Leynes, 2010). Sel B pada pasien SLE memiliki karakteristik aktivasi poliklonal dan kemampuan membentuk antibodi yang lebih besar. Antibodi yang dibentuk sebagian besar merupakan immunoglobulin G (IgG) namun terdapat penurunan dalam produksi subkelas IgG2 yang melawan bakteri berkapsul. Terdapat pula peningkatan sel B yang memproduksi IL-10, sebuah sitokin yang mensupresi imunitas seluler. Selain itu, sel CD8+ pada pasien LES memiliki fungsi sitolitik yang berkurang sehingga

ekspansi sel B autoreaktif yang diaktivasi oleh sel T CD4+ menjadi tidak terkontrol. Sel T CD4+ pada pasien LES juga memiliki kecenderungan menjadi sel Th2 dan Th17 dibandingkan sel Th1 sehingga terdapat penurunan ketahanan terhadap virus dan bakteri intraselular. Sel Treg pada pasien LES juga mengalami penurunan jumlah dan aktivitas dengan salah satu akibatnya yaitu mendorong terjadinya inflamasi (Caza, *et al,* 2014)

2.7 Metode Escalating Dose Immunotherapy dalam Menurunkan Progesivitas Penyakit Autoimun

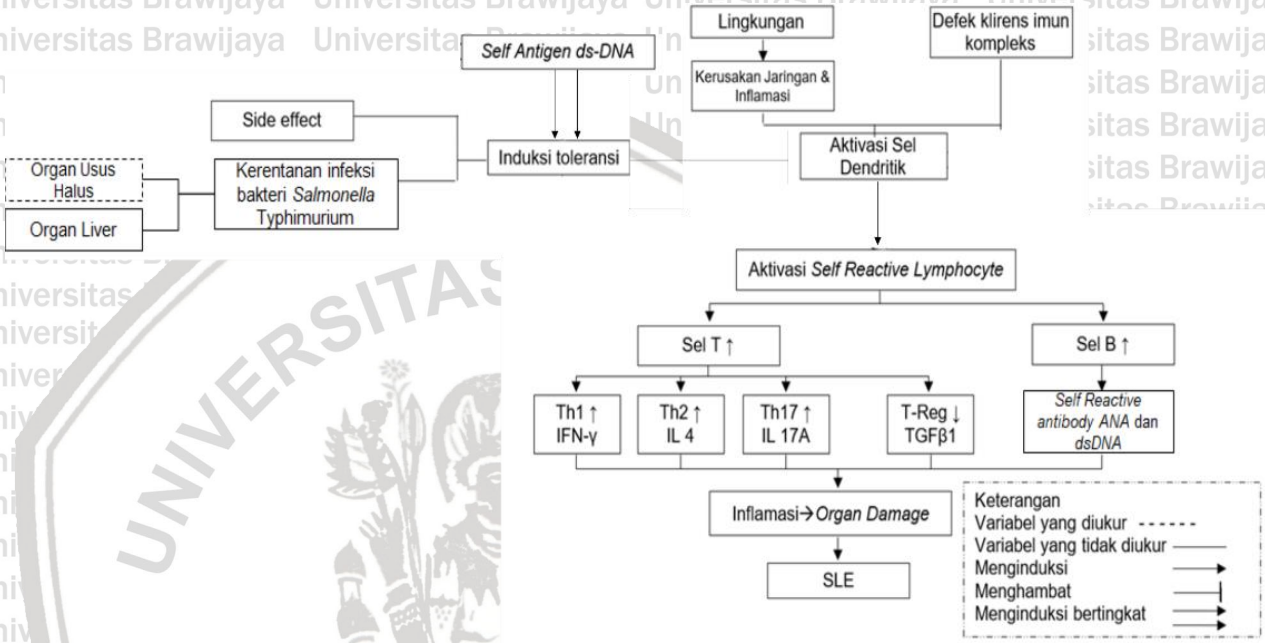
Allergen-specific immunotherapy seringkali dilakukan dengan cara pemberian antigen dengan dosis meningkat secara bertahap sebelum *maintenance dose* yang tinggi dipertahankan dan menghasilkan desensitisasi alergi. Penggunaan metode *escalating dose* meminimalisir risiko efek samping terkait imunoterapi. Peningkatan bertahap dari dosis memungkinkan pemberian dosis antigen yang lebih besar dengan efek yang minimal. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa konsep desensitisasi pada pasien alergi juga dapat digunakan pada kasus penyakit imunologis lainnya. Dinyatakan bahwa dosis yang efektif dan aman digunakan dalam terapi alergi ini adalah 5 hingga 20µg zat allergen utama (Bousquet, *et al*. 1998).

Penelitian yang dilakukan Burton et al menggunakan prinsip *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) untuk terapi *experimental autoimmune encephalomyelitis model* menggunakan *Myelin Basic Protein* dengan dosis 0,008µg, 0,08µg, 0,8µg, dan 8µg menunjukkan bahwa toleransi spesifik terhadap antigen diri dapat terinduksi lewat pemberian secara subkutan. Pada penelitian ini, ditemukan bahwa EDI meminimalisir aktivasi dan proliferasi sel T CD4þ pada tahap awal terapi. Hal

ini mencegah pelepasan sitokin secara sistemik yang berlebihan (Burton, *et al.* 2014).

BAB III
KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Faktor lingkungan yang menyebabkan terjadinya kerusakan jaringan dan inflamasi dan faktor defek klirens kompleks imun menyebabkan aktivasi sel dendritik yang sensitif terhadap antigen diri yang kemudian akan mengaktivasi *self-reactive lymphocyte* memproduksi antibodi anti-ANA dan dsDNA dan sitokin-sitokin proinflamasi. Pemberian *escalating dose antigen specific immunotherapy* menggunakan *self-antigen* dsDNA menginduksi toleransi sistem imun yang akan menghambat aktivasi *self-reactive lymphocyte*. Setelah pemberian *self antigen dsDNA,* diharapkan toleransi sistem imun kembali ke tingkat normal. Pada penelitian ini, peneliti ingin menguji apakah kembalinya toleransi sistem imun memiliki efek meningkatkan kerentanan infeksi organ usus halus terhadap bakteri *Salmonella* Typhimurium.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian *self-antigen* dsDNA dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara bertahap tidak berpengaruh terhadap jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus mencit Balb/c model lupus.

BAB IV
METODE PENELITIAN

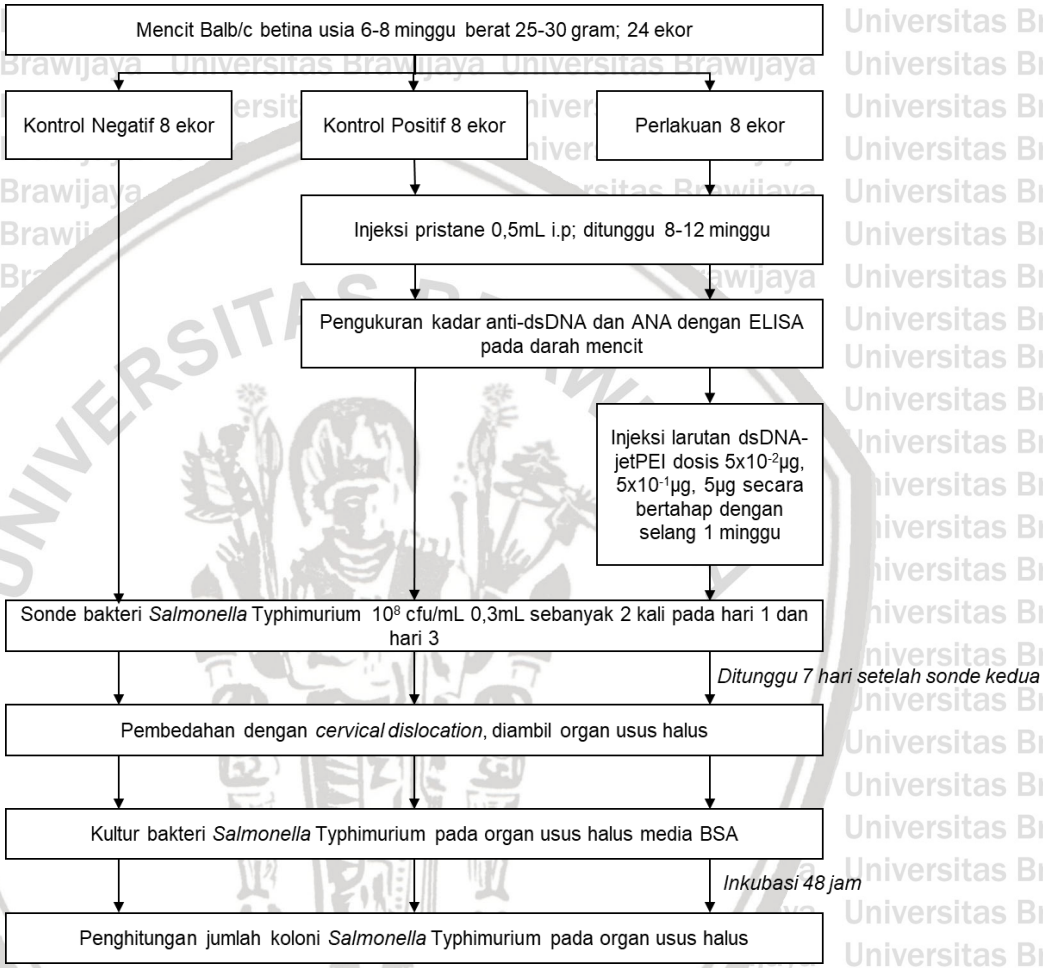
4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental*) laboratorik dengan menggunakan desain *post test only controlled group design*. Penelitian ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan mencit balb/C sebagai subjek penelitian yang sebelumnya diinjeksikan *pristane* untuk induksi LES dan kemudian diinjeksikan *self-antigen* dsDNA dalam dosis tertentu secara berurutan dan bertahap.

Pengelompokan dan perlakuan hewan coba dilakukan secara acak dengan metode *simple random sampling* dan pembagian kelompok didasarkan atas pembagian pemberian pristane dan *self-antigen* dsDNA. Berikut ini merupakan pembagian kelompok perlakuan:

A. Kelompok 1: kelompok kontrol negatif (mencit yang tanpa injeksi pristane, dsDNA, dan disonde *Salmonella* Typhimurium).
B. Kelompok 2: Kelompok kontrol positif (mencit yang diinjeksi pristane, tanpa injeksi dsDNA, dan disonde *Salmonella* Typhimurium).

C. Kelompok 3: mencit yang diinjeksi pristane dan dsDNA konsentrasi ($5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, dan 5µg) secara berurutan dan disonde *Salmonella* Typhimurium



Gambar 4.1 Bagan Tahapan Eksperimen Penelitian.

Pada penelitian ini, mencit Balb/c betina usia 6-8 minggu dibagi ke dalam tiga kelompok yakni kelompok kontrol negative, kontrol positif, dan perlakuan masing-masing sebanyak 8 ekor. Kelompok kontrol positif dan perlakuan kemudian diinjeksi pristane 0,5mL secara intraperitoneal. Delapan hingga 12 minggu setelah injeksi, kelompok perlakuan diinjeksikan dsDNA sebanyak 3 kali dengan dosis bertahap $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg, tiap kali injeksi berselang satu minggu. Ketiga kelompok kemudian disonde bakteri *Salmonella* Typhimurium 10^8

cfu/mL 0,3mL sebanyak 2 kali pada hari pertama dan hari ketiga dan ditunggu hingga 7 hari setelah sonde kedua. Kemudian mencit dikorbankan dengan metode *cervical dislocation* dan organ usus halus mencit diambil untuk dicek koloni *Salmonella* Typhimurium yang terbentuk dari kultur organ usus halus tersebut pada medium *bismuth sulphite agar* (BSA).

4.2 Populasi dan Sampel

Populasi penelitian adalah mencit strain Balb/c. Sampel penelitan ini adalah mencit strain Balb/c model lupus akibat induksi pristane. Mencit dibuat model lupus dengan injeksi pristane, diinjeksikan *self antigen dsDNA* dengan dosis tertentu secara bertahap, kemudian disonde dengan bakteri *Salmonella* Typhimurium lalu dibedah pada akhir perlakuan untuk dinilai ketahanan terhadap infeksi melalui jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus. Penelitian akan dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Berikut ini merupakan kriteria inklusi mencit subjek penelitian ini :

1. Mencit strain Balb/C betina
2. Mencit berwarna bulu putih, sehat, dan tingkah laku normal yang ditunjukkan dengan pergerakan aktif dalam kandang, perilaku membersihkan diri, makan, minum, dan berinteraksi dengan mencit lainnya (Burkholder, *et al*, 2012).
3. Umur 6-8 minggu
4. Berat badan rata-rata 25-30 gram
5. Mencit yang diinjeksi pristane menunjukkan tanda klinis dan imunologis LES.

Berikut ini adalah kriteria eksklusi subjek penelitian

1. Mencit yang selama penelitian tidak mau makan
2. Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung
3. Mencit yang diinjeksi pristane tidak menunjukkan tanda klinis dan imunologis LES.

Jumlah sampel mencit yang digunakan dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus Federer sebagai berikut :

n (p – 1) ≥ 15; n : jumlah ulangan p : jumlah perlakuan

Penelitian ini terdapat tiga perlakuan sebagaimana yang telah disebutkan sebelumnya. Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

n (3– 1) ≥ 15; n ≥ 7.5 dibulatkan menjadi 8 ekor

Untuk tiga perlakuan, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak 8 ekor untuk tiap perlakuan sehingga sampel mencit total yang diperlukan dalam penelitian ini adalah minimal 24 ekor mencit Balb/C betina.

4.3 Variabel Penelitian

4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian *self antigen* dsDNA dengan dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara intraperitoneal bertahap kepada mencit Balb/c model Lupus.

4.3.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah jumlah koloni bakteri *Salmonella* Typhimurium pada usus halus pada media kultur.

4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi, Laboratorium Sentral Biomedik, dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Penelitian dilaksanakan pada bulan Januari—Oktober 2018.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat dan Bahan Pemeliharaan Mencit

Alat: Kandang mencit, botol air minum mencit. Bahan: Pakan mencit, air PDAM, sekam, *handscoen*

4.5.2 Injeksi Pristane

Alat: Spuit 3cc. Bahan: Pristane, handscoen

4.5.3 Alat dan Bahan Isolasi dsDNA

Alat: Pipet, sentrifus, kit Invitrogen, vortex, water bath, nanodrop. Bahan: vacutainer EDTA, falcon, proteinase K, RNAse A, genomic lysis/binding buffer, alcohol absolut, spin column, Eppendorf

4.5.4 Alat dan Bahan Preparasi dan Injeksi dsDNA

Alat: Laminar Air Flow, pipet, vortex. Bahan: glukosa 5%, reagen invivo-jetPEI, larutan dsDNA, spuit 1cc

4.5.5 Alat dan Bahan Sonde Salmonella Typhimurium

Alat: tabung reaksi. Bahan: Bakteri Salmonella Typhimurium konsentrasi 108 cfu/mL, PBS, spuit 1cc

4.5.6 Alat dan Bahan Pengukuran Kolonisasi Bakteri

Alat: cawan petri, inkubator 370C, timbangan, mortar. Bahan: Bismuth Sulfite Agar, APW, organ usus halus

4.6 Definisi Operasional

- Hewan coba model Lupus adalah mencit *strain* Balb/C betina, yang telah menunjukkan tanda lupus karena induksi *pristane* meliputi tanda klinis dan tanda imunologis yaitu adanya antibodi anti-dsDNA.
- Pristane (tetramethylpentadecane) merupakan alkana isoprenoid yang digunakan untuk menginduksi lupus pada mencit (Reeves, *et al*, 2009). Pristane (Sigma Aldrich) didapatkan dari CV Gamma Scientific Biolab Malang.
- Antibodi anti-dsDNA merupakan antibodi yang bersifat spesifik terhadap *double-stranded* DNA yang merupakan antigen *nuclear* spesifik. Antibodi ini telah dibuktikan dapat menimbulkan reaksi patogenik yang mengarah ke LES (Kavanaugh, *et al. 2*000).
- *Self-antigen dsDNA* merupakan antigen yang digunakan dengan metode *escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy*. Dosis yang efektif dan aman digunakan dalam terapi desensitisasi ini adalah 5 hingga 20µg zat allergen utama menurut WHO (Bousquet, *et al*. 1998). Konsentrasi dsDNA yang diinjeksikan, $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, dan 5µg, diadaptasi berdasarkan konsentrasi *Myelin Basic Protein* yang digunakan pada penelitian Burton et al pada tahun 2014 yaitu $8x10^{-2}$µg, $8x10^{-1}$µg, dan 8µg (Burton, *et al*, 2014). Eskalasi dosis menggunakan konsep logaritmik (US Food and Drug Administration, 2013) dengan dosis kedua dan ketiga adalah hasil perkalian dengan faktor 10 dari dosis sebelumnya.
- *Salmonella* Typhimurium adalah bakteri yang sering menginfeksi pasien LES (Winarsih, *et al,* 2019). Pada penelitian ini, Salmonella

Typhimurium yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi FKUB disonde kedalam hewan coba secara oral dengan dosis 10^8 cfu/ml (Kim *et al,* 2014). Selanjutnya akan dilakukan pencatatan kolonisasi bakteri pada organ usus halus pada minggu kedua untuk menilai kerentanan tubuh terhadap infeksi setelah dilakukan escalating dose self-antigen dsDNA immunotherapy dengan menggunakan teknik kultur.

- *Colony Forming Unit* (CFU) adalah satuan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada media agar dengan asumsi bahwa setiap koloni yang terbentuk terpisah satu sama lain dan berasal dari satu sel bakteri. Hasil hitung koloni kemudian dapat dikalikan dengan faktor dilusi sehingga didapatkan jumlah bakteri yang tumbuh pada media agar tersebut dalam satuan cfu/mL (Goldman dan Green, 2015)

4.7 Prosedur Penelitian

4.7.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit strain Balb/C yang dipilih berdasarkan kriteria inklusi dan eksklusi. Mencit Balb/C diperoleh dari UIN Malang karena telah memiliki sertifikasi mengenai keaslian strain. Mencit Balb/C dipilih karena penelitian terdahulu yang menunjukkan bahwa mencit Balb/C dapat memberikan gambaran imunologis seperti yang terjadi pada manusia (Rottman dan Willis, 2010). Mencit diberikan makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang. Penelitian ini dilakukan setelah mendapat persetujuan etik dari komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.7.2 Injeksi Pristane

Pristane diinjeksikan ke dalam mencit kelompok kontrol positif dan perlakuan dengan volume 0,5mL. Injeksi pristane diharapkan memunculkan reaksi autoimunitas terhadap dsDNA (Reeves *et al*, 2009).

4.7.3 Isolasi dsDNA

ds-DNA diisolasi dari serum darah mencit yang sehat menggunakan kit Invitrogen. Darah yang diambil dimasukkan ke dalam falcon 15cc. masing-masing falcon ditambahkan proteinase K sebanyak 20µL dan 20µL RNAse A. Falcon kemudian divortex lalu inkubasi dalam suhu ruang selama 2 menit. Genomic lysis/binding buffer dimasukkan ke tiap falcon dan divortex hingga homogen. Lakukan inkubasi selama 5 menit dalam water bath 550C, vortex, dan lanjutkan inkubasi kembali selama 5 menit. Tambahkan alkohol absolut 200µL dalam falcon kemudian vortex 5 detik.

Sebanyak 640µL lysate dari masing-masing falcon dimasukkan ke dalam spin column untuk kemudian mendapatkan DNA setelah proses binding dan washing tiap-tiap spin column. Spin column yang telah melalui proses binding dan washing ditambahkan elution buffer kemudian diinkubasi suhu ruang selama 1 menit dan sentrifus kecepatan maksimal selama 3 menit. Lakukan proses nanodrop setelah DNA yang didapat dicampurkan pada Eppendorf.

4.7.4 Preparasi dan injeksi dsDNA

Reagen *invivo-jetPEI* dilarutkan dalam setengah volume injeksi pada glukosa 5% dengan pelarut *sterile water* kemudian divortex cepat. Diambahkan larutan tersebut seluruhnya ke dalam larutan dsDNA (setengah volume injeksi) dan divortex kembali. Dilakukan inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang hingga larutan menjadi stabil. Larutan dsDNA diinjeksikan secara intraperitoneal

sebanyak 3 kali dengan selang waktu satu minggu sesuai dosis masing–masing tahapan injeksi. Perbandingan campuran yang digunakan adalah 100 µg dsDNA : 16 µl reagen *invivo-jetPEI* : 1 mL glukosa 5% sesuai dengan protokol *Nucleic Acid Delivery Protocol* dari produsen reagen *invivo-jetPEI* (Polyplus-transfection Inc.).

Tabel 4.1 Penghitungan Dosis Injeksi dsDNA

Larutan A

Dosis dsDNA (µg)	Glukosa (µl)	dsDNA (µl)	H20 (µl)	Volume Akhir A (µl)
0.05	2750	11	2739	5500
0.5	2750	110	2640	5500
5	2750	462	2288	5500

Larutan B

Dosis dsDNA (µg)	Glukosa (µl)	dsDNA (µl)	PEI (µl)	Volume Akhir A (µl)
0.05	2618	132	2750	5500
0.5	1430	1320	2750	5500
5	2736.8	13.2	2750	5500

4.7.5 Pengukuran Kolonisasi Pada Organ Usus Halus

Salmonella Typhimurium disonde kedalam hewan coba dengan dosis 10^8 cfu/mL pada hari ke-1 dan 3 kemudian diinkubasi hingga minggu kedua.

Selanjutnya dilakukan pembedahan terhadap organ. Organ usus halus diambil dari mencit lalu disimpan pada wadah yang telah disediakan. Organ yang telah diambil digerus dengan mortir, lalu ditimbang sama rata sebanyak 1 gram. Organ hasil gerusan yang telah ditimbang dibuat seri pengenceran dengan *Alkaline Peptone Water* (Sampel organ dicampur dengan 9 mL APW kemudian dihomogenkan, dilakukan hingga 4 kali pengulangan). Setelah itu dibiakkan pada medium *bismuth sulfite agar*. Pembiakkan dibiarkan di inkubasi selama 48 jam dan dilakukan pengamatan serta penghitungan bakteri dengan *colony counter*.

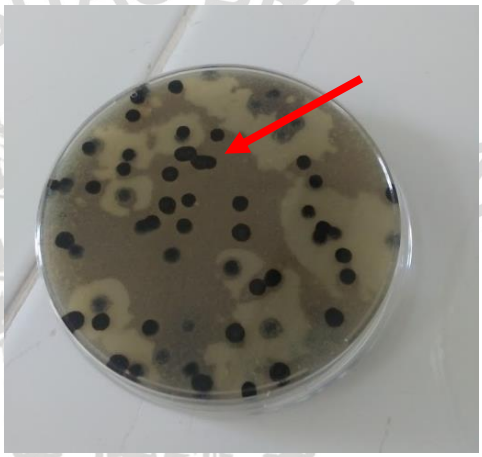
4.7.6 Prosedur Analisis Data

Hasil pengukuran variabel dari mencit kontrol dan perlakuan dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *IBM SPSS Statistics 24* dengan tingkat signifikansi 0,05 (p = 0,05) dan taraf kepercayaan 95% (α = 0,05). Langkah-langkah uji hipotesis untuk penelitian ini pertama-tama adalah uji normalitas data *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varian *Levene*. Apabila didapatkan distribusi data normal dan variasi data homogen maka dilakukan uji parametrik *One-way ANOVA* dan *Tukey Post hoc test.* Apabila didapatkan distribusi data tidak normal dan/atau variasi data tidak homogen maka dilakukan uji nonparametrik *Kruskal-Wallis One Way ANOVA* dan uji *Mann-Whitney*.

BAB V
HASIL PENELITIAN

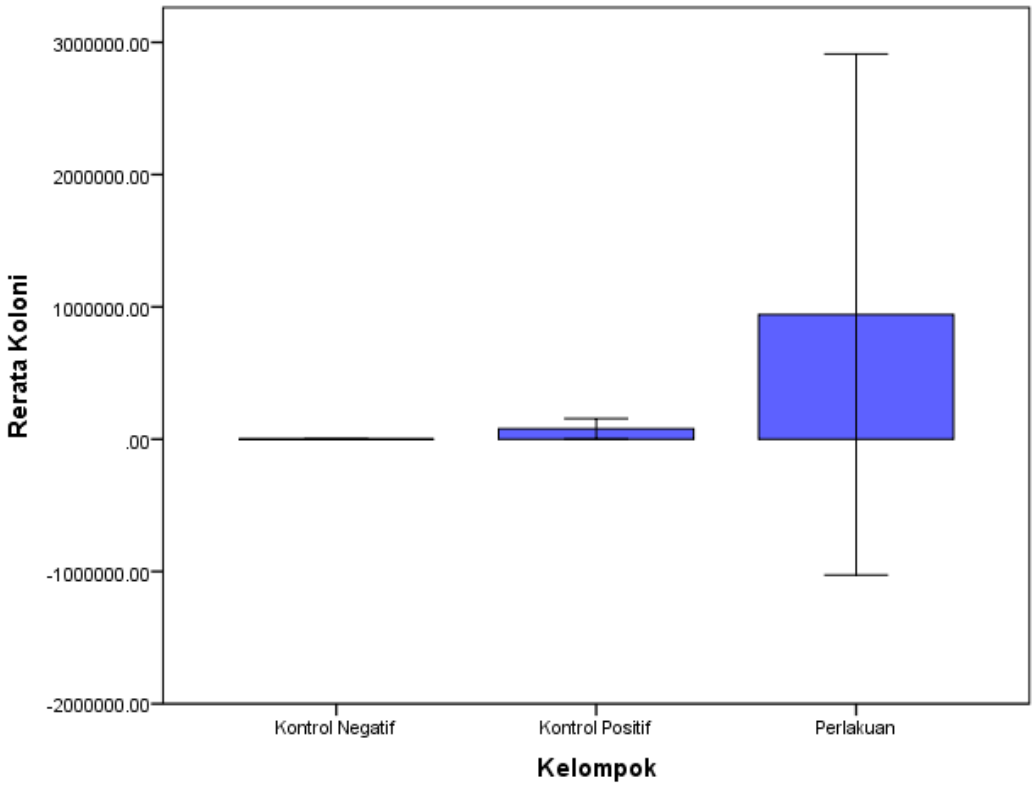
5.1 Hasil Pengukuran Kolonisasi Bakteri *Salmonella* Typhimurium

Organ usus halus dari mencit diambil kemudian digerus dan dibuat seri pengenceran yang diaplikasikan ke dalam *Bismuth Sulfite Agar* yang selektif terhadap bakteri genus *Salmonella* dengan metode *pour plate.* Setelah diinkubasi selama 48 jam, terbentuk koloni bakteri *Salmonella* Typhimurium dengan karakteristik *black jet colony* (Sastry dan Bhat, 2018).



Gambar 5.1 Koloni *Salmonella* Typhimurium pada Media BSA. Panah merah menunjukkan *black jet colony* yang khas ditemukan pada pertumbuhan bakteri *Salmonella*.

Jumlah koloni yang terbentuk diukur menggunakan *colony counter* dan didapatkan hasil sebagai berikut:



Gambar 5.2 Hasil Pengukuran Koloni Bakteri. Menunjukkan grafik rerata jumlah koloni tiap kelompok

5.2 Analisis Data

5.2.1 Uji Normalitas

Dilakukan uji normalitas untuk mengetahui kenormalan distribusi data dalam tiap kelompok. Sampel yang tersedia untuk dianalisis berjumlah 4 (<50) sehingga uji yang digunakan adalah uji Shapiro-Wilk. Setelah melalui uji normalitas, didapatkan distribusi data pada kelompok kontrol positif tidak normal (p=0,004), namun distribusi data kelompok perlakuan normal (p=0,092). Data dari kelompok kontrol negatif bernilai konstan (0) sehingga tidak diukur distribusi datanya.

5.2.2 Uji Homogenitas

Dilakukan uji homogenitas untuk melihat homogenitas variasi populasi menggunakan *Levene's test.* Didapatkan hasil uji homogenitas tidak

signifikan (p=0,000).

5.2.3 Uji Nonparametrik

Karena uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil tidak signifikan, maka uji antar kelompok yang digunakan adalah uji nonparametrik.

5.2.3.1 Uji Kruskal-Wallis

Uji *Kruskal-Wallis* digunakan untuk menguji perbedaan distribusi nilai variabel antar kelompok. Setelah diuji, didapatkan nilai signifikansi 0,01 (<0,05) sehingga disimpulkan bahwa distribusi nilai variabel antar kelompok tidak sama.

5.2.3.2 Uji Mann-Whitney

Uji *Mann-Whitney* digunakan untuk menguji signifikansi perbedaan rerata antara satu kelompok data dengan kelompok lainnya. Pada uji *Mann-Whitney* didapatkan:

Tabel 5.1 Hasil Uji *Mann-Whitney*

Kelompok	Rerata Koloni ± SD	Normalitas	Homogenitas
K(-)	0,00±0,00[(a)]	-	0,000
K(+)	78.250,00±38.525,96[(b)]	0,004	
Perlakuan	942.500,00±984.375,77[(c)]	0,092	

- Kontrol negatif dibandingkan dengan kontrol positif didapatkan nilai signifikansi 0,013 (<0,05) dan dibandingkan dengan kelompok perlakuan didapatkan nilai signifikansi 0,014 (<0,05) sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara rerata nilai kontrol negatif dengan kontrol positif

dan kelompok perlakuan (notasi a).

- Kontrol positif dibandingkan dengan kontrol negatif didapatkan nilai signifikansi 0,013 (<0,05) sementara kontrol positif dibandingkan dengan kelompok perlakuan didapatkan nilai signifikansi 0,081 (>0,05). Hal ini menunjukkan adanya perbedaan signifikan antara rerata nilai kontrol positif dan kontrol negatif tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan antara rerata nilai kontrol positif dan kelompok perlakuan (notasi b).
- Kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol negatif didapatkan nilai signifikansi 0,014 (<0,05) sementara jika dibandingkan dengan kontrol positif didapatkan nilai signifikansi 0,081 (<0,05). Hal ini menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan dengan kontrol negatif tetapi tidak terdapat perbedaan signifikan antara kelompok perlakuan dengan kontrol positif (notasi c).

BAB VI
PEMBAHASAN

6.1 Perbedaan Jumlah Koloni Antar Kelompok

Studi ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian terapi *escalating dose self-antigen dsDNA* terhadap kerentanan infeksi hewan coba yang diukur dengan variabel jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus. Metode yang digunakan adalah mengukur kolonisasi bakteri *Salmonella* Typhimurium pada media BSA *pour plate* menggunakan *colony counter*. Metode *pour plate* digunakan untuk mendapatkan gambaran representatif dari kolonisasi bakteri *Salmonella* yang bersifat anaerobik fakultatif (Tortora, *et al*, 2004).

Dari hasil kultur, didapatkan perbedaan jumlah koloni antar kelompok sampel. Pada usus halus mencit kontrol negatif, tidak didapatkan pertumbuhan koloni bakteri. Hal ini dapat terjadi karena adanya perbedaan *clearance* bakteri dari organ usus halus mencit tiap kelompok sampel. *Clearance* bakteri diperantarai antara lain oleh kerja dari sel dendritik, makrofag, neutrofil, immunoglobulin IgA, dan peptide antimikroba pada fase awal (Santaolalla, R. dan Abreu, 2012; Wick, M.J., 2011) dan sel T $CD4^+$ pada fase akhir dari infeksi, dengan kapasitas *clearance* bakteri dari tiap jenis mencit berbeda-beda (Pie, *et al*, 1997). Studi oleh Pie et al menggunakan mencit *strain* CBA dan C57BL/6 yang diinfeksi dengan bakteri *Salmonella* Typhimurium menunjukkan *clearance* bakteri pada organ limpa mencit meskipun durasi inkubasi pada kedua *strain* mencit dalam studi tersebut lebih lama dibandingkan dengan studi ini (Pie, *et al*, 1997).

Studi lainnya yang dilakukan oleh Bao *et al* tidak mendapati pertumbuhan bakteri *Salmonella* Typhimurium pada mencit *strain* c57bl/6j *wild type* normal dibandingkan dengan mencit IFN-γ-*knockout* baik itu pada dosis tinggi ($5x10^8$)

maupun dosis rendah (2,5x10^7) (Bao, *et al*, 2000). Selain itu, pengaruh *stress* atau kondisi dari lingkungan dapat menyebabkan bakteri memasuki bentuk viable namun tidak dapat dikultur (*Viable But Non Culturable*) (Smith, *et al*, 2002). Ketiga hasil studi diatas dapat menjelaskan tidak adanya pertumbuhan koloni pada sampel kontrol negatif mencit penelitian ini.

6.2 Perbedaan Jumlah Koloni Mencit Sehat dan Mencit Terinduksi LES

Perbedaan signifikan jumlah koloni bakteri *Salmonella* Typhimurium pada mencit kontrol positif maupun kelompok perlakuan dibandingkan kontrol negatif dapat dijelaskan melalui patofisiologi dari penyakit LES yaitu abnormalitas regulasi sistem imun dan bertambahnya kerentanan individu terhadap infeksi akibat efek samping terapi dengan steroid. Abnormalitas regulasi sistem imun menyebabkan pasien LES rentan terkena infeksi (Bourn, *et al,* 2016). Pada pasien LES, terjadi gangguan kemotaksis, pengenalan bakteri, fagositosis, dan neutropenia. Terdapat pula perubahan jumlah limfosit T dan penurunan aktivitas sel T helper melawan antigen virus, toxoid, dan alloantigen sehingga terjadi peningkatan kerentanan terhadap infeksi (Danza, A. dan Ruiz-Irastorza, G., 2013). Selain itu, terdapat bukti adanya pengaruh mikrobiota usus terhadap *clearance* dari bakteri. Adanya mikrobiota usus yang baik menyebabkan hanya <10% mencit *normal* yang diberi inokulasi *Salmonella* Typhimurium yang menunjukkan pertumbuhan koloni dan inflamasi pada organ usus (Endt, *et al,* 2010). Apabila terjadi perbedaan dari mikrobiota yang ada pada usus halus mencit kontrol negatif dengan kontrol positif dan kelompok perlakuan, hal ini memungkinkan menjadi penyebab perbedaan jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium.

Terapi menggunakan steroid memiliki efek samping infeksi sekunder yang merupakan penyebab tersering kematian pada pasien LES. Studi *case control*

yang dilakukan oleh Lupus-Cruces Cohort menemukan bahwa penggunaan kortikosteroid pada pasien SLE adalah salah satu faktor risiko utama terjadinya infeksi serius. Studi regresi yang dilakukan pada penelitian tersebut juga menunjukkan bahwa risiko infeksi mayor meningkat 12% setiap 1mg prednisone yang digunakan pasien SLE per harinya (Kasturi, S dan L.R. Samaritano, 2016).

6.3 Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri Setelah Terapi

Setelah pemberian *escalating dose self-antigen dsDNA*, diharapkan adanya penurunan respon imunologis maupun klinis dari LES namun tidak menimbulkan kerentanan infeksi seperti pada penggunaan obat steroid. Terapi ini diharapkan dapat meningkatkan jumlah dan aktivitas sel Treg secara spesifik terhadap *self-antigen* sehingga efek kerentanan sistem imun terhadap infeksi dan malignansi dapat dihindari. Hal ini telah dibuktikan dalam studi-studi pada hewan coba dengan penyakit autoimun organ, penolakan transplantasi, *multiple sclerosis,* dan diabetes mellitus tipe I (Spence *et al,* 2015).

Pada penelitian ini, jumlah koloni bakteri pada organ usus halus mencit kelompok perlakuan cenderung lebih tinggi dibandingkan kontrol positif maupun negatif, walaupun perbedaan tersebut tidak signifikan. Hal ini dapat disebabkan adanya faktor lain yang menyebabkan kerentanan infeksi pada mencit yang diberi *escalating dose self-antigen dsDNA.* Terdapat banyak komponen yang mempengaruhi sistem imun, salah satunya adalah interferon tipe I. Interferon (IFN) tipe I merupakan sitokin yang berperan aktif dalam pathogenesis LES. Paparan persisten *antigen presenting cells* (APC) oleh kompleks imun menyebabkan peningkatan produksi IFN tipe I dan fungsi efektor sel T dan B, meningkatkan produksi autoantibodi, dan akhirnya bermanifestasi pada munculnya penyakit autoimun. Sementara itu, studi menunjukkan bahwa IFN tipe I dapat meningkatkan

produksi sitokin antiinflamasi, salah satunya IL-10, oleh sel imun *innate* sehingga terjadi kerentanan terhadap infeksi (Ivashkiv dan Donlin, 2014). Apabila terapi *escalating dose self-antigen dsDNA* dapat meningkatkan kadar IFN tipe I, maka kerentanan terhadap infeksi dapat meningkat akibat terapi ini. Dapat disimpulkan bahwa penggunaan metode terapi *escalating dose self-antigen dsDNA* tidak menambah kerentanan infeksi secara signifikan pada usus halus mencit model LES akibat induksi pristane, walaupun cenderung meningkat setelah terapi.

Keterbatasan penelitian ini adalah kurangnya durasi penelitian untuk memunculkan respon imun adaptif terhadap infeksi bakteri. Selain itu, kurangnya jumlah sampel membuat penelitian ini bersifat kurang representatif terhadap populasi.

BAB VII
PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa pemberian s*elf-antigen* dsDNA dosis $5x10^{-2}$µg, $5x10^{-1}$µg, 5µg secara bertahap tidak berpengaruh terhadap jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada organ usus halus mencit Balb/c model lupus.

7.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang didapat, terdapat saran-saran yang dapat diberikan guna menyempurnakan penelitian yang telah dilakukan:

7.2.1 Diperlukan studi yang membandingkan terapi konvensional dengan terapi metode *escalating dose self-antigen dsDNA.*

7.2.2 Diperlukan studi lebih lanjut mengenai pengaruh terapi metode ini terhadap regulasi sistem imun dalam lingkup infeksi.

7.2.3 Diperlukan studi lebih lanjut mengenai mekanisme-mekanisme sistem imun dalam mengatasi infeksi

DAFTAR RUJUKAN

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. and Pillai, S., 2014. Basic immunology: functions and disorders of the immune system. *Elsevier Health Sciences*.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P., 2002. The structure and function of DNA.

Bao, S., Beagley, K.W., France, M.P., Shen, J. and Husband, A.J., 2000. Interferon-γ plays a critical role in intestinal immunity against Salmonella typhimurium infection. *Immunology*, *99*(3), pp.464-472.

Belladonna, M.L., Orabona, C., Grohmann, U. and Puccetti, P., 2009. TGF-β and kynurenines as the key to infectious tolerance. *Trends in molecular medicine*, 15(2), pp.41-49.

Bourn, R., Slight-Webb, S. and James, J., 2016. Infections in Early Systemic Lupus Erythematosus Pathogenesis. In *Systemic Lupus Erythematosus* (pp. 191-197). Academic Press.

Bousquet, J., Lockey, R. and Malling, H.J., 1998. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *102*(4), pp.558-562.

Bouts, Y.M., Wolthuis, D.F., Dirkx, M.F., Pieterse, E., Simons, E.M., Van Boekel, A.M., Dieker, J.W. and Van Der Vlag, J., 2012. Apoptosis and NET formation in the pathogenesis of SLE. *Autoimmunity*, *45*(8), pp.597-601.

Burkholder, T., Foltz, C., Karlsson, E., Linton, C. G., and Smith, J. M. (2012). Health Evaluation of Experimental Laboratory Mice. *Current protocols in mouse biology*, *2*, pp.145–165.

Burton, B.R., Britton, G.J., Fang, H., Verhagen, J., Smithers, B., Sabatos-Peyton, C.A., Carney, L.J., Gough, J., Strobel, S. and Wraith, D.C., 2014. Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy. *Nature communications*, 5, p.4741.

Caza, T., Oaks, Z., and Perl, A., 2014. Interplay of infections, autoimmunity, and immunosuppression in systemic lupus erythematosus. *International reviews of immunology*, *33*(4), 330.

Danza, A. and Ruiz-Irastorza, G., 2013. Infection risk in systemic lupus erythematosus patients: susceptibility factors and preventive strategies. *Lupus*, *22*(12), pp.1286-1294.

Deriu, E., Liu, J.Z., Pezeshki, M., Edwards, R.A., Ochoa, R.J., Contreras, H., Libby, S.J., Fang, F.C. and Raffatellu, M., 2013. Probiotic bacteria reduce salmonella typhimurium intestinal colonization by competing for iron. *Cell host & microbe*, *14*(1), pp.26-37.

Endt, K., Stecher, B., Chaffron, S., Slack, E., Tchitchek, N., Benecke, A., Van

Maele, L., Sirard, J.C., Mueller, A.J., Heikenwalder, M. and Macpherson, A.J., 2010. The microbiota mediates pathogen clearance from the gut lumen after non-typhoidal Salmonella diarrhea. *PLoS pathogens*, *6*(9), p.e1001097.

Fernando, M.M.A. and Isenberg, D.A., 2005. How to monitor SLE in routine clinical practice. *Annals of the rheumatic diseases*, 64(4), pp.524-527.

Giang, S. and La Cava, A., 2016. Regulatory T cells in SLE: biology and use in treatment. *Current rheumatology reports*, 18(11), p.67.

Gladman, D., 2017. Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults. *UpToDate*. Diakses dari: http://www. uptodate. com/contents/overview-of-the-clinical-manifestations-of-systemic-lupus-erythematosus-in-adults.

Goldman, E., and Green, L. H. 2015. *Practical handbook of microbiology*. CRC press.

Isenberg, D.A., Manson, J.J., Ehrenstein, M.R. and Rahman, A., 2007. Fifty years of anti-ds DNA antibodies: are we approaching journey's end?.

Ivashkiv, L.B. and Donlin, L.T., 2014. Regulation of type I interferon responses. Nature reviews Immunology, 14(1), p.36.

Jarukitsopa, S., Hoganson, D.D., Crowson, C.S., Sokumbi, O., Davis, M.D., Michet, C.J., Matteson, E.L., Maradit Kremers, H. and Chowdhary, V.R., 2015. Epidemiology of systemic lupus erythematosus and cutaneous lupus erythematosus in a predominantly white population in the United States. *Arthritis care & research*, 67(6), pp.817-828.

Kalim, H. 1996. Gambaran klinik and harapan hidup penderita lupus eritematosus sistemik (LES). *Majalah Kedokteran Indonesia*, 46: 383-384

Kalim, H. 2000. HLA Klas II And Kerentanan Genetik Terhadap Lupus Eritematosus Sistemik Di Indonesia. *Acta Med Ind XXXII*, 11-15

Kalim, H., Handono, K. and Hasanah, D., 2015. Hubungan Kadar Vitamin D Dengan Jumlah Set T Regulator pada Pasien Lupus Eritematosus Sistemik. *Research Journal of Life Science*, 2(1), pp.34-39.

Kang, I. and Park, S.H., 2003. Infectious complications in SLE after immunosuppressive therapies. *Current opinion in rheumatology*, 15(5), pp.528-534.

Kasturi, S. and Sammaritano, L.R., 2016. Corticosteroids in lupus. *Rheum Dis Clin North Am*, *42*(1), pp.47-62.

Kavanaugh, A., Tomar, R., Reveille, J., Solomon, D.H. and Homburger, H.A., 2000. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Archives of pathology &*

laboratory medicine, 124(1), pp.71-81.

Kim, D.K., Jeong, J.H., Lee, J.M., Kim, K.S., Park, S.H., Kim, Y.D., Koh, M., Shin, M., Jung, Y.S., Kim, H.S. and Lee, T.H., 2014. Inverse agonist of estrogen-related receptor γ controls Salmonella typhimurium infection by modulating host iron homeostasis. *Nature medicine*, *20*(4), p.419.

Kuhn, A., Bonsmann, G., Anders, H.J., Herzer, P., Tenbrock, K. and Schneider, M., 2015. The diagnosis and treatment of systemic lupus erythematosus. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112(25), p.423.

Li, M.O., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A., 2007. T cell-produced transforming growth factor-β1 controls T cell tolerance and regulates Th1-and Th17-cell differentiation. *Immunity*, 26(5), pp.579-591.

Minhas, U., Das, P. and Bhatnagar, A., 2011. Role of reactive intermediates in the immunopathogenesis of the pristane-induced Balb/c model of lupus. *Lupus*, *20*(13), pp.1421-1425.

Mittrücker, H.W. and Kaufmann, S.H., 2000. Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *Journal of leukocyte biology*, 67(4), pp.457-463.

Monrad, Sheeta, and Killen Paul. 2008. The role of aldosterone blockade in murine lupus nephritis. *Arthritis Research & Therapy*, vol 10:R5, page1186

Naureckas, E.T., Solway, J., Kasper, D., Fauci, A., Hauser, S., Longo, D., Jameson, J.L. and Loscalzo, J., 2015. Harrison's Principles of Internal Medicine.

Navarra, S.V. and Leynes, M.S.N., 2010. Infections in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, *19*(12), pp.1419-1424.

Ngo, S.T., Steyn, F.J. and McCombe, P.A., 2014. Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), pp.347-369.

Perhimpunan Reumatologi Indonesia. 2013. Rekomendasi Perhimpunan Reumatologi Indonesia Untuk Diagnosis and Pengelolaan Lupus Eritematosus Sistemik, pp. 12-15.

Perry, D., Sang, A., Yin, Y., Zheng, Y.Y. and Morel, L., 2011. Murine models of systemic lupus erythematosus. *BioMed Research International*, *2011*.

Petri, M., Orbai, A.M., Alarcón, G.S., Gordon, C., Merrill, J.T., Fortin, P.R., Bruce, I.N., Isenberg, D., Wallace, D.J., Nived, O. and Sturfelt, G., 2012. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 64(8), pp.2677-2686.

Pie, S., Truffa-Bachi, P., Pla, M. and Nauciel, C., 1997. Th1 response in Salmonella typhimurium-infected mice with a high or low rate of bacterial

clearance. *Infection and immunity*, *65*(11), pp.4509-4514.

Pusat Data and Informasi Kemenkes RI. 2017. Infodatin Situasi Lupus di Indonesia. Jakarta: Pusdatin.

Reeves, W.H., Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Satoh, M. and Lu, L., 2009. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in immunology*, *30*(9), pp.455-464.

Rottman, J.B. and Willis, C.R. 2010. Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Veterinary Pathology*, 47(4): 4664-4676.

Santaolalla, R. and Abreu, M.T., 2012. Innate immunity in the small intestine. *Current opinion in gastroenterology*, *28*(2), p.124

Sastry, A.S. and Bhat, S., 2018. *Essentials of medical microbiology*. Jaypee Brothers, Medical Publishers Pvt. Limited.

Smith, R.J., Newton, A.T., Harwood, C.R. and Barer, M.R., 2002. Active but nonculturable cells of Salmonella enterica serovar Typhimurium do not infect or colonize mice. *Microbiology*, *148*(9), pp.2717-2726.

Spence, A., Klementowicz, J.E., Bluestone, J.A. and Tang, Q., 2015. Targeting Treg signaling for the treatment of autoimmune diseases. Current opinion in immunology, 37, pp.11-20.

Strickland, F.M., Hewagama, A., Lu, Q., Wu, A., Hinderer, R., Webb, R., Johnson, K., Sawalha, A.H., Delaney, C., Yung, R. and Richardson, B.C., 2012. Environmental exposure, estrogen and two X chromosomes are required for disease development in an epigenetic model of lupus. *Journal of autoimmunity*, *38*(2-3), pp.J135-J143.

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. and Johnson, T.R., 2004. *Microbiology: an introduction* (Vol. 9). San Francisco, CA: Benjamin Cummings.

US Food and Drug Administration, 2013. Good review practice: clinical review of investigational new drug applications.

Wick, M.J., 2011. Innate immune control of Salmonella enterica serovar Typhimurium: mechanisms contributing to combating systemic Salmonella infection. *Journal of innate immunity*, *3*(6), pp.543-549

Winarsih, S., Kosasih, T., Putera, M.A., Rahmadhiani, N., Poernomo, E.L., Runtuk, K.S. and Oswari, M.V., 2019. β-Glucan of Candida albicans Cell Wall Extract Inhibits Salmonella Typhimurium Colonization by Potentiating Cellular Immunity (CD8+ and CD4+ T Cells). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *52*.

Zandman-Goddard, G. and Shoenfeld, Y., 2003. SLE and infections. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 25(1), pp.29-39.