



Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya
Universitas Brawijaya

PENGARUH ESCALATING DOSE IMMUNOTHERAPY (EDI) DENGAN

SELF ANTIGEN dsDNA TERHADAP JUMLAH KOLONI *Salmonella*

Typhimurium PADA HATI MENCIT BALB/C MODEL LUPUS

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Umum



Oleh:
Ade Siska
NIM 165070100111068

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

TUGAS AKHIR

**PENGARUH ESCALATING DOSE IMMUNOTHERAPY (EDI) DENGAN
SELF ANTIGEN dsDNA TERHADAP JUMLAH KOLONI *Salmonella*
Typhimurium PADA HATI MENCIT BALB/C MODEL LUPUS**

Oleh :

Ade Siska

NIM 165070100111068

Telah diikutsertakan dalam

*Research Paper Competition International Scientific Competition of
Medical Fiesta 2018*

Malang, 26 Oktober 2018

Pembimbing I

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

Pembimbing II

Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes
NIP/NIK. 195909261984032003

Mengetahui,

Ketua Program Studi Kedokteran



dr. Triwahju Astuti, M.Kes, Sp.P(K)
NIP196310221966012001



KEPUTUSAN
DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
NOMOR 345 TAHUN 2019

TENTANG

PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI
PESERTA PIMNAS XXXII DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL
TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI SERTA KOMPETISI INTERNASIONAL TAHUN
AKADEMIK 2019/2020

DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA,

- Menimbang : a. bahwa untuk peningkatan atmosfer akademik di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya perlu di tingkatkan kegiatan-kegiatan kemahasiswaan yang bernuansa akademis;
b. bahwa dalam meningkatkan motivasi dan mendorong partisipasi para mahasiswa dalam kegiatan yang bernuansa tersebut perlu adanya penghargaan;
c. bahwa berdasarkan pertimbangan sebagaimana dimaksud dalam huruf a dan b, perlu diterbitkan Keputusan Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya tentang Pemberian Penghargaan Kepada Mahasiswa Berprestasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Peserta Pimnas XXXII dan atau Kompetisi Nasional Tingkat Kementerian/ DIKTI/ LIPI serta Kompetisi Internasional Tahun Akademik 2019/2020;
- Mengingat : 1. Undang-undang Nomor 20 Tahun 2003 Tentang Sistem Pendidikan Nasional Nasional (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2003 Nomor 78, Tambahan Lembar Negara Republik Indonesia Nomor 4301);
2. Undang-undang Nomor 12 Tahun 2012 tentang Pendidikan Tinggi (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2012 Nomor 158, Tambahan Lembar Negara Republik Indonesia Nomor 5336);
3. Peraturan Pemerintah Nomor 17 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2010 Nomor 23, Tambahan Lembar Negara Republik Indonesia Nomor 5105) sebagaimana telah diubah dengan Peraturan Pemerintah Nomor 66 Tahun 2010 tentang Pengelolaan dan Penyelenggaraan Pendidikan (Lembaran Negara Republik Indonesia Tahun 2010 Nomor 112, Tambahan Lembar Negara Republik Indonesia Nomor 5157);
4. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia Nomor 232/U/2000 tentang Pedoman Penyusunan Kurikulum Pendidikan Tinggi dan Penilaian Hasil Belajar Mahasiswa;
5. Keputusan Mendiknas Republik Indonesia Nomor 080/O/2002 tentang Statuta Universitas Brawijaya;





- MEMUTUSKAN
- Menetapkan : KEPUTUSAN DEKAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA TENTANG PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA PESERTA PIMNAS XXXII DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI SERTA KOMPETISI INTERNASIONAL TAHUN AKADEMIK 2019/2020.
- KESATU : Memberikan Penghargaan kepada Mahasiswa anggota Tim PIMNAS XXXII dan atau Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI serta Kompetisi Internasional Tahun Akademik 2019/2020 yang susunan anggotanya seperti tercantum dalam lampiran Surat Keputusan ini.
- KEDUA : Bentuk penghargaan berupa pembebasan para anggota Tim Mahasiswa dari kewajiban akademis pembuatan Karya Ilmiah Tugas Akhir regular, dengan tetap berkewajiban menyerahkan naskah karya ilmiah yang diikutinya oleh masing-masing mahasiswa.
- KETIGA : Memberikan nilai prestasi Akademis A pada Karya Ilmiah Tugas Akhir bagi setiap mahasiswa anggota TIM oleh karena capaian prestasi berskala nasional yang diperoleh pada PIMNAS XXXII dan atau Kompetisi-kompetisi Nasional Tingkat Kementerian / DIKTI / LIPI serta Kompetisi Internasional pada Tahun Akademik 2019/2020.
- KEEMPAT : Memberikan dana pembinaan kepada setiap kelompok dari Tim Mahasiswa sesuai dengan capaian prestasi pada PIMNAS XXXII dan Kompetisi Nasional serta Kompetisi Internasional.
- KELIMA : Menugaskan kepada lembaga-lembaga di lingkungan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang terkait dengan ini untuk menindaklanjuti keputusan ini.
- KEENAM : Keputusan Dekan ini mulai berlaku pada tanggal ditetapkan.

Ditetapkan di Malang
pada tanggal 01 November 2019



WISNU BARLIANTO
NIP 197307262005011008

Tembusan :

1. Rektor Universitas Brawijaya
2. Segenap Wakil Dekan di Lingkungan FKUB
3. Segenap Ka. Jur. dan KPS di Lingkungan FKUB
4. Segenap Ka. Dep di Lingkungan FKUB
5. Presiden BEM FKUB

Lampiran Keputusan Dekan FKUB
Nomor 345 Tahun 2019
Tanggal 01 November 2019

**PEMBERIAN PENGHARGAAN KEPADA MAHASISWA BERPRESTASI
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA
PESERTA PIMNAS XXXII DAN ATAU KOMPETISI NASIONAL
TINGKAT KEMENTERIAN / DIKTI / LIPI SERTA KOMPETISI INTERNASIONALTAHUN
AKADEMIK 2019/2020**

NO	NAMA	NIM	KEGIATAN	TINGKAT	CAPAIAN PRESTASI
1	Nadya Vira Saputri	165070101111020	Hasanuddin Scientific Fair 2019	Nasional	Juara 1 Research Paper Congress
2	Rivaldo Brahmaントio Hardani	165070101111067	Hasanuddin Scientific Fair 2019	Nasional	Juara 1 Research Paper Congress
3	Joshua Tande Jayapratama	165070107111036	Medical Fiesta 2018	Internasional	2 nd Winner of Research Paper Competition
4	Ade Siska	165070100111068	Medical Fiesta 2018	Internasional	2 nd Winner of Research Paper Competition
5	Vigyan Dananjaya	165070107111047	Medical Fiesta 2018	Internasional	2 nd Runner Up of Research Paper Competition
6	Aviola Anggita Gunardi	165070100111069	Medical Fiesta 2018	Internasional	3 rd Tunner Up of Research Paper Competition
7	Bigy Nuuron Dana	165070100111003	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 1/2019)	Internasional	Gold Award
8	Aminah Rahmayani Hsb	175070101111066	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award





9	Ihsanul Fikri	175070201111009	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award
10	Gerry Rinaldi	175070207111012	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award
11	Afiyfah Kiysa Waafi	165070100111025	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 2/2019)	Internasional	Bronze Award
12	Muhammad Syarif Utama	155070100111009	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 2/2019)	Internasional	Silver Award



9	Ihsanul Fikri	175070201111009	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award
10	Gerry Rinaldi	175070207111012	The 2nd World Invention Technology Expo	Internasional	Silver Award
11	Afiyfah Kiysa Waafi	165070100111025	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 2/2019)	Internasional	Bronze Award
12	Muhammad Syarif Utama	155070100111009	International Invention & Innovative Competition (InIIC Series 2/2019)	Internasional	Silver Award

A circular blue ink stamp from Universitas Gadjah Mada (UGM). The outer ring contains the text "UNIVERSITAS GADJAH MADA" and "YOGYAKARTA". Inside the circle is a stylized building or tree design. Overlaid on the stamp is a handwritten signature in black ink.



Medical Students Research Organization
Faculty of Medicine, Universitas Brabaya

Certificate of Appreciation

I hereby granted to

ADE SISKA SINAGA

୮୫

2nd WINNER OF RESEARCH PAPER COMPETITION

In recognition of your writing effort and long-lasting contribution for

**INTERNATIONAL SCIENTIFIC COMPETITION
OF MEDICAL FIESTA 2018**

Faculty of Medicine, Universitas Brawijaya
Malang, October 26th 2018

Vice Dean of Student Affairs
Faculty of Medicine, University of British Columbia

A vertical strip containing four rectangular blue ink postmarks from Germany. From top to bottom: 1. A circular postmark from Berlin (West) dated 1970, featuring a stylized eagle and the text 'BERLIN (WEST)'. 2. A rectangular postmark from Berlin (West) dated 1970, featuring a bridge over water and the text 'BERLIN (WEST)'. 3. A rectangular postmark from Berlin (West) dated 1970, featuring a bridge over water and the text 'BERLIN (WEST)'. 4. A rectangular postmark from Berlin (West) dated 1970, featuring a bridge over water and the text 'BERLIN (WEST)'.

Prof Dr. Yun-Yen Wang P.W. M.Ken Sp.Radi(X)
H# 1650/023 1968012001

KATA PENGANTAR

Bersyukur kepada Tuhan Yang Maha Esa, Yesus Kristus atas kasih

karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul

"Pengaruh Escalating Dose Immunotherapy (EDI) Dengan Self Antigen

dsDNA Terhadap Jumlah Koloni *Salmonella Typhimurium* Pada Hati Mencit

Balb/C Model Lupus". Atas selesainya tugas akhir ini, rasa bersyukur dan

terima kasih juga penulis haturkan kepada :

1. dr. Wisnu Barlianto, MSi.Med, Sp.A(K).., selaku Dekan Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya

Universitas Brawijaya.

2. dr. Triwahju Astuti, M.Kes.,Sp.P(K).., selaku Ketua Program Studi Sarjana

Kedokteran Universitas Brawijaya.

3. Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK sebagai pembimbing pertama yang

dengan sabar memberi nasehat dan memberikan bantuan untuk penulis serta

senantiasa memberi semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas

akhir ini.

4. Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes sebagai pembimbing kedua yang

senantiasa memberi semangat serta arahan dan koreksi dalam penulisan

sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.

5. Para analis di Laboratorium Parasitologi, Biomedik, dan Mikrobiologi, serta

segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah membantu

penulis dalam menyelesaikan penelitian dan melancarkan urusan

administrasi tugas akhir.

6. Kedua orang tua terkasih penulis Rosman Sinaga dan Baskita Barus,

kembaran penulis Dea Siska, dan adik penulis Anggi Januarman yang selalu



memberikan semangat dan mendoakan penulis hingga penulis dapat berjuang hingga saat ini.

7. Teman-teman penulis, Erwin, Valdo, Sherly, Ayu, Yunita, dan Ruth yang telah menjadi teman baik sejak awal memasuki dunia perkuliahan, serta Aisha,

Syahrul, Indy, Kiki dan Rena yang memberikan semangat dan membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir.

8. Kak Saiful, Kak Thoha, Kak Naya dan Kak Tanti yang memberikan kesempatan kepada penulis untuk ikut dalam penelitian payung Lupus dan mendapat banyak pengalaman baru, serta membimbing penulis dalam melakukan penelitian dan penulisan tugas akhir.

9. Sahabat Mencit, Tande, Lola, Vigyan, Vivi, Valdo, yang telah berjuang bersama-sama dengan penulis dalam melakukan penelitian dan menyusun tugas akhir.

10. Teman-teman Pendidikan Dokter FKUB 2016 yang saling memberikan semangat selama menjalani perkuliahan hingga saat ini.

11. Dan semua pihak yang telah membantu penulis dalam menyelesaikan tugas akhir ini yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa Tugas Akhir ini masih jauh dari sempurna. Oleh

karena itu, penulis membuka diri untuk segala kritik dan saran. Semoga Tugas Akhir ini bermanfaat bagi pembaca khususnya profesi di bidang kesehatan.

Malang, 21 November 2019

Penulis

Siska, Ade. 2019. Pengaruh *Escalating Dose Immunotherapy (EDI)* dengan *Self Antigen dsDNA* terhadap Jumlah Koloni *Salmonella Typhimurium* pada Hati Mencit BALB/C Model Lupus. Tugas Akhir, Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK (2) Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun sistemik kronis yang ditandai dengan respons imun hiperaktif dan produksi autoantibodi abnormal. Terapi imunosupresan dan steroid belum menunjukkan hasil yang memuaskan, selain itu dapat meningkatkan kerentanan infeksi. Terapi lain yang dikembangkan adalah *escalating dose immunotherapy* (EDI) dsDNA. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh EDI dsDNA terhadap jumlah koloni *Salmonella Typhimurium* pada hati mencit Balb/C model lupus. Penelitian ini menggunakan 24 mencit Balb/C betina yang dibagi menjadi tiga kelompok; kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan. Kelompok kontrol positif dan perlakuan diinjeksi 0,5 mL pristan intraperitoneal. Setelah 12 minggu paska injeksi, kadar serologis dan manifestasi klinis dievaluasi. Kelompok perlakuan kemudian diberi EDI dsDNA yang dikomplekskan dengan *polyethylenimine* (PEI), secara bertahap (dosis 0,05 μ g, 0,5 μ g, 5 μ g) interval 1 minggu. Lalu ketiga kelompok disonde bakteri *Salmonella Typhimurium* 10^8 CFU/mL. Mencit dibedah dan dikultur hatinya di media BSA serta dihitung koloni bakterinya. Hasil analisis didapatkan EDI dengan dsDNA secara signifikan meningkatkan jumlah koloni bakteri dibandingkan kontrol positif ($p=0,021$) dan kontrol negatif ($p=0,014$). Pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA dapat meningkatkan jumlah koloni *Salmonella Typhimurium* pada hati mencit model lupus.

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

ABSTRACT

Siska, Ade. 2019. The Effect of Escalating Dose Immunotherapy (EDI) with Self Antigen dsDNA on Number of *Salmonella* Typhimurium Colonies in Liver of BALB/C Mice Model Lupus. Final Assignment, Medicalaprogram, Faculty of medicine, University of Brawijaya. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Kusworini, M.Kes, Sp.PK (2) Dr. dr. Masruroh Rahayu, M.Kes

Systemic lupus erythematosus (LES) is a chronic systemic autoimmune disease characterized by a hyperactive immune response and abnormal autoantibody production. Immunosuppressants and steroids therapy have not shown satisfactory results, furthermore it increases susceptibility to infections.

Another developing therapy is escalating dose immunotherapy (EDI) dsDNA. This study aims to study the effect of EDI dsDNA on the number of *Salmonella* Typhimurium colonies in liver of Balb/C mice model lupus. This study used 24 female Balb/C mice divided into three groups; negative control group, positive control group, and treatment group. Positive control and treatment groups were injected 0.5 mL pristane intraperitoneally. After 12 weeks post injection, serological levels and clinical manifestations are evaluated. The treatment group was then given EDI dsDNA complexed with polyethylenimine (PEI), gradually (doses of 0.05 μ g, 0.5 μ g, 5 μ g) interval of 1 week. Then, all groups were given 10⁸ CFU/mL *Salmonella* Typhimurium. Mice were dissected and cultured on BSA media and bacterial colonies were counted. The results showed EDI dsDNA significantly increased the number of bacterial colonies compared to positive control group ($p = 0.021$) and negative control group ($p = 0.014$). Escalating dose immunotherapy (EDI) dsDNA can increase the number of *Salmonella* Typhimurium colonies in the liver of mice model lupus.

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



Judul	DAFTAR ISI	Halaman
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	i
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	ii
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	iii
Universitas Brawijaya	Universitas Brawijaya	viii
Universitas Brawijaya	Kata Pengantar	ix
Universitas Brawijaya	Abstrak	x
Universitas Brawijaya	Abstract	xii
Universitas Brawijaya	Daftar Isi	xiii
Universitas Brawijaya	Daftar Gambar	xviii
Universitas Brawijaya	Daftar Tabel	xix
Universitas Brawijaya	Daftar Bagan	xx
Universitas Brawijaya	Daftar Singkatan	xxi
BAB I PENDAHULUAN		
Universitas Brawijaya	1.1 Latar Belakang	1
Universitas Brawijaya	1.2 Rumusan Masalah	4
Universitas Brawijaya	1.3 Tujuan Penelitian	4
Universitas Brawijaya	1.4 Manfaat Penelitian	4
Universitas Brawijaya	1.4.1 Manfaat Akademis	4
Universitas Brawijaya	1.4.2 Manfaat Praktis	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA		
Universitas Brawijaya	2.1 Lupus Eritematosus Sistemik	5



2.1.1 Definisi	5
2.1.2 Respon Imun pada Pasien LES	5
2.1.3 Manifestasi Klinis	6
2.1.4 Diagnosis	7
2.1.5 Pengaruh LES terhadap Hati	9
2.2 Pengobatan Umum	10
2.3 <i>Self-antigen dsDNA</i>	11
2.4 Toleransi Sistem Imun	12
2.5 Pengembangan Metode <i>Escalating Dose Immunotherapy</i> dalam Menurunkan Progesivitas Penyakit Autoimun	13
2.6 Infeksi pada Lupus Eritematosus Sistemik	14
2.7 <i>Salmonella Typhimurium</i>	14
2.7.1 Definisi	14
2.7.2 <i>Salmonella Typhimurium</i> pada LES	15
2.7.3 <i>Salmonella Typhimurium</i> pada Hati	15
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	17
3.1 Kerangka Konsep	17
3.2 Hipotesis Penelitian	18
BAB IV METODE PENELITIAN	19
4.1 Rancangan Penelitian	19
4.2 Populasi dan Sampel	19
4.2.1 Populasi Penelitian	19
4.2.2 Sampel Penelitian	19

4.2.2.1 Kriteria Inklusi.....	19
4.2.2.2 Kriteria Eksklusi.....	20
4.2.2.3 Perolehan Sampel.....	20
4.3 Tempat dan Waktu Penelitian	20
4.4 Variabel Penelitian.....	21
4.4.1 Variabel Bebas.....	21
4.4.2 Variabel Terikat.....	21
4.5 Definisi Operasional.....	21
4.6 Alat dan Bahan Penelitian.....	23
4.6.1 Pemeliharaan Mencit	23
4.6.2 Isolasi dsDNA	23
4.6.3 Induksi Lupus pada Mencit.....	23
4.6.4 Preparasi dan injeksi dsDNA.....	23
4.6.5 Pengukuran kadar antibodi (ANA dan anti-dsDNA)	23
4.6.6 Sonde <i>Salmonella Typhimurium</i>	24
4.6.7 Pembedahan Mencit	24
4.6.8 Kultur Hati Mencit.....	24
4.6.9 Sanitasi dan Higienisasi	24
4.7 Metode Pengumpulan Data	24
4.7.1 Persiapan Hewan Coba	24
4.7.2 Isolasi dsDNA	25
4.7.3 Injeksi pristan.....	25
4.7.4 Preparasi dan injeksi dsDNA.....	25
4.7.5 Pengukuran kadar antibodi (ANA dan anti-dsDNA)	26
4.7.6 Pengukuran Kolonisasi Pada Organ Hati	27

4.8 Pengolahan Data	27
4.9 Alur Penelitian.....	28
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	29
 5.1 Hasil Penelitian.....	29
 5.1.1 Induksi Lupus pada Mencit.....	29
 5.1.2 Kultur dan Penghitungan Koloni Bakteri	29
 5.2 Analisis Data.....	31
 5.2.1 Uji Asumsi Data.....	31
 5.2.1.1 Normalitas Distribusi Data.....	31
 5.2.1.2 Homogenitas Ragam Data.....	31
 5.2.2 Uji Kruskall-Wallis	32
 5.2.3 Uji Mann-Whitney.....	32
BAB VI PEMBAHASAN	33
 6.1 Pengaruh Lupus Eritematosus Sistemik yang Diinduksi Pristan Terhadap Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri <i>Salmonella Typhimurium</i> di Hati	33
 6.2 Pengaruh <i>Escalating Dose Immunotherapy</i> (EDI) dengan <i>self antigen</i> dsDNA terhadap Jumlah Koloni Bakteri <i>Salmonella Typhimurium</i> pada Hati Lupus Eritematosus Sistemik.....	35
BAB VII PENUTUP	37
 7.1 Kesimpulan.....	37
 7.2 Saran.....	37

**DAFTAR PUSTAKA..... 38****LAMPIRAN 1. Pernyataan Keaslian Tulisan..... 44****LAMPIRAN 2. Analisis Data..... 45**

5.2.1.1 Uji Normalitas Distribusi Data..... 45

5.2.1.2 Uji Homogenitas Ragam Data..... 45

5.2.2 Uji Kruskall-Wallis..... 46

5.2.3 Uji Mann-Whitney 46

LAMPIRAN 3. Surat Kelaikan Etik..... 48**LAMPIRAN 4. Dokumentasi Penelitian..... 49****LAMPIRAN 5. Dokumentasi Medical Fiesta 2018..... 51**



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Kriteria Diagnosis Lupus Eritematosus Sistemik	7
Gambar 5.1 Manifestasi Klinis Mencit Model Lupus Induksi Pristan	29
Gambar 5.2 Koloni <i>Salmonella Typhimurium</i> pada Media BSA.....	30

**DAFTAR TABEL**

Tabel 2.1 Kriteria Diagnosis LES berdasarkan SLICC 2012 7

Tabel 4.1 Dosis Injeksi dsDNA 26

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rerata Koloni *Salmonella Typhimurium* pada HatiMencit yang diberikan *Escalating Dose Immunotherapy (EDI)*

dengan dsDNA 30

Tabel 5.2 Hasil uji Normalitas dan Homogenitas 31

Tabel 5.3 Hasil Uji Mann-Whitney 32

DAFTAR SINGKATAN

AIH	: <i>Autoimmune Hepatitis</i>
ALT	: <i>Aspartate aminotransferase</i>
ANA	: <i>Anti Nuclear Antibody</i>
Anti-dsDNA	: <i>Anti double strand deoxyribonucleic acid</i>
AST	: <i>Alanine aminotransferase</i>
BSA	: <i>Bismuth Sulfite Agar</i>
C3	: <i>Complement 3</i>
CD	: <i>Cluster Differentiation</i>
DC	: <i>Dendritic Cell</i>
DMARDs	: <i>Disease-Modifying Anti-Rheumatic Drugs</i>
EDI	: <i>Escalating Dose Immunotherapy</i>
EDTA	: <i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
ELISA	: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FNH	: <i>Focal Nodular Hyperplasia</i>
Ig	: <i>Immunoglobulin</i>
IL	: <i>Interleukin</i>
I.P.	: <i>Intra Peritoneal</i>
LES	: <i>Lupus Eritematosus Sistemik</i>
MBP	: <i>Myelin Basic Protein</i>
NET	: <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NSAID	: <i>Nonsteroidal anti-inflammatory drug</i>
PBC	: <i>Primary Biliary Cirrhosis</i>
PBS-T	: <i>Phosphate Buffered Saline with Tween</i>
PEI	: <i>Polyethylenimine</i>



PSC

: Primary Sclerosing Cirrhosis

SLICC

: Systemic Lupus International Collaborating Clinics

TGF- β

: Transforming Growth Factor β

Thsitas

: T Helper

TLR

: Toll Like Receptor

TNF

: Tumor Necrosis Factor

T Reg

: T Regulator



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) merupakan penyakit inflamasi autoimun kronis yang belum jelas penyebabnya, dan memiliki sebaran gambaran klinis yang luas dan tampilan perjalanan penyakit yang beragam, sehingga disebut juga penyakit "seribu wajah" (Infodatin, 2017). Sebagian besar orang yang terkena LES berusia 15-44 tahun. LES sering menyerang wanita dengan usia produktif, namun laki-laki, anak-anak, dan remaja juga dapat terkena LES. Penyakit ini dapat menyerang semua ras dan etnis, namun lebih sering ditemukan pada ras kulit berwarna. Penderita Lupus di seluruh dunia diperkirakan berjumlah 5 juta orang dengan 16.000 kasus dilaporkan tiap tahun dari berbagai negara (Lupus Foundation of America, 2013). Prevalensi LES di masyarakat Indonesia berdasarkan survei yang dilakukan oleh Handono Kalim, dkk di Malang memperlihatkan angka sebesar 0,5% terhadap total populasi (Infodatin, 2017). Angka harapan hidup pasien LES di Indonesia masih rendah, yaitu sebesar 70% untuk angka harapan hidup 5 tahun dan 50% untuk angka harapan hidup 10 tahun.

Patogenesis dan etiologi LES masih belum jelas, tetapi telah dibuktikan bahwa adanya Th17 hiperaktif yang berkaitan dengan terganggunya fungsi sel Treg dan kelainan sel dendritik yang menyebabkan aktivasi sel T dan B yang menghasilkan jumlah antibodi yang tinggi dan menginduksi mediator inflamasi toksik dalam jaringan yang sangat penting dalam progresifitas penyakit pasien LES (Wahono *et al.*, 2014).

LES melibatkan berbagai organ seperti ginjal, kulit, sistem saraf pusat, dan hati.

Gangguan pada hati dilaporkan 48,55% pasien LES. Hepatomegali terdapat pada

30-50% pasien dan peningkatan enzim hati terdapat pada 23,5% pasien (Adiga &

Nugent, 2017). Pada pasien lupus didapatkan peningkatan *aspartate*

aminotransferase (AST) sebesar 8,7% dari batas normal, peningkatan *alanine*

aminotransferase (ALT) sebesar 5% dari batas normal, maupun peningkatan

keduanya yang lebih tinggi 34,7% dari batas normal. Gangguan hati pada lupus bisa

dari berbagai faktor termasuk hepatitis lupus, pengobatan selama perawatan pasien

LES (NSAID, Aspirin, *immune-suppressors*, hydroxyzine, hydroxychloroquine),

perlemakan hati (biasanya diinduksi oleh kortikosteroid), hepatitis terkait autoimun,

sirosis bilier primer, kolangitis, dan hepatitis viral (Tahernia *et al.*, 2017). Gangguan

hati sering terjadi pada lupus dan harus dibedakan penyebabnya, baik dari obat,

toxin, virus, autoimun, dan penyebab hepatitis lainnya (Adiga & Nugent, 2017).

Kortikosteroid adalah obat yang umum digunakan pada LES, dan sebagian

besar pasien LES menggunakannya dalam beberapa waktu selama perjalanan

penyakit mereka. Namun penggunaan kortikosteroid dapat memberikan efek

samping yang signifikan, termasuk infeksi, hipertensi, hiperglykemia, osteoporosis,

nekrosis avaskular, miopati, katarak, dan glaukoma (Kasturi, 2016). Prednison

adalah steroid yang paling sering diresepkan untuk penderita lupus (Adiga & Nugent,

2017). Penggunaan jangka panjang steroid dapat meningkatkan risiko infeksi. Infeksi

merupakan salah satu penyebab utama kematian pada penderita lupus (Lupus

Foundation of America, 2013).

Pasien LES sangat rentan terhadap infeksi dengan rata-rata kematian 4,7%,

berkisar dari 1,2% hingga 36% disebabkan oleh infeksi. Diantara infeksi-infeksi ini,

Salmonella berpeluang besar menyerang (Gerona & Navarra, 2009). *Salmonella*

enterica serovar Typhimurium yang merupakan salah satu serotip terpenting dari

Salmonella yang ditransmisikan dari hewan ke manusia di sebagian besar belahan

dunia. Infeksi *Salmonella* Typhimurium ini biasanya tidak terjadi komplikasi, namun

dapat menjadi berat pada orang dengan kelemahan sistem kekebalan tubuh (CDC,

2019). Infeksi *Salmonella* Typhimurium dapat menyerang hati, lalu diikuti bakteremia

dan lesi granulomatous (Umezawa *et al.*, 1995). Pada pasien LES dengan terjadinya

penurunan sistem kekebalan tubuh, menjadikan penderitanya rentan terhadap

berbagai infeksi termasuk *Salmonella* Typhimurium, hal ini dapat semakin berat

dengan pengobatan steroid yang memiliki efek samping penurunan sistem

kekebalan tubuh juga.

Pengembangan metode terapi *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan

pemberian *self-antigen* telah dicoba pada tikus model autoimun *multiple sclerosis*.

Penelitian tersebut menggunakan *self-antigen* sel schwann sendiri yaitu MBP (*Myelin*

Basic Protein) dan menghasilkan penurunan sitokin proinflamasi yang bermakna dan

menunjukkan kembalinya mekanisme toleransi (Lomakin *et al.*, 2016). Pada

penelitian sebelumnya, dibuktikan bahwa pemberian EDI dengan *self antigen*

dsDNA dapat memperbaiki regulasi sistem imun pada LES. Berdasarkan uraian

diatas maka diperlukan penelitian lebih lanjut tentang keamanan pemberian EDI

dengan *self antigen dsDNA* terhadap kerentanan infeksi. Penelitian ini dilakukan

dengan menghitung jumlah koloni *Salmonella* Typhimurium pada hati mencit Balb/C

model lupus yang telah diinjeksi *self antigen dsDNA*. Penelitian lanjut metode terapi

ini diharapkan dapat menjadi metode terapi yang aman tanpa meningkatkan

kerentanan infeksi pada organ.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah pengaruh pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI)

dengan dsDNA dosis $5 \times 10^{-2} \mu\text{g}$, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ terhadap jumlah koloni *Salmonella* *Typhimurium* pada hati mencit Lupus Eritematosus Sistemik (LES)?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI)

dengan dsDNA dosis $5 \times 10^{-2} \mu\text{g}$, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ terhadap jumlah koloni *Salmonella* *Typhimurium* pada hati mencit Balb/C model lupus.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

a. Memberikan informasi tentang pengaruh pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA terhadap jumlah koloni *Salmonella* *Typhimurium* pada hati mencit Balb/C model lupus.

b. Memberikan informasi tentang *escalating dose immunotherapy* (EDI) sebagai referensi atau acuan dalam penelitian selanjutnya maupun terhadap penyakit autoimun lainnya.

1.4.2 Manfaat Praktis

a. Sebagai terapi yang aman untuk pasien Lupus Eritematosus Sistemik (LES).

b. Meningkatkan pemanfaatan *escalating dose immunotherapy* (EDI) sebagai terapi penyakit autoimun.

2.1 Lupus Eritematosus Sistemik

2.1.1 Definisi

Lupus Eritematosus Sistemik (LES) adalah penyakit autoimun inflamasi sistemik kronis dengan morbiditas dan mortalitas tinggi yang melibatkan kerusakan multi organ (Handono *et al.*, 2014). LES lebih sering terjadi pada wanita dewasa (perempuan / laki-laki: 9/1) tetapi tidak umum terjadi pada anak-anak dan sekitar 20% pasien adalah anak di bawah usia 15 tahun. Rasio perempuan banding laki-laki pada anak-anak adalah 2-6 banding 1 dan pada populasi lanjut usia adalah 3-8 banding 1 (Tahernia *et al.*, 2017). Di Indonesia, tingkat harapan hidup pasien LES masih rendah, yakni angka harapan hidup 5 tahun sebesar 70% dan 10 tahun sebesar 50% (Handono *et al.*, 2014).

2.1.2 Respon Imun pada Pasien LES

Berbagai faktor penting dalam patogenesis LES dapat dibagi menjadi tiga kelompok besar. Faktor-faktor ini adalah faktor lingkungan, imunologi dan genetik. Semua faktor ini menyebabkan kerusakan toleransi tubuh dengan merangsang respons imunologis terhadap antigen nukleat. Faktor utama penyebab penyakit ini adalah hancurnya toleransi tubuh terhadap *self-antigen* dan selanjutnya, terjadi peningkatan antibodi (Ab) terhadap nukleus dan sel (Tahernia *et al.*, 2017). Patogenesis dan etiologi LES masih belum jelas, namun bukti menunjukkan bahwa hiperaktivitas sel T *helper 17* (Th17) terkait dengan perubahan fungsi regulator T regulator (Treg) dan abnormalitas sel dendritik (DC) menyebabkan aktivasi sel T dan

sel B menghasilkan jumlah antibodi yang tinggi dan menginduksi mediator inflamasi

toksik pada jaringan yang sangat penting dalam progresi penyakit pasien LES (Wahono et al., 2014).

2.1.3 Manifestasi Klinis

LES dapat mempengaruhi banyak organ tubuh, sehingga manifestasi klinis yang terjadi bermacam-macam. Gejala-gejala tersebut dapat hilang timbul, dan gejala yang berbeda dapat muncul pada waktu yang berbeda selama perjalanan penyakit (Lupus Foundation of America, 2013).

Manifestasi klinis umum dari lupus (baik laki-laki maupun perempuan) adalah:

- Kelelahan ekstrim
- Nyeri kepala
- Nyeri sendi atau bengkak
- Bengkak
- Anemia (jumlah sel darah merah atau hemoglobin rendah, atau volume darah total rendah)
- Pembengkakan (edema) pada kaki, tangan, dan/atau di sekitar mata
- Nyeri di dada saat bernafas dalam (pleuritis)
- Ruam berbentuk kupu-kupu di pipi dan hidung.
- Fotosensitifitas
- Rambut rontok
- Pembekuan darah abnormal
- Jari menjadi putih dan/atau biru saat dingin (fenomena Raynaud)
- Ulkus pada mulut atau hidung

2.1.4 Diagnosis

Berdasarkan *Systemic Lupus International Collaborating Clinics* (SLICC) tahun 2012 (Gambar 2.1 dan Tabel 2), untuk menegakkan diagnosis LES, harus memenuhi 4 atau lebih kriteria (minimal 1 kriteria klinis dan 1 kriteria laboratorium).

SLICC[†] Classification Criteria for Systemic Lupus Erythematosus

Requirements: ≥ 4 criteria (at least 1 clinical and 1 laboratory criteria)
OR biopsy-proven lupus nephritis with positive ANA or Anti-DNA

Clinical Criteria

1. Acute Cutaneous Lupus*
2. Chronic Cutaneous Lupus*
3. Oral or nasal ulcers *
4. Non-scarring alopecia
5. Arthritis *
6. Serositis *
7. Renal *
8. Neurologic *
9. Hemolytic anemia
10. Leukopenia *
11. Thrombocytopenia (<100,000/mm³)

Immunologic Criteria

1. ANA
2. Anti-DNA
3. Anti-Sm
4. Antiphospholipid Ab *
5. Low complement (C3, C4, CH50)
6. Direct Coombs' test (do not count in the presence of hemolytic anemia)

[†]SLICC: Systemic Lupus International Collaborating Clinics

* See notes for criteria details

Gambar 2.1. Kriteria Diagnosis Lupus Eritematosus Sistemik

Tabel 2.1 Kriteria Diagnosis LES berdasarkan SLICC 2012 (Petri et al., 2013)

KRITERIA	KETERANGAN
Acute Cutaneous Lupus	<i>Lupus malar rash</i> (tidak termasuk jika malar diskoid), lupus bulosa, varian <i>toxic epidermal necrolysis</i> LES, ruam lupus makulopapular, ruam lupus fotosensitif (tanpa adanya <i>dermatomyositis</i>).
Chronic Cutaneous Lupus	Ruam diskoid klasik terlokalisasi (di atas leher) atau digeneralisasi (di atas dan di bawah leher), lupus hipertrofi (verukosa), <i>lupus panniculitis</i> (profundus), lupus mukosa, <i>lupus erythematosus tumidus</i> , <i>chillblains lupus</i> , <i>discoid lupus-lichen planus</i> tumpang tindih.

Oral or Nasal Ulcers	Ulkus pada langit-langit mulut, bukal, lidah, atau ulkus hidung (tidak ada penyebab lain seperti vaskulitis, <i>Behcet's disease</i> , infeksi (herpes), penyakit radang usus, arthritis reaktif, dan makanan asam).
Non-scarring alopecia	Menipisnya atau merapuhnya rambut dan rambut terlihat rusak (tidak ada penyebab lain seperti <i>alopecia areata</i> , obat-obatan, defisiensi besi dan <i>alopecia androgenik</i>).
Arthritis or Synovitis involving >2 Joints	Ditandai dengan pembengkakan atau efusi atau nyeri tekan pada 2 sendi atau lebih dan tiga puluh menit atau lebih kekakuan di pagi hari (<i>morning stiffness</i>).
Serositis	Pleuritis tipikal selama lebih dari 1 hari atau efusi pleura atau <i>pleural rub</i> . Nyeri perikardium tipikal lebih dari satu 1 hari atau efusi perikardial atau <i>pericardial rub</i> atau perikarditis dengan EKG (tidak ada penyebab lain seperti infeksi, uremia, dan perikarditis <i>Dressier</i>).
Renal	Rasio protein urin/kreatinin (atau protein urin 24 jam) sebesar 500 mg protein dalam 24 jam atau <i>red blood cell casts</i> .
Neurologic	Kejang, psikosis, mononeuritis multipleks (tanpa adanya penyebab lain seperti vaskulitis primer), mielitis, neuropati perifer atau kranial (tanpa adanya penyebab lain seperti vaskulitis primer, infeksi dan diabetes mellitus), keadaan konfusional akut (tanpa adanya penyebab lain seperti toksik-metabolik, uremia, obat-obatan).
Hemolytic Anemia	Tanpa penyebab lainnya yang diketahui.
Leukopenia or Lymphopenia	Leukopenia $< 4000 \text{ mm}^3$ minimal sekali (tanpa adanya penyebab lain seperti <i>Felty's syndrome</i> , obat-obatan, dan hipertensi portal). Limfopenia $< 1000 \text{ mm}^3$ minimal sekali (tanpa adanya penyebab lain seperti kortikosteroid, obat-obatan dan infeksi).
Thrombocytopenia	$< 100.000 \text{ mm}^3$ minimal sekali (tanpa adanya penyebab lain seperti obat-obatan, hipertensi portal, dan TTP).
ANA	Di atas rentang referensi laboratorium.
Anti-DNA	Di atas rentang referensi laboratorium (atau 2 kali lipat kisaran referensi jika diuji oleh ELISA).
Anti-Sm	Adanya antibodi terhadap antigen nukleus Sm.
Antiphospholipid Ab	Uji positif antikoagulan lupus, hasil tes positif palsu RPR, titer antibodi antikardiolipin sedang atau tinggi (IgA, IgG, atau IgM), hasil tes positif untuk anti-2-glikoprotein I (IgA, IgG, atau IgM).
Low Complement	C3, C4 atau CH50.
Direct Coombs' Test	Tanpa adanya anemia hemolitik.

2.1.5 Pengaruh LES terhadap Hati

Seperti sudah diketahui diatas, bahwa LES bersifat sistemik dan mempengaruhi banyak organ didalam tubuh manusia, salah satunya adalah hati.

Walaupun hati bukanlah organ utama yang menjadi target LES, namun frekuensi terjadinya disfungsi hati ataupun abnormalitas kadar enzim hati pada pasien LES berkisar antara 19% hingga 60%. Komplikasi LES pada hati contohnya adalah

Autoimmune Hepatitis (AIH), *Primary Biliary Cirrhosis* (PBC), dan *Primary Sclerosing Cirrhosis* (PSC). Pada dasarnya, pasien LES mempunyai kemungkinan lebih tinggi untuk kejadian kasus thromboembolisme yang berdampak pada sirkulasi hepatis.

Adanya gangguan dalam peredaran darah yang menuju ke hati akibat LES juga dapat mendukung perkembangan dari *benign hepatic lesions*, seperti *focal nodular hyperplasia* (FNH) dan *hemangioma* (Shizuma, 2015).

Bessone (2014) mengklasifikasikan penyebab kerusakan hati terkait LES sebagai berikut: (1) komorbiditas imunologis (sindrom tumpang tindih); (2) komorbiditas non-imunologis terkait dengan LES; dan (3) kerusakan hati yang diduga diinduksi oleh LES sendiri, disebut sebagai "lupus hepatitis". Pada kelompok pertama, kerusakan hati bisa berasal dari hepatopati yang tumpang tindih yang dipicu oleh mekanisme autoimun selain LES terjadi dengan insiden tinggi dalam konteks lupus (misalnya AIH, sirosis bilier primer). Kelompok kedua meliputi penyakit hati non-autoimun, seperti steatosis, hepatitis C, hiperkoagulasi terkait lesi hati, lesi hiperplasia parenkim dan vaskular, porfiria cutanea tarda, dan hepatotoksitas akibat obat. Kelompok terakhir, berdasarkan data dalam literatur mendukung adanya penyakit hati yang dihasilkan oleh LES sendiri, atau terjadinya kondisi rentan terkait LES yang meningkatkan kerentanan untuk mendapatkan penyakit hati lainnya.

Keterlibatan hati terjadi pada 50-60% pasien di beberapa titik selama

perjalanan penyakit mereka. Tiga puluh sampai lima puluh persen pasien mengalami

hepatomegali, dan 23,5% pasien mengalami peningkatan enzim hati. Dalam banyak

kasus, enzim transaminase yang meningkat ini disebabkan oleh obat hepatotoksik,

virus hepatitis, atau perlemakan hati (Adiga & Nugent, 2017).

Disfungsi hati yang disebabkan oleh obat terlihat pada 21-31% kasus dalam

beberapa penelitian. Suatu studi mengidentifikasi aspirin sebagai obat yang paling

umum menyebabkan toksitas. Peningkatan penggunaan obat imunosupresif,

termasuk azatioprin, metotreksat, dan obat antimalaria, dikaitkan dengan

peningkatan risiko disfungsi hati. Viral hepatitis ditemukan pada 0,8-14% pasien.

Dalam 28-42% pasien, tidak ada penyebab disfungsi hati yang jelas, dan

diperkirakan terjadi karena lupus itu sendiri (Adiga & Nugent, 2017).

Dari penjelasan diatas, bisa kita simpulkan bahwa sangat sulit untuk

membedakan penyebab dari komplikasi hati yang terjadi pada pasien LES. Apakah

komplikasi ini dikarenakan gangguan autoimun LES yang langsung berdampak pada

sel hati, ataukah komplikasi ini dikarenakan terapi LES yang bersifat imunosupresif

sehingga melemahkan sistem imun untuk proteksi hati (Shizuma, 2015).

2.2 Pengobatan Umum

LES tidak dapat disembuhkan dan pengobatannya hanya bersifat

simptomatik. Pengobatan LES terdiri dari golongan *disease-modifying anti-rheumatic*

drugs (DMARDs) biologis seperti belimumab atau rituximab, golongan DMARDs

non-biologis seperti siklofosfamid atau metotreksat, golongan NSAID seperti

acetaminophen, golongan kortikosteroid seperti prednisolon atau golongan anti-

malaria seperti hydroxychloroquine (Nobee et al., 2015).

Steroid adalah salah satu obat yang paling umum diresepkan pada pasien lupus. Steroid dapat menurunkan inflamasi dan menurunkan respon sistem imun. Steroid yang paling umum digunakan termasuk prednison, prednisolon, metilprednisolon dan decadron. Efek samping dari steroid yakni peningkatan berat badan, moon-shaped face, perubahan kulit atau jerawat, iritabilitas, depresi, osteoporosis, kelemahan otot, gangguan tidur, katarak dan infeksi (Lupus Foundation of America, 2018).

2.3 Self-antigen dsDNA

Penelitian terdahulu yang dilakukan Christensen *et al* menunjukkan bahwa self-antigen dsDNA yang menjadi penyusun kompleks imun dapat memicu aktivasi plasmositoid sel dendritik pada pasien LES sehingga terbentuk autoantibodi dsDNA (Christensen *et al.*, 2015). Begitu apoptosis seluler dimulai dengan faktor stimulasi seperti mekanisme ultraviolet atau otonom, ekspresi self-antigen dsDNA meningkat dan kemudian ini memicu respon kekebalan tubuh. Begitu sel-sel rusak, peptida antimikroba, seperti LL37 dan NET, dilepaskan dan berikatan dengan kompleks imun. Kompleks imun ini terbuat dari self-antigen dsDNA dan antibodi. Oleh karena itu, kompleks imun tersebut tidak dapat dihancurkan oleh sel makrofag dan dendritik. Namun, kompleks imun ini dikeluarkan dari permukaan sel B melalui reseptor FCYRIIA dan dimasukkan ke dalam sitoplasma melalui endositosis. Selanjutnya, mereka mengikat TLR-7/9 di permukaan endosom. Proses ini menyebabkan produksi interferon- α oleh sel dendritik plasmositoid. Selain itu, sejumlah kecil autoantibodi diproduksi oleh sel interferon- α mengaktifkan sel dendritik mieloid. Setelah aktivasi, toleransi terhadap antigen tubuh rusak, oleh karena itu, sel

dendritik ini mengantarkan antigen mereka ke sel T CD4 + dan mengaktifkannya

(Tahernia *et al.*, 2017).

Sel T membantu sel B autoreaktif melalui ikatan CD40 / CD40L dan produksi IL-21, sehingga sel-sel ini dapat menghasilkan autoantibodi. Selama aktivasi sel dendritik, sitokin pro-inflamasi seperti Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , IL-6 dan faktor yang mengaktivasi sel B diproduksi. Sitokin-sitokin ini mempengaruhi sel B dan menyebabkan produksi antibodi tambahan (Tahernia *et al.*, 2017).

2.4 Toleransi Sistem Imun

Toleransi imunologis adalah salah satu mekanisme normal yang dimiliki oleh

sistem imun. Secara normal sistem imun dapat bereaksi terhadap berbagai macam

jenis mikroba (*non self-antigen*) namun tidak bereaksi melawan antigen yang berasal

dari tubuh sendiri (*self-antigen*). Hal ini dikarenakan sel limfosit memiliki kemampuan

untuk mengenali *self-antigen* yang didapatkannya saat proses menuju maturasi.

Mekanisme ini sangat penting dalam menjaga keseimbangan sistem tubuh. Apabila

mekanisme ini gagal, maka akan terjadi suatu autoimunitas, yaitu sistem imun dari

individu dapat menyerang sel dan jaringan dari individu itu sendiri. Penelitian tentang

induksi toleransi dewasa ini banyak dilakukan untuk menemukan cara yang aman

untuk mentoleransi pasien autoimun terhadap *self-antigen* mereka. Hal ini biasanya

dilakukan dengan memberikan serangkaian panjang suntikan alergen yang di

formulasi khusus atau *self-antigen* untuk mengembalikan regulasi imun (Abbas,

2014).



2.5 Pengembangan Metode *Escalating Dose Immunotherapy* dalam

Menurunkan Progesivitas Penyakit Autoimun

Tujuan utama dari terapi penyakit autoimun adalah membatasi respon imunitas terhadap *self-antigen* tanpa menurunkan kemampuan sel imun untuk mengeleminasi antigen asing (*non-self*). *Escalating dose self-antigen immunotherapy* dapat menginduksi sel regulator pada respon imun yaitu T-Reg untuk mensupresi Sel T yang autoreaktif (Sakaguchi, 2000).

Dalam klinik, *allergen-specific immunotherapy* biasanya meliputi pemberian dosis antigen bertahap di fase awal pengobatan, sebelum akhirnya *maintenance dose* tinggi tercapai, menghasilkan desensitisasi alergi. Hal ini diterima secara luas bahwa penggunaan strategi dosis bertahap meminimalkan risiko efek samping terkait imunoterapi, yang mungkin berkisar dari gejala ringan sampai anafilaksis. Dengan dosis bertahap dapat dilakukan pemberian dosis antigen yang lebih besar dan, bila berhasil, terjadi pemulihan toleransi imunologi terhadap pemberian antigen (Burton *et al.*, 2014).

Pemberian *escalating dose self-antigen immunotherapy* lain yang telah dikembangkan adalah terhadap penyakit autoimun *Multiple Sclerosis*. Injeksi subkutan *Myelin Basic Protein* mampu menurunkan sitokin IL-17 sehingga menghambat perkembangan sel B dan T autoreaktif. Selain itu juga, didapatkan penurunan kadar sitokin-sitokin proinflamasi (Lomakin *et al*, 2016). Pada penelitian sebelumnya, dibuktikan bahwa pemberian EDI dengan *self antigen dsDNA* dapat memperbaiki regulasi sistem imun pada LES. Didapatkan penurunan kadar autoantibodi ANA dan *anti-dsDNA*, serta peningkatan proliferasi sel Treg sehingga mengembalikan regulasi sistem imun. Namun, diperlukan penelitian lebih lanjut

mengenai efek samping pemberian EDI dengan *self antigen dsDNA* terhadap kerentanan infeksi pada LES.

14

2.6 Infeksi pada Lupus Eritematosus Sistemik

Pasien LES berisiko tinggi untuk semua jenis infeksi. Pertama, lupus sendiri dapat membuat infeksi lebih sering terjadi dikarenakan lupus dapat mempengaruhi sistem imun dan membatasi kemampuan tubuh untuk melawan agen infeksi, seperti bakteri dan virus. Kedua, pasien lupus sering menggunakan obat-obatan imunosupresif untuk mengontrol sistem imun yang terlalu aktif. Obat-obatan ini membatasi kemampuan sistem imun tubuh untuk merespons dan membuat penderitanya lebih rentan terhadap agen infeksi.

Infeksi yang paling umum terjadi pada lupus melibatkan sistem pernapasan (paru-paru dan jantung), kulit, dan saluran kemih. Selain itu juga pasien lupus juga berisiko tinggi untuk terinfeksi *Candida* dan *Herpes zoster* (Lupus Foundation of America, 2013)

2.7 *Salmonella Typhimurium*

2.7.1 Definisi

Salmonella adalah kelompok heterogen besar dari basil Gram-negatif motil yang menginfeksi hewan dan manusia. *Salmonella* memiliki kemampuan untuk bertahan hidup meskipun ada antibodi humoral dan seluler. Infeksi akan berat pada pasien dengan gangguan fungsi sel-T, khususnya mereka yang mengalami penurunan limfosit, berkurang jumlah sel Th, dan penurunan rasio Th:Treg. Saluran pencernaan lebih sering menjadi lokasi utama infeksi. Namun, jika infeksi menyebar ke saluran lain dapat menyebabkan gejala klinis yang berbeda. Bakteremia dapat

terjadi pada penyakit LES, sirosis hati, infeksi HIV dan kanker organ (Gerona *et al.*, 2009).

Dua puluh persen yang terinfeksi *Salmonella* non-typhoidal, termasuk

Salmonella Typhimurium, adalah pasien LES (Lim *et al.*, 2001).

2.7.2 *Salmonella Typhimurium* pada LES

LES merupakan faktor predisposisi pasien ke berbagai infeksi, termasuk

Salmonella non-typhoidal. Risiko infeksi meningkat pada saat fase imunosupresi

meningkat, terutama saat fase *lupus flares* (Joshua *et al.*, 2003).

Pada salmonellosis murine, patogen menyebar dari tempat utama infeksi ke

organ sistem retikuloendotelial (RES), dimana bakteri *Salmonella* Typhimurium

dapat berkembang biak dengan cepat. Hal ini menunjukkan bahwa patogenitas

salmonella sangat bergantung pada kemampuan untuk berkembang biak dalam

makrofag RES (Lin *et al.*, 1987).

Pada pasien LES terjadi gangguan sistem retikuloendotelial dalam

membersihkan *Salmonella*, yang diakibatkan oleh opsonisasi yang tidak memadai,

gangguan fagositosis mononuklear, hiposplenisme fungsional, dan

hipokomplementaemia (Lim *et al.*, 2001).

2.7.3 *Salmonella Typhimurium* pada Hati

Pada mencit, *Salmonella* Typhimurium menyebar secara sistemik melalui

sirkulasi dan karakteristik infeksinya adanya perubahan patologis yang berat dan

tingginya jumlah bakteri di *Payer's patches*, kelenjar getah bening mesenterika, hati,

dan limpa (Zhang *et al.*, 2003).

Di hati, bakteri *Salmonella Typhimurium* difagosit oleh sel Kupffer dan

berkembang biak, bakteri kemudian menyerang hepatosit. Secara patologis, abses

soliter kecil dengan infiltrasi banyak sel polimorfonuklear (PMN) dapat diamati pada

tahap awal, sedangkan pada tahap selanjutnya, abses menjadi granuloma.

Perkembangan lesi granulomatosa adalah salah satu dari karakteristik bakteri

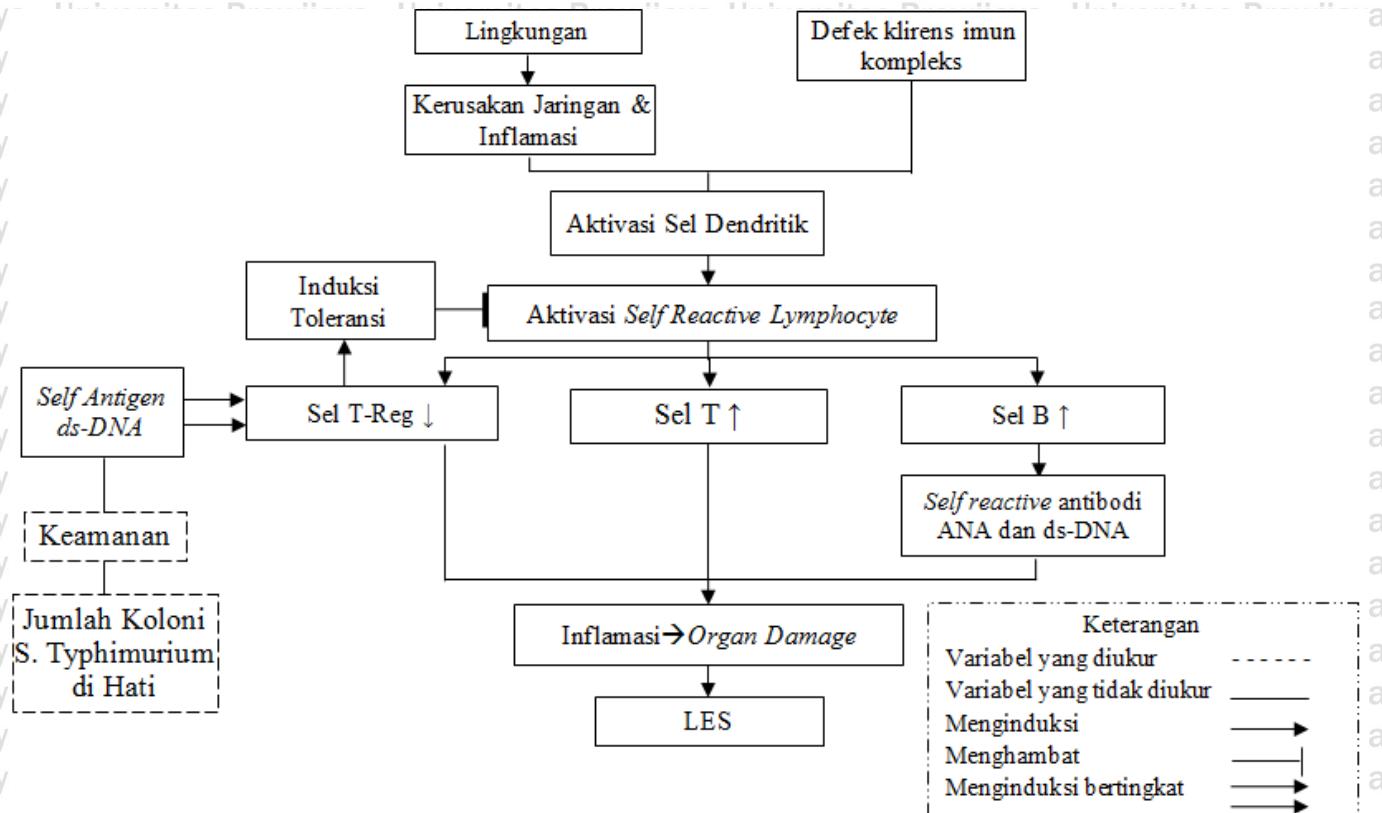
intraseluler seperti *Salmonella Typhimurium* (Umezawa *et al.*, 1995).



KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

BAB III

3.1 Kerangka Konsep



Bagan 3.1 Kerangka Konsep

Lupus Eritematosus Sistemik disebabkan oleh berbagai faktor termasuk adanya defek klirens imun kompleks dan lingkungan yang menyebabkan kerusakan jaringan dan inflamasi. Faktor-faktor tersebut menyebabkan aktivasi sel dendritik yang kemudian mengaktifkan sel-sel limfosit yang reaktif. Hipereaktivitas sel T dan sel B juga didorong oleh penurunan sel Treg baik secara fungsi maupun jumlah. Sehingga regulasi sel T dan sel B rusak.

Meningkatnya sel limfosit B yang reaktif akan memicu produksi antibodi yang menyerang *self-antigen* nukleus dan dsDNA. Sedangkan peningkatan sel T akan memicu peningkatan Th1, Th2, Th17 beserta sitokin-sitokin yang dihasilkan seperti IFN- γ , IL-4, IL-17A. Sel-sel reaktif tersebut akan menyebabkan inflamasi dan menyebabkan kerusakan pada organ-organ tubuh, dan mengarah ke penyakit LES. *Escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan pemberian *self-antigen* dsDNA dapat menginduksi kembalinya fungsi maupun jumlah sel Treg dan menginduksi toleransi dengan meregulasi kembali sel T dan sel B, sehingga terjadi penurunan sel limfosit reaktif. Dalam menginduksi toleransi diharapkan terapi EDI dengan *self-antigen* dsDNA tidak menekan seluruh sistem imun dan tidak menyebabkan kerentanan terhadap infeksi sehingga aman untuk digunakan. Untuk menguji kerentanan infeksi maka dilakukan dengan penghitungan jumlah koloni bakteri *Salmonella Typhimurium* yang diberikan pada organ mencit model lupus yang sudah diberi terapi EDI dengan *self-antigen* dsDNA.

3.2 Hipotesis Penelitian

Pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA dosis 5×10^{-2} μg , 5×10^{-1} μg , $5 \mu\text{g}$ tidak meningkatkan jumlah koloni *Salmonella Typhimurium* pada

hati mencit Lupus Eritematosus Sistemik.

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni (*true experimental design*) 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 pristan untuk induksi LES dan kemudian diinjeksikan *self-antigen dsDNA* dalam dosis tertentu secara berurutan dan bertahap, lalu disonde *Salmonella Typhimurium*.

4.2 Populasi dan Sampel

4.2.1 Populasi Penelitian

Populasi penelitian ini adalah mencit strain Balb/C betina yang berusia 6-8 minggu dengan berat badan rata-rata 25-30 gram. Mencit Balb/C diperoleh dari LPPT Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim 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).

4.2.2 Sampel Penelitian

4.2.2.1 Kriteria Inklusi

- Mencit strain Balb/C betina tanpa kelainan anatomis.
- Mencit hidup yang sudah terinduksi lupus oleh pristan.

4.2.2.2 Kriteria Eksklusi

- Mencit yang selama penelitian tidak mau makan
- Mencit yang kondisinya menurun atau mati selama penelitian berlangsung

4.2.2.3 Perolehan Sampel

Teknik yang digunakan untuk memilih sampel dari populasi adalah

randomisasi, untuk meminimalisir bias. Jumlah sampel mencit yang digunakan

dalam penelitian ini dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$n(p - 1) \geq 15 \quad n : \text{jumlah ulangan} \quad p : \text{jumlah kelompok}$$

Penelitian ini terdapat tiga kelompok sebagaimana yang telah disebutkan

sebelumnya. Oleh karena itu didapatkan jumlah sampel sebagai berikut:

$$n(3 - 1) \geq 15 \quad | \quad n \geq 7.5 \text{ dibulatkan menjadi } 8 \text{ ekor}$$

Untuk tiga kelompok, diperlukan pengulangan paling sedikit sebanyak 8 ekor

untuk tiap kelompok sehingga sampel mencit total yang diperlukan dalam penelitian

ini adalah minimal 24 ekor mencit Balb/C betina.

4.3 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasitologi, Biomedik, dan

Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari

sampai Oktober tahun 2018.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel Bebas

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

A. Kelompok kontrol negatif: mencit yang tidak diinjeksi pristan maupun dsDNA, lalu berikutnya disonde *Salmonella Typhimurium*.

B. Kelompok kontrol positif: mencit yang diinjeksi pristan namun tidak diinjeksi dsDNA, lalu berikutnya disonde *Salmonella Typhimurium*.

C. Kelompok perlakuan: mencit yang diinjeksi pristan dan dsDNA dosis $5 \times 10^{-2} \mu\text{g}$, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ secara berurutan lalu berikutnya disonde *Salmonella Typhimurium*.

4.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah jumlah kolonisasi bakteri *Salmonella Typhimurium* di hati pada media kultur.

4.5 Definisi Operasional

a. Hewan coba model Lupus adalah mencit galur Balb/C betina, yang telah menunjukkan tanda lupus karena induksi pristan meliputi tanda klinis seperti arthritis dan kerontongan bulu pada mencit serta adanya ANA dan anti-dsDNA (Li et al., 2018; Lin et al., 2017).

b. *Antinuclear antibodies* (ANA) adalah antibodi yang menyerang protein di dalam inti sel. Studi sebelumnya telah membuktikan bahwa ANA positif

memiliki sensitivitas yang tinggi terhadap LES (Leuchten *et al*, 2017). Titer

ANA akan diukur dengan metode ELISA.

c. *Anti-dsDNA* adalah antibodi spesifik pada LES. *Anti-dsDNA* dapat diproduksi

dari sel B autoreaktif matur yang diaktifkan oleh lingkungan inflamasi.

Kompleks imun antibodi *anti-dsDNA* telah dapat mengaktifkan jalur inflamasi

dalam sel mieloid, sehingga memicu umpan balik sistem imun inat dan

adaptif (Malkiel *et al*, 2016). Titer *anti-dsDNA* akan diukur dengan metode

ELISA.

d. Pristan (*tetramethylpentadecane*) merupakan alkana isoprenoid yang

digunakan untuk menginduksi lupus pada mencit. Pristan didapatkan dari

Gamma Scientific Biolab. Pristan 0,5 mL diinjeksikan secara intraperitoneal.

e. *Self-antigen dsDNA* merupakan antigen yang digunakan dalam metode

Escalating Dose Immunotherapy (EDI) dengan optimasi/penentuan dosis

antigen ini diisolasi dari darah mencit yang telah diinduksi lupus.

f. *Salmonella Typhimurium* adalah bakteri yang disonde kedalam hewan coba

dengan dosis 10^8 CFU yang nantinya akan dilakukan pencatatan efek

Salmonella Typhimurium tujuh hari kemudian untuk menilai kerentanan tubuh

terhadap infeksi setelah dilakukan pemberian bertahap dosis *self-antigen*

dsDNA dengan cara penghitungan kolonisasi bakteri pada organ hati dengan

menggunakan teknik kultur.

g. *Colonies Forming Units (CFU) counting* pada plates adalah metode *gold*

standard yang paling banyak digunakan dalam menghitung jumlah bakteri.

Metode CFU hanya menghitung bakteri yang hidup dan bukan bakteri mati

atau *debris* (Hazan *et al.*, 2012).

4.6 Alat dan Bahan Penelitian

4.6.1 Pemeliharaan Mencit

Untuk pemeliharaan mencit diperlukan kandang pemeliharaan mencit, tutup kandang dari anyaman kawat, sekam, botol minum, dan pakan standar mencit.

4.6.2 Isolasi dsDNA

Alat dan bahan yang digunakan adalah falcon 15cc, proteinase K 20 μ L, RNAse A 20 μ L, vortex, water bath, genomic lysis/binding buffer, alcohol absolut 200 μ L, spin column, elution buffer, alat sentrifus, nanodrop, eppendorf, pipet, vacutainer EDTA, dan kit Invitrogen.

4.6.3 Induksi Lupus pada Mencit

Bahan yang digunakan adalah pristan 0,5ml dan diinjeksikan ke mencit dengan sputit 1cc.

4.6.4 Preparasi dan injeksi dsDNA

Alat dan bahan yang digunakan adalah Laminar Air Flow, pipet, vortex, glukosa 5%, reagen *invivo-jetPEI*, larutan dsDNA 5x10 $^{-2}$ μ g, 5x10 $^{-1}$ μ g, 5 μ g, dan sputit 1cc.

4.6.5 Pengukuran kadar antibodi (ANA dan anti-dsDNA)

Cawan ELISA, PBS-T 0,2%, BSA 1%, serum antibodi primer, tabung, antibodi sekunder (*anti mouse IgG*), SA-HRP, TMB, HCl 1N, dan ELISA reader ($\lambda=450\text{nm}$).

4.6.6 Sonde *Salmonella Typhimurium*

Alat dan bahan yang digunakan adalah bakteri *Salmonella Typhimurium* 10^8

4.6.7 Pembedahan Mencit

Alat dan bahan yang digunakan adalah kloroform, kapas, *aluminium foil*,

wadah berukuran sedang, wadah berukuran kecil, gunting, pinset, jarum pentul, meja bedah, dan formalin.

4.6.8 Kultur Hati Mencit

Alat dan bahan yang digunakan adalah organ hati mencit, mortir, timbangan,

9 mL APW, *bismuth sulfite agar plate*, dan inkubator.

4.6.9 Sanitasi dan Higienisasi

Alat dan bahan yang digunakan adalah tempat cuci tangan, antiseptik, jas

laboratorium, masker, dan *handscoons*.

4.7 Metode Pengumpulan Data

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

diberikan makanan standar dan ditempatkan di dalam kandang. Penelitian ini

dilakukan setelah mendapat persetujuan etik darikomisi etik Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya.

4.7.2 Isolasi dsDNA

dsDNA diisolasi dari serum mencit menggunakan kit Invitro. Darah yang diambil dimasukkan ke dalam falcon 15cc. masing-masing falcon ditambahkan proteinase K sebanyak 20 μ L dan 20 μ L 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 55°C, vortex, dan lanjutkan inkubasi kembali selama 5 menit. Tambahkan alcohol absolut 200 μ L dalam falcon kemudian vortex 5 detik. Sebanyak 640 μ L 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.

4.7.3 Injeksi Pristan

Pristan 0,5 mL diinjeksikan secara intraperitoneal pada mencit sehat untuk menginduksi LES, lalu ditunggu dan dievaluasi tanda klinisnya selama 8-12 minggu (Pawar et al., 2014).

4.7.4 Preparasi dan injeksi dsDNA

Reagen *invivo-jetPEI* dilarutkan dalam setengah volume injeksi pada glukosa 5% dengan pelarut sterile water. Vortex perlahan dan lakukan *spin down*. Diambahkan larutan tersebut seluruhnya ke dalam larutan dsDNA sesuai tabel 4.1.

Vortex perlahan dan lakukan *spin down*. Dilakukan Inkubasi selama 15 menit pada suhu ruang hingga larutan menjadi stabil. dsDNA diinjeksikan secara intraperitoneal dengan konsentrasi $5 \times 10^{-2} \mu\text{g}$, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ secara berurutan pada kelompok perlakuan dengan interval injeksi setiap dosis 1 minggu.

Tabel 4.1 Dosis Injeksi dsDNA

Larutan	DOSIS dsDNA (μg)	Glukosa (μg)	dsDNA (μg)	H_2O (μg)	Volume Akhir (μg)
Universitas Brawijaya A	0,05	2750	11	2739	5500
	0,5	2750	110	2640	5500
	5	2750	462	2288	5500
Larutan	DOSIS dsDNA (μg)	Glukosa (μg)	PEI (μg)	H_2O (μg)	Volume Akhir (μg)
Universitas Brawijaya B	0,05	2618	132	2750	5500
	0,5	1430	1320	2750	5500
	5	2736,8	13,2	2750	5500

4.7.5 Pengukuran kadar antibodi (ANA dan anti-dsDNA)

Prosedur pengukuran dengan meng-coating antigen 1:20 dalam cawan ELISA, inkubasi *overnight* suhu 4°C , kemudian dicuci dengan PBS-T. Kemudian blocking dengan BSA 1%. Dicuci kembali dengan PBS-T. Antibodi primer (serum) diencerkan 1:500 dalam PBS, ditambahkan 100 ul dalam tabung di inkubasi selama 1 jam. Tabung dicuci kembali dengan 300 ul PBS-T 0,2 % selama 3 kali. Antibodi sekunder berlabel enzim (*anti mouse IgG*) 1:1000 ditambahkan pada tabung dengan inkubasi 1 jam. Cuci dengan PBS-T 0,2 %. Ditambahkan SA-HRP 1:1000 diinkubasi

selama 1 jam. Sel dicuci dengan PBS-T 0,2 %. Kemudian dilakukan penambahan

substrat (*sureblue*) TMB dan diinkubasi 30 menit. Tanpa membuang *sureblue* TMB,

reaksi distop dengan HCl 1N, inkubasi 15 menit. Kemudian dibaca ELISA reader

($\lambda=450\text{nm}$). Kadar ANA / *anti-dsDNA* ditunjukkan dalam $\mu\text{l}/\text{mL}$.

4.7.6 Pengukuran Kolonisasi Pada Organ Hati

Salmonella Typhimurium disonde kedalam hewan coba dengan dosis 10^8

CFU/mL pada hari ke-1 dan ke-3 dan diinkubasi selama 7 hari. Kemudian dilakukan

pembedahan terhadap organ. Organ hati diambil dari mencit lalu disimpan pada

wadah yang telah disediakan. Organ yang telah diambil digerus dengan mortir, lalu

ditimbang sama rata. Organ hasil gerusan yang telah ditimbang dibuat seri

pengenceran dengan APW (sampel organ dicampur dengan 9 mL APW kemudian

dihomogenkan, dilakukan hingga 4 kali pengulangan). Setelah itu dibiakkan pada

medium *bismuth sulfite agar plate*. Pembiakan dibiarkan di inkubasi selama 48 jam

dan dilakukan pengamatan serta penghitungan bakteri dengan *colony counter*.

4.8 Pengolahan Data

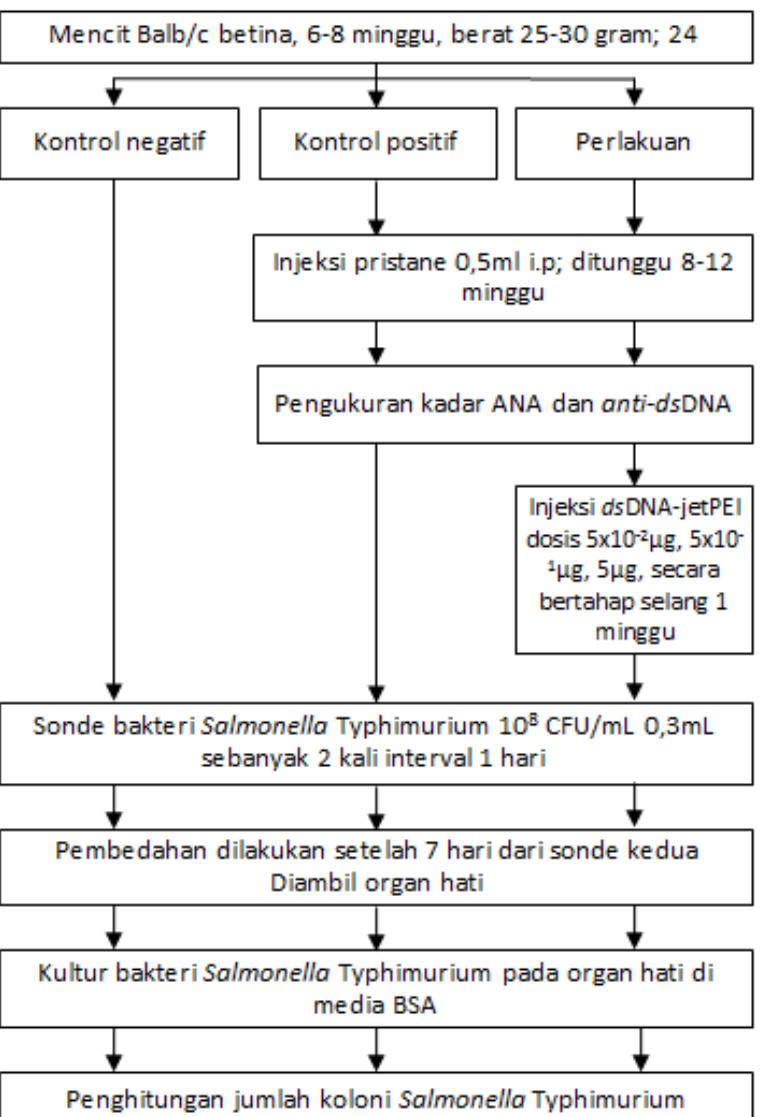
Hasil pengukuran koloni mencit dianalisa secara statistik dengan

menggunakan program *IBM SPSS Statistics* versi 24 dengan tingkat signifikansi

$0,05$ ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis

komparatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *Kruskall-Wallis* dan

uji *Mann-Whitney*.

4.9 Alur Penelitian**Bagan 4.1 Alur Penelitian**

28

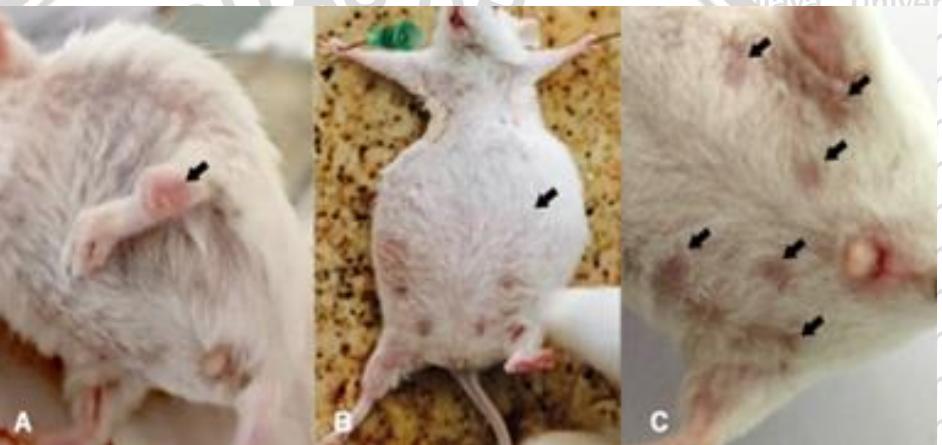
HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Induksi Lupus pada Mencit

Setelah 8-12 minggu paska injeksi pristan, mencit memperlihatkan manifestasi klinis penyakit seperti arthritis, asites, dan alopecia (Gambar 5.1).

Selain itu, dari hasil uji serologis, didapatkan hasil tes ANA positif (Li et al., 2018).



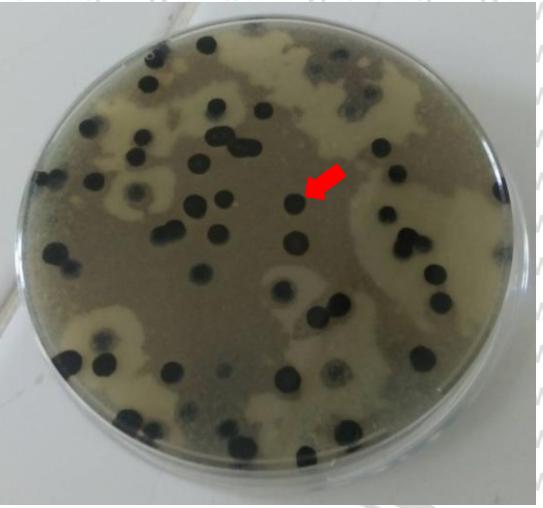
Gambar 5.1. Manifestasi Klinis Mencit Model Lupus Induksi Pristan

Panah hitam menunjukkan: (A) Inflamasi sendi. (B) produksi cairan abdominal atau asites. (C) Alopecia

5.1.2 Kultur dan Penghitungan Koloni Bakteri

Setelah mencit dibedah dan organ hati mencit diambil, dilakukan kultur akukan pengamatan serta penghitungan koloni bakteri dengan *colony*

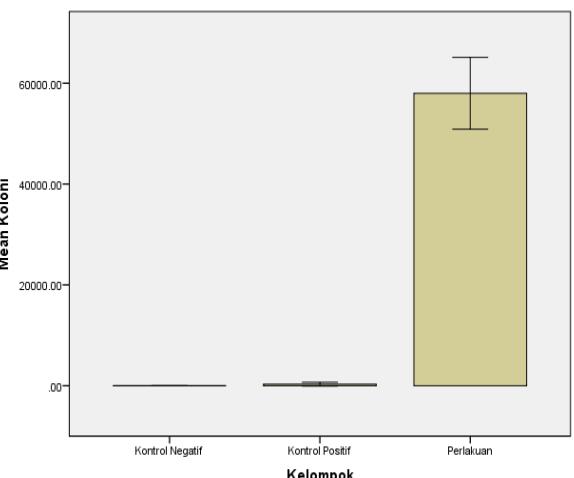
counter, Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas Brawijaya Universitas



Gambar 5.2 Koloni *Salmonella Typhimurium* pada Media BSA

Panah merah menunjukkan *black jet colony* yang khas ditemukan pada pertumbuhan bakteri *Salmonella* (Kumar, 2016).

Hasil *colony counter* dianalisa secara statistik dengan menggunakan program *IBM SPSS Statistics* versi 24 dengan tingkat signifikansi 0,05 ($p = 0,05$) dan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Langkah-langkah uji hipotesis komparatif adalah uji normalitas data, uji homogenitas varian, uji *Kruskall-Wallis* dan uji *Mann-Whitney*.



Kelompok	Rerata Koloni <i>Salmonella Typhimurium</i> ($r \pm SD$)
Negatif	$0,00 \pm 0,00$
Positif	$311,00 \pm 187,236$
Perlakuan	$58000,00 \pm 3559,026$

Tabel 5.1 Hasil Perhitungan Rerata Koloni *Salmonella Typhimurium* pada Hati Mencit yang diberikan Escalating Dose Immunotherapy (EDI) dengan dsDNA



5.2 Analisis Data

Data pada penelitian ini dianalisis dengan software SPSS versi 24 dan *output* analisis dapat dilihat pada lampiran.

5.2.1 Uji Asumsi Data

Sebelum data diatas dianalisis dengan menggunakan uji statistik, perlu dilakukan pengujian terhadap beberapa asumsi data, yaitu uji normalitas distribusi data dan uji homogenitas data.

5.2.1.1 Uji Normalitas Distribusi Data

Pada penelitian ini normalitas distribusi data diuji dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk*, karena jumlah sampel yang digunakan sedikit (kurang dari 50 sampel). Hasil uji normalitas menggunakan uji *one Shapiro-Wilk* menunjukkan distribusi dari data normal atau $p > 0,05$ (Tabel 5.1).

5.2.1.2 Uji Homogenitas Ragam Data

Untuk mengetahui ada atau tidaknya heterogenitas ragam data, perlu dilakukan uji kesamaan ragam, yaitu uji *Levene (Levene test homogeneity of variances)*. Berdasarkan uji *Levene*, nilai signifikansi data penelitian adalah kurang dari $p (0,05)$ yang membuktikan bahwa data tidak homogen, sehingga metode *Kruskall-Wallis* yang harus digunakan untuk menganalisis data (Tabel 5.1).

Tabel 5.2 Hasil uji Normalitas dan Homogenitas

Kelompok	Uji Normalitas	Uji Homogenitas
Negatif	-	
Positif	0,965	0,028
Perlakuan	0,405	



5.2.2 Uji Kruskall-Wallis

Pada hasil analisis *Kruskal-Wallis* didapatkan nilai signifikansi sebesar

0,006 ($p<0,05$), berarti terdapat perbedaan rerata koloni *Salmonella Typhimurium*

pada masing-masing kelompok. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok

perilaku, dilakukan uji lanjutan menggunakan uji *Mann-Whitney*.

5.2.3 Uji Mann-Whitney

Berdasarkan uji *Mann-Whitney* didapatkan nilai signifikansi $p<0,05$ (Tabel

5.2).

Tabel 5.3 Hasil Uji Mann-Whitney

Uji Mann-Whitney	Hasil Uji
Kelompok Negatif dan Kelompok Positif	0,014
Kelompok Negatif dan Kelompok Perlakuan	0,014
Kelompok Positif dan Kelompok Perlakuan	0,021

Sehingga dapat disimpulkan bahwa:

- a. Kelompok kontrol negatif berbeda signifikan dengan kelompok kontrol positif dan perlakuan.
- b. Kelompok kontrol positif berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif dan perlakuan.
- c. Kelompok perlakuan berbeda signifikan dengan kelompok kontrol negatif dan kontrol positif.



PEMBAHASAN

versitas Penelitian ini merupakan *True Experimental* dengan desain penelitian

Post-test Only Controlled Group Design. Penelitian jenis ini dipilih karena baik

sampel maupun perlakuan lebih terkendali, terukur, dan pengaruh perlakuan

lebih dapat dipercaya. Penelitian ini bertujuan bertujuan untuk mengetahui

pengaruh EDI dengan dsDNA terhadap jumlah koloni *Salmonella Typhimurium*

pada hati mencit Balb/C model lupus.

Mencit dibuat model lupus melalui injeksi pristap atau

tetramethylpentadecane (TMPD). Injeksi secara intraperitoneal pristap pada

menicit Balb/C dapat menginduksi produksi autoantibodi dan manifestasi klinis

LES, seoperi arthritis maupun glomerulonefritis (Reeves et al., 2009)

6.1 Pengaruh Lupus Eritematosus Sistemik yang Diinduksi Pristan

Terhadap Perbedaan Jumlah Koloni Bakteri *Salmonella* Typhimurium di

Hati

Berdasarkan hasil计数菌计数 bakteri yang telah dikultur, didapatkan

perbedaan yang signifikan antar kelompok, dimana pada kelompok LES (kontrol)

positif dan yang diberi tanda), didapatkan pertumbuhan jumlah kohesi yang tinggi.

Universitas Binaan Indonesia | Universitas Binaan Indonesia

Pada kelompok kontrol negatif tidak didapatkan koloni bakteri pada kultur

organ hati. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh status genetik dari mencit.

Penelitian terkait infeksi *Salmonella* umumnya dilakukan pada galur tikus yang

rentan seperti mencit BAL B/c atau C57BL/6 yang membawa alel Nram1

mutan. Namun, beberapa galur tikus yang membawa alel *Nramp1* tipe liar bisa



lebih tahan hingga 1000 kali lipat terhadap infeksi *Salmonella Typhimurium* daripada galur yang membawa alel Nramp1 mutan (Raupach *et al.*, 2006).

Selain itu, pada mencit yang sehat terdapat banyak variasi spesies bakteri dan mikroorganisme lainnya di saluran pencernaan. Mikrobiota memiliki peran penting dalam proteksi terhadap infeksi, termasuk *Salmonella Typhimurium*. Sebuah studi dilakukan pada mencit sehat yang terdapat bakteri *Mucispirillum schaedler* pada saluran cernanya dibandingkan dengan yang tidak terdapat *Mucispirillum schaedler*. Hasilnya menunjukkan bahwa *Mucispirillum schaedler* sebagai mikrobiota saluran cerna dapat memberikan proteksi terhadap infeksi *Salmonella Typhimurium*, melalui kompetisi mendapatkan nitrat, yakni nutrisi esensial untuk faktor virulensi *Salmonella Typhimurium* (Herp *et al.*, 2019). Studi tersebut menunjukkan adanya peran mikrobiota usus pada mencit sehat (kontrol negatif) bersifat protektif dan supresif terhadap pertumbuhan koloni bakteri.

Namun, variasi mikrobiota usus dapat berubah seiring muncul dan berkembangnya penyakit pada mencit. (Wang *et al.*, 2019). Pada penyakit autoimun dapat terjadi disfungsi dari mikrobiota usus. Disfungsi tersebut menyebabkan menurunnya *barrier* usus yang mengakibatkan mudahnya penyebaran infeksi bakteri ke hati (Konturek *et al.*, 2018). Hal ini menjelaskan terganggunya sifat protektif dan supresif terhadap pertumbuhan koloni bakteri oleh mikrobiota usus pada mencit LES. Sehingga sejalan dengan hasil didapatkan pertumbuhan jumlah koloni yang tinggi pada mencit LES dibandingkan mencit sehat.

Pertumbuhan koloni bakteri yang tinggi pada mencit LES juga sejalan dengan studi yang dilakukan Joshua *et al* yang menjelaskan bahwa penderita LES mengalami gangguan fungsi sistem imun yang disebabkan oleh penyakit



LES sendiri maupun obat-obatan imunosupresif, sehingga berisiko tinggi untuk semua jenis infeksi, termasuk *Salmonella* non-typhoidal (Joshua *et al.*, 2003).

Salah satu gangguan sistem imun pada LES yakni didapatkan peningkatan ekspresi TLR-7 dan TLR-9 dibandingkan kelompok sehat dan ekspresi tersebut berkorelasi positif dengan kadar sitokin proinflamasi IL-6, TNF- α , dan IFN- γ (Sanchez *et al.*, 2015). Sitokin-sitokin tersebut berperan dalam meningkatkan kerentanan infeksi serta mengganggu *clearance* bakteri (Duvigneau *et al.*, 2016).

Studi-studi tersebut dapat menjelaskan perbedaan kerentanan infeksi dan pertumbuhan koloni bakteri pada mencit sehat dan mencit yang telah diinduksi LES.

6.2 Pengaruh *Escalating Dose Immunotherapy* (EDI) dengan *self antigen*

dsDNA terhadap Jumlah Koloni Bakteri *Salmonella Typhimurium* pada Hati

Lupus Eritematosus Sistemik

Pada kelompok LES yang dipaparkan bakteri *Salmonella Typhimurium* dan sudah diterapi EDI dengan *self antigen dsDNA* didapatkan jumlah koloni bakteri dengan perbedaan yang signifikan dibandingkan dengan kelompok yang tidak diterapi, dimana jumlah koloni bakteri pada kelompok terapi jauh lebih tinggi.

Sebuah studi menggunakan metode EDI pada paparan *Myelin Basic Protein* untuk penyakit *Multiple Sclerosis* menunjukkan terjadinya induksi IL-10 yang memiliki peran penting dalam mekanisme regulasi yang efektif untuk terapi penyakit autoimun dan alergi. Induksi IL-10 ini juga terjadi pada paparan kronis infeksi dan berperan dalam membatasi gangguan imunitas pada infeksi kronis (Burton *et al.*, 2014). Studi lain menunjukkan pada pemberian DNA dari sel sehat didapatkan kadar pro-IL-1 β dan pro-IL-18 yang rendah (Imaeda *et al.*, 2009).



Substrat caspase-1, yakni IL-1 β dan IL-18 (bentuk matur pro-IL-1 β dan pro-IL-18), dapat berperan sebagai imunitas inat melawan infeksi *Salmonella*

Typhimurium (Raupach et al., 2006). Jika terapi EDI dengan *self antigen dsDNA*

dapat menghasilkan IL-10, IL-1 β dan IL-18 yang rendah maka terapi ini dapat

mengganggu regulasi terhadap infeksi dan meningkatkan kerentanan infeksi,

seperti infeksi *Salmonella Typhimurium* pada hati penderita LES.

Selain itu juga, studi lain menunjukkan pemberian *dsDNA* pada mencit

yang diinduksi asites terjadi apoptosis masif dinding sel saluran cerna. Fungsi

barrier dari dinding sel saluran cerna menurun cepat dan mengakibatkan

berkembangnya kontaminasi bakteri pada cairan asites hingga sepsis. Hal ini

terjadi bersamaan dengan apoptosis masif dan nekrosis sekunder dari sel asites,

yang mempercepat nekrosis di peritoneum dan dinding saluran cerna sehingga

meningkatkan kerentanan infeksi (Alyamkina et al., 2015).

Ketiga studi tersebut dapat menjelaskan tingginya pertumbuhan koloni

bakteri pada mencit yang diterapi dengan pemberian *dsDNA*, dibandingkan

dengan mencit yang tidak diterapi. Dari hasil penelitian dapat disimpulkan

pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan *self antigen dsDNA*

dapat meningkatkan kerentanan infeksi pada hati mencit yang diinduksi LES.



7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, diperoleh kesimpulan bahwa pemberian *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA dosis $5 \times 10^{-2} \mu\text{g}$, $5 \times 10^{-1} \mu\text{g}$, $5 \mu\text{g}$ meningkatkan jumlah koloni *Salmonella Typhimurium* pada hati mencit Lupus Eritematosus Sistemik. Hal ini menunjukkan bahwa terapi *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA dapat meningkatkan kerentanan infeksi.

7.2 Saran

Berdasarkan kesimpulan yang telah dikemukakan, maka diberikan saran-saran yang dapat diambil untuk menyempurnakan penelitian yang telah dilakukan, yaitu sebagai berikut:

- 1) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA.
- 2) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai regulasi sistem imun terhadap berbagai infeksi dalam terapi *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA.
- 3) Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut membandingkan terapi konvensional dengan terapi metode *escalating dose immunotherapy* (EDI) dengan dsDNA.

DAFTAR PUSTAKA

Abbas, A.K., Lichtman, A.H., & Pillai, S. (2014) Basic Immunology, Fourth Edition.

Philadelphia: Elsevier.

Adiga, A. and Nugent, K. (2016) 'Author ' s Accepted Manuscript', *The American*

Journal of the Medical Sciences. Elsevier. doi: 10.1016/j.amjms.2016.10.014.

Alyamkina, E. A. et al. (2015) 'Combination of cyclophosphamide and double-stranded DNA demonstrates synergistic toxicity against established xenografts', pp. 1–14. doi: 10.1186/s12935-015-0180-6.

Bessone, F., Poles, N. and Roma, M. G. (2014) 'Challenge of liver disease in systemic lupus erythematosus: Clues for diagnosis and hints for pathogenesis', 6(6), pp. 394–409. doi: 10.4254/wjh.v6.i6.394.

Burton, B. R. et al. (2014) 'Sequential transcriptional changes dictate safe and effective antigen-specific immunotherapy', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 5, pp. 1–13. doi: 10.1038/ncomms5741.

Centers for Disease Control and Prevention. (2019) 'Salmonellosis (Nontyphoidal)', <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/salmonellosis-nontyphoida>. Diakses 5 November 2019.

Christensen, S. R., Kashgarian, M., Alexopoulou, L., Flavell, R. A., Akira, S., & Shlomchik, M. J. (2005) 'Toll-like receptor 9 controls anti-DNA autoantibody production in murine lupus', *The Journal of experimental medicine*, 202(2), pp: 321–331. doi:10.1084/jem.20050338.

- Duvigneau, S., Sharma-chawla, N. and Boianelli, A. (2016) 'Hierarchical effects of pro- inflammatory cytokines on the post-influenza susceptibility to pneumococcal coinfection', *Nature Publishing Group*: Nature Publishing Group, (August), pp. 1–11. doi: 10.1038/srep37045.
- Gerona, J. G. and Navarra, S. V (2009) 'Salmonella infections in patients with systemic lupus erythematosus : a case series', pp. 319–323.
- Handono, K. et al (2014) 'Vitamin D Prevents Endothelial Damage Induced by Increased Neutrophil Extracellular Traps Formation in Patients with Systemic Lupus Erythematosus', *Acta Med Indones - Indones J Intern Med*, 46(3), pp. 189–198.
- Hazan, R. et al. (2012) 'A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates', *BMC Microbiology*. BMC Microbiology, 12(1), p. 1. doi: 10.1186/1471-2180-12-259.
- Herp, S. et al. (2019) 'Mucispirillum schaedleri Antagonizes Salmonella Virulence to Protect Mice against Colitis Article Mucispirillum schaedleri Antagonizes Salmonella Virulence to Protect Mice against Colitis', pp. 1–14. doi: 10.1016/j.chom.2019.03.004.
- Imaeda, A. B. et al. (2009) 'Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome Find the latest version : Acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice is dependent on Tlr9 and the Nalp3 inflammasome', 119(2), pp. 305–314. doi: 10.1172/JCI35958.sive.
- Infodatin. (2017) 'Situasi Lupus di Indonesia', <https://www.depkes.go.id>. Diakses 10 Oktober 2018.

- Joshua, F. (2003) 'Salmonella typhimurium mediastinal abscess in a patient with systemic lupus erythematosus', pp. 710–713.
- Kasturi, S. (2016) 'Corticosteroids in Lupus', *Rheumatic Disease Clinics of NA*. Elsevier Inc, 42(1), pp. 47–62. doi:10.1016/j.rdc.2015.08.007.
- Konturek, P. C. et al. (2018) 'medical sciences Gut – Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver ?' doi: 10.3390/medsci6030079.
- Kumar, S. (2016) Essentials of Microbiology. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers.
- Leuchten, N. et al. (2018) 'Performance of Antinuclear Antibodies for Classifying Systemic Lupus Erythematosus : A Systematic Literature Review and Meta-Regression of Diagnostic Data', 70(3), pp. 428–438. doi: 10.1002/acr.23292.
- Li, W., Titov, A. A. and Morel, L. (2018) 'HHS Public Access', 29(5), pp. 434–441. doi: 10.1097/BOR.0000000000000412.An.
- Lim, E. et al. (2001) 'Non-thyphoidal salmonellosis in patients with systemic lupus erythematosus . A study of ®fty patients and a review of the literature', (2001).
- Lin, F. et al. (1987) 'Electron microscopic studies on the location of bacterial proliferation in the liver in murine salmonellosis', pp. 539–550.
- Lin, Y. et al. (2017) 'Salvianolic acid A alleviates renal injury in systemic lupus erythematosus induced by pristane in BALB / c mice', *Acta Pharmacologica Sinica B*. Elsevier B.V., 7(2), pp. 159–166. doi: 10.1016/j.apsb.2016.07.001.
- Lomakin, Y. et al. (2016) 'Administration of Myelin Basic Protein Peptides

Encapsulated in Mannosylated Liposomes Normalizes Level of Serum TNF-

alpha and IL-2 and Chemoattractants CCL2 and CCL4 in Multiple Sclerosis

Patients', *Mediators of Inflammation*, pp. 1–8 . doi:10.1155/2016/2847232.

Lupus Foundation of America. (2013). 'Lupus facts and statistics'. Diakses 5

November 2019.

Malkiel, S. and Diamond, B. (2016) *Anti-DNA Antibodies, Systemic Lupus Erythematosus: Basic, Applied and Clinical Aspects*. Elsevier. doi:

10.1016/B978-0-12-801917-7.00024-3.

Nobee, A. et al. (2015) 'Systemic Lupus Erythematosus (SLE): A 360 Degree

Review', 3(4), pp. 60–63. doi: 10.12691/ajcmr-3-4-1.

Pawar, R. et al. (2014) 'Serum autoantibodies in pristane induced lupus are

regulated by neutrophil gelatinase associated lipocalin', *Clinical*

Immunology, 154(1), pp. 49–65. doi: 10.1016/j.clim.2014.06.007.

Petri, M. et al. (2013) 'NIH Public Access', 64(8), pp. 2677–2686. doi:

10.1002/art.34473.Derivation.

Raupach, B. et al. (2006) 'Caspase-1-Mediated Activation of Interleukin-1 (IL-1) and

IL-18 Contributes to Innate Immune Defenses against *Salmonella enterica*

Serovar Typhimurium Infection', 74(8), pp. 4922–4926. doi:

10.1128/IAI.00417-06.

Reeves, W.H., Lee, P.Y., Weinstein, J.S., Satoh, M., Lu, L. (2009) ' Induction of

autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons', 30(9),

- Rottman, J. B. and Willis, C. R. (2010) 'Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus Reveal a Complex Pathogenesis', 47(4), pp. 664–676. doi: 10.1177/0300985810370005.
- Sakaguchi, S. (2000) 'Animal models of autoimmunity and their relevance to human diseases', pp. 684–690.
- Sánchez, B. (2015) 'Interaction of Intestinal Microorganisms with the Human Host in the Framework of Autoimmune Diseases', 6(November), pp. 1–9. doi: 10.3389/fimmu.2015.00594.
- Shizuma, T. (2015) 'Rheumatology : Current Liver Complications Associated with Systemic Lupus Erythematosus', 5(1), pp. 1–5. doi: 10.4172/2161-1149.1000146.
- Tahernia, Leili et al. (2017) 'Cytokines in systemic lupus erythematosus : their role in pathogenesis of disease and possible therapeutic opportunities', 2(1), pp. 1–9. doi: 10.22631/rr.2017.69997.1010.
- Tahernia, Leila et al. (2017) 'Frequency and Type of Hepatic and Gastrointestinal Involvement in Juvenile Systemic Lupus Erythematosus', pp. 1–5. doi: 10.1155/2017/8097273.
- Umezawa, K. et al. (1995) 'Granulation in Livers of Mice Infected with *Salmonella typhimurium* Is Caused by Superoxide Released from Host Phagocytes', 63(11), pp. 4402–4408.
- Wahono, C. S. et al. (2014) 'Effects of 1,25(OH)₂D₃ in immune response regulation

of systemic lupus erithematosus (SLE) patient with hypovitamin D', 7(1), pp. 22–31.

Wang, J. et al. (2019) 'Core Gut Bacteria Analysis of Healthy Mice', 10(April), pp. 1–14. doi:10.3389/fmicb.2019.00887.

Zhang, S. et al. (2003) 'Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium-Induced MINIREVIEW Molecular Pathogenesis of *Salmonella enterica* Serotype'. doi: 10.1128/IAI.71.1.1.

