

**PENGARUH STATIN DAN ANTIBODI LPS TERHADAP TNF- $\alpha$ , OKSIDATIF  
STRESS DAN PENANDA BIOKIMIWI DARI DISFUNGI ORGAN  
TIKUS MODEL SEPSIS IIP *E. coli***

**DISERTASI**

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Doktor



oleh :

**DIAN SAMUDRA**

**NIM 117070100011008**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN  
PROGRAM PASCA SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**

**PENGARUH STATIN DAN ANTIBODI LPS TERHADAP TNF- $\alpha$ , OKSIDATIF  
STRESS DAN PENANDA BLOKIMIAWI DARI DISFUNSI ORGAN  
TIKUS MODEL SEPSIS IIP *E. coli***

**DISERTASI**

Untuk Memenuhi Persyaratan  
Memperoleh Gelar Doktor



oleh :

**DIAN SAMUDRA**

**NIM 117070100011008**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN  
PROGRAM PASCA SARJANA FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2019**



LEMBAR PENGESAHAN

PENGARUH STATIN DAN ANTIBODI LPS TERHADAP TNF- $\alpha$ , OKSIDATIF STRESS  
DAN PENANDA BIOKIMIWI DARI DISFUNGI ORGAN  
TIKUS MODEL SEPSIS IIP *E. coli*

DISERTASI

Oleh

Nama : DIAN SAMUDRA  
NIM : 117070100011008  
Minat : Biomedik  
Program : Doktor Ilmu Kedokteran

Mengetahui,  
Komisi Pembimbing,  
ketua

Prof. Dr. dr. Sumarno, DMM., SpMK(K)  
Promotor

Anggota 1,

Anggota 2,

Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H., SpMK(K) ko-promotor 1, Dr. dr. Aswoco Andyk Asmoro, SpAn., FIPM ko-promotor 2

## PERNYATAAN ORISINALITAS DISERTASI

Saya menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah DISERTASI ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah DISERTASI ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia DISERTASI ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh (DOKTOR) dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang, 17 Desember 2019

Mahasiswa,

Nama : dr. Dian Samudra, Sp.PD



**IDENTITAS TIM PENGUJI**

**PENGARUH STATIN DAN ANTIBODI LPS TERHADAP TNF- $\alpha$ , OKSIDATIF STRESS, DAN PENANDA BIOKIMIWI DARI DISFUNGI ORGAN TIKUS MODEL SEPSIS IIP E.coli. DISERTASI**

Nama Mahasiswa : Dian Samudra

NIM : 117070100011008

Program Studi : DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Minat : BIOMEDIK

Komisi Promotor : Prof.Dr.dr.Sumarno Reto Prawiro,DMM., SpMK(K)

Ko-Promotor 1 : Prof.Dr.dr.Sanarto Santoso,DTMH&H.,SpMK(K)

Ko-Promotor 2 : Dr.dr.Aswoco Andyk Asmoro,SpAn., FIPM

Tim Dosen Penguji :

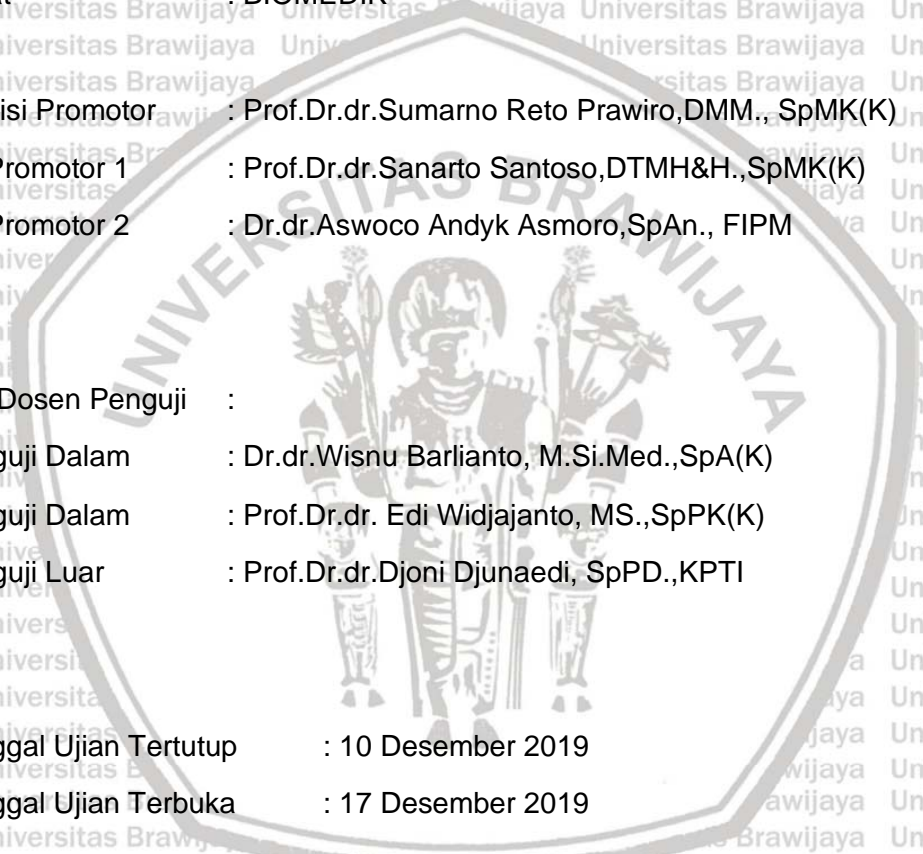
Penguji Dalam : Dr.dr.Wisnu Barlianto, M.Si.Med.,SpA(K)

Penguji Dalam : Prof.Dr.dr. Edi Widjajanto, MS.,SpPK(K)

Penguji Luar : Prof.Dr.dr.Djoni Djunaedi, SpPD.,KPTI

Tanggal Ujian Tertutup : 10 Desember 2019

Tanggal Ujian Terbuka : 17 Desember 2019



**PERNYATAAN KOMUNIKASI DAN PUBLIKASI ILMIAH**

Dian Samudra, Sumarno Reto Prawiro, Sanarto Santoso, Aswoco Andyk Asmoro

The Effects of Statin and LPS antibody on TNF- $\alpha$ , Oxidative Stress and Biochemical Markers of Organ Dysfunction in Rat Models Sepsis IIP *E. coli*

Journal of Global Pharma Technology (ISSN: 0975 -8542 )





**PERUNTUKAN**

Puji syukur kehadiran Allah SWT, Tuhan seru sekalian alam atas segala rahmad, hidayah, petunjuk dan ijinNya maka penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul :

**Pengaruh Statin Dan Antibodi LPS Terhadap TNF- $\alpha$ , Oksidatif Stress Dan Penanda Biokimiawi Dari Disfungsi Organ Pada Tikus Model Sepsis IIP *E. Coli***

Dengan selesainya disertasi ini perkenankan penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya dan penulis persembahkan disertasi ini untuk orang-orang tercinta :

1. Bapak dan ibu tercinta dr.H. Soebarno, SpA (Alm) dan Hj.Kustumitahsih (Alm) yang memberikan inspirasi penulis untuk melanjutkan sekolah ke jenjang S3 dan karena Doa mereka penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.
2. Istri tercinta Nike Kusumawati, ST yang dengan sabar mendampingi dan selalu memberikan dorongan penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.
3. Untuk anak- anak tercinta : Arrafi Dani Kuspratama, Farel Zakwan dan Athalla Virendra Kuswardana, capailah cita-citamu setinggi-tingginya.
4. Kakak dan Adik tercinta dr.Medica Lenty dan Lenta Andhika SE yang memberikan dorongan dan doa dalam menyelesaikan disertasi ini
5. Bapak dan Ibu mertua dr.H Kuswardjojo, SpA (Alm) dan Hj.Dumiastuti atas segala dukungan, Doa dan motivasinya.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadirat Allah SWT, Tuhan seru sekalian alam atas segala rahmad, hidayah, petunjuk dan ijinNya maka penulis dapat menyelesaikan disertasi yang berjudul :

**Pengaruh Statin Dan Antibodi LPS Terhadap TNF- $\alpha$ , Oksidatif Stress Dan Penanda Biokimiawi Dari Disfungsi Organ Pada Tikus Model Sepsis IIP *E. coli***

Disertasi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memenuhi ujian guna memperoleh gelar Doktor pada Program Doktor Ilmu Kedokteran Minat Biomedik, Program Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Disertasi ini mengangkat masalah membuat tikus model sepsis IIP *E.coli* dan pemberian perlakuan statin, antibodi LPS (AbLPS), dan kombinasi statin+AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.

Dengan selesainya disertasi ini perkenankan penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat :

1. Rektor Universitas Brawijaya Malang, Prof. Dr. Ir. Nuhfil Hanani, MS dan mantan Rektor Prof. Dr. Ir. Mohammad Bisri, MS serta Prof. Dr. Ir Yogi Sugito yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Universitas Brawijaya.
2. Dekan FKUB Dr. dr. Wisnu Barlianto, M.Med, SpA(K) dan mantan dekan FKUB Dr. dr. Sri Andarini, MKes dan Dr. dr. Karyono Mintaroem, Sp.PA yang telah memberi kesempatan, dukungan dan segala fasilitas kepada saya untuk mengikuti dan menyelesaikan pendidikan Program Doktor di Universitas Brawijaya.
3. Ketua Program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Prof. Dr. dr.Kusworini Handono, MKes dan mantan KPS Prof. dr. M. Aris Widodo, MS, Sp.FK, PhD yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk mengikuti pendidikan Program Doktor di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
4. Prof.Dr.dr. Sumarno Reto Prawiro, DMM,SPMK(K) selaku promotor, Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM&H,SpMK(K) dan Dr.dr. Aswoco Andyk Asmoro, SpAn selaku ko-



- promotor yang telah memberikan ilmu, arahan, bimbingan dan motivasi dengan penuh ketelitian dan kesabaran sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.
5. Prof.Dr.dr. Edi Widjajanto, MS.,SpPK.(K), Prof.Dr.dr Djoni Djunaidi, SpPD-KPTI, Dr. dr. Wisnu Barlianto, MSi.Med.,SpA.(K), selaku penguji yang telah memberikan saran, arahan dan masukan yang sangat berharga bagi perbaikan disertasi ini.
  6. Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Doktor di Universitas Brawijaya Malang
  7. Rumah Sakit Umum Daerah Sidoarjo yang telah memberikan kesempatan pada saya untuk mengikuti Program Pendidikan Doktor di Universitas Brawijaya Malang
  8. Kepala Laboratorium Farmakologi Prof. Dr. dr. Nurdiana, M.Kes, dan mantan Lepala Laboratorium Farmakologi DR. dr. Umi Kalsum serta seluruh keluarga besar Lab. Farmakologi FKUB atas ijin, dukungan dan bantuannya sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.
  9. Keluarga besar dr.H. Soebarno, SpA dan Keluarga besar dr.H Kuswardjojo, SpA, atas segala dukungan dan motivasinya. Suami dan anak-anak tercinta atas segala keihlasan, kesabaran dan dukungan yang tak hingga sehingga saya dapat menyelesaikan disertasi ini.
  10. Dr. Husnul Khotimah, S.Si. Mkes selaku evaluator makalah, atas segala saran, arahan dan bimbingan yang memberikan manfaat besar untuk penulisan disertasi ini.
  11. Emy Koestanti Sabdongrum, Drh., Mkes dan Dr. Soeharsono, Drh., M.S atas segala bantuannya.
  12. Teman-teman PDIK angkatan 2011 dan 2012 atas kebersamaan, dukungan dan motivasinya.

13. Seluruh pihak yang terlibat secara langsung maupun tak langsung dalam penyelesaian disertasi ini, yang tidak dapat saya sebutkan satu-persatu.

Sangat saya sadari bahwa masih terdapat keterbatasan dan kekurangan dalam penulisan disertasi ini, oleh karena itu dengan penuh kerendahan hati saya mengharapkan saran dan masukan demi perbaikan disertasi ini.

Malang, Desember 2019

Penulis





## RINGKASAN

**Pengaruh Statin Dan Antibodi LPS Terhadap Tnf- $\alpha$ , Oksidatif Stress Dan Penanda Biokimiawi Dari Disfungsi Organ Pada Tikus Model Sepsis IIP *E. coli*.** Dian Samudra. Promotor : Prof. Dr. Dr. Sumarno RP, DMM, SpMK., Dr. Dr. Andyk Aswoco, SpAn(K), Prof. Dr. Dr. Sanarto Santoso, DMM, SPMK

Sepsis merupakan sindroma klinik karena respon tubuh secara berlebihan terhadap infeksi. Sepsis juga disertai penggandaan respon host terhadap infeksi yang menyebabkan disregulasi dari respon host. Di seluruh dunia sekitar 13 juta orang menderita sepsis dan 4 juta orang meninggal setiap tahunnya dan meningkat diperkirakan akan terus meningkat. Gejala dan tanda sepsis yang bervariasi menimbulkan tanda kesakitan secara sistemik. Biaya yang dikeluarkan pasien untuk penanganan sepsis juga tidak sedikit. Sepsis sampai saat ini merupakan penyebab kematian terbesar di unit perawatan intensif. Oleh karena itu perlu penanganan tepat dan cepat untuk segera dapat mengatasi keadaan ini.

Penyebab infeksi yang mengarah pada sepsis dapat berupa infeksi bakteri, jamur, virus atau parasit. Lipopolisakarida (LPS) merupakan bagian *outer membrane* bakteri *gram negative* yang memiliki sifat patogen. Induksi *E. coli* menyebabkan peningkatan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-6 dan IL-1. Target terapi saat ini adalah anti-lipid, IL-1 antagonis, anti-TNF- $\alpha$ . Statin diketahui dapat menghambat ekspresi TNF- $\alpha$ , NFkB, AP-1 dan MCP-1 akibat induksi *E. coli*. Biomarker yang sering digunakan untuk mengetahui kondisi sepsis adalah berbagai mediator inflamasi. Oleh karena inflamasi selalu diikuti dengan tekanan oksidatif sehingga keseimbangan oksidan dan antioksidan memiliki peran penting untuk menghambat progresifitas sepsis.

Tujuan penelitian untuk mengetahui perlakuan IIP *E. coli* pada control terhadap perubahan mediator proinflamasi yang meliputi TNF a, Hs-CRP, PCT, MDA, fungsi ginjal (ureum, BUN dan kreatinin) dan fungsi hepar (SGPT, SGOT dan total bilirubin) serta untuk mengetahui pengaruh pemberian statin, antibody LPS, dan kombinasi keduanya pada perlakuan IIP *E. coli* pada jam ke nol dan ketiga.

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan *E. coli* terhadap control akan berpengaruh terhadap peningkatan kadar mediator proinflamasi yang meliputi TNF $\alpha$ , Hs-CRP, PCT, MDA, fungsi ginjal (ureum, BUN dan kreatinin) dan fungsi hepar (SGPT, SGOT dan total bilirubin). Pemberian statin, menunjukkan perubahan penurunan signifikan pada jam ke nol untuk parameter MDA dan pada jam ketiga untuk parameter TNF-a dan Hs-CRP. Pemberian AbLPS menunjukkan perubahan penurunan signifikan pada jam ke nol untuk parameter MDA, kreatinin, dan total bilirubin dan pada jam ke tiga untuk parameter MDA. Pemberian kombinasi statin dan AbLPS menunjukkan perubahan penurunan signifikan pada jam ke nol untuk parameter MDA, kreatinin, total bilirubin dan pada jam ketiga untuk parameter kreatinin, total bilirubin.



## SUMMARY

**The Effects of Statin and LPS antibody on TNF- $\alpha$ , Oxidative Stress and Biochemical Markers of Organ Dysfunction in Rat Models Sepsis IIP *E. coli*.** Dian Samudra. Promotor : Prof. Dr. Dr. Sumarno RP, DMM, SpMK., Dr. Dr. Andyk Aswoco, SpAn(K), Prof. Dr. Dr. Sanarto Santoso, DMM, SPMK

Sepsis is a clinical syndrome caused by the body's excessive response to infection. Sepsis is also accompanied by a doubling of the host response to infection that causes dysregulation of the host response. There are approximately 13 million people on the world who have Sepsis and 4 millions die every year and it is predicted that the number keeps increasing. Varied symptoms and signs of sepsis cause systemic signs of pain. Costs spent by patients for sepsis are also not small. Until now Sepsis is the main cause of death in the intensive care unit. Therefore, it needs proper and fast handling to immediately overcome this situation. The causes of infections that lead to sepsis can be a bacterial, fungal, viral or parasitic infections. Lipopolysaccharides (LPS) are part of the outer membrane of gram negative bacteria that has pathogenic properties.

*E. coli* induction causes an increase in proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1. The current therapeutic targets are the anti-lipid, IL-1 antagonist, anti-TNF- $\alpha$ . It is known that Statins can inhibit the expression of TNF- $\alpha$ , NF $\kappa$ B, AP-1 and MCP-1 due to the induction of *E. coli*.

The biomarkers that are often used to determine the condition of sepsis are various inflammatory mediators. The inflammation is always accompanied with oxidative pressure so that the balance of oxidants and anti-oxidants has important role to inhibit the progression of Sepsis.

The objective of this study is to determine the treatment of IIP *E. coli* in control of changes in proinflammatory mediators including TNF  $\alpha$ , Hs-CRP, PCT, MDA, kidney function (ureum, BUN and creatinine) and liver function (SGPT, SGOT and total bilirubin) and to find out the effect of hunting statins, LPS antibodies, and a combination of both on IIP *E. coli* treatment at the zero and third hours.

This study shows that *E. coli* treatment in control the changes of proinflammatory mediators will influence the increase in proinflammatory mediator levels including TNF- $\alpha$ , Hs-CRP, PCT, MDA, kidney function (ureum, BUN and creatinine) and liver function (SGPT, SGOT and total bilirubin). Statin administration shows a significant decrease in the zero hour for MDA parameters but in the third hour for TNF- $\alpha$  and Hs-CRP ones. AbLPS administration shows a significant decrease in the zero hour for the MDA parameter, creatinine, and total bilirubin but in the third hour for the MDA parameters.

The combination of statin and AbLPS administration shows a significant decrease in the zero hour for MDA, creatinine, and total bilirubin parameters but in the third hour for creatinine parameters, and total bilirubin.



DAFTAR ISI

Sampul .....	i
Halaman Judul .....	ii
Halaman Pengesahan .....	iii
Halaman Pernyataan Orisinalitas .....	iv
Halaman Identitas Tim Penguji .....	v
Halaman Pernyataan Komunikasi dan Publikasi Ilmiah .....	vi
Halaman Peruntukan .....	vii
Halaman Kata Pengantar .....	viii
Ringkasan .....	xi
Summary .....	xii
Daftar isi .....	xiii
Daftar table .....	xviii
Daftar gambar .....	xx
Daftar singkatan .....	xxii
<b>BAB 1 PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1. Latar belakang .....	1
1.2. Rumusan masalah umum penelitian .....	5
1.2.1. Rumusan masalah khusus penelitian .....	6
1.3. Tujuan penelitian .....	7
1.3.1. Tujuan umum .....	7
1.3.2. Tujuan khusus .....	7
1.4. Manfaat penelitian .....	8
1.4.1. Pengembangan ilmu pengetahuan .....	8
1.4.2. Manfaat klinis .....	9
<b>BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>10</b>
2.1. Sepsis .....	10
2.1.1. Batasan sepsis .....	10
2.1.2. Epidemiologi sepsis .....	13
2.1.3. Patomekanisme Sepsis .....	14
2.1.4. Inflamasi pada Sepsis .....	16
2.1.5. Koagulasi pada Sepsis .....	23
2.1.6. Kematian Sel pada Sepsis .....	26
2.1.6.1. Jalur Kematian Sel .....	26
2.1.6.2. Respon Akibat Kematian Sel .....	30

2.1.7. Kegagalan Sistem Imun pada Sepsis.....	33
2.1.8. Sepsis dan Disfungsi Organ.....	34
2.1.8.1. <i>Mekanisme Disfungsi Organ</i> .....	42
2.1.8.2. Gagal Kardiovaskuler.....	51
2.1.8.3. Gagal Ginjal.....	54
2.2. Lipopolisakarida (LPS).....	57
2.2.1. Struktur LPS.....	58
2.2.2. Interaksi LPS dan Host.....	59
2.2.3. TLR4 dan Aktivasinya.....	61
2.2.4. Amplifikasi Sinyal.....	62
2.2.5. Sinyal Terkait Sepsis.....	69
2.3. Peran Statin pada Sepsis.....	74
2.3.1. Efek Antiinflamasi.....	76
2.3.2. Efek terhadap Sel.....	77
2.3.3. Efek terhadap Sitokin.....	79
2.3.4. Efek terhadap Koagulasi.....	80
2.4. Tikus Sepsis.....	81
2.4.1. <i>Caecal Ligation Puncture (CLP)</i> .....	82
2.4.2. Induksi LPS (Lipopolisakarida).....	83
2.5. Antibodi.....	86
2.5.1. Sifat Kimia.....	86
2.5.2. Interaksi Antigen-Antibodi.....	86
2.5.3. Klasifikasi.....	88
2.5.4. Produksi.....	89
2.5.5. Aplikasi.....	91
2.6. Kerangka teori.....	93
<b>BAB 3 KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA.....</b>	<b>94</b>
3.1. kerangka Konsep.....	94
3.2. Keterangan Kerangka konsep.....	95
3.3. Hipotesis.....	96
3.3.1. Hipotesis Penelitian.....	96
3.3.2. Hipotesis minor.....	96
<b>BAB 4 METODE PENELITIAN.....</b>	<b>98</b>
4.1. Desain Penelitian.....	98
4.2. Waktu dan Tempat Penelitian.....	98
4.3. Sampel Penelitian.....	98



4.4. Variable penelitian.....	100
4.4.1. Variable bebas.....	100
4.4.2. Variable terikat.....	100
4.5. Alat dan Bahan.....	100
4.5.1. Alat.....	100
4.5.2. Bahan.....	100
4.6. Prosedur Penelitian.....	101
4.6.1. Pemberian Statin.....	101
4.6.2. Disfungsi organ.....	101
4.6.3. Metode Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$ .....	101
4.6.4. Metode Pemeriksaan hs-CRP.....	102
4.6.5. Metode Pemeriksaan pro-calcitonin.....	102
4.6.6. Metode Pemeriksaan Malondialdehid.....	103
4.7. Definisi operasional variable.....	103
4.8. Alur Penelitian.....	104
<b>BAB 5 HASIL PENELITIAN.....</b>	<b>105</b>
5.1. Perbedaan Rataan dan Simpangan Baku Variable Perlakuan Control dan IIP <i>E. coli</i> .....	105
5.2. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 terhadap mediator Proinflamasi TNF- $\alpha$ pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	106
5.3. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 terhadap mediator Proinflamasi hs-CRP (high-sensitivity C-reactive protein) pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	107
5.4. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 terhadap mediator Proinflamasi PCT (procalcitonin) pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	108
5.5. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap stress oksidatif (MDA) pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	110
5.6. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Ureum pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	111
5.7. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap BUN pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	112
5.8. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap kreatinin pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	114
5.9. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap	



SGPT pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	117
5.10. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	118
5.11. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Total Bilirubin pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	119
<b>BAB 6 PEMBAHASAN</b> .....	122
6.1. Pengaruh perlakuan IIP <i>E. coli</i> terhadap kadar mediator proinflamasi (TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT), stress oksidatif (MDA), fungsi ginjal (ureu, BUN, Kreatinin), fungsi hepar (SGOT, SGPT, total bilirubin).....	122
6.2. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan Kombinasi Statin + AbLPS terhadap mediator Proinflamasi TNF- $\alpha$ pada model tikus sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	124
6.3. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan Kombinasi Statin + AbLPS terhadap hs-CRP pada model tikus sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	125
6.4. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan Kombinasi Statin + AbLPS terhadap procalsitonin (PCT) pada model tikus sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	126
6.5. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap stress oksidatif (MDA) pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	127
6.6. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Ureum pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	128
6.7. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap BUN pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	129
6.8. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Kreatinin pada Model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	130
6.9. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap SGPT pada model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	131
6.10. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap SGOT pada model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	132
6.11. Pengaruh Statin, AbLPS dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap total bilirubin pada model Tikus Sepsis IIP <i>E. coli</i> .....	132
6.12. Keterbatasan penelitian.....	135
6.13. Kebaruan Penelitian.....	135
<b>BAB 7 KESIMPULAN</b> .....	136
7.1. Kesimpulan.....	136
7.2. Saran.....	137
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	138
Lampiran.....	154



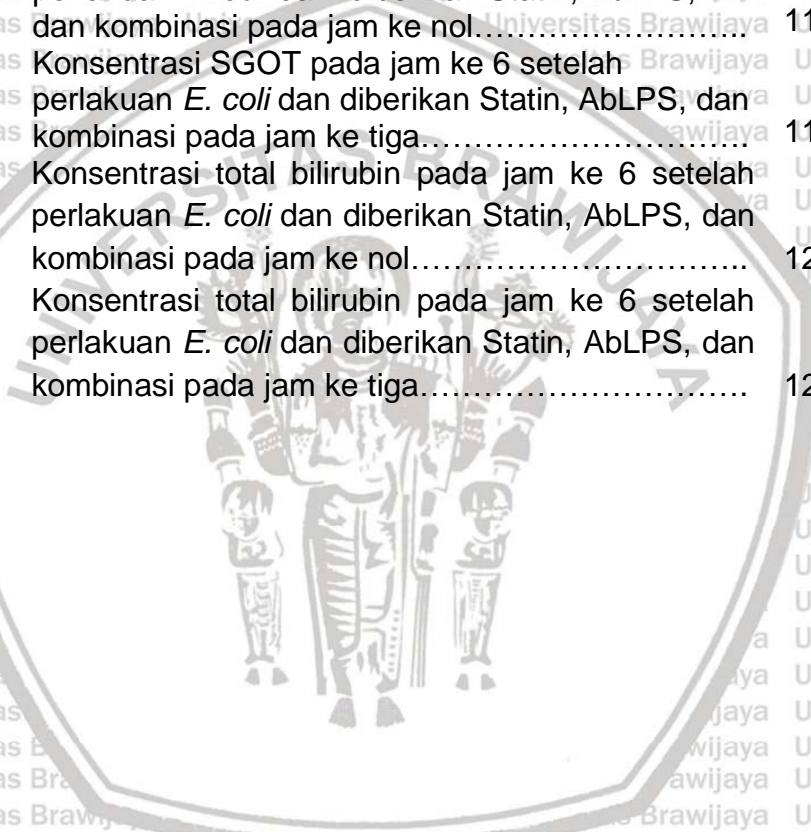


DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 2.1	10
Tabel 2.2	11
Tabel 2.3	18
Tabel 2.4	84
Tabel 5.1	105
Table 5.2.	106
Tabel 5.3.	106
Tabel 5.4.	107
Table 5.5.	107
Tabel 5.6.	108
Tabel 5.7.	108
Tabel 5.8.	110
Tabel 5.9	110
Tabel 5.10	112
Tabel 5.11	112
Tabel 5.12	113
Table 5.13	113



Tabel 5.14	Konsentrasi kreatini pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol.....	114
Tabel 5.15	Konsentrasi kreatinin pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol.....	115
Table 5.16	Konsentrasi SGPT pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol.....	117
Tabel 5.17	Konsentrasi SGPT pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga.....	117
Tabel 5.18	Konsentrasi SGOT pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol.....	118
Tabel 5.19	Konsentrasi SGOT pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga.....	118
Tabel 5.20	Konsentrasi total bilirubin pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol.....	120
Tabel 5.21	Konsentrasi total bilirubin pada jam ke 6 setelah perlakuan <i>E. coli</i> dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga.....	120





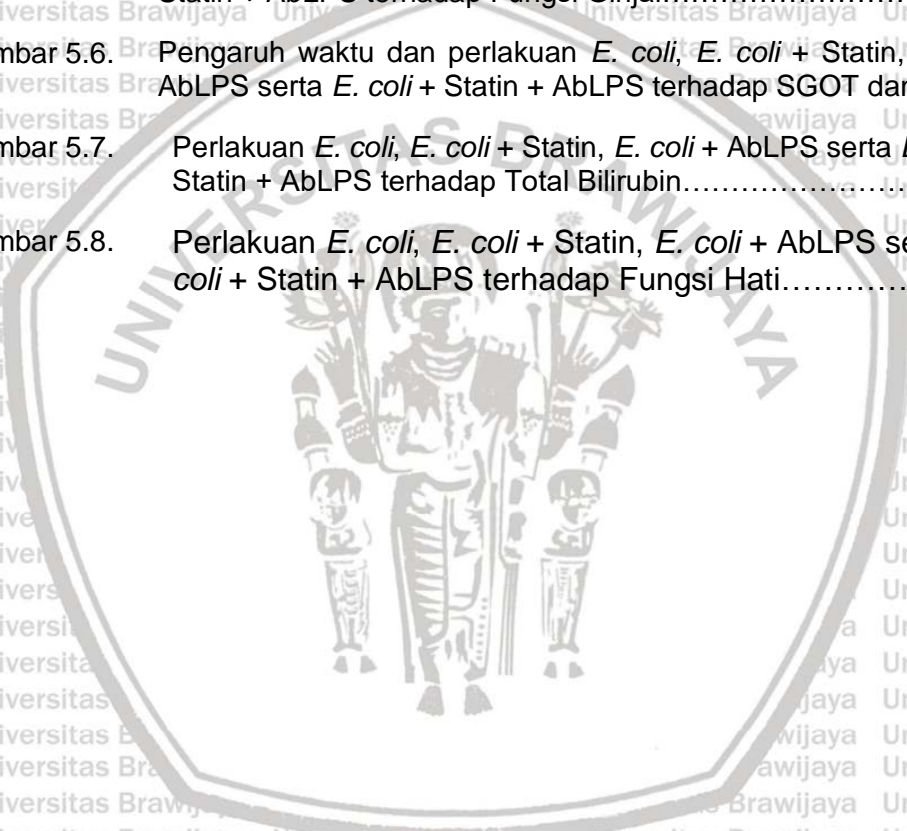
DAFTAR GAMBAR

	Hal
Gambar 2.1	Patofisiologi sepsis-overview. Infeksi primer yang disebabkan oleh bakteri, protozoa atau fungi menyebabkan <i>damage</i> pada jaringan <i>host</i> .....
Gambar 2.2	Jalur persinyalan Toll-like receptor (TLR) .....
Gambar 2.3	Nucleotide-binding domain, jalur persinyalan leucine-rich repeat containing protein (NLR).....
Gambar 2.4	Interaksi antara kaskade koagulasi dan sepsis.....
Gambar 2.5	Jalur apoptosis pada sepsis .....
Gambar 2.6	Kematian sel yang diinduksi infeksi bakteri.....
Gambar 2.7	Respon sistem imun terhadap patogen, melibatkan cross-talk antara banyak sistem imun termasuk makrofag, sel dendritik, dan sel T CD4.....
Gambar 2.8	Pelekatan neutrofil pada endothelium sebagai tempat infeksi.....
Gambar 2.9	Rekrutmen neutrofil terhadap infeksi bakteri pada jaringan non-pulmonary (A) individu sehat dan (B) pasien sepsis.....
Gambar 2.10	Mekanisme neutrofil yang memediasi kerusakan organ pada sepsis.....
Gambar 2.11	Jalur sistemik disfungsi organ pada sepsis .....
Gambar 2.12	Sinopsis mekanisme disfungsi myocardial pada sepsis. MDS mengindikasikan <i>myocardial depressant substance</i> .....
Gambar 2.13	Diagram representatif patogenesis pada syok sepsis manusia.....
Gambar 2.14	Struktur umum LPS dengan berbagai komponen yang menyusunnya.....
Gambar 2.15	Mekanisme prinsip pengenalan LPS pada permukaan sel.....
Gambar 2.16	Sepsis mengganggu keseimbangan homeostasis normal antara mekanisme prokoagulan dan antikoagulan.....
Gambar 2.17	Lipopolisakarida (LPS) dan komponen mikrobial lain yang terlibat untuk mengaktivasi berbagai <i>cascade</i> paralel dalam patofisiologi <i>Adult Respiratory Distress Syndrome</i> (ARDS) dan sepsis.....
Gambar 2.18	Pathway mevalonat dan efek pleiotropik statin pada sel endotel.....
Gambar 2.19	Penghambatan interaksi antara LFA-1 dengan ICAM1 oleh statin....
Gambar 2.20	Mekanisme penghambatan inflamasi oleh statin .....
Gambar 2.21	Respon antibodi terhadap antigen.....





Gambar 2.22.	Epitop pada antibodi .....	87
Gambar 2.23.	Klasifikasi immunoglobulin.....	88
Gambar 5.1.	Pengaruh waktu dan perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap TNF- $\alpha$ , hs-CRP dan PCT.....	109
Gambar 5.2	Pengaruh waktu dan perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap MDA.....	111
Gambar 5.3.	Pengaruh waktu dan perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap Ureum dan BUN.....	113
Gambar 5.4.	Perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap Kreatinin.....	115
Gambar 5.5.	Perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap Fungsi Ginjal.....	116
Gambar 5.6.	Pengaruh waktu dan perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap SGOT dan SGPT:..	119
Gambar 5.7.	Perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap Total Bilirubin.....	120
Gambar 5.8.	Perlakuan <i>E. coli</i> , <i>E. coli</i> + Statin, <i>E. coli</i> + AbLPS serta <i>E. coli</i> + Statin + AbLPS terhadap Fungsi Hati.....	121





DAFTAR SINGKATAN

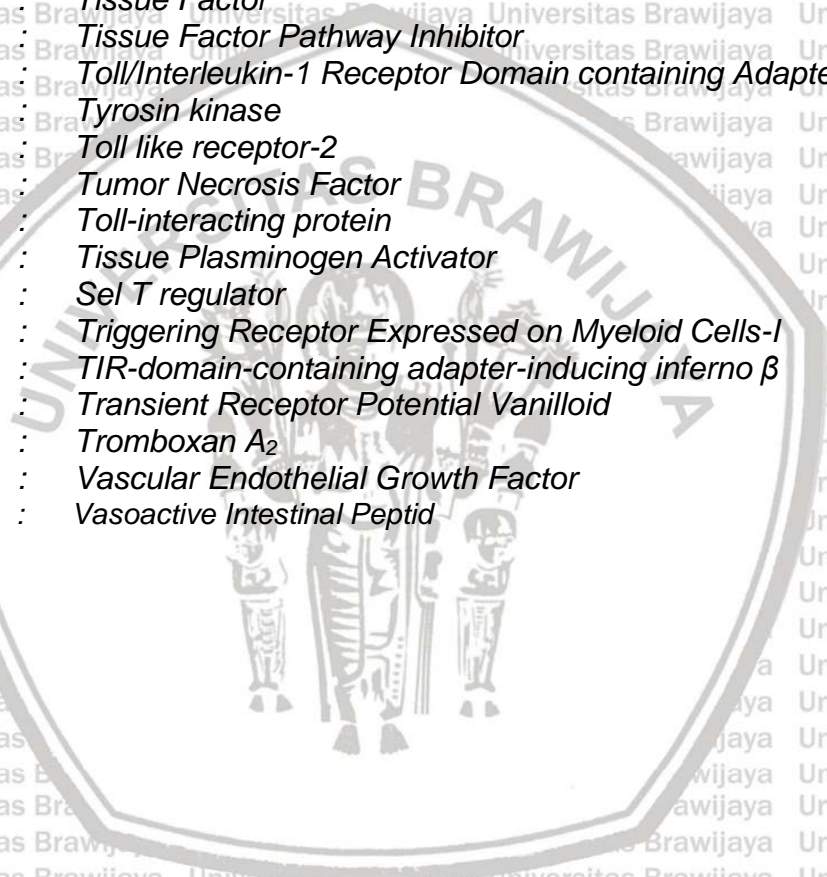
ACE	: Angiotensin Converting Enzyme
AIF	: Apoptosis Inducing Factors
AKI	: Acute Kidney Injury
APACHE	: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation
APC	: Antigen Presenting Cell
APP	: Acute Phase Protein
aPTT	: Activated Partial Thromboplastin Time
ARDS	: Acute Respiratory Distress Syndrome
ARF	: Acute Renal Failure
AVP	: Arginine Vasopressin
BNP	: Brain Natriuretic Peptide
BUN	: Blood Urea Nitrogen
CARD	: Caspase Recruitment Domain
CASP	: Colon Ascendens Stent Peritonitis
CD	: Cluster Differentiation
CGRP	: Calcitonin Gen-Related Peptide
CRP	: C-Reactive Protein
CRTH2	: Chemoattractant Receptor-Homologous Expressed On Th2
CSF	: Cairan Cerebrospinal
CTproAVP	: C-Terminal Pro AVP
DAMPs	: Damage-Associated Molecular Patterns
DIC	: Disseminated Intravascular Coagulation
DISC	: Death-Inducing Signal Complex
DIT	: Diiodotyrosine
ELAM	: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EPC	: Endothelial Progenitor Cells
EPCR	: Endothelial Protein C Receptor
FADD	: Fas-Associated Death Domain
FCS	: Filterable Cardiodepressant Substance
FOXP3	: Forkhead Box P3
FPA	: Fibrinopeptide A
G-CSF	: Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GFAP	: Glial Fibrillary Acidic Protein
GFR	: Glomerular Filtration Rate
GGPP	: Geranylgeranylpyrophosphate
GM-CSF	: Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GPI	: Glycosylphosphatidylinositol
GRO alpha	: Growth Related Oncogene alpha
GST	: Glutathione S-transferase
HBP	: Heparin-Binding Protein
H-FABP	: Heart Type Fatty Acid Binding Protein
HGF	: Hepatocyte Growth Faccot
HLA	: Human Leukocyte Antigen
HMG-Coa	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme reductase
HMGB1	: High Mobility Group Box Protein-1



HS-CRP	High Sensitivity-C Reactive Protein
HSP	Heat Shock Protein
ICU	Intensive Care Unit
ICAD	Inhibitor of Caspase-Activated Deoxyribonuclease
IL	Interleukin
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IIP <i>E. coli</i>	Injeksi Intraperitoneal <i>E. coli</i>
IP	Induced Protein
JAK	Janus Kinase
LBP	Lipopolisakarida Binding Protein
LFA-1	Lymphocyte Function Antigen-1
LPS	Lipopolisakarida
LRR	Leucine Rich Repeats
LTA	Lipotechoic Acid
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAMPs	Microbial-Associated Molecular Patterns
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MDA	Malondialdehyde
MDS	Myocardial Depressant Substance
MD2	Myeloid Differentiation-2
ML	MD-2 Related Lipid Recognition
MyD88	Myeloid Differentiation Protein 88
MIF	Macrophage Inhibitory Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Proteins
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOF	Multi Organ Failure
MR-proANP	Mid-Regional pro-Atrial Natriuretik Peptida
NDW	Neutrophil Distribution Width
NO	Nitric Oxide
NK	Natural Killer
NT	Neopterin
NF $\kappa$ B	Nuklear factor kappaB
PAF	Platelet Activating Factor
PAI-1	Plasminogen-Activator Inhibitor Type-1
PAMPs	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAR	Protease-Activated Receptor
PBEF	Pra B Cell Colony-Enhancing Factor
PCT	Procalcitonin
PKC	Protein kinase C
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PG	Peptidoglikan
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PPAR $\alpha$	Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\alpha$
PPAR $\gamma$	Peroxisome Proliferator Activated Receptor- $\gamma$
PPTA	Preprotachykinin-A
PRRs	Pattern Recognition Receptors
PRX4	Peroxisredoxin 4
PTX3	Pentraxin
RAAS	Rennin-Angiostensin Aldosterone System



RAGE	: Receptor for Advanced Glycation End Products
RBF	: Renal Blood Flow
RE	: Retikulum Endoplasma
ROS	: Reactive Oxygen Species
SAA	: Serum Amyloid A
SIRS	: Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOFA	: Sequential Organ Failure Assessment
SOCS	: Supressore of Cytokine Signaling
SOD	: Superoxide Dismutase
STAT	: Signal Transducer and Activator of Transcription
TACE	: TNF-Converting Enzyme
TAT	: Trombin Antithrombin
TAFI	: Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor
TF	: Tissue Factor
TFPI	: Tissue Factor Pathway Inhibitor
TIRAP	: Toll/Interleukin-1 Receptor Domain containing Adapter Protein
TK	: Tyrosin kinase
TLR2	: Toll like receptor-2
TNF	: Tumor Necrosis Factor
TOLLIP	: Toll-interacting protein
TPA	: Tissue Plasminogen Activator
Treg	: Sel T regulator
TREM-1	: Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1
TRIF	: TIR-domain-containing adapter-inducing inferno $\beta$
TRPV	: Transient Receptor Potential Vanilloid
TXA <sub>2</sub>	: Tromboxan A <sub>2</sub>
VEGF	: Vascular Endothelial Growth Factor
VIP	: Vasoactive Intestinal Peptid





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar belakang

Sepsis merupakan keadaan disfungsi organ yang mengancam jiwa yang disebabkan karena disregulasi respon tubuh terhadap infeksi. Syok sepsis didefinisikan sebagai keadaan sepsis dimana abnormalitas sirkulasi dan metabolic yang terjadi dapat menyebabkan kematian secara signifikan (Levy *et al.*, 2018). Sepsis disebabkan oleh respon tubuh secara berlebihan terhadap infeksi di darah, urin, paru, kulit dan jaringan lain. Sepsis juga disertai oleh penggandaan respon host terhadap infeksi yang kemudian menyebabkan disregulasi dari respon host (Cohen *et al.*, 2002; Anand *et al.*, 2012). Gejala dan tanda sepsis sangat bervariasi, sangat tidak spesifik dan memberikan tanda kesakitan secara sistemik (Das *et al.*, 2011). Sepsis ditandai oleh demam, kekacauan mental, hipotensi, penurunan ekskresi urin, dan trombositopenia. Apabila tidak mendapatkan terapi secara adekuat, sepsis akan berkembang menjadi kegagalan pernafasan atau kegagalan ginjal, abnormalitas koagulasi, dan kematian (Bone, 1992). Sampai saat ini, sepsis masih merupakan penyebab kematian utama di unit perawatan intensif (Das *et al.*, 2011).

Secara global terdapat 27-30 juta kejadian sepsis di seluruh dunia dan setiap 7 juta – 9 juta meninggal dunia atau 1 orang meninggal setiap 3.5 detik (ESICM, 2019). Pada sebuah penelitian antara tahun 1979 sampai 2000 di Amerika Serikat, proporsi pasien yang menderita sepsis meningkat dari 19,1%



pada 11 tahun awal studi menjadi 30,2% di akhir studi (Martin *et al.*, 2003; Lever *et al.*, 2007). Selanjutnya, diperkirakan 751.000 kasus sepsis terjadi setiap tahun di Amerika Serikat, dengan angka mortalitas 28,6% serta rerata biaya yang diperlukan per kasus sebesar 22.100 US\$ (Angus *et al.*, 2001). Untuk negara berkembang seperti Indonesia, angka kematian akibat sepsis dua hingga tiga kali lipat dibandingkan Amerika. Pada tahun 1996, terdapat 4774 pasien yang masuk ke Rumah Sakit Pendidikan Surabaya dan 504 pasien didiagnosis sepsis dengan angka kematian 70,2% (Soedjito *et al.*, 1998). Di Rumah Sakit Pendidikan di Yogyakarta, ditemukan 631 kasus sepsis di tahun 2007 dengan angka kematian 48,96% (Pradipta, 2009). Berbagai penelitian epidemiologis menyatakan bahwa insidensi dan mortalitas sepsis lebih tinggi pada pria dibandingkan wanita, meskipun belum ada faktor yang dapat menjelaskan temuan epidemiologis tersebut. Sumber infeksi dan organisme tertentu menjadi penyebab sepsis atau mendasari perkembangan disfungsi organ, serta kondisi medis komorbid tertentu yang memberikan pengaruh kuat terhadap keluaran penderita sepsis (Alberti *et al.*, 2005; Guidet *et al.*, 2005). Pada tahun 2012-2013 di Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Saiful Anwar Malang, secara keseluruhan ditemukan 1026 pasien terdiagnosa sepsis dan 788 diantaranya meninggal dunia (76,8%). Sedangkan khusus di *Intensive Care Unit* (ICU) terdapat 168 pasien sepsis dan 78 diantaranya meninggal dunia (46,4%). (Asmoro *et al.*, 2015).

Sepsis dapat disebabkan oleh berbagai mikroorganisme termasuk virus, bakteri, jamur maupun protozoa (Nasonudin, 2011a). Penyebab utama sepsis adalah paparan lipopolisakarida (LPS). Lipopolisakarida adalah komponen struktural membran terluar bakteri gram negatif. Peptidoglikan dan asam lipoteichoic sebagai komponen struktural membran bakteri gram positif juga menjadi etiologi sepsis. Bakteri gram negatif terlibat dalam 60-70% kejadian



sepsis, dengan berbagai variasi regional. Bakteri gram positif juga berperan dalam 30-50% kasus sepsis (Anname *et al.*, 2005; Vincent *et al.*, 2009).

Lipopolisakarida merupakan endotoksin yang bersifat proinflamatori (Das *et al.*, 2011). Ketika terlepas menuju sirkulasi, LPS akan mengaktifasi makrofag dan leukosit untuk mensekresikan sitokin proinflamasi, misalnya *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), IL-1 dan senyawa oksigen reaktif. TNF- $\alpha$  merupakan protein pendek yang memediasi efek *in vitro* dari endotoksin. TNF- $\alpha$  yang diinjeksikan ke organisme akan menginduksi syok endotoksik. Selain itu, peningkatan TNF- $\alpha$  akan disertai oleh pembentukan senyawa oksigen reaktif pada syok endotoksik (Ge *et al.*, 2010; Gryglewskiet *al.*, 1998).

Kondisi patologis pada keadaan sepsis (sepsis berat atau syok sepsis) dapat mempengaruhi pada hampir setiap komponen sel, termasuk sel endotel, sel otot polos, lekosit, eritrosit, dan jaringan (Trzeciak, 2005). Pengobatan yang diberikan pada pasien sepsis adalah terapi modulasi sistem imun, dengan target terapi sepsis adalah mediator inflamasi. Beberapa target terapi sepsis diantaranya adalah anti-lipid, IL-1 antagonis reseptor, *inhibitor platelet activating factor* (PAF), antibodi monoklonal anti-TNF- $\alpha$ , immunoglobulin, kortikosteroid dosis tinggi, anti endotoksin, dan anti-thrombin III. Antibodi monoklonal anti-TNF- $\alpha$ , kortikosteroid, dan pemberian immunoglobulin intravena membawa hasil klinis yang efisien pada pasien dengan sepsis dan syok sepsis. Eliminasi dari sel *natural killer* (NK) dan aktivasi sel T juga dapat digunakan sebagai terapi sepsis (Okazaki & Matsukawa, 2009; Chen *et al.*, 2011).

Beberapa terapi yang sedang diinvestigasi secara klinis adalah imunostimulan menggunakan *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF) dan *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF). Terapi ini bertujuan untuk menghilangkan LPS menggunakan *polymixin B-immobilized fiber columns*.



Gen atau protein *delivery* dari protein SOCS dapat menjadi target terapi yang menjanjikan. Protein SOCS adalah jalur regulator negatif dari *janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) yang memediasi sinyal sitokin. Beberapa studi menggunakan model hewan sepsis membuktikan bahwa STATs dan SOCS terlibat dalam patogenesis sepsis (Marshall, 2004 ; Okazaki & Matsukawa, 2009; Chen *et al.*, 2011;).

Pemberian antibodi anti-LPS belum pernah dilakukan pada model sepsis dan diduga akan memberikan efek yang lebih baik dibandingkan antibodi monoklonal anti-TNF- $\alpha$ . Hal ini disebabkan oleh efeknya yang langsung kepada lipopolisakarida sebagai penyebab sepsis dan bukan kepada TNF- $\alpha$  sebagai sitokin yang terbentuk dalam respon sepsis. Untuk meningkatkan efektifitasnya, antibodi anti-LPS akan dikombinasikan dengan statin. Statin berperan sebagai senyawa antiinflamasi dengan cara menghambat ekspresi TNF- $\alpha$  dan MCP-1 yang diinduksi LPS, dan menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dan AP-1 (Yano *et al.*, 2007). Pemberian statin secara signifikan menghasilkan penurunan adhesi leukosit pada endotelium dengan cara menurunkan ekspresi dari molekul adhesi yaitu P-selektin, CD11b, dan CD18 dengan menghambat *lymphocyte function antigen-1* (LFA-1) yang berfungsi dalam memerantarai adhesi (Weitz-Schmidt *et al.*, 2001). Statin juga mampu menstimulasi fibrinolisis dengan mempengaruhi kadar dan aktivitas dari *tissue plasminogen activator* (tPA) dan PAI-1 (Dichtl *et al.*, 2003, Krysiak *et al.*, 2003). Statin dapat ditoleransi dengan baik. Efek samping pemberian statin adalah myopati, peningkatan insiden diabetes, dan peningkatan transaminase serum (Desai *et al.*, 2014).

Statin biasanya diresepkan dengan aspirin untuk mencegah dan mengobati penyakit kardiovaskuler melalui mekanisme penurunan kadar serum lipid (Lee *et al.*, 2012; Shao *et al.*, 2012). Statin dapat menghambat aktivasi



makrofag melalui berbagai mekanisme. Statin menekan respon inflamasi yang diinduksi oleh LDL teroksidasi melalui penghambatan ekspresi ERK terfosforilasi di makrofag murin (Shao *et al.*, 2012). Statin dapat menghambat produksi TNF- $\alpha$  melalui *pathway heme-oxygenase* di makrofag RAW264.7 yang diinduksi oleh LPS (Wang *et al.*, 2014). Pada tikus model sepsis akibat ligasi dan pungsi sekum, pengobatan dengan simvastatin, atorvastatin, dan pravastatin dapat memperpanjang survival akibat perbaikan fungsi jantung dan sistem hemodinamik, akan tetapi hal ini tidak terjadi pada fluvastatin (Merx *et al.*, 2005).

Berdasarkan pada uraian latar belakang diatas, dalam penelitian ini, pemodelan tikus sepsis akan dilakukan melalui injeksi *E. coli* dengan dosis  $10^5$  CFU secara intraperitoneal (IIP *E. coli*  $10^5$  CFU). Tikus model sepsis kemudian akan diberi terapi antibodi LPS dan atau statin (simvastatin) untuk mengetahui perubahan kondisi (parameter) sebelum dan sesudah pemberian terapi. Metode ini diketahui dapat meningkatkan respon sitokin TNF- $\alpha$ , meningkatkan MDA dan menurunkan SOD secara signifikan setara dengan tikus model sepsis CLP (*cecal ligation puncture*) (Samudra *et al.*, 2019).

## 1.2. Rumusan Masalah Umum Penelitian

Berdasarkan uraian latar belakang diatas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah “Apakah perlakuan IIP *E. coli* mempengaruhi mediator proinflamasi yang meliputi TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT, MDA dan fungsi ginjal, fungsi hepar serta bagaimana pengaruh pemberian statin, AbLPS, dan kombinasinya pada perlakuan IIP *E. coli* ?

### 1.2.1. Rumusan Masalah Khusus Penelitian

1. Apakah terdapat pengaruh perlakuan IIP *E. coli* terhadap kadar mediator proinflamasi (TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT, MDA), fungsi ginjal (ureu, BUN, kreatinin), fungsi hepar ( SGPT, SGOT, total bilirubin)?
2. Apakah terdapat penurunan Mediator Proinflamasi TNF- $\alpha$ , pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?
3. Apakah terdapat penurunan Mediator Proinflamasi hs-CRP pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?
4. Apakah terdapat penurunan Mediator Proinflamasi PCT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?
5. Apakah terdapat penurunan Mediator Proinflamasi MDA pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?
6. Apakah terdapat penurunan ureum/ BUN pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?
7. Apakah terdapat penurunan kreatinin pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?
8. Apakah terdapat penurunan SGPT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?



9. Apakah terdapat penurunan SGOT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?

10. Apakah terdapat penurunan total bilirubin pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*?

### 1.3. Tujuan Penelitian

#### 1.3.1. Tujuan Umum:

Penelitian ini dimaksudkan untuk menentukan apakah perlakuan IIP *E. coli* mempengaruhi mediator proinflamasi yang meliputi TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT, MDA dan fungsi ginjal, fungsi hepar serta melihat pengaruh pemberian statin, AbLPS, dan kombinasinya pada perlakuan IIP *E. coli*.

#### 1.3.2. Tujuan khusus:

1. Menganalisis pengaruh perlakuan IIP *E. coli* terhadap kadar mediator proinflamasi (TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT), stress oksidatif (MDA), fungsi ginjal (ureu, BUN, Kreatinin), fungsi hepar (SGOT, SGPT, total bilirubin)
2. Menganalisis penurunan TNF- $\alpha$  pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.
3. Menganalisis penurunan Hs-CRP pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.
4. Menganalisis penurunan PCT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.

5. Menganalisis penurunan MDA (*Malondialdehyde*) pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada model tikus sepsis IIP *E. coli*.
6. Menganalisis penurunan Ureum/BUN pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.
7. Menganalisis penurunan Kreatinin pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.
8. Menganalisis penurunan SGPT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.
9. Menganalisis penurunan SGOT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.
10. Menganalisis penurunan Total Bilirubin pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + ABLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 pada tikus model sepsis IIP *E. coli*.

#### 1.4 Manfaat Penelitian

Adapun manfaat yang diperoleh dari penelitian ini yaitu sebagai berikut ini.

##### 1.4.1 Pengembangan Ilmu Pengetahuan

- a. Memberikan masukan bahwa dengan perlakuan IIP *E. coli*  $10^5$  CFU mampu membuat tikus model sepsis tanpa melukai hewan coba.
- b. Pemberian terapi berdasarkan agen penyebab (*gram negative*) sepsis dan pemberian terapi kombinasi statin dan AbLPS mampu memberikan perbaikan survival, penghambatan inflamasi serta perbaikan fungsi organ.



### 1.4.2 Manfaat klinis

Menambah pengetahuan dalam pencegahan, penanganan dan pengobatan sepsis secara optimal dengan menggunakan terapi antibodi anti-LPS, statin dan kombinasi sehingga dapat mengurangi dampak adanya sepsis.



## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Sepsis

#### 2.1.1 Batasan Sepsis

Sepsis menurut konsensus terbaru adalah keadaan disfungsi organ yang mengancam jiwa yang disebabkan karena disregulasi respon tubuh terhadap infeksi. Syok sepsis didefinisikan sebagai keadaan sepsis dimana abnormalitas sirkulasi dan metabolik yang terjadi dapat menyebabkan kematian secara signifikan (Levy *et al*, 2018). Pada syok sepsis ditandai oleh hipoperfusi organ dan hipoksia yang pada akhirnya menyebabkan terjadinya *multiple-organ dysfunction syndrome* (MODS), yaitu disfungsi lebih dari satu organ dan memerlukan intervensi untuk mempertahankan homeostasis (Munford, 2005).

Menurut konsensus sepsis bisa didiagnosa dengan sistem skor SOFA atau *sequential [sepsis-related] Organ Failure Assessment Score* (Tabel 2.1). Apabila skor SOFA lebih dari dua dan curigai adanya infeksi yang telah terdokumentasi, hal tersebut memenuhi kriteria diagnosis sepsis.

**Tabel 2.1. SOFA SCORE** (singer *et al*, 2018)

SOFA score	0	1	2	3	4
<b>Pernafasan (PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, mmHg)</b>	≥400 (53,3)	<400 (53,3)	<300 (40)	<200 (26.7) dengan dukungan pernafasan	<100 (13.3) dengan dukungan pernafasan
<b>pembekuan Trombosit x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup></b>	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Hati Bilirubin, mg/dL (umol/L)</b>	<1.2 (20)	1,2 - 1,9 (20-32)	2,0-5,9 (33-101)	6,0-11,9 (102-204)	>12.0 (204)
<b>Kardiovaskular</b>	MAP ≥70mmHg	MAP <70mmHg	Dopamin <5 atau dopupamin (setiap dosis)	Dopamin 5,1-15 atau epinefrin ≤0.1 atau	Dopamin > 15 atau epinefrin > 0,1 atau



				norepinefrin ≤0,1	norepinefrin >0,1
<b>System syaraf pusat</b>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Skor glasglow coma scale</b>					
<b>Ginjal</b>	<1.2 (110)	1,2-1,9 (110-170)	2,0-3,4 (171-299)	3,5-4,9 (300-440)	> 5.0 (440)
<b>Kreatinin, mg/dL (umol/L)</b>					
<b>Urine output, mL/d</b>				<500	<200

Sedangkan untuk kriteria skor sepsis pada hewan coba (*murine*) memiliki skor dengan kriteria sebagai berikut (Tabel 2.2).

**Tabel 2.2 Skor Sepsis pada Murine (MSS)**

Variabel	Score dan Deskripsi
Keadaan umum	0 Rambut tampak halus
	1 Beberapa bagian rambut piloereksi
	2 Mayoritas rambut punggung piloereksi
	3 Piloereksi mungkin ada atau tidak, tikus tampak bengkak
	4 Piloereksi mungkin ada atau tidak, tikus tampak kurus
Kesadaran	0 Tikus aktif
	1 Tikus aktif, namun menghindari berdiri tegak
	2 Aktivitas tikus tampak berkurang. Tikus masih sadar
	3 Aktivitas tikus terganggu. Tikus hanya bergerak saat diprovokasi dengan adanya tremor



	4	Aktivitas tikus sangat terganggu. Hanya diam saat diprovokasi, dengan kemungkinan tampak tremor
Aktivitas	0	Aktivitas tikus normal, dimana tikus masih makan, minum, memanjat, berlari, dan bertarung
	1	Aktivitas sedikit turun, tikus bergerak disekitar kandang
	2	Aktivitas turun, hanya diam dan terkadang bergerak
	3	Tidak ada aktivitas dan hanya diam
	4	Tidak ada aktivitas, tikus tremor khususnya pada kaki belakang
Respon stimulus	0	Tikus berespon cepat terhadap stimulus auditorik atau sentuhan
	1	Respon lambat atau tidak berespon terhadap stimulus respon auditorik. Namun respon kuat terhadap sentuhan
	2	Tidak ada respon stimulus auditorik, namun respon sedang terhadap sentuhan
	3	Tidak ada respon stimulus auditorik, namun respon ringan terhadap sentuhan
	4	Tidak ada respon baik stimulus auditorik maupun sentuhan, tidak bisa memperbaiki diri ketika didorong kuat
Mata	0	Mata membuka sempurna
	1	Mata tidak membuka penuh, mungkin terdapat sekret
	2	Mata separuh menutup, mungkin terdapat sekret



	3	Mata menutup lebih dari separuh, mungkin terdapat sekret
	4	Mata menutup atau putih susu
Laju pernafasan	0	Normal pernafasan cepat
	1	Pernafasan menurun ringan (frekuensi tidak dihitung dengan mata)
	2	Pernafasan menurun sedang (frekuensi pada batas atas dengan pengukuran dengan mata)
	3	Pernafasan sangat menurun (frekuensi mudah dihitung dengan mata, 0,5 detik antar nafas)
	4	Pernafasan turun ekstrim (>1 detik antar nafas)
Kualitas pernafasan	0	Normal
	1	Beberapa periode sesak nafas
	2	Sesak, tidak terengah-engah
	3	Sesak dengan terengah-engah intermiten
	4	Nafas tersengal sengal

**2.1.2 Epidemiologi Sepsis**

Angka kejadian sepsis diperkirakan antara 50-95/100.000 populasi dengan peningkatan sebesar 9% tiap tahunnya. Di seluruh dunia, angka kematian berkisar antara 30-70% (Rittirsch *et al.*, 2007). Di Amerika Serikat (AS), sepsis dan syok sepsis menjadi penyebab kematian nomor 10, dengan peningkatan insiden sebesar 1,5% per tahun (Merx & Weber, 2007). Kejadian sepsis di AS

terjadi sebanyak 750.000 kasus setiap tahun dan sekitar 225.000 kasus berakhir dengan kematian (Reinhardt *et al.*, 2005). Pasien tersebut mengalami kematian diakibatkan proses inflamasi yang tidak terkontrol (Hotckiss & Karl, 2003). Selain itu, biaya rumah sakit nasional di Amerika Serikat yang dikeluarkan untuk menangani sepsis sekitar 16.7 miliar dollar per tahun. Di Inggris, laju kematian pasien sepsis di rumah sakit mencapai 46% (Merx & Weber, 2007).

Angka kematian pada sepsis tergantung beberapa faktor seperti umur, jenis kelamin, ras, riwayat trauma paru akut, sindrom gagal napas akut, gagal ginjal, dan penyebab infeksi (Marik *et al.*, 2008). Sepsis lebih banyak diderita oleh pria dibandingkan wanita (rerata resiko 1,28) dan lebih banyak pada orang tidak berkulit putih dibandingkan orang berkulit putih (rerata resiko 1,90). Mortalitas paling tinggi terjadi pada pria berkulit hitam (Martin *et al.*, 2003). Laki-laki lebih kerap mengalami disfungsi organ dibandingkan wanita. Sumber sepsis dari saluran nafas lebih dominan pada pria dan sumber sepsis dari traktus urinarius lebih sering pada wanita (Marik *et al.*, 2008).

### 2.1.3 Patomekanisme Sepsis

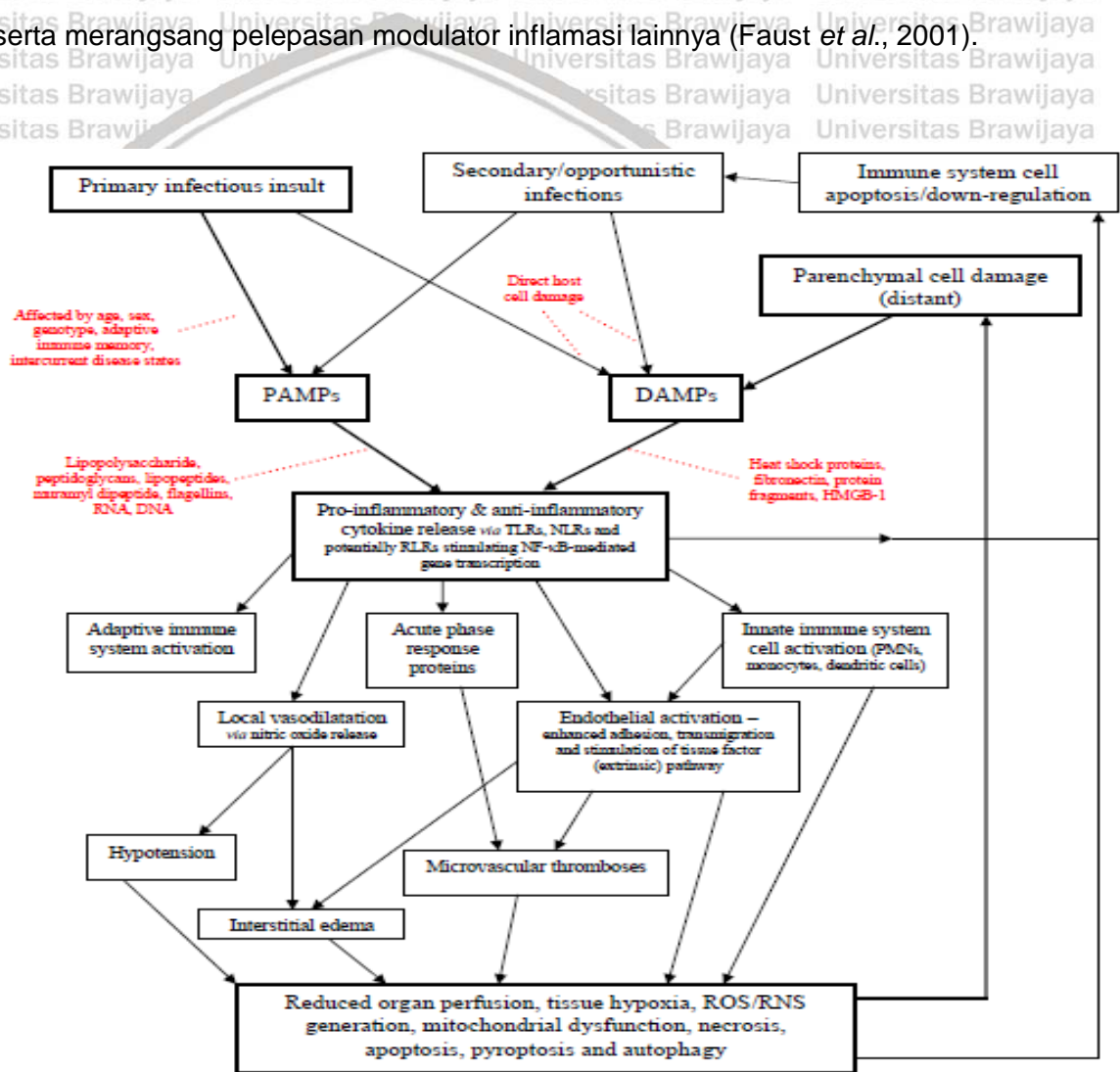
Patofisiologi sepsis masih belum diketahui dengan jelas. Beragam tipe sel, mediator inflamasi, faktor koagulasi, serta sistem imun innate dan sel T terlibat dalam sindrom kompleks ini. Sepsis secara klinis dibagi berdasarkan tingkat keparahan yaitu sepsis dan syok sepsis.

Tahap pertama sepsis yaitu suatu proses yang dikenal dengan SIRS (*systemic inflammatory response syndrom*) dimulai saat muncul cedera pada tubuh, misalnya luka bakar, trauma, infeksi (Huber *et al.*, 2006). *Systemic Inflammatory Response Syndrome* (SIRS) berhubungan dengan peningkatan produksi sitokin proinflamasi, kemokin proinflamasi, *reactive oxygen species*



(ROS), serta aktivasi kaskade komplemen dan koagulasi (Shankar *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

Cedera tersebut akan merangsang pelepasan substansi imunomodulator yang mempengaruhi lapisan dalam (endotel) pembuluh darah. Pelepasan imunomodulator akan menginduksi proses inflamasi melalui pelepasan sitokin-sitokin proinflamasi. Sitokin ini selanjutnya akan menyebabkan inflamasi pada lapisan dinding pembuluh darah dan mengaktifasi proses pembekuan darah, serta merangsang pelepasan modulator inflamasi lainnya (Faust *et al.*, 2001).



**Gambar 2.1 Patofisiologi sepsis-overview.** Infeksi primer yang disebabkan oleh bakteri, protozoa atau fungi menyebabkan **damage** pada jaringan **host**. Ligasi dari *pattern-recognition receptors* (TLRs dan NLRs) oleh promotor PAMP dan DAMP dan mengeluarkan sitokin pro dan antiinflamasi yang dapat memicu hipoperfusi organ, hipoksia jaringan, terbentuknya ROS dan RNS, disfungsi mitokondria dan kematian sel akibat

nekrosis, apoptosis, pyroptosis, dan autophagy. Selain itu, DAMP dapat membantu kerja yang terus menerus dari respon inflamasi dan kematian sel imun sehingga sel mudah diserang oleh infeksi sekunder. Singkatan: PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*; DAMP: *danger-associated molecular patterns*; TLR: *Toll-like receptor*; NLR: *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing protein*; RLR: *retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-1)-like receptor*; NFκB: *nuclear factor kappa B*; PMN: *polymorphonuclear cell*; ROS: *reactive oxygen species*; RNS: *reactive nitrogen species* (Modifikasi Lewis *et al.*, 2012).

Tahap kedua dari sepsis adalah koagulasi (pembekuan darah), merupakan proses berantai yang kompleks dalam tubuh manusia. Inflamasi merangsang pelepasan substansi yang disebut sebagai *tissue factor* (TF) yang memicu pembentukan thrombin, stimulus utama agar terjadi pembekuan darah.

Thrombin mengawali koagulasi dengan membentuk fibrin. Pada sepsis, fungsi berantai tersebut berjalan secara abnormal (Cohen, 2002).

Tubuh pada umumnya mengatur proses inflamasi dan koagulasi melalui serangkaian alur biokimia untuk mencegah koagulasi secara berlebihan. Pencegahan koagulasi yang berlebihan dilakukan dengan memecah fibrin (fibrinolisis). Akan tetapi dalam siklus sepsis yang rumit, proses fibrinolisis dihambat, sehingga menyebabkan koagulasi pada berbagai organ vital yang menghambat aliran darah dan menyebabkan kerusakan jaringan (Basisio *et al.*, 2002).

#### 2.1.4 Inflamasi pada Sepsis

Semua organisme hidup pasti akan menghadapi infeksi mikroorganisme patogen. Survival atau daya tahan bergantung pada penghalang fisik untuk melawan masuknya patogen, seperti adanya sistem imun yang secara cepat dapat menginduksi respon inflamasi (Lewis *et al.*, 2012). Dua faktor penting dalam sistem imun innate untuk merespon serangan patogen adalah kehadiran reseptor yang melawan marker patogen dan ketersediaan reseptor ini secara



alami pada seluruh bagian tubuh. Reseptor ini tidak hanya diekspresikan oleh banyak sel efektor sistem imun seperti makrofag, neutrofil, sel dendritik, dan limfosit, tetapi juga ditemukan pada sel epitelial, sel endothelial, dan miosit.

Target utama dari *pattern recognition receptors* (PRRs) adalah *pathogen-associated molecular pattern* (PAMPs). Molekul ini pada bakteri non-patogenik dan komensal dikenal sebagai "*microbial-associated molecular patterns*" (MAMPs). PAMPs dikarakterisasi menjadi beberapa golongan (Cinel & Opal, 2009; Chen *et al.*, 2011 ; Lewis *et al.*, 2012) diantaranya:

- a. PAMPs yang diproduksi hanya oleh mikroba patogen, tidak oleh host (seperti peptidoglikan yang diproduksi oleh bakteri tetapi tidak dihasilkan oleh sel eukariotik).
- b. PAMPs yang secara umum diekspresikan oleh sebagian besar mikroorganisme (contohnya lipoarabinomannan yang ditemukan pada dinding sel semua *Mycobacteria*).
- c. PAMPs biasanya merupakan struktur vital yang terlibat dalam survival atau sifat patogen mikroorganisme (contohnya lipopolisakarida (LPS) pada membran luar dari bakteri Gram negatif): target ini merupakan molekul yang terkonservasi dengan tinggi dan membutuhkan variabilitas PRRs pada *host*.

Tabel 2.3 Pathogen-associated molecular pattern (PAMP) ligan dari pattern recognition receptor (PRR) yang terlibat dalam sepsis (Lewis et al., 2012)

PRR	Lokasi	Tipe Sel	Pengenalan PAMP
TLR 1/CD281	pm	pbmc, np, u	<i>triacyl lipopeptide</i>
TLR 2/CD282	pm, el	pbmc, dc, mc, nkc	<i>peptidoglikan, lipoprotein, lipopolisakarida, glycosilphosphatidylinositols, mannans</i>
TLR 3/CD283	Pm, el	dc, epi, fb, blc, nkc	<i>ssRNA, dsRNA, dsDNA</i>
TLR 4/ CD284	pm	pbmc, mc, np, epi	<i>lipopolisakarida, glycosilphosphatidylinositols, protein viral envelope, mannans</i>
TLR 5	pm	pbmc, dc, epi, nkc	<i>Flagellin</i>
TLR 6/Cd286	pm	mc, blc	<i>diacyl lipopeptide</i>
TLR 7	el	pbmc, dc, blc	<i>ssRNA</i>
TLR 8/CD288	el	Nkc	<i>ssRNA</i>
TLR 9/CD289	el	dc, blc, nkc, epi	<i>ssDNA, dsDNA</i>
TLR 10/CD290	pm	pbmc, dc, blc	<i>unknown</i>



TLR 11	pm	epi, dc, pbmc	<i>Profiling</i>
NOD 1/NLRC1	Cyt,	epi, dc, pbmc	<i>Peptidoglycan</i>
NOD 2/NLRC2/ CARD15	pm	pbmc, paneth cells	<i>muramyl dipeptide</i>
NLRC4/IPAF	cyt	unknown	<i>Flagellin</i>
NLRP1	cyt	unknown	<i>muramyl dipeptide, Bacillus anthracis lethal toxin</i>
NLRP3	cyt	unknown	bakteri dan RNA virus, <i>lipopolisakarida, lipotechoic acid, muramyl dipeptide</i>
NLRB1/NAIP5	cyt	unknown	<i>Flagellin</i>

Keterangan: PRR: *pattern-recognition receptor*; PAMP: *pathogen-associated molecular pattern*; TLR, *Toll-like receptor*; NOD, *nucleotide-dinding oligomerization domain*; NLR, *nucleotide-binding domain, leucine-rich repeat containing protein*; NLRC, NLR family, *CARD containing*; IPAF: *interleukin-1 converting enzyme (ICE) protease-activating factor*; NRLP, NLR family, *pyrin domain containing*; NRLB, NLR family, *baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat domain containing*; NAIP: *neuronal inhibitor of apoptosis*; pm: *plasma membrane*; el: *endolysosomes*; cyt: *cytoplasma*; np: *neutrophils*; u: *ubiquitous*; dc: *dendritic cells*; mc: *mast cells*; nkc: *natural killer cells*; epi: *epithelial cells*; fb: *fibroblasts*; blc: *B lymphocytes*; ss: *single-stranded*; ds: *double-stranded*.

Meskipun komponen permukaan sel bakteri pada membran luar sel bakteri Gram negatif (LPS) dan pada membran sel bakteri Gram positif (lipotechoic acid/LTA) merepresentasikan contoh klasik dari PAMPs, pengenalan dari "altered self" secondary untuk kolonisasi sel host oleh patogen merupakan hal yang sangat penting. Sistem imun innate kemudian berkembang dengan kemampuan dapat mendeteksi marker terjadinya kerusakan sel endogen yang



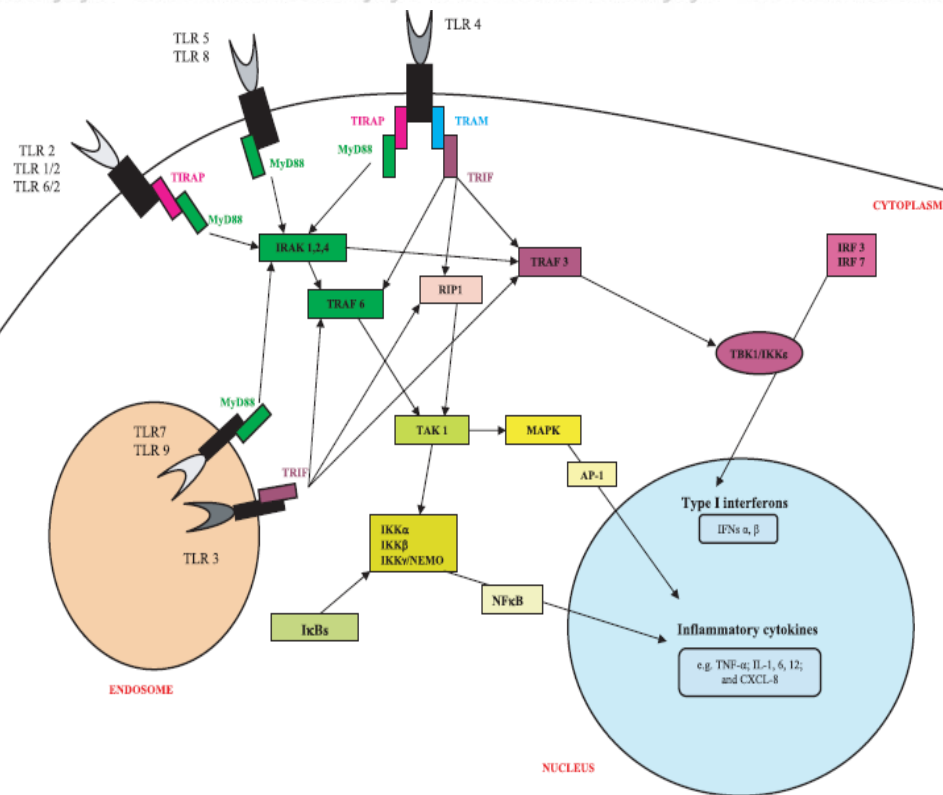
disebut “*alarming*” atau “*danger-associated molecular patterns*” (DAMPs) (Cinel & Opal, 2009 ; Lewis *et al.*, 2012).

Inisiasi reaksi inflamasi pada nekrosis dan apoptosis, kematian sel akan terlihat berguna pada mekanisme pertahanan host, serta interaksi DAMPs dan PAMPs dengan reseptornya akan memicu peningkatan laju kematian sel pada sepsis. Reaksi PRR untuk PAMPs dan DAMPs memperlihatkan adanya sistem umpan balik positif multipel menjadi stabil dan memicu progresi cepat dari respon inflamasi global dengan beberapa pertanda klinis (Gambar 2.1).

Jalur persinyalan via *Toll-like receptor* (TLR) terlibat dalam respon inflamasi sistem imun dalam merespon patogen yang menyebabkan sepsis. Domain sitoplasmik TIR dari TLR berinteraksi dengan beberapa *TIR domain containing adaptor* (Gambar 2.2). TLR diekspresikan oleh beberapa sel yang berbeda, termasuk sel dendritik, makrofag, sel B, sel natural killer (NK), sel endothelial, sel epithelial, dan fibroblast. TLR 2 terlihat sangat penting karena kemampuannya mampu mengenali PAMP yang beragam yaitu lipotechoic acid (bakteri Gram-positif), peptidoglikan (bakteri Gram-positif dan Gram-negatif), hemagglutinin (virus measles), polisakarida (yeast), lipoprotein (*E. coli* , *Borrelia burgdorferi*, *Mycoplasma* spp. dan *Mycobacterium tuberculosis*), patogen lain seperti *Clostridium* spp., *Chlamydomphila* spp., dan virus herpes simpleks, dan beberapa ligan endogen. TLR 4 juga signifikan berperan untuk memicu sistem imun innate dalam merespon beberapa molekul diantaranya LPS (bakteri Gram-negatif), beberapa protein envelope virus, dan molekul endogen. Pengenalan utama LPS oleh TLR 4 bergantung pada pembentukan kompleks dengan PRR lain, *myeloid differentiation protein-1* (MD2), *membrane bound CD14* (mCD14), dan lipopolysaccharide-binding-protein (LBP). TLR 2 dan TLR 4 secara intensif diteliti pada pasien sepsis manusia, ditemukan bahwa upregulasi dari TLR ini dapat



memperburuk tingkat keparahan dan mortalitas pada penyakit ini (Cinel dan Opal, 2009 ; Lewis *et al.*, 2012).



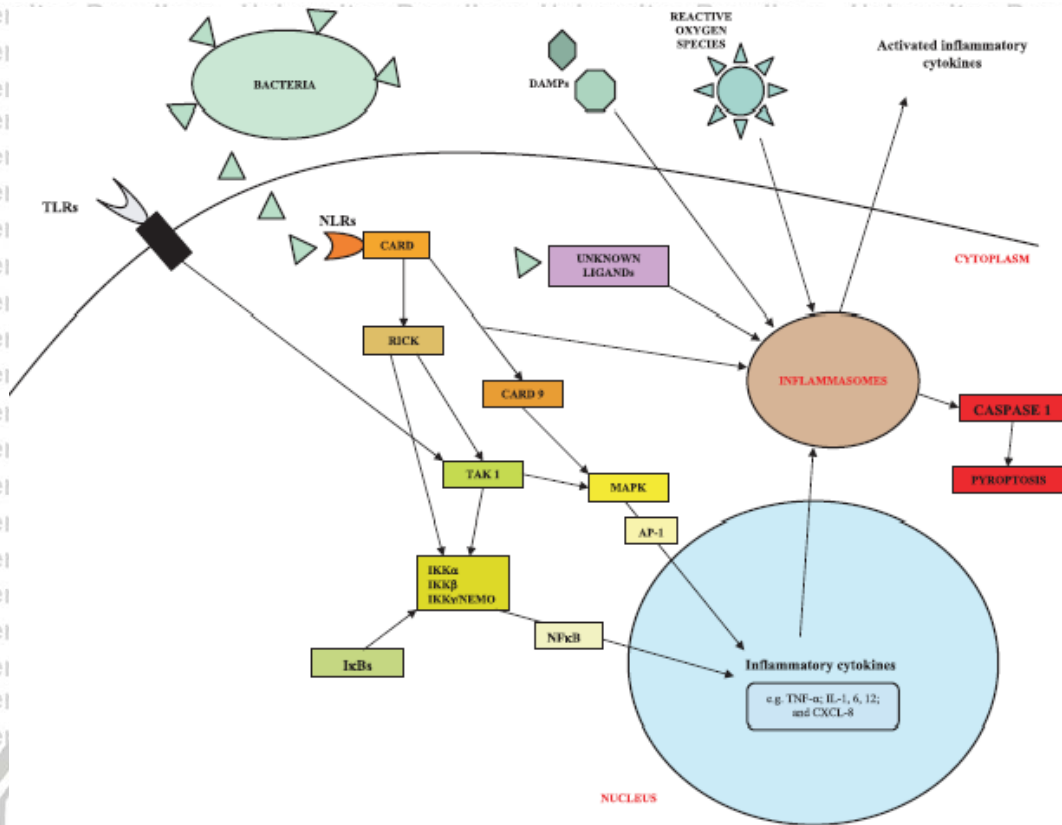
**Gambar 2.2 Jalur persinyalan Toll-like receptor (TLR).** Sitoplasmik Toll/domain reseptor interleukin-1 (TIR) dari TLR yang berinteraksi dengan TIR-domain-containing adaptor, seperti gen respon awal diferensiasi myeloid (MyD88), TIR-containing adaptor protein (TIRAP), TIR-domain-containing adaptor molecule 1 (TICAM1, disebut juga TRIF) dan TIR-domain-containing adaptor molecule 2 (TICAM2, disebut juga TRAM). PAMP mengikat reseptor menghasilkan aktivasi jalur persinyalan MyD88 atau TICAM1/TRIF. Jalur ini terlibat dalam berbagai kinase pada IL-1R associated kinase (IRAK) yang menghasilkan aktivasi inhibitor  $\kappa$  B kinase (IKK) kompleks enzim dan jalur mitogen-activated protein kinase (MAPK). Kompleks IKK terfosforilasi protein inhibitor I $\kappa$ B $\alpha$ , kemudian membebaskan faktor transkripsi nuklear factor kappa B (NF $\kappa$ B); memicu jalur persinyalan MAPK menghasilkan aktivasi activator protein 1 (AP-1). NF $\kappa$ B dan AP-1 kemudian menginisiasi transkripsi gen sitokin. Singkatan: TRAF: TNF receptor-associated factor; RIP: receptor interacting protein; TAK: TGF- $\beta$ -activated kinase; NEMO: NF $\kappa$ B essential modulator; TBK: TRAF family member-associated NF $\kappa$ B activator (TANK)-binding kinase; IRF: interferon regulatory factor (Lewis *et al.*, 2012).

Oleh karena TLR tidak mampu mengenali semua PAMP sehingga ditemukan tambahan PRR intraseluler, yaitu NLR. Pada manusia, NLR ditemukan sedikitnya berjumlah 23 sedangkan pada mencit terdapat 34. NLR

merupakan reseptor ditemukan pada sitoplasma sel eukariot, meskipun beberapa penelitian menunjukkan bahwa reseptor ini dapat berasosiasi dengan membran plasma. Mekanisme pengenalan NLR dengan PAMP masih belum diketahui secara jelas, namun pengenalan oleh NLR ini akan memicu aktivasi kinase sehingga I $\kappa$ B terfosforilasi, mobilisasi NF- $\kappa$ B, dan aktivasi sinyal MAPK (Gambar 2.3). NOD1 (NLR family, aktivasi caspase, dan rekrutmen domain [CARD] containing 1; NLRC1) dan NOD2 (NLRC2, disebut juga CARD15) diketahui berperan untuk mengenali muropeptide derivat dari peptidoglikan, struktur utama dinding sel bakteri Gram positif dan Gram negatif (Cinel & Opal, 2009 ; Lewis *et al.*, 2012).

Caspase-1 merupakan caspase eksekutor dalam proses inflamasi, yaitu dapat mensintesis IL-1 $\beta$  dan IL-18 aktif dan mekanisme pertahanan dari patogen. Mencit yang mengalami defisiensi caspase-1 lebih rentan terhadap infeksi bakteri dan sepsis sedangkan mencit yang mengalami defisiensi caspase-12 yang berperan dalam menekan ekspresi caspase-1, menunjukkan proses peningkatan perlawanan terhadap infeksi bakteri dan resisten terhadap sepsis. Meskipun caspase-1 berperan penting untuk perlawanan patogen, tetapi aktivitasnya perlu untuk dikontrol (Lewis *et al.*, 2012).





**Gambar 2.3 Nucleotide-binding domain, jalur persinyalan leucine-rich repeat containing protein (NLR).** Selama ligasi PAMP, NLRs merekrut serine-threonine kinase RIP-like interacting caspase-like apoptosis regulatory protein (CLARP) kinase (RICK), disebut juga reseptor-interacting serine/threonine-protein-kinase 2 (RIPK2 atau RIP 2), yang mengikat NF-κB essential modulator (NEMO), subunit IKK menghasilkan fosforilasi IκB dan mengekspresikan NF-κB; RICK juga memediasi rekrutmen dari transforming growth factor β-activated kinase 1 (TAK 1) dan bersama molekul ini menstimulasi aktivasi jalur persinyalan mitogen-activated protein kinase (MAPK). Aktivasi NLR memicu transkripsi gen sitokin inflamasi via mobilisasi NF-κB dan AP-1. Ligasi NLR mengaktifasi inflammasome, kompleks makromolekul yang mengandung pro-caspase-1 dan beberapa adaptor protein yang lain. Caspase-1 sangat penting dalam mensintesis IL-1β dan IL-18 aktif, menginduksi pemrograman kematian sel yang disebut pyroptosis (Lewis *et al.*, 2012).

### 2.1.5 Koagulasi pada Sepsis

Prevalensi kerusakan koagulasi dan *disseminated intravascular coagulation* (DIC) pada sepsis berhubungan dengan jalur inflamasi dan koagulasi. Pada skala lokal, aktivasi koagulasi merupakan aksi perlindungan terhadap patogen dan mediator inflamasi. Studi klinis membuktikan bahwa peningkatan aktivasi koagulasi sebagai akibat *down* regulasi mekanisme

antikoagulan dan reduksi fibrinolisis pada manusia dengan SIRS dan sepsis (Chen *et al.*, 2011 ; Lewis *et al.*, 2012).

Deskripsi yang lebih detail tentang kompleksitas interaksi antara inflamasi dan koagulasi pada pasien sepsis dapat dilihat ilustrasinya pada Gambar 2.4.

Singkatnya, kunci untuk memicu koagulasi pada sepsis adalah *tissue factor* (TF) yang menginisiasi koagulasi via jalur aktivasi kontak (ekstrinsik). Pada kondisi normal, hilangnya paparan TF diantara sistem vascular dan kehadiran beberapa protein sirkulasi seperti protein C, antithrombin, dan *tissue factor plasminogen*

*inhibitor* akan memodulasi koagulasi dengan pencegahan aktivasi TF. Ekspresi

TF oleh monosit atau makrofag dan sel parenkim jaringan akan mengaktifasi beberapa sitokin inflamasi, *C-reactive protein* (CRP) dan PAMP karena

pemberian LPS. Jumlah yang besar dari TF akan mengekspresikan mikropartikel

yang dapat diidentifikasi pada sampel darah dari pasien sepsis manusia dan hal

ini berhubungan dengan tingkat mortalitas. Mikropartikel ini dilepaskan dari

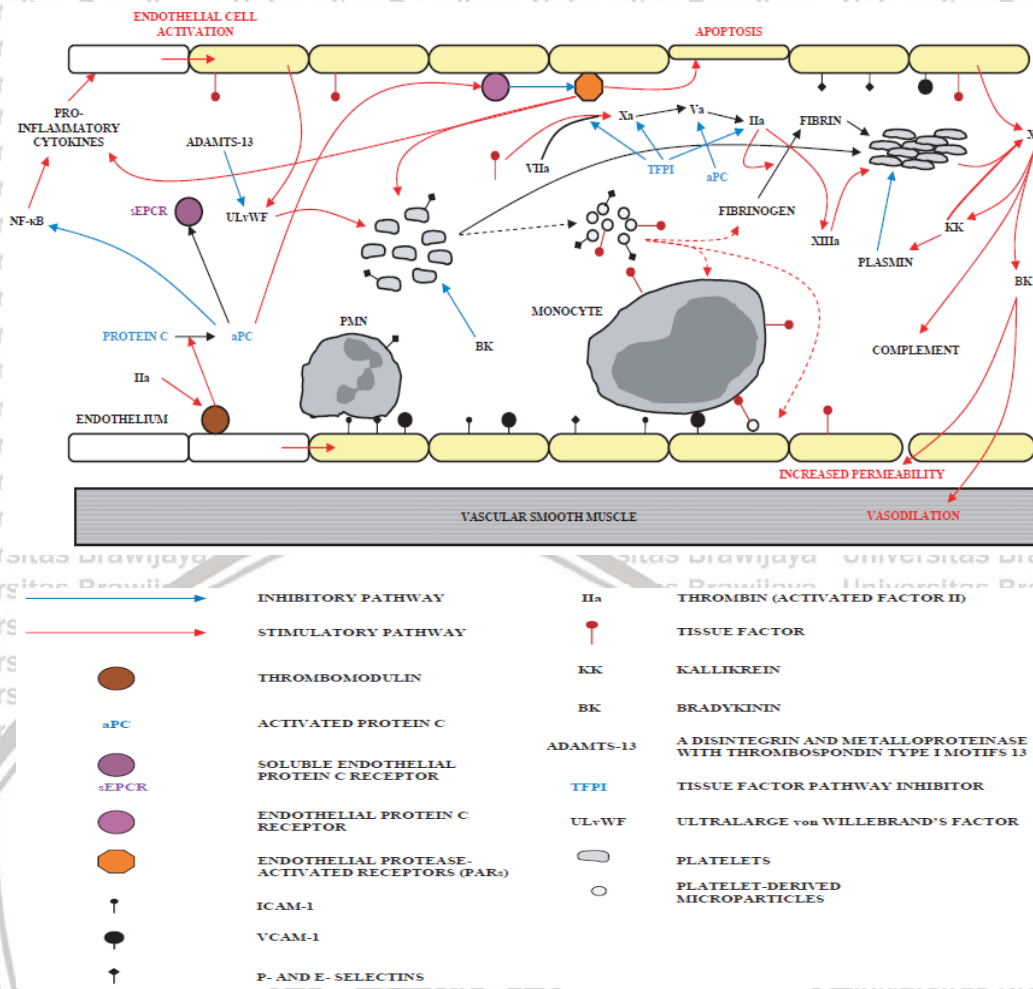
beberapa sel yang teraktivasi atau mengalami apoptosis seperti platelet, monosit,

eritrosit, dan sel endothelial, dan interaksi antar sel tersebut dengan sel

endothelial dan platelet akan membentuk jalur koagulasi (Liu & Malik, 2006;

Abraham & Singer, 2007 ; Lewis *et al.*, 2012).





Gambar 2.4 Interaksi antara kaskade koagulasi dan sepsis (Lewis et al., 2012).

Pada kondisi tidak adanya inflamasi, beberapa mekanisme antikoagulasi teraktivasi untuk mencegah koagulasi. Thrombomodulin dan *endothelial protein C receptor* berinteraksi dengan thrombin untuk mengaktivasi protein C (aPC) dengan interaksi dengan protein S untuk menginaktivasi faktor V. Sel endothelial juga mengekspresikan *Tissue Factor Pathway Inhibitor* (TFPI) dan antithrombin pada permukaan luminal sel tersebut dan mensekresikan tissue plasminogen activator (tPA). Banyaknya faktor antikoagulasi seperti protein fase akut negatif yang konsentrasi pada plasma menurun selama sepsis. Di sisi lain, sitokin proinflamasi dilepaskan selama sepsis untuk mengaktivasi sel endothelial, platelet dan bersirkulasi dengan sel darah putih, memulai untuk

mengekspresikan tissue factor (TF) dan hilangnya protein antikoagulasi di permukaan. Pembentukan mikropartikel meningkat bersamaan dengan ekspresi dari molekul adesi fungsional pada platelet, mikropartikel, monosit, dan sel endothelial. Konsentrasi antithrombin dalam plasma, aPC, protein S, dan TFPI menurun. Setelah memicu jalur contact activation (TF), interaksi mikropartikel dengan sel endotel dan platelet terjadi pada jalur koagulasi. Kehadiran komponen jalur koagulasi (kompleks TF-VIIa, Xa, Va, thrombin) dan protease mengaktivasi protease endothelial protease-activated receptor (PAR) yang memperbanyak proses inflamasi dengan menstimulasi pelepasan mediator inflamasi lainnya (TNF $\alpha$ , IL-6, dan CXCL-8), aktivasi platelet dan kematian sel. Aktivasi sistem *contact phase* dapat mengaktivasi faktor XII (faktor Hageman), akan memicu pembentukan kallikrein (KK) dan bradykinin (BK) (Lewis *et al.*, 2012).

## 2.1.6 Kematian Sel pada Sepsis

### 2.1.6.1 Jalur Kematian Sel

Kematian sel dapat terjadi melalui beberapa cara, meliputi nekrosis, apoptosis dan autofagi. Ketika terjadi nekrosis, sel mengalami pembengkakan sitoplasma, disorganisasi struktur organel, terpecahnya membran sel dan karyolisis pada inti sel (Yasuhara, *et al.*, 2007). Pada saat sel mengalami apoptosis akan terjadi peristiwa yang berbeda dengan nekrosis. Ciri-ciri sel yang mengalami apoptosis antara lain, pengkerutan sel (ukurannya menjadi lebih kecil, sipolasma eosinofilik, permukaan sel tidak rata dan terpisah dari sel di sekitarnya), terjadi kondensasi kromatin (warna menjadi hiperbasofilik dan bentuk yang tidak teratur), terjadi fragmentasi nukleus (jumlah fragmentasi nukleus berkisar antara 1-5 potongan per sel) dan akan terbentuk *apoptotic*



*bodies* (Kerr, et al., 1994; Silva & Victor, 2009). Autofagi merupakan proses dimana sel mendegradasi komponen selnya sendiri dengan tujuan untuk mendaur ulang atau mengurangi konten pada sitoplasma yang berlebihan.

Proses ini seringkali terjadi pada situasi-situasi kritis seperti kelaparan, yang mana proses ini ditandai dengan pembentukan autofagosom (Klionsky, 2004).

Proses apoptosis dibedakan atas fase inisiasi dan fase eksekusi. Fase inisiasi ditandai oleh aktivasi caspase. Fase eksekusi terjadi ketika enzim bereaksi menjadikan sel apoptosis. Terdapat tiga *pathway* untuk menginduksi sel

menuju apoptosis, yaitu *death receptor-pathways*, jalur mitokondria dan jalur retikulum endoplasma (Ashkenazi & Dixit, 1998). *Death receptor-pathways* (disebut juga sebagai mekanisme jalur ekstrinsik) diawali oleh ikatan ligan pada *cell surface death receptor* sehingga menyebabkan sel mengalami oligomerisasi.

Death receptor mempunyai cytoplasmic domain yang berisi protein interaksi yang disebut death domain untuk mengirim sinyal apoptosis (Pecorico, 2005). Ligan untuk kematian sel antara lain yaitu FasL dan TNF $\alpha$ , sedangkan reseptor kematian sel yang paling sering dipelajari adalah CD95 (Fas atau Apol) dan TNFRI (p55 atau CD120a) (Ashkenazi & Dixit, 1998).

Jalur mitokondria (mekanisme jalur intrinsik) diinduksi oleh stimulus internal seperti kerusakan DNA dan stres oksidatif. Jalur intrinsik disebabkan oleh peningkatan permeabilitas mitokondria sehingga mengaktifasi pelepasan molekul pro-apoptosis dari famili Bcl-2 ke sitoplasma. Famili Bcl-2 terdiri dari kurang lebih 18 macam protein antara lain Bim, Noxa, Puma, Bid dan Bad, yang semuanya berfungsi sebagai regulator apoptosis (Silva & Victor, 2009). Dua protein yang berfungsi sebagai anti apoptosis adalah Bcl-2 dan Bcl-X. Protein anti-apoptosis dalam keadaan normal berada disekitar membran mitokondria dan sitoplasma. Ketika sel kehilangan kemampuan mempertahankan diri atau



mengalami stres, Bcl-2 dan atau Bcl-x akan menghilang dari membran mitokondria dan digantikan kelompok protein pro-apoptosis seperti Bax, Bak dan Bim. Ketika jumlah Bcl-2/Bcl-x menurun, maka akan terjadi peningkatan permeabilitas membran mitokondria sehingga menyebabkan keluarnya beberapa protein yang akan mengaktifkan caspase kaskade (Macdonal, *et al.*, 2004).

Pada mitokondria terdapat faktor proapoptosis seperti sitokrom c dan AIF (*apoptosis inducing factors*). Saat keduanya dilepaskan ke sitoplasma maka akan terjadi aktivasi jalur caspase dan pelepasannya diatur oleh famili Bcl-2 yang terikat dengan mitokondria, yaitu Bax dan Bad (Silva & Victor, 2009). Sitokrom c adalah protein heme yang berperan sebagai pembawa elektron yang larut dalam air dalam fosforilasi oksidatif mitokondria. Sitokrom c yang keluar ke sitoplasma akan berikatan dengan Apaf-1 membentuk CARD (*caspase recruitment domain*). Beberapa CARD bergabung membentuk kompleks apoptosom kemudian mengikat pro-caspase 9 dan mengaktifkannya menjadi caspase 9 (caspase inisiator). Caspase 9 ini akan mengaktifkan procaspase-3 menjadi caspase 3 yang merupakan caspase efektor yang melaksanakan apoptosis (Fan, *et al.*, 2005).

Stres pada retikulum endoplasma (RE) juga dapat menginduksi program kematian sel. Stres pada RE disebabkan karena adanya akumulasi agregat protein. Fungsi caspase-12 dalam jalur ini telah dipelajari tapi dengan hasil yang masih belum jelas (Nakagawa, *et al.*, 2000; Di Sano, *et al.*, 2006). Caspase-12 dapat mengaktifkan caspase-3, -8 dan -9, sedangkan caspase-12 itu sendiri dapat teraktivasi oleh Ca<sup>2+</sup> dan stres oksidatif (Oyadomari & Mori, 2004).

Caspase-12 diketahui dapat menghalangi aktivasi caspase-1 dan meningkatkan survival dari syok septik (Saleh, *et al.*, 2006).

Fase inisiasi diawali dengan terikatnya sinyal kematian sel pada reseptor. Sinyal kematian sel seperti *Fas ligand* (FasL) dan *Tumor Necrosis Factor* (TNF)



secara spesifik dikenali oleh reseptornya seperti Fas dan TNF reseptor (TNFR)-1 di membran plasma sel (Ashkenazi & Dixit, 1998). Fas mampu berikatan dengan *Fas-Associated Death Domain* (FADD) dan menyebabkan terjadinya agregasi DED yang kemudian akan mengarahkan DED berinteraksi dengan DED pada prodomain procaspase-8, yang selanjutnya akan menginduksi oligomerisasi procaspase-8 yang berada pada sisi sitosolik pada membran plasma dan membentuk kompleks *Death-Inducing Signal Complex* (DISC). Di dalam DISC, dua subunit linear dari procaspase-8 akan merapat sehingga menyebabkan autoaktifasi procaspase-8 menjadi caspase-8. Pada beberapa tipe sel, caspase-8 ini mampu secara langsung mengaktifasi procaspase-3 menjadi caspase-3 (Cowling, *et al.*, 2002).

Fase eksekusi merupakan fase akhir dari apoptosis yang dibantu kaskade proteolitik. Famili Caspase terdiri lebih dari 10 macam protein yang mempunyai 2 fungsi dasar yaitu *initiator caspase* seperti caspase-8, caspase-9 dan *executioner caspase* seperti caspase-3 dan caspase-6. *Executioner caspase* berikatan dengan sitoskeleton dan *nuclear matrix protein* yang menyebabkan gangguan pada sitoskeleton dan terpecahnya nukleus (Macdonal, *et al.*, 2004). Caspase-3 adalah bentuk aktif dari procaspase-3 dan merupakan faktor kunci untuk eksekusi apoptosis. Procaspase-3 dapat diaktifasi oleh caspase-3, caspase-8, caspase-9, caspase-10, protease CPP32 dan granzyme B (Gran B). Substrat yang dapat di aktivasi oleh caspase-3 yaitu procaspase-3, procaspase-6, procaspase-9, DNA-PK, PKC $\gamma$ , PARP, D4-GDI (D4 GDP-dissociation inhibitor), *steroid response element-binding protein*, U<sub>1</sub>-70kD, dan *inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease* (ICAD) (Yuan & Ding, 2002). Caspase-6 dan caspase-7 mempunyai kemiripan yang tinggi dengan caspase-3. Procaspase-3 dapat diaktifasi oleh caspase-3 tetapi tidak dapat diaktifasi oleh



Gran B. Caspase-6 juga mampu mengaktivasi procaspase-3 melalui jalur *feedback* positif (Sattar, *et al.*, 2003).

#### 2.1.6.2 Respon Akibat Kematian Sel

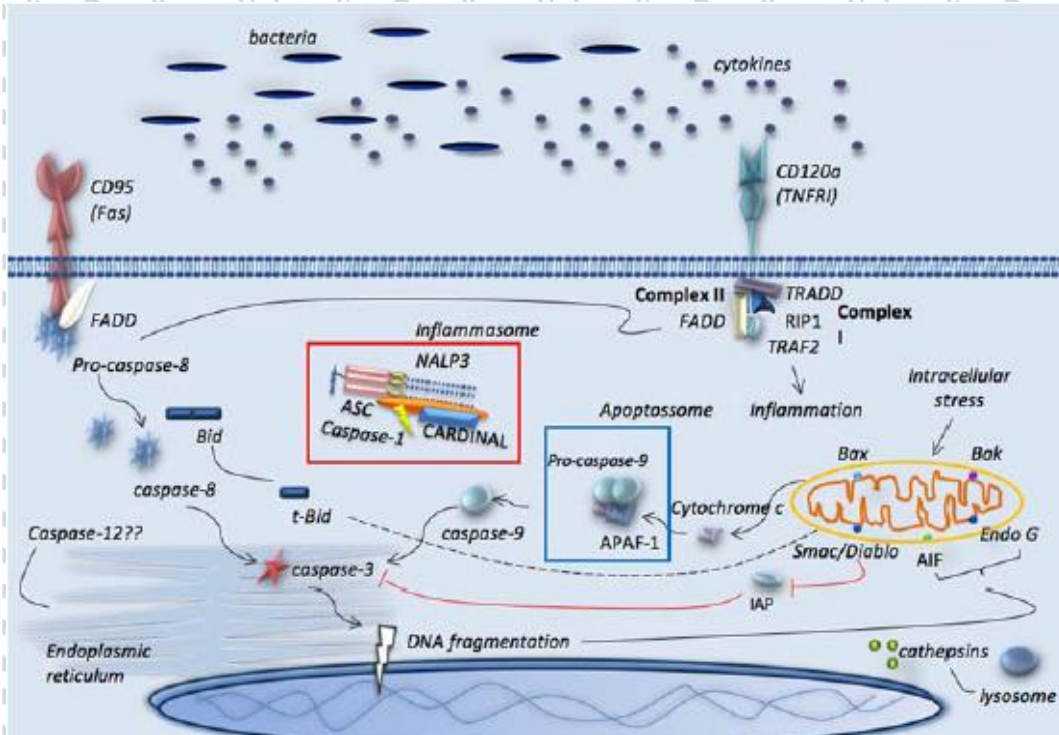
Pada pasien sepsis, terdapat peningkatan jumlah sel yang mengalami apoptosis, terutama yaitu sel limfosit, sel dendritik dan sel epitel (Silva & Victor, 2009). Tingkat apoptosis sel berhubungan dengan keparahan gejala sepsis dan terbukti dengan luaran klinis pasien yang menurun (Le Tulzo, *et al.*, 2002).

Populasi limfosit yang berkurang adalah sel B dan sel T CD4<sup>+</sup>. Selain pengurangan jumlah limfosit, sepsis juga menginduksi apoptosis pada sel epitel.

Organ utama yang mengalami peningkatan apoptosis sel epitel antara lain yaitu usus (Coopersmith, *et al.*, 2002), paru-paru (Perl, *et al.*, 2005), dan hati (Wesche-Soldato, *et al.*, 2007). Kematian sel apoptosis dapat menyebabkan terjadinya pada sepsis yang diinduksi anergi (keadaan tidak responsif terhadap antigen).

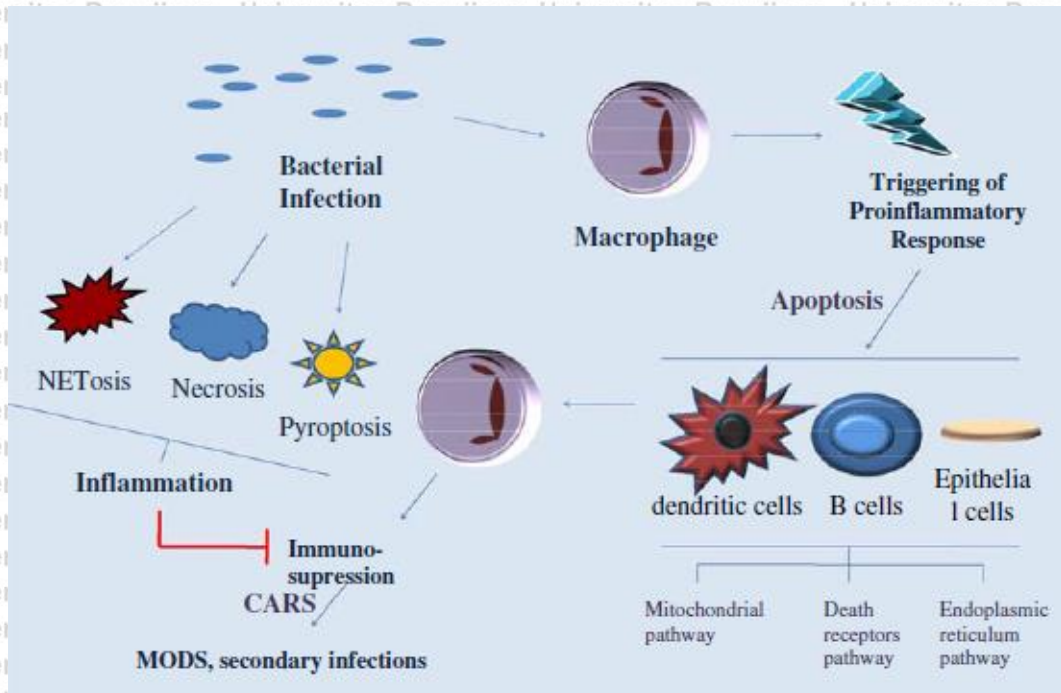
Tipe dari kematian sel menentukan respon imunologi yang diberikan oleh sel imun. Kematian sel secara apoptosis dapat menginduksi anergi atau sitokin antiinflamasi yang mengganggu respon terhadap patogen. Kematian sel secara nekrosis menyebabkan stimulasi sistem imun dan meningkatkan pertahanan antimikroba (Hotchkiss, 2003).





**Gambar 2.5. Jalur apoptosis pada sepsis (Silva & Victor, 2009)**

Respon inflamasi terhadap nekrosis merupakan kejadian yang masih belum dipahami secara lengkap. Sel yang mengalami nekrosis akan melepaskan berbagai sinyal yang berbahaya, beberapa dari molekul sinyal tersebut akan dikenali oleh reseptor sehingga menstimulasi produksi sitokin proinflamasi. Pada kejadian apoptosis, apabila sel tidak segera difagositosis, sel akan mengalami sebuah proses yang disebut nekrosis sekunder sehingga sel akan melepaskan organel intraselulernya dan menginduksi terjadinya inflamasi (Rock & Kono, 2008). Kematian sel secara apoptosis mempunyai peran penting pada sepsis karena proses tersebut mempengaruhi sel imun. Regulasi kematian sel merupakan aspek penting dari respon *host* terhadap adanya infeksi (Thornberry & Lazebnik, 1998).



**Gambar 2.6** Kematian sel yang diinduksi infeksi bakteri (Silva & Victor, 2009)

Apoptosis diduga berkontribusi terhadap derajat immunosupresi yang berkontribusi terhadap perpanjangan sepsis. Terdapat dua mekanisme utama dalam immunosupresi, yaitu program kematian sel pada sel efektor utama, atau kapasitas sel apoptosis dalam induksi anergi dan respon Th2 (Hotchkiss & Nicholson, 2006). Ketika sel makrofag atau sel dendritik memfagosit sel apoptosis, maka keduanya akan melepaskan molekul co-stimulator dengan kadar yang lebih rendah dari kadar basal (Green & Beere, 2000). Anergis adalah keadaan dari tidak responsif terhadap antigen. Sel T mengalami anergi pada saat gagal untuk berproliferasi atau mensekresi sitokin sebagai respon terhadap antigen spesifiknya. Studi mengenai fungsi sel T pada pasien dengan peritonitis menunjukkan bahwa terjadi penurunan fungsi Th1 tanpa peningkatan produksi sitokin Th2 (Imboden, 1994; Hotchkiss, 2003).

Pasien dengan sepsis mengalami immunosupresi dengan ciri-ciri yaitu kehilangan atau terhambatnya hipersensitifitas, kemampuan merespon infeksi,



dan sebagai predisposisi terhadap infeksi nosokomial. Pada awalnya sepsis ditandai dengan peningkatan mediator inflamasi, tetapi bila sepsis menetap maka akan berubah menjadi keadaan antiinflamasi imunosepresif (Hotchkiss, 2003).

Sel T mensekresi sitokin dengan sifat proinflamasi (Sel T helper tipe-1 (Th1)), termasuk TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , dan IL-2, atau sitokin dengan sifat antiinflamasi (Sel T helper tipe-2 [Th2]), contohnya IL-4 dan IL-10. Faktor-faktor yang menentukan apakah Sel T CD-4 mempunyai respon Th1 atau Th2 belum diketahui, akan tetapi diduga dipengaruhi oleh tipe patogen yang menginfeksi, ukuran dari inokulum bakteri, dan tempat infeksi (Hotchkiss & Nicholson, 2006).

### 2.1.7 Kegagalan Sistem Imun pada Sepsis

Pasien yang menderita sepsis mengalami penekanan sistem imun yang meliputi hilangnya penundaan hipersensitivitas, ketidakmampuan untuk membersihkan infeksi, kecenderungan untuk mengalami infeksi nosokomial. Sepsis dikarakterisasi dengan meningkatnya mediator inflamatori, tetapi sepsis tetap bertahan pada tubuh host karena pada tubuh penderita sepsis terjadi perubahan sistem imun dimana akan terjadi penekanan sistem imun antiinflamatori. Terjadinya penekanan sistem imun pada sepsis menunjukkan bahwa lipopolisakarida menstimulasi keseluruhan darah pasien sepsis untuk mengeluarkan sitokin inflamatori dalam jumlah yang kecil yaitu TNF $\alpha$  dan interleukin 1 $\beta$  daripada yang dibutuhkan oleh pasien (Hotchkiss dan Karl, 2003; Liu & Malik, 2006).

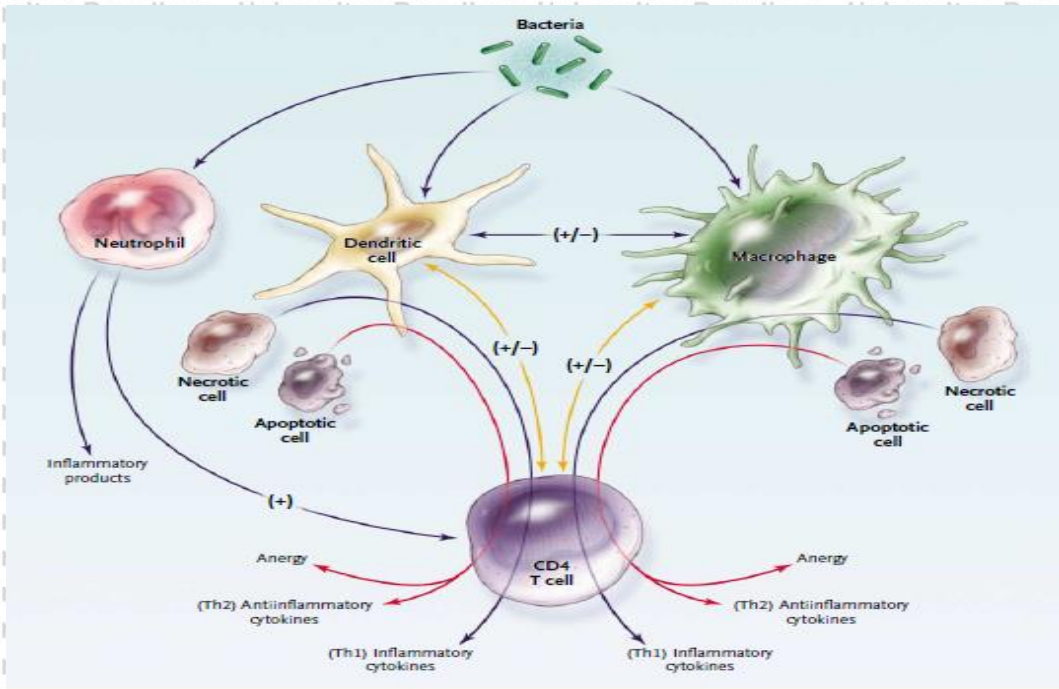
Sel CD4 T yang teraktivasi diprogram untuk mengeluarkan sitokin yang terlibat dalam sistem imun. Sel ini mengeluarkan sitokin inflamatori (sel T helper tipe 1 [Th1]), seperti TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , dan IL-2, atau sitokin dengan antiinflamatori (sel T helper tipe 2 [Th2]), seperti IL-4 dan IL-10. Faktor yang mendeterminasikan

apakah sel CD4T memiliki respon Th1 atau Th2 masih belum diketahui atau mungkin terpengaruh oleh tipe patogen, ukuran inokulum bakteri, dan letak infeksi. Sel mononuklear dari pasien dengan luka bakar atau trauma memiliki penurunan kadar sitokin Th1 tetapi peningkatan kadar sitokin Th2 IL-4 dan IL-10, dan hal ini tidak akan mendukung survival pasien sepsis. Studi lain menunjukkan bahwa peningkatan kadar IL-10 pada pasien sepsis bisa digunakan untuk memprediksi mortalitas (Hotchkiss & Karl, 2003).

### 2.1.8 Sepsis dan Disfungsi Organ

Sepsis dapat menyebabkan disfungsi organ dikarenakan kegagalan sistemik sistem imun dalam mengatasi infeksi yang masuk kedalam tubuh. Disfungsi organ pada sepsis ditandai dengan adanya hipoperfusi jaringan dan hipoksia, asidosis laktat, oliguria, atau perubahan fungsi cerebral. Pemberian treatment dengan antibiotik, pemberian resuscitation cairan, dan teknologi yang dapat membantu kerja organ, tingkat mortalitas pasien sepsis masih mencapai 35%. Kebanyakan infeksi disebabkan oleh bakteri dan mayoritas pasien mengalami disfungsi paru-paru yang berhubungan dengan ketidakstabilan kardiovaskular dan memburuknya fungsi ginjal. Beberapa faktor yang terlibat dalam patogenesis kegagalan organ seperti endokrin dan sistem imun, *disseminated intravascular coagulation* (DIC), faktor genetic, dan kekacauan energi metabolisme, kemungkinan pada mitokondria (Brown *et al.*, 2006; Liu & Malik, 2006; Abraham & Singer, 2007).





**Gambar 2.7 Respon sistem imun terhadap patogen, melibatkan cross-talk antara banyak sistem imun termasuk makrofag, sel dendritik, dan sel T CD4** (Sumber: Hotchkiss dan Karl, 2003). Makrofag dan sel dendritik teraktivasi dan mencerna bakteri dan menstimulasi sitokin (IFN- $\gamma$ ) yang disekresikan oleh sel T CD4. Sel T CD4 mempunyai profil antiinflamasi (sel helper tipe 2 [Th2]) yang mensekresikan IL-10 yang berperan menekan aktivasi makrofag. Sel T CD4 teraktivasi oleh stimulasi makrofag dan sel dendritik. Contohnya, makrofag dan sel dendritik mensekresikan IL-12 yang mengaktivasi sel T CD4 untuk mensekresikan sitokin inflamatori (sel helper tipe 1 [Th1]). Tergantung pada beberapa faktor diantaranya jenis organisme dan letak infeksi, makrofag dan sel dendritik akan merespon dengan menginduksi sitokin inflamatori atau anti inflamatori atau menyebabkan penurunan global pada produksi sitokin (anergy). Makrofag dan sel dendritik yang telah mencerna sel nekrosis akan menginduksi profil sitokin inflamatori (Th1). Pencernaan sel apoptosis dapat menginduksi profil sitokin anti inflamatori yang lain atau anergy. Tanda plus mengindikasikan terjadinya up-regulasi, tanda minus mengindikasikan down-regulasi, apabila tanda plus dan minus bersamaan maka up-regulasi dan down-regulasi terjadi bersamaan, bergantung pada beberapa faktor (Hotchkiss & Karl, 2003).

Neutrofil berperan penting dalam melawan infeksi bakteri dimana dapat terjadi neutropenia (setelah kemoterapi), yang meningkatkan kerentanan terhadap infeksi dan sepsis. Aktivasi neutrofil yang berlebihan dapat meningkatkan kerusakan jaringan. Disfungsi organ meningkat pada pasien sepsis, salah satunya dipengaruhi oleh aktivasi neutrofil yang berlebihan dalam mengatasi infeksi sehingga beberapa studi klinis memanfaatkan neutrofil sebagai



agen terapi pada pasien sepsis (Brown *et al.*, 2006; Hotchkiss & Karl, 2003).

Neutrofil berperan penting dalam eliminasi patogen bakteri karena memiliki enzim proteolitik yang sangat besar dan cepat memproduksi *reactive oxygen species* untuk mendegradasi patogen yang terinternalisasi. Jika faktor litik atau sitokin proinflamatori dilepaskan secara ekstraseluler dari jaringan yang terinfiltrasi neutrofil maka akan terjadi kerusakan lokal. Neutrofil akan menginduksi kerusakan jaringan pada lokasi terjadinya lokalisasi infeksi bakteri, pada tahap yang lebih ekstrim, akan memicu pembentukan nanah (*abscess*) meskipun infiltrasi jaringan atau kerusakan organ pada situasi ini sangat jarang (Brown *et al.*, 2006; Liu & Malik, 2006; Abraham & Singer, 2007).

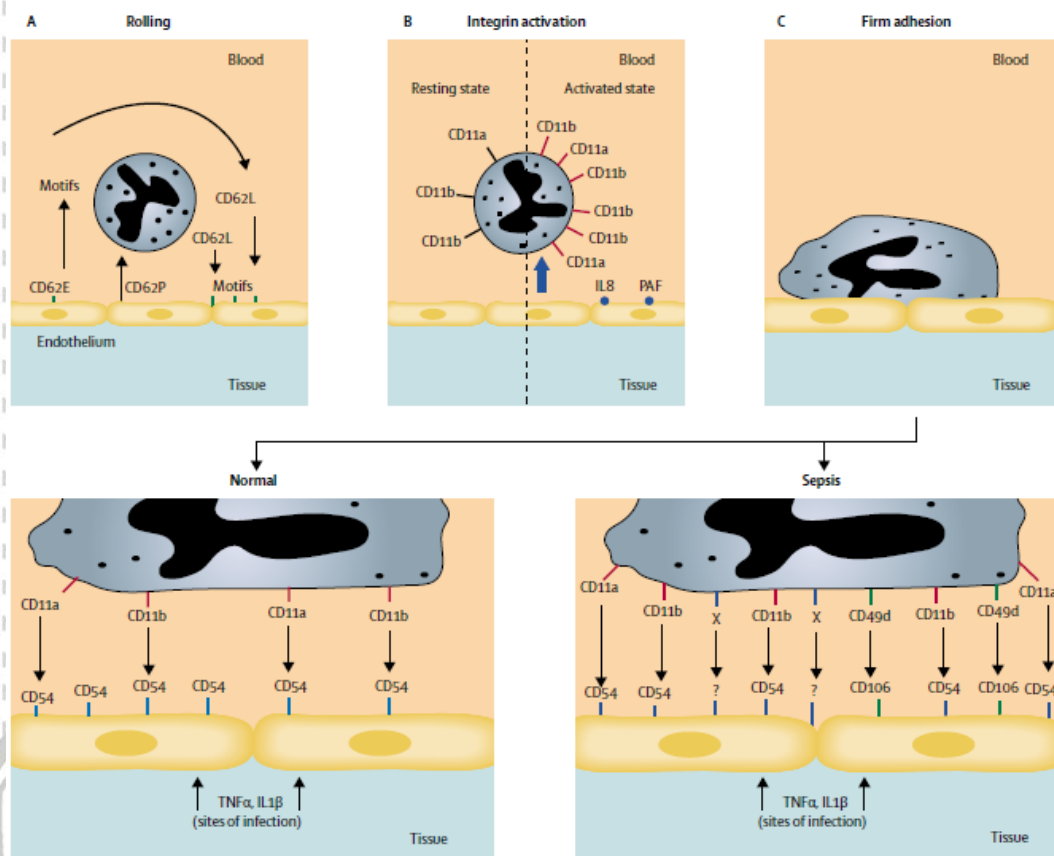
Pemeriksaan pada spesimen autopsi pasien dengan kegagalan multiple organ membuktikan adanya lokalisasi neutrofil dan teragregasi pada pembuluh darah ginjal dan terjadi infiltrasi pada paru-paru. Pada kondisi *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), beberapa kerusakan paru-paru akut berhubungan dengan sepsis, intensitas neutrofil yang terinfiltrasi berhubungan dengan kerusakan fungsi paru-paru (Brown *et al.*, 2006; Liu & Malik, 2006; Abraham & Singer, 2007).

Selama inflamasi sistemik, terjadi mekanisme homeostasis yang disertai oleh mikrosirkulasi termasuk hiperaktivasi endothelial, deposisi fibrin, terhambatnya vascular, dan terganggunya oksigenasi pada jaringan. Supresi fungsi neutrofil pada sepsis dapat meredakan kegagalan organ, tetapi pengaturan atau peningkatan aktivitas neutrofil dapat mengeliminasi inisiasi patogen. Neutrofil membutuhkan 14 hari perkembangan dalam bone marrow dan akan tersimpan sebelum dilepaskan ke dalam darah, neutrofil membutuhkan 12-14 jam untuk transit dari *circulating pool* (axial stream) menuju *marginating pool* (kontak dengan dinding pembuluh darah). Ketika tidak terjadi infeksi bakteri, neutrofil memasuki organ retikuloendotelial, seperti liver, atau kembali ke dalam



bone marrow untuk mengalami apoptosis. Neutrofil yang mengalami penuaan akan mengerut membentuk body apoptosis yang akan difagosit oleh makrofag disekitarnya, hal ini mencegah terjadinya kerusakan jaringan oleh faktor litik yang dikeluarkan oleh sel yang mengalami penuaan (*senescent*) (Brown *et al.*, 2006; Lewis *et al.*, 2012).

Kriteria klinis sepsis termasuk jumlah neutrofil yang tinggi, rendah, atau mengandung lebih dari 10% sel *immature*. Tingginya jumlah neutrofil darah terjadi karena rekrutmen yang berlebihan dari bone marrow, kembalinya sel margined kedalam circulatory pool atau keduanya. Sampai saat ini, masih belum ada strategi terapi yang bertujuan untuk mereduksi jumlah neutrofil pada sepsis, hal ini dikarenakan sirkulasi neutrofil yang banyak diasumsikan lebih baik daripada terlalu sedikit selama infeksi bakteri. Eliminasi bakteri tergantung pada kecepatan rekrutmen neutrofil darah menuju lokasi infeksi. Neutrofil harus *binding* pertama kali pada dinding sel pembuluh darah sebelum bermigrasi di sekitar jaringan sebagai respon terhadap stimuli kimia (*chemotaxis*) (Brown *et al.*, 2006; Remick, 2007).



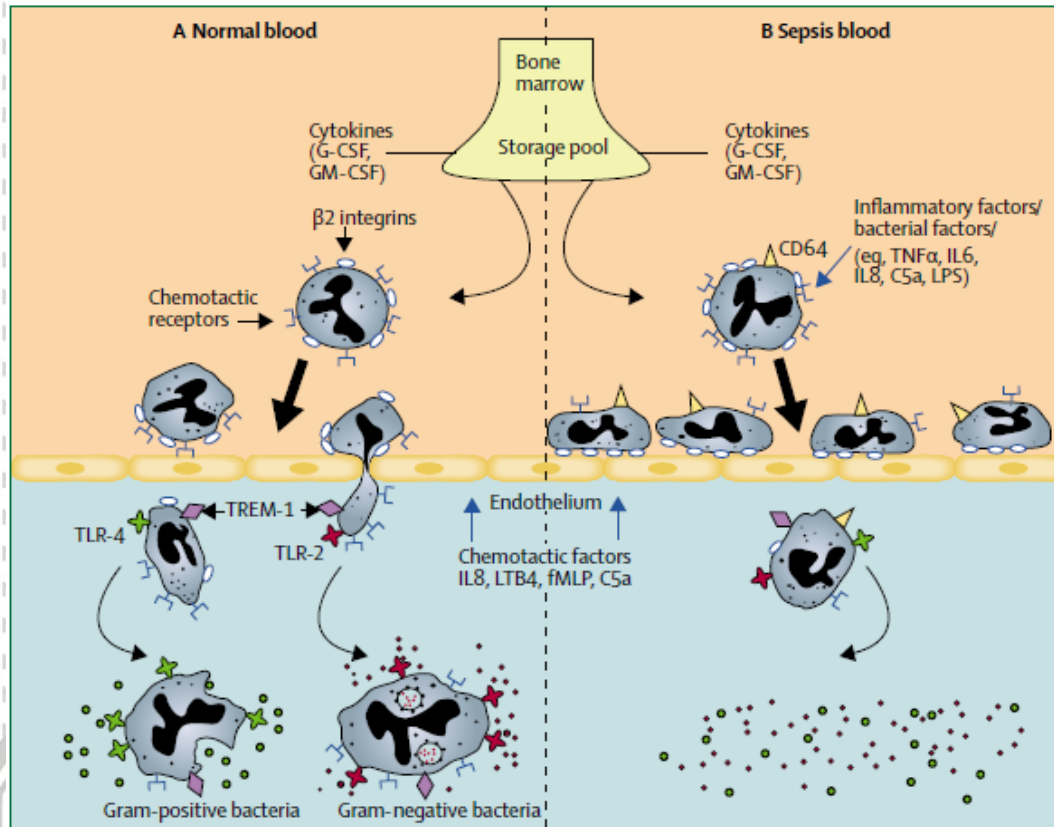
**Gambar 2.8 Pelekatan neutrofil pada endothelium sebagai tempat infeksi.**

Ikatan dari sirkulasi neutrofil pada venula postcapillary berdekatan dengan tempat infeksi bergantung pada tiga faktor yaitu *rolling* neutrofil pada endothelium, aktivasi neutrofil oleh stimuli inflamasi yang diekspresikan pada permukaan endothelial, dan adesi yang kuat. (A) Selectin pada neutrofil (L-selectin) dan pada sel endothelial (E-selectin dan P-selectin) mengenali motif kompleks karbohidrat yang menginduksi *rolling* atau *tethering* (ikatan) dari neutrofil. (B) Ikatan yang berinteraksi dengan molekul inflamatori (*platelet-activating factor* dan IL-8), yang diekspresikan pada endothelium meningkat selama infeksi. Aktivasi neutrofil oleh molekul inflamatori ini meningkat pada permukaan yang ditandai dengan adanya ekspresi  $\beta 2$  integrin, CD11a, dan CD11b, yang akan memicu *firm adhesion* kedalam endothelium. (C) Neutrofil pada kondisi sehat, *firm adhesion* dipicu oleh CD11a dan CD11b yang berinteraksi dengan CD54 yang mengalami up regulasi oleh pembentukan lokal sitokin proinflamatori (TNF $\alpha$  dan IL-1). Neutrofil pada pasien sepsis, terjadi interaksi molekul yang sama tetapi juga terjadi peningkatan intensitas dan tempat interaksi. Ikatan antara CD49d dengan CD106 sebagai akibat induksi TNF $\alpha$  dan IL-1, dan kemungkinan disebabkan oleh ekspresi molekul lainnya (X) (Brown *et al.*, 2006).

Neutrofil dari pasien sepsis menunjukkan adanya peningkatan internalisasi dan destruksi mikroorganisme, meskipun mekanismenya masih belum jelas apakah terjadi fagositosis atau penghalangan pada tempat infeksi.



Neutrofil dapat mengikat bakteri jika patogen tersebut diselubungi oleh IgG. Afinitas yang kuat dari reseptor terhadap IgG dimiliki oleh CD64, dan protein ini dipertimbangkan menjadi marker neutrofil yang teraktivasi. Ekspresi ini diinduksi oleh IFN $\gamma$  dan GM-CSF. Kebanyakan neutrofil dari pasien sepsis mengekspresikan CD64, dan up regulasi CD64 pada neutrofil neonatal dapat dijadikan indikator terjadinya sepsis. Peningkatan ekspresi CD64 berhubungan dengan ledakan aktivitas respirasi dan molekul ini terdapat pada kebanyakan neutrofil yang mengikat endothelium, interaksi ini adalah penghalangan oleh antibodi anti-CD64. Pengikatan bakteri juga terjadi via CD14, reseptor untuk LPS dan reseptor ini terdapat pada semua monosit. Reseptor ini lemah terekspresi pada neutrofil tetapi menjadi up regulasi jika terjadi respon terhadap infeksi bakteri. Reseptor lainnya yang meningkatkan fagositosis dan pengenalan bakteri diantaranya reseptor C3b yang mengikat peptida komplemen C3b; dan CD16 dan CD32 yang serupa dengan CD64 juga mengikat Fc site (tail region) dari IgG. Semua reseptor ini terekspresi pada neutrofil dari pasien dengan sepsis (Brown *et al.*, 2006; Benjamin *et al.*, 2004).



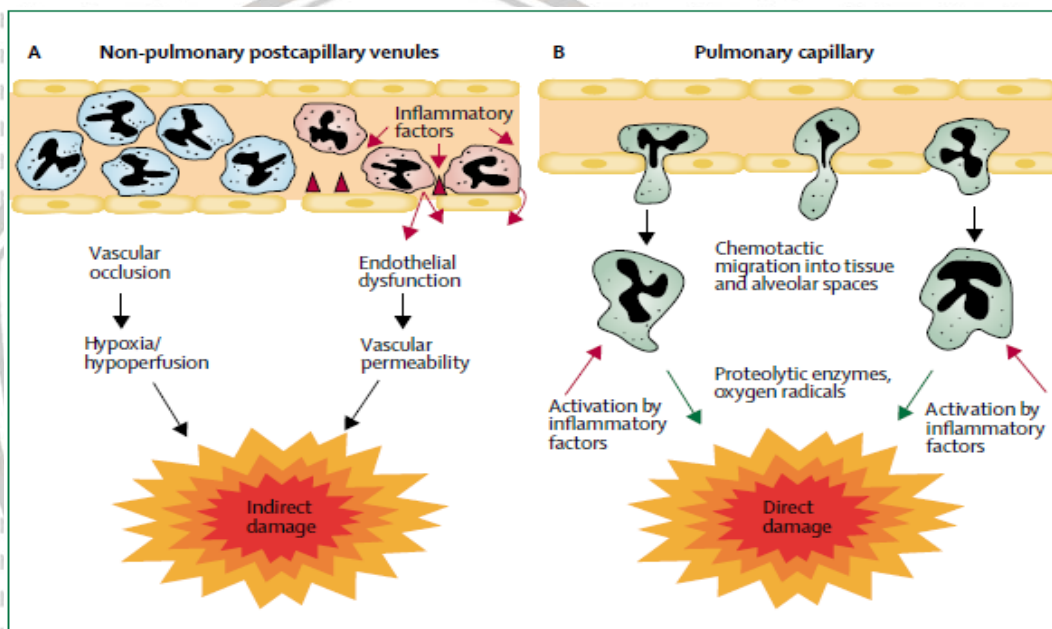
**Gambar 2.9 Rekrutmen neutrofil terhadap infeksi bakteri pada jaringan non-pulmonary (A) individu sehat dan (B) pasien sepsis.**

Sebagai respon terhadap infeksi bakteri, sitokin (G-CSF/GM-CSF) terbentuk, yang menginduksi pelepasan neutrofil dari bone marrow. (A) Pada kondisi normal, besarnya jumlah neutrofil dalam darah memasuki site infeksi bakteri oleh pelekatan pertama untuk mengaktifkan endothelium local postcapillary venules (PCV) sebelum migrasi menuju faktor chemotactic (C5a, fMLP, leukotriene B, IL-8) yang diproduksi oleh sumber infeksi. Eliminasi bakteri Gram positif didukung oleh neutrofil yang mengekspresikan Toll-like receptor 2 (TLR2), dimana bakteri Gram negatif berhubungan dengan neutrofil TLR4. Ekspresi TREM-1 (memicu terekspresinya reseptor pada sel myeloid) pada neutrofil terjadi pada semua infeksi bakteri. Kemudian, bakteri dirusak dengan fagositosis. (B) Pada pasien sepsis, setelah stimulasi neutrofil darah karena adanya faktor inflamasi (IL-1, TNF $\alpha$ , G-CSF, C5a, nitric oxide) atau produk bakteri (LPS atau lipoteichoic acid), permukaan integrin dan CD64 (afinitas tinggi reseptor Fc yang mengikat monomer IgG) mengalami up regulasi untuk memicu adesi endothelial ke dalam venula postkapiler. Beberapa faktor ini juga mengalami down regulasi sehingga banyak neutrofil yang terikat pada endothelium tetapi memiliki respon yang rendah dibandingkan neutrofil yang sehat. LPS= lipopolisakarida, LTB4= leukotriene B, Area merah= bakteri Gram positif, Area hijau= bakteri Gram negatif (Brown *et al.*, 2006).

Pada sepsis terlihat adanya dikotomi fungsional neutrofil, yang berhubungan dengan respon terhadap infeksi bakteri. Pada jaringan non-pulmonary, banyaknya neutrofil yang menuju site infeksi terhalangi kemungkinan



karena ikatan endothelial yang berlebihan sehingga mereduksi respon chemotactic, hal ini berlawanan dengan infiltrasi yang kuat dari sel ini kedalam jaringan pulmonary yang terinfeksi (gambar 8). Berkumpulnya neutrofil ini dapat dijadikan kunci inisiasi kerusakan multiple organ. Ikatan neutrofil pada dinding pembuluh darah kemungkinan dimediasi oleh ekspresi abnormal dari molekul adesi yang berbeda dari ikatan ini kedalam endothelium pulmonary, atau oleh molekul yang memiliki ikatan kuat dengan ligan endothelial.



**Gambar 2.10 Mekanisme neutrofil yang memediasi kerusakan organ pada sepsis.** (A) Jaringan non-pulmonary mengalami kerusakan secara tidak langsung dari penambahan ikatan neutrofil terhadap dinding pembuluh darah. Neutrofil (biru) terikat dengan kuat pada venula postkapiler endothelium yang menyebabkan terjadinya hambatan vaskuler sehingga memicu hipoksia dan hipoperfusi jaringan. Alternatifnya, neutrofil (merah) dilengkapi oleh sirkulasi faktor inflamatori yang terikat pada endothelium, dan menjadi siap teraktivasi oleh chemokin (segitiga) yang diekspresikan pada permukaan endothelial sebagai respon inflamasi. Sebagai respon yang tidak menguntungkan dari aktivasi ini, neutrofil akan melepaskan faktor litik yang menginduksi disfungsi endothelial, membuka junction interseluler, dan meningkatkan permeabilitas vaskuler. (B) Pada paru-paru, infiltrasi neutrofil menginduksi kerusakan secara langsung. Neutrofil mengikat kapiler endothelium dan merespon stimuli chemotactic yang diproduksi oleh mikroorganisme yang berasosiasi dengan infeksi pulmonary, neutrofil bermigrasi ke sekitar parenkim dan ruang alveolar. Ketika neutrofil teraktivasi, infiltrasi neutrofil akan menginduksi kerusakan jaringan secara langsung melalui pelepasan ekstraseluler oleh enzim proteolitik dan radikal oksigen. Kedua mekanisme kerusakan organ tersebut dapat terjadi secara bergantian jika terjadi kerusakan pada

dinding pembuluh darah karena ikatan neutrofil yang kuat sehingga neutrofil lainnya akan menuju site infeksi (Brown *et al.*, 2006).

Kerusakan organ terjadi karena neutrofil memiliki efek yang lemah pada fungsi sel endothelial berhubungan dengan mekanisme patologis yang lain pada sepsis. Neutrofil adalah sumber sitokin proinflamatori dimana ekspresinya dikontrol oleh NF $\kappa$ B yang terekspresi dengan tinggi pada pasien sepsis. Sekresi sitokin oleh neutrofil terbatas pada dinding pembuluh darah dapat merubah komponen thrombogenic sel endothelial menjadi kondisi prokoagulan dengan inisiasi disseminated intravascular coagulation (DIC), dan induksi produksi nitric oxide pada endothelial dan sel otot halus. Induksi hipotensi pada septic shock melepaskan nitric oxide yang tidak cocok dengan metabolisme jaringan via penghambatan enzim mitokondria dan berdampak pada pembentukan nitric oxide dari neutrofil tersebut. Pada paru-paru, terjadinya kerusakan organ karena kerusakan alveolus, kerusakan membran, dan gangguan mekanisme pembersihan cairan pada alveolus. Besarnya jumlah neutrofil yang memasuki jaringan alveolus akan mensekresikan enzim proteolitik dan radikal oksigen yang merespon aktivasi yang tidak menguntungkan oleh faktor inflamasi lokal atau produk bakteri (Brown *et al.*, 2006; Liu & Malik, 2006 ; Abraham dan Singer, 2007).

#### 2.1.8.1 Mekanisme Disfungsi Organ

Beberapa polimorfisme genetik berhubungan dengan sepsis diantaranya adalah substitusi dari G menjadi A pada promotor TNF- $\alpha$  posisi 308. Famili Toll-like receptor (TLR) menginduksi aktivasi seluler setelah infeksi produk mikrobia yaitu lipopolisakarida. Polimorfisme reseptor TLR4 berhubungan dengan penurunan aktivasi seluler dan reaktivitas bronchial setelah paparan



lipopolisakarida dan predisposisi syok dengan organisme Gram negatif (Balk dan Goyette, 2001 ; Abraham & Singer, 2007;).

Peningkatan aktivasi transkripsi nuclear factor- $\kappa$ B terjadi pada sepsis dan kerusakan paru-paru akut. Nuclear factor- $\kappa$ B meregulasi banyak mediator proinflamatori yang berhubungan dengan disfungsi organ, berhubungan dengan peningkatan aktivasi nuclear factor- $\kappa$ B. Ikatan antara TLR4 dengan lipopolisakarida, atau TLR2 dengan produk bakteri Gram positif seperti peptidoglikan menghasilkan peningkatan translokasi nuklear dari nuclear factor- $\kappa$ B setelah aktivasi upstream kinase. Reseptor IL-1 berhubungan dengan kinase pada perubahan asam amino pada posisi 532 sekitar 25% pada orang berkulit putih. Pasien sepsis dengan reseptor IL-1-associated kinase variant haplotype memiliki peningkatan aktivasi nuclear factor- $\kappa$ B, memiliki ventilatory support lebih besar, membutuhkan vasopressor yang lebih besar dan meningkatkan laju kematian (Liu & Malik, 2006 ; Abraham & Singer, 2007).

Selain sitokin, nitric oxide (NO) dan reactive oxygen species (ROS) juga terlibat dalam mekanisme patologis disfungsi organ pada sepsis. NO terlibat dalam relaksasi otot halus dan meningkatkan pelepasan NO berkontribusi dalam induksi hipotensi pada sepsis. NO juga menyebabkan aktivasi beberapa jalur proinflamasi pada sepsis. ROS berperan dalam produksi disfungsi organ pada sepsis dan kerusakan paru-paru akut. Meskipun scavenger non spesifik ROS tidak mampu menghambat mortalitas secara signifikan tetapi molekul seperti selenium atau mimetics dari superoxide dismutase ekstraseluler dapat dimanfaatkan sebagai pengangkal ROS. Seperti NO, ROS juga penting dalam menginduksi jalur intraseluler yang berhubungan dengan inflamasi akut dan disfungsi sistem organ. Peningkatan jumlah *heat shock protein* (HSP) terjadi selama sepsis. HSP 90 memiliki efek perlindungan. Overekspresi HSP 90 dan



mungkin HSP yang lainnya dapat menurunkan mortalitas dan kerusakan jaringan pada hewan model sepsis (Abraham & Singer, 2007; Baptiste, 2007).

Selama sepsis, aktivasi awal dari sel imun seperti monosit/makrofag, limfosit, dan neutrofil diikuti dengan down regulasi aktivitas mereka. Hal ini memicu terjadinya imunoparesis dan meningkatkan resiko superinfeksi.

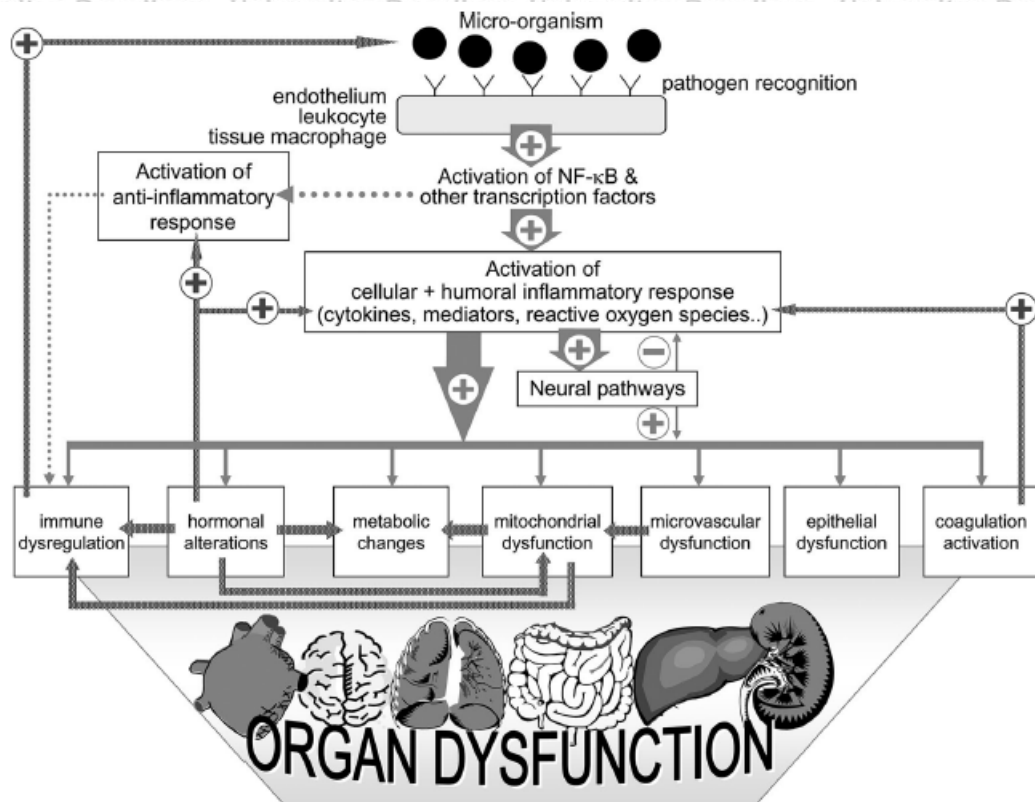
Keseimbangan antara respon proinflamasi dan anti-inflamasi dipengaruhi lokal oleh sel yang berbeda diantara kompartemen. Sirkulasi monosit dan makrofag yang bermigrasi menuju lokasi inflamasi dipengaruhi oleh signaling atau fagositosis. Kondisi lokal mempengaruhi respon imun seluler (Carcillo, 2003).

Kadar antioksidan lokal seperti glutathione dan konsentrasi substrat pada jaringan seperti arginin dan glutamine meningkat ketika terjadi inflamasi. Limfosit darah tepi mereduksi kapasitas untuk proliferasi, monosit melemahkan ledakan respiratory, dan neutrofil mereduksi aktivitas fagositosis. Paru-paru, ginjal dan organ lainnya mengalami disfungsi organ selama sepsis akut. Hal ini dikarenakan adanya sirkulasi sistemik mediator dari kompartemen teraktivasi yang akan melewati organ-organ penting dalam tubuh tersebut (Abraham & Singer, 2007; Baptiste, 2007).

Beberapa mekanisme pada sepsis yang menginduksi disfungsi organ masih belum diketahui dengan jelas. Sirkulasi dipengaruhi oleh jumlah makrosirkulasi dan mikrosirkulasi akan menyebabkan perfusi jaringan dan fungsi normal organ. Terjadinya perubahan oksigen dan substratnya, sel bereaksi terhadap sepsis dengan memodifikasi perilaku, fungsi dan aktivitas sel mereka.

Contohnya, kerusakan seluler secara langsung pada sepsis melibatkan peroksidasi membran lipid, kerusakan atau modifikasi protein seperti enzim, reseptor, dan transporter, dan kerusakan DNA (Abraham & Singer, 2007; Remick, 2007).





**Gambar 2.11 Jalur sistemik disfungsi organ pada sepsis (Abraham & Singer, 2007)**

Pada sepsis, meningkatnya hipotensi disebabkan adanya kombinasi hipovolemia sekunder menjadi redistribusi cairan eksternal dan internal, vasodilatasi, dan hiperaktivitas. Beberapa faktor yang mempengaruhi diantaranya produksi berlebih dari NO dan metabolisemenya, aktivasi vascular potassium channel, dan perubahan jumlah hormon (cortisol, vasopressin) atau respon vascular terhadap hormon ini (Abraham & Singer, 2007; Remick, 2007; Baptiste, 2007).

Perubahan metabolik yaitu terjadinya hiperglikemia berperan dalam patogenesis kegagalan organ pada sepsis. Toksisitas akut dari jumlah glukosa yang tinggi mungkin berhubungan dengan overload glukosa seluler dan menghasilkan stress oksidatif pada hepatosit, neuron, mukosa usus, tubulus ginjal, imun, dan sel endothelial. Hiperglikemia menyebabkan kerusakan oksidatif

serius pada mitokondria. Kerusakan ini terlihat jelas pada hepatosit akibat postmortem dari sepsis nonsurvivor dimana mitokondria otot terjadi down regulasi GLUT-4. Hiperglikemia juga memproduksi beberapa efek metabolic dan non metabolic seperti perubahan sirkulasi lipid, disfungsi endothelial, penurunan fungsi neutrofil termasuk fagositosis dan aktivitas opsonic. Beberapa perubahan ini berakibat negatif pada fungsi organ dan daya tahan pasien sepsis (Remick, 2007; Baptiste, 2007). Kekacauan metabolisme pada sepsis merupakan respon terhadap kerusakan dan penurunan pemasukan makanan. Terapi intervensi seperti catecholamines dapat meningkatkan resistensi insulin dan lipolisis (Abraham & Singer, 2007).

Paru-paru terlibat dalam proses inflamasi awal dengan neutrofil teraktivasi, edema interstitial, kehilangan surfaktan, dan fibrinous alveolar exudates. Patologi dikarakterisasi dengan infiltrasi sel mononuclear, proliferasi pneumocytes tipe II, dan fibrosis interstitial yang menginduksi kerusakan paru-paru dan toksisitas oksigen. Apoptosis dapat diinisiasi dengan mediasi reseptor dan jalur mitokondria. Pembentukan reseptor "death" yang dipicu oleh ligan protein pada permukaan sel efektor atau fase soluble di sekitar cairan ekstraseluler. Fas (CD95) adalah salah satu protein reseptor membran yang memediasi apoptosis via aktivasi caspase (protease intraseluler) yang menghasilkan cleavage DNA. Soluble FasL meningkat signifikan pada cairan bronchoalveolar yang diambil dari pasien dengan resiko kerusakan paru-paru akut. Akumulasi soluble FasL akan membentuk fenotip proinflamasi pada makrofag alveolar dan sel mononuclear baru. Tetapi masih belum diketahui dengan jelas hubungan apoptosis dengan faktor resiko kerusakan paru-paru akut seperti pada sepsis (Balk & Goyette, 2001; Abraham & Singer, 2007; Baptiste, 2007).



Patogenesis pada kerusakan paru-paru dipengaruhi oleh ROS. Selain efek dari sitotoksik secara langsung, ROS berperan penting dalam respon inflamasi yang dimediasi oleh perubahan keseimbangan oksidan/antioksidan, sinyaling redoks, dan reaksi katabolisme iron. Ketersediaan iron juga meregulasi aktivitas transkripsi hypoxia inducible factor (HIF) sebagai respon kadar oksigen yang rendah dengan up regulasi ekspresi beberapa gen, termasuk mengkode vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin, dan inducible heme oxygenase-1. Katabolisme heme oleh heme oxygenase-1 memproduksi karbon monoksida, bilirubin, dan iron bebas. Meskipun heme oxygenase-1 berperan sebagai cytoprotective, ini dapat memproduksi kerusakan paru-paru pada hewan model sepsis. Pada tikus yang mengalami overload iron, heme oxygenase-1 mengalami up regulasi lebih cepat pada paru-paru dibandingkan organ tubuh yang lain (Balk & Goyette, 2001; Abraham & Singer, 2007; Baptiste, 2007).

Pasien sepsis mengalami kerusakan otak dengan ciri klinis encephalopathy yaitu agitation, kekacauan, dan koma. Pada studi autopsi pasien sepsis terdapat beberapa lesi cerebral yaitu ischemia hemorrhage (26%), microthrombi (9%), microabscesses (9%), dan multifocal necrotizing leukoencephalopathy (9%). Kerusakan otak akibat mikroorganisme dan inflamasi terjadi dengan beberapa jalur yang berbeda. Difusi langsung dari mikroorganisme dan mediator inflamasi kedalam struktur cerebral akan merusak barrier darah dalam otak, aktivasi endothelial dan kebocoran atau difusi pasif dari sitokin dan produk bakteri seperti lipopolisakarida (LPS), dan input via serat sensor afferent dalam vagus. Otak kemudian akan melakukan respon modulatori yang kuat via tiga jalur efferent: *hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, sistem saraf sympathetic, dan jalur anti-inflamasi cholinergic. Efek sepsis pada otak akan mempengaruhi organ yang lain dengan menstimulasi respon neuroendokrin dan gangguan keseimbangan antara sistem saraf pusat dan sistem imun,



menghasilkan perubahan fungsi imunologis. Imunomodulator neurotransmitter dari host dan mediator neuroendokrin akan dirilis pada sepsis, termasuk sensory neuropeptides, calcitonin gene related peptide, substance P, corticotrophin-releasing factor, dan  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone (Abraham & Singer, 2007; Tandon & Tsao, 2008).

Regulasi sistem neuroendokrin terhadap respon stres pada beberapa kondisi normal. Pelepasan awal dari catecholamines, corticotrophin-releasing factor, vasopressin, dan oksitosin diikuti dengan sekresi hormon adrenocorticotrophic pituitary, kemudian prolaktin dan hormon pertumbuhan.

Akibatnya terjadi pelepasan hormon dari organ target (contohnya glukokortikoid dari kelenjar adrenal, rennin dari ginjal, dan glucagon dari pankreas). Pada sepsis, respon normal ini akan terganggu. Sebagai contoh, NO diekspresikan pada otak dapat menginduksi apoptosis pada neuron dan sel mikroglial, meskipun terlihat sebagai target untuk neuroendokrin dan nukleus autonomic. Pada paru-paru, apoptosis terlihat lebih berbahaya daripada otak karena pada otak terdapat produksi faktor proapoptosis seperti neuronal cytochrome C yang menyediakan perlindungan pada sepsis (Abraham & Singer, 2007 ; Tandon & Tsao, 2008).

Sistem hepatosplanchnic tidak secara langsung dipengaruhi oleh sepsis, tetapi seperti otak dan paru-paru, dapat juga dipengaruhi oleh organ yang lainnya. Pengeringan limfatik dan perubahan permeabilitas epitel intestinal memberikan penyerapan sistemik secara langsung dan tidak langsung dari mediator proinflamasi dan toksin dari mikroba luminal. Enterocytes dapat membentuk sitokin proinflamasi, termasuk HMGB1. Sepsis menginduksi gangguan barrier epitel yang terjadi secara luas pada seluruh tubuh, dari usus hingga ginjal, paru-paru hingga otak. NO dan metabolisemenya peroxynitrite terlibat dalam regulasi dan fungsi dari ekspresi protein tight junction, dan terlibat



dalam modulasi aktivitas pompa membran,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -adenosine triphosphatase (Tandon & Tsao, 2008; Baptiste, 2007).

Pengeringan sistem portal akan berpengaruh langsung pada hati. Suplai darah ke dalam hati akan secara langsung didapatkan dari sirkulasi sistemik. Hal ini digunakan untuk mendeteksi adanya mikroba atau produk mikrobia dari usus atau sistemik. Usus adalah tempat primer untuk pembersihan endotoksin bakteri dan produksi sitokin proinflamasi dapat menyebabkan efek jangka panjang pada paru-paru. Liver juga terlibat dalam produksi protein fase akut sehingga pada sepsis dan syok sepsis dapat terjadi disfungsi liver (Abraham & Singer, 2007; Baptiste, 2007; Tandon & Tsao, 2008).

Beberapa tanda disfungsi organ akut yang terjadi pada sepsis diantaranya (Balk & Goyette, 2001; Baptiste, 2007):

- a. Disfungsi respiratori dapat didefinisikan dengan perubahan status oksigenasi, ditandai dengan penurunan rasio  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  atau membutuhkan suplemen oksigen, peningkatan kadar PEEP, dan atau membutuhkan pertolongan ventilator. Gradasi dari ketiga parameter ini mengindikasikan keparahan atau disfungsi dengan karakterisasi  $\text{FiO}_2 \geq 0.40$ ,  $\text{PEEP} \geq 5-10 \text{ cmH}_2\text{O}$  dan atau pertolongan ventilator selama  $\geq 72$  jam.
- b. Disfungsi renal dapat diketahui dengan perubahan output urin atau serum creatinine. Tanpa memperhatikan polyuria atau oliguria, jumlah serum creatinine  $\geq 20 \text{ mg/l}$  ( $> 2 \text{ mg/dl}$ ) yang mengindikasikan kegagalan ginjal, sehingga membutuhkan dialysis atau terapi lain untuk menjaga keseimbangan cairan, asam basa dan atau homeostasis elektrolit.
- c. Disfungsi kardiovaskuler diindikasikan dengan hipotensi, atrial atau ventricular arrhythmias, membutuhkan bantuan inotropic atau vasopressor dan meningkatnya filling pressure (seperti CVP, PCWP). Gradasi dari



beberapa parameter, laju jantung dan rasio CVP:MAP digunakan untuk mendefinisikan keparahan disfungsi atau kegagalan kardiovaskuler.

d. Disfungsi hepatic dikarakterisasi dengan penyakit kuning, hiperbilirubinaemia atau meningkatnya jumlah serum dari enzim hepatic, dan frekuensi yang rendah dari hipoalbuminaemia atau prothrombin time (PT) dalam jangka waktu yang lama. Kegagalan ginjal dapat didefinisikan dengan parameter seperti serum bilirubin  $> 20 \text{ mg/l}$  ( $> 2 \text{ mg/dl}$ ) selama 48 jam, dengan kenaikan glutamate dehydrogenase dua kali daripada jumlahnya pada kondisi normal.

e. Disfungsi haematologic dikarakterisasi dengan thrombocytopenia, leukocytosis atau leucopenia, dan biomarker dari coagulopathy, termasuk abnormalitas PT, activated partial thromboplastin time (APTT), produk fibrin, D-dimer atau beberapa kejadian DIC.

f. Disfungsi gastrointestinal dikarakterisasi dengan adanya pendarahan, intoleransi terhadap suplai nutrisi tambahan, intestinal ischaemia atau infarksi, acalculous cholecystitis, pankreatitis, perforasi usus besar, ileus dan necrotizing enterocolitis.

g. Disfungsi neurologic dikarakterisasi dengan perubahan kadar kesadaran dan fungsi sistem saraf pusat (CNS), dan biasanya dikuantifikasikan Glasgow coma Coma score Score. Encephalopathy diindikasikan dengan beberapa kriteria subyektif seperti psychosis, kekacauan, coma dan obturation.

h. Disfungsi endokrin lebih sulit dikenali daripada sistem organ yang lain. Hal ini mungkin terlibat dalam disfungsi adrenal atau termanifestasi dalam hiperglikemia, hipertrigliserida, hipoalbuminaemia, hilangnya berat badan, cachexia, dan hiperkatabolisme.

i. Disfungsi imunologis juga sulit dievaluasi, hal ini mungkin diindikasikan dengan perkembangan infeksi nosocomial, peningkatan leukositosis, pyrexia, dan perubahan aktivitas imunitas.



### 2.1.8.2 Gagal Kardiovaskuler

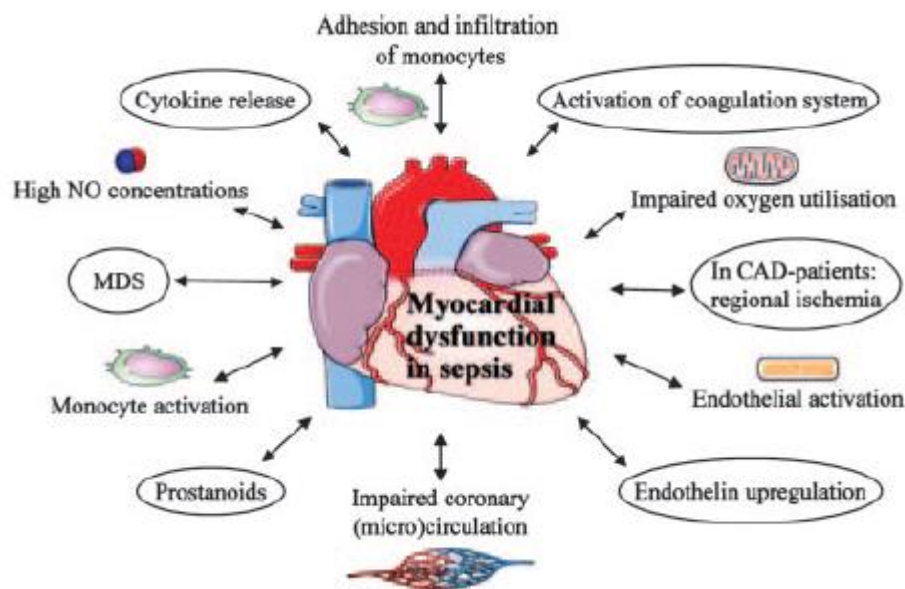
Sistem organ paling penting yang terkena dampak sepsis dan syok sepsis adalah sistem kardiovaskuler. Disfungsi kardiovaskuler pada sepsis meningkatkan laju mortalitas dari 70% menjadi 90% dan hanya 20% pasien sepsis yang tidak mengalami disfungsi kardiovaskuler. Oleh karena itu, disfungsi myocardial pada sepsis menjadi fokus penelitian meskipun mediator dan jalur yang menunjukkan hubungan depresi myocardial dengan sepsis masih belum diketahui dengan jelas (Merx & Weber, 2007; Remick, 2007).

Studi echocardiographic menunjukkan adanya ketidakcocokan fungsi sistolik ventricular kiri dan diastolik pada pasien sepsis, penurunan kontraktil dan ketidakesesuaian compliance myocardial yang menyebabkan disfungsi myocardial pada sepsis. Meskipun terjadi perbedaan fungsi dan struktur antara ventrikel kiri dan kanan, perubahan fungsi yang serupa telah diobservasi pada ventrikel kanan dan menunjukkan bahwa disfungsi ventrikel kanan pada sepsis bersifat paralel dengan disfungsi ventrikel kiri. Meskipun kontribusi ventrikel kanan dalam cardiomyopathy sepsis masih belum diketahui dengan jelas (Merx & Weber, 2007; Abraham & Singer, 2007).

Depresi kardiak selama sepsis kemungkinan disebabkan oleh banyak faktor. Teori awal depresi myocardial pada sepsis didasarkan pada hipotesis global myocardial ischemia meskipun pasien sepsis menunjukkan tingginya aliran *coronary blood* dan berkurangnya *coronary artery*-perbedaan *coronary sinus oxygen*. Pada sirkulasi periperal, perubahan ini menyebabkan gangguan aliran autoregulasi atau gangguan penggunaan oksigen. Coronary sinus blood pada pasien syok sepsis menunjukkan terjadinya perubahan kompleks metabolik pada myocardium sepsis, termasuk peningkatan ekstraksi laktat, penurunan ekstraksi asam lemak bebas, dan penurunan uptake glukosa. Pemeriksaan pada



mencit model sepsis dengan resonansi magnetik diketahui adanya energi fosfat tinggi pada myocardium. Pasien sepsis mungkin mengalami *coronary artery disease (CAD)*, *regional myocardial ischemia* atau infark sekunder CAD yang tidak terdiagnosis. Faktor pembentukan CAD pada sepsis akan mengakibatkan terjadinya inflamasi dan mengaktifkan sistem koagulasi. Endothelium berperan penting dalam sepsis tetapi belum dapat diketahui hubungan antara CAD dengan disfungsi endothelium pada sepsis (Merx & Weber, 2007; Abraham & Singer, 2007).



**Gambar 2.12** Sinopsis mekanisme disfungsi myocardial pada sepsis. MDS mengindikasikan *myocardial depressant substance*.

*Myocardial depressant substance (MDS)* yang terlibat pada disfungsi myocardial akan menyebabkan peningkatan konsentrasi IL-1, IL-8, dan C3a. Lisozim c, agen bakteriolitik dipercaya berasal dari disintergrasi neutrofil granulosit dan monosit dimana lisozim ini memediasi efek cardiodepressive selama sepsis *Escherichia coli* dan hambatan terhadap lisozim c dapat mencegah depresi myocardial yang telah diujikan pada hewan model sepsis. Kandidat



potensial dari MDS diantaranya adalah sitokin, prostanooid, dan nitric oxide (NO) (Merx & Weber, 2007; Bernard & Bernard, 2012).

Keberadaan lipopolisakarida (LPS) dalam manusia dan hewan menyebabkan efek hemodinamik syok sepsis, meskipun hanya sedikit pasien dengan syok sepsis yang terdeteksi kadar LPS dan karakteristik kimia dari LPS tidak konsisten untuk merepresentasikan MDS. TNF $\alpha$  merupakan mediator penting endotoksin yang menginduksi syok, TNF $\alpha$  disekresikan oleh makrofag yang teraktivasi, tetapi beberapa penelitian menunjukkan bahwa TNF $\alpha$  juga disekresikan oleh myocytes kardiak sebagai respon terhadap sepsis. IL-1 juga disintesis oleh monosit, makrofag, dan neutrofil sebagai respon terhadap TNF $\alpha$  dan berperan penting dalam repon sistem imun. IL-1 menekan kontraktilitas kardiak dengan stimulasi NO synthase (NOS). transkripsi IL-1 diikuti dengan penundaan transkripsi IL-1 receptor antagonist (IL-1-ra), yang berfungsi sebagai inhibitor endogenous untuk IL-1. Rekombinan IL-1 yang dievaluasi pada uji coba klinis fase III menunjukkan peningkatan survival pada pasien sepsis meskipun terapi ini masih belum berhasil secara signifikan. Sitokin proinflamasi lainnya yaitu IL-6 juga berperan dalam patogenesis sepsis dan dipertimbangkan sebagai predictor yang lebih konsisten daripada TNF $\alpha$  karena memiliki sirkulasi tinggi dalam waktu yang lama pada disfungsi myocardial. Beberapa sitokin yang berperan dalam penurunan kontraktilitas myocardial akan menginduksi atau melepaskan faktor lainnya yang merubah fungsi myocardial seperti prostanooid atau NO (Liu & Malik, 2006 ; Merx & Weber, 2007; Abraham & Singer, 2007).

Prostanooid diproduksi oleh enzim cyclooxygenase dari asam arachidonic.

Ekspresi dari enzim cyclooxygenase 2 diinduksi oleh stimuli yang lain yaitu LPS dan sitokin. Tingginya kadar prostanooid seperti thromboxane dan prostacyclin berpotensi merubah autoregulasi coronary, fungsi endothelial coronary, dan aktivasi leukosit intracoronary pada pasien sepsis. Penghambatan pada enzim



cyclooxygenase dapat digunakan sebagai target terapi pada sepsis. Upregulasi endothelin-1 (ET-1) terjadi setelah enam jam induksi LPS pada syok sepsis. Overekspresi ET-1 pada kardiak memicu meningkatnya sitokin inflamasi (TNF $\alpha$ , IL-1, dan IL-6), infiltrasi inflamasi interstitial, dan inflamasi cardiomyopathy yang berakibat kegagalan jantung dan kematian. Nitric oxide (NO) disekresikan berlebihan sebagai efek biologis sistem kardiovaskuler. NO dapat memodulasi fungsi kardiak pada kondisi fisiologis dan patofisiologis. Orang sehat memiliki NO pada dosis yang rendah sedangkan pada pasien sepsis memiliki kadar NO yang tinggi dan dapat menginduksi disfungsi kardiak dengan menekan pembentukan energy myocardial. Sepsis memicu ekspresi inducible NOS (iNOS) pada myocardium yang diikuti dengan produksi NO yang tinggi yang berperan dalam disfungsi myocardial dan pembentukan cytotoxic peroxynitrite, produk dari NO dan superoksida. Pada mencit yang mengalami defisiensi iNOS, fungsi kardiak terjaga setelah paparan endotoksin (Merx & Weber, 2007; Liu & Malik, 2006).

### 2.1.8.3 Gagal Ginjal

Reaksi *host* terhadap infeksi mikroba melibatkan sinyal dan respon yang cepat karena infeksi bakteri dapat menyebar kedalam jaringan. Demam atau hipotermia, tachypnoea, dan tachycardia sering terjadi pada permulaan sepsis, respon inflamasi sistemik terhadap infeksi bakteri. Ketika kontrol regulasi berlebihan, mikroba bergerak dari lokal site menyebar kedalam aliran darah maka terjadi kegagalan homeostasis, dan disfungsi beberapa organ (Tiwari & Vikrant, 2002).

*Acute Renal Failure* (ARF) adalah akibat yang umum ditimbulkan oleh sepsis dan syok sepsis. Lebih dari 50% pasien sepsis mengalami ARF dan mekanisme yang terlibat dalam disfungsi ini masih belum diketahui dengan jelas.



Selama sepsis, terjadi produksi berlebihan dari mediator inflamasi humoral dan aktivasi sistem seluler, dimana aktivasi dari symathico-adrenal axis akan meningkatkan kadar plasma dari (nor) epinephrine, rennin-angiotensin aldosterone system (RAAS) dengan kadar angiotensi II yang tinggi dan tingginya kadar vasopressin sebagai respon *host*. Mekanisme ini berperan dalam manifestasi klinis sepsis, termasuk perubahan haemodinamik yang dikarakterisasi dengan vasodilatasi, sirkulasi hiperdinamik dan perubahan mikrosirkulasi sehingga terjadi ekstraksi oksigen yang tidak efisien (Tiwari & Vikrant, 2002; Abraham & Singer, 2007).

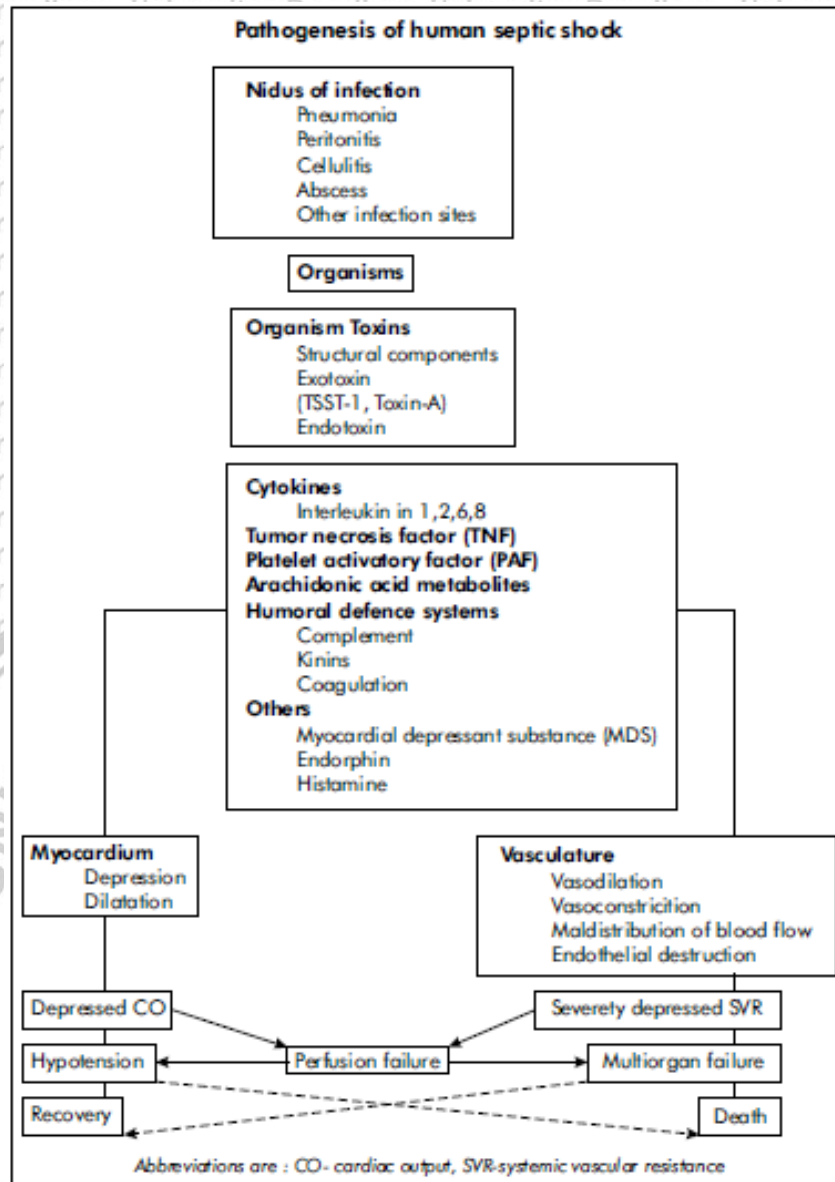
Efek sepsis pada vasculature sistemik adalah reduksi mean arterial pressure (MAP). Pada keadaan normal, ketika autoregulasi tekanan darah jatuh atau menurun akan terjadi pemeliharaan renal blood flow (RBF), peningkatan proporsi dari output jantung menuju ginjal. Ketika MAP menurun yang dibawah rentangan autoregulator pada haemorrhagic atau syok kardiogenik, renal vasoconstriction akan terjadi. Jika terjadi sepsis dalam jangka waktu yang lama maka hipoperfusi global akan menyebabkan nekrosis tubular akut. Perubahan aliran darah dari glomerulus diperkirakan mereduksi filtrasi glomerular pada nefron. Perubahan dari medulla menyebabkan segmentasi tubular medulla dan menimbulkan resiko terjadinya ischaemic. Perubahan aliran darah dari korteks menuju medulla akan memperburuk penghambatan NO (Tiwari & Vikrant, 2002; Carcillo, 2003; Abraham & Singer, 2007).

Perubahan signifikan fungsi glomerulus pada sepsis adalah penurunan glomerular filtration rate (GFR). Pada banyak kasus dikarakterisasi dengan jatuhnya aliran renal plasma dan tekanan perfusi glomerular dan hipotensi sistemik. Reduksi area permukaan untuk filtrasi adalah efek dari mediator vasoaktif yang terlibat dalam sepsis yaitu leukotrienes, thromboxane A<sub>2</sub>, dan angiotensin II. Perubahan kapilaritas glomerulus menyebabkan kerusakan

endothelial akut. Hal ini berhubungan dengan aktivasi sistem koagulasi oleh endotoksin, pelepasan tissue factor, deposisi platelet dan fibrin diantara kapiler darah, dan penurunan aktivitas fibrinolytic. Aktivasi neutrofil dan sitokin seperti IL-1b, TNF dan platelet activating factor mempengaruhi patogenesis dari kerusakan endotel (Tiwari & Vikrant, 2002; Carcillo, 2003).

Infeksi menjadi faktor yang potensial terhadap mekanisme imunologis akan memproduksi inflamasi glomerulus akut. Acute proliferative glomerulonephritis pada sepsis berhubungan dengan pembentukan abscess dan endocarditis. Infeksi ini menyebabkan penyakit vasculitis. Pada ginjal, penyakit ini disebabkan terjadinya nekrosis pada epitel glomerulus. Kerusakan ginjal pada sepsis disebabkan juga oleh nekrosis tubular akut dan menyebabkan perubahan laju darah, oksigenasi arteri dan konsentrasi hemoglobin. Kerusakan tubular diperparah dengan gangguan haemodinamik ketika terjadi kerusakan renal akut sehingga pada beberapa kasus harus ditreatment dengan dialysis (Tiwari & Vikrant, 2002; Carcillo, 2003).





Gambar 2.13 Diagram representatif patogenesis pada syok sepsis manusia (Tiwari & Vikrant, 2002)

## 2.2 Lipopolisakarida (LPS)

*Pathogen associated molecular pattern* (PAMP) merupakan motif struktural yang diekspresikan oleh bakteri, virus, dan fungi sehingga bisa dikenali oleh sel-sel imun. PAMP mampu menstimulasi reseptor *Toll like receptors* (TLR) yang diekspresikan oleh sel imun sehingga mampu mendeteksi adanya infeksi mikroba (Akira *et al.*, 2006). Lipopolisakarida (LPS) atau endotoksin adalah

komponen membran luar bakteri gram negatif dan merupakan salah satu jenis PAMP yang paling sering dipelajari. LPS mengaktifasi TLR4 sehingga menyebabkan jalur persinyalan yang mengaktifkan faktor transkripsi NF- $\kappa$ B, *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) dan *interferon response factor* (IRF) yang akan memicu pelepasan sitokin proinflamasi, misalnya interleukin (IL)-1, IL-6, IL-12, *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ ,  $\beta$  dan nitrit oksida (NO). LPS juga mampu menginduksi produksi sitokin anti-inflamasi, antara lain IL-10 dan IL-14 (Huber *et al.*, 2006).

Produksi sitokin proinflamasi dan induksi mediator yang lebih distal meliputi NO, *platelet activation factor* (PAF), dan prostaglandin menyebabkan hipotensi, perfusi organ inadkuat, dan kematian sel yang berhubungan dengan MODS. Status proinflamasi ini didefinisikan sebagai SIRS. Induksi sistem imunitas innate secara masif ini dapat dan seringkali menimbulkan efek katastrofik pada pasien, yang disebut sindrom sepsis (Huber *et al.*, 2006).

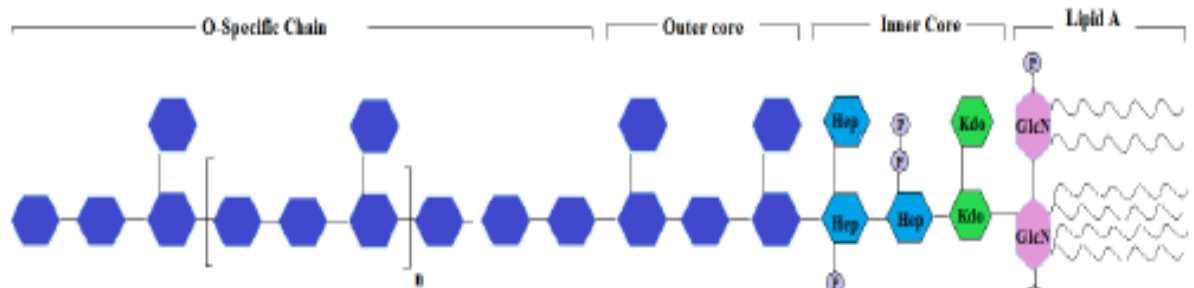
### 2.2.1 Struktur LPS

Lipopolisakarida terdiri atas tiga bagian, yaitu Lipid A, *core oligosaccharide*, dan *O side chain*. Lipid A merupakan bagian yang menginduksi respon seluler sehingga seringkali disebut sebagai '*endotoxin principle*'. Lipid A tersusun atas D-glucosamine disaccharide yang membawa hingga enam residu asam lemak. Meskipun strukturnya tidak terlalu bervariasi, akan tetapi terdapat banyak variasi dalam hal panjang, posisi, dan jumlah asam lemak yang menyusun dari lipid A tersebut. Komponen minimal yang harus dimiliki oleh bakteri *E. coli* agar mampu menginduksi aktivasi reseptor TLR adalah dua residu *gluco-configured hexosamine*, dua grup fosforil, dan enam asam lemak.

Kekurangan salah satu dari komponen tersebut menyebabkan penurunan



aktivitas. Komponen minimal tersebut bisa berbeda antara spesies satu dengan yang lainnya dan juga tergantung dari jenis TLR4 yang diaktivasi (Huber *et al.*, 2006).



Gambar 2.14 Struktur umum LPS dengan berbagai komponen yang menyusunnya (Bashir *et al.*, 2011)

### 2.2.2 Interaksi LPS dan Host

Stimulasi LPS pada sel mamalia terjadi melalui interaksi dengan beberapa protein, antara lain *LPS binding protein* (LBP), CD14, MD-2, dan TLR-4. LBP merupakan glikoprotein berukuran 58 – 60 kDa, tergolong dalam famili lipid transfer dan merupakan protein host pertama yang terlibat dalam pengenalan LPS. LBP mempunyai peran ganda dalam interaksinya dengan LPS, yang bergantung kepada rasio dari stoikiometri. Pada konsentrasi rendah, LBP meningkatkan persinyalan LPS dengan mengekstraksinya dari membran bakteri dan kemudian mentransfer monomer LPS menuju CD14. Untuk konsentrasi tinggi, LBP menghambat persinyalan LPS dengan mengubah LPS menjadi serum lipoprotein dan melalui pembentukan agregat dengan LPS (Gutsmann *et al.*, 2001).

CD14 merupakan glikoprotein yang tersusun secara integral di membran atau dalam bentuk terlarut di dalam serum. CD14 berasosiasi dengan TLR pada permukaan membran sel monosit, makrofag, neutrofil, dan sel hepatosit.

Kompleks CD14 – LPS mempunyai stoikiometri yang rendah dan proses

ikatannya diperantarai oleh LBP. Selanjutnya LPS ditransfer menuju kompleks TLR4 / MD-2. Tikus dengan *knock out* gen CD14-nya tetap menunjukkan respon yang signifikan terhadap LPS, akan tetapi tidak memodulasi proses persinyalannya. Apabila tidak tersedia CD14, LPS halus tidak bisa mengaktifasi TLR4 sama sekali, sedangkan LPS kasar atau lipid A akan mengaktifasi TLR4 melalui jalur persinyalan MyD88 / Mal. Keberadaan CD14 akan menyebabkan LPS kasar maupun LPS halus dapat merekrut MyD88 / *MyD88 adapter like protein* (Mal) dan TIR-domain yang berisi *adapter inducing interferon- $\beta$  / TRIF-related adapter molecule* (TRIF / TRAM). Beberapa studi terakhir menunjukkan bahwa CD14 berasosiasi dengan famili kinase src dan G-protein heterodimer pada lipid sehingga berfungsi untuk amplifikasi sinyal melalui pemindahan TLR menuju *kinase-rich environment* dari *lipid raft microdomains* (Finberg & Kurt-jones, 2006).

MD-2 merupakan glikoprotein yang disekresikan dan termasuk dalam super famili ML (*MD-2 related lipid recognition*) dari lipid-binding protein. MD-2 terdapat dalam bentuk terlarut (sMD-2) atau dalam kompleks dengan ektodomain dari TLR4. Penelitian tentang struktur dari MD-2 menunjukkan adanya sebuah rongga hidrofobik di antara dua antiparalel  $\beta$ -sheets, dengan empat rantai acyl dari LPS dapat terakomodasi serta adanya residu bermuatan positif sehingga mampu menstabilkan ikatannya dengan LPS (Ohto *et al.*, 2007). MD-2 juga bisa berikatan dengan ligan amfipatik seperti eritorain (analog lipid-A sintesis) dan lipid Iva (prekursor lipid-A). Kompleks TLR4 / MD-2 mempunyai afinitas terhadap LPS 10 kali lebih tinggi dibandingkan dengan MD-2 saja, meskipun peran dari TLR4 dalam pengenalan LPS masih belum banyak diketahui (Mullen *et al.*, 2003).



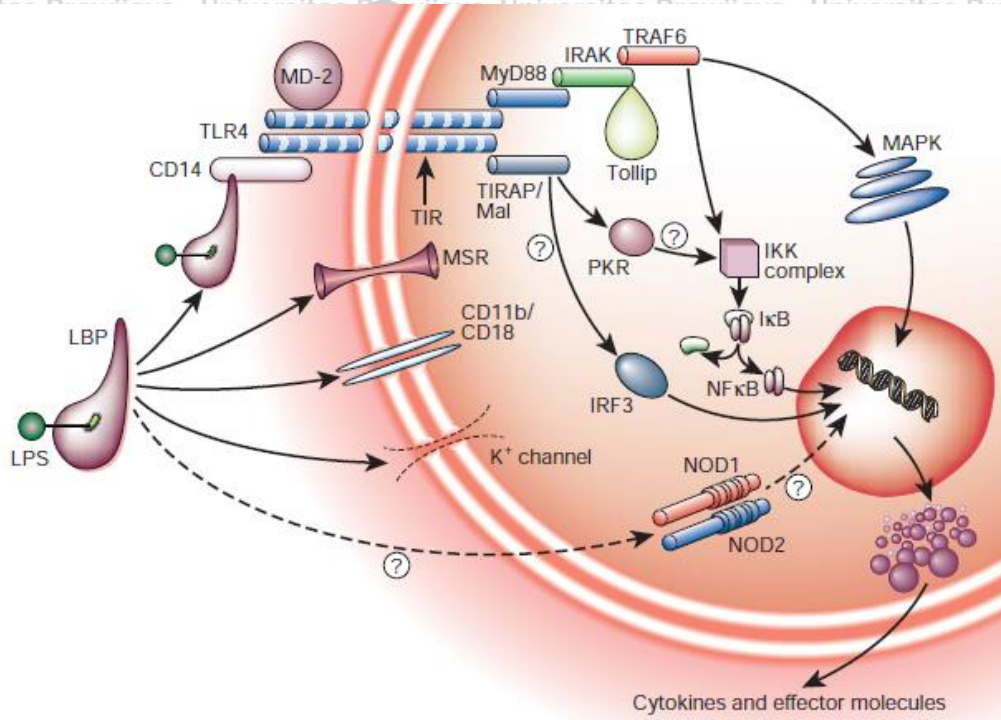
### 2.2.3 TLR4 dan Aktivasinya

Semua TLR4 mempunyai struktur dasar yang sama dan memiliki *leucine rich repeats* (LRR) ekstraseluler yang merupakan daerah transmembran tunggal dan domain intraseluler Toll / IL-1 (TIR). TLR4 berbeda dengan TLR yang lainnya pada proses interaksinya dengan ligan yang secara tidak langsung, yaitu melalui MD-2 yang bertindak sebagai co-reseptor. Domain LRR berinteraksi dengan MD-2; sedangkan domain TIR terlibat dalam interaksi dengan protein adaptor di dalam sel. TLR4 terdapat dalam bentuk homomultidimer atau heteromultidimer meskipun tanpa adanya ligan, akan tetapi bentuk tersebut tidak bisa menginduksi persinyalan karena orientasi reseptor yang tidak tepat. Dimerisasi domain ekstraseluler menyebabkan terbentuknya *interface* TIR domain yang sesuai sehingga menyebabkan perekrutan protein adaptor dan inisiasi persinyalan intraseluler (Weber *et al.*, 2005).

Pengenalan terhadap LPS di membran sel terjadi melalui LBP yang selanjutnya memicu persinyalan menuju kompleks TLR4 – MD-2. Meskipun demikian, beberapa molekul permukaan sel yang lain juga mampu mengenali keberadaan LPS, antara lain *macrophage scavenger receptor* (MSR), CD11b / CD18 dan ion *channel*. Persinyalan intraseluler tergantung pada pengikatan TIR (Toll / IL-1 *receptor homology domain*) yang merupakan domain intraseluler TLR pada IRAK (IL-1 *receptor associated kinase*), sebuah proses yang difasilitasi oleh dua protein adaptor yaitu MyD88 (Myeloid differentiation protein 88) dan TIRAP (TIR *domain-containing adapter protein*; atau disebut juga sebagai MyD88-adapter like protein (Mal)) dan dihambat oleh protein Tollip (*Toll-interacting protein*) ke-3. Terdapat jalur persinyalan lain yang disebut sebagai *MyD88-independent pathway*. Pada jalur persinyalan tersebut sinyal TIRAP / Mal melalui sebuah RNA-dependent protein kinase (PKR) dan *interferon regulatory factor*



(IRF)-3. Sel juga diduga mampu merespon LPS melalui reseptor intraseluler yang disebut protein NOD (*nucleotide-binding oligomerization domain*). NOD1 (dikenal juga sebagai caspase-recruitment domain 4) telah teridentifikasi merupakan struktur homolog dari protein regulator apoptosis (Apaf-1). Ekspresi NOD1 dan NOD2 dapat memberikan reaksi terhadap LPS pada bakteri gram negatif tetapi tidak memberikan reaksi terhadap asam lipoteichoic yang dimiliki oleh bakteri gram positif (Cohen, 2002).



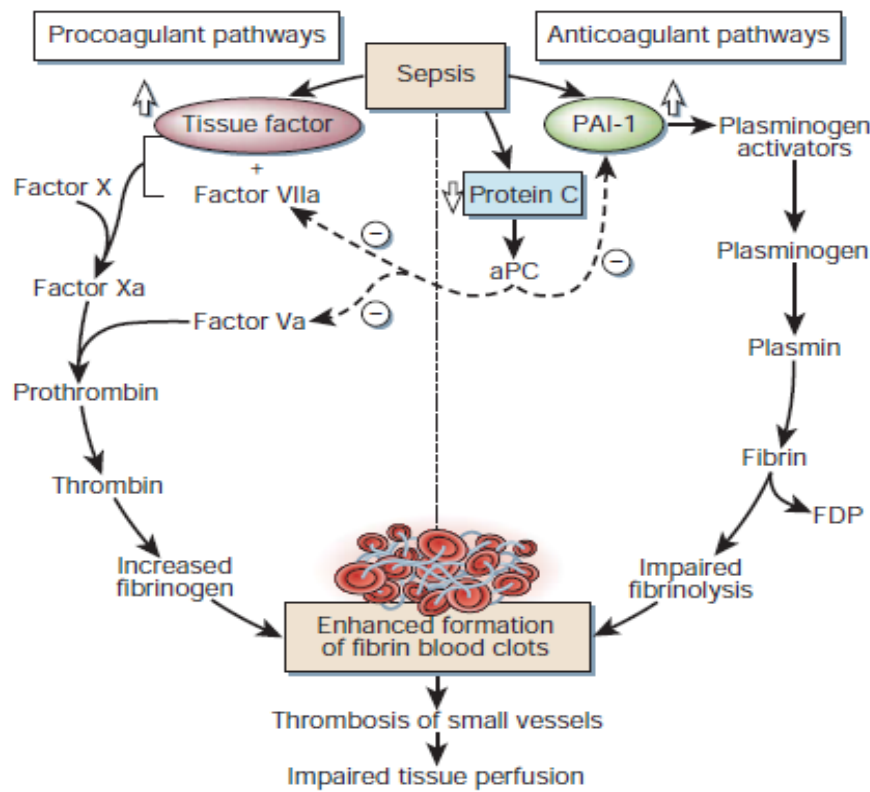
**Gambar 2.15** Mekanisme prinsip pengenalan LPS pada permukaan sel (Cohen, 2002)

**2.2.4 Amplifikasi Sinyal**

Peran sel mononuklear dalam respon imun berupa pelepasan sitokin proinflamasi IL-1, IL-6 dan TNF- $\alpha$ , serta mengatur pelepasan sitokin yang lain termasuk IL-12, IL-15 dan IL-18. TNF- $\alpha$  dan IL-1 merupakan sitokin pro-inflamasi yang memediasi berbagai mekanisme imunopatologi dari syok yang diinduksi oleh LPS. Kedua sitokin tersebut dilepaskan pada 30 – 90 menit pertama setelah



terpaparnya LPS. Pelepasan sitokin akan mengaktifkan tahap kedua dari kaskade inflamasi, meliputi sitokin, mediator lipid, dan *reactive oxygen species* serta upregulasi molekul adhesi sel sehingga menyebabkan migrasi sel inisiator inflamasi menuju jaringan. Sitokin proinflamasi berperan penting karena sitokin-sitokin tersebut bertanggung jawab terhadap penyusunan *complex network* (jaringan) dari respon sekunder (Dinarello, 1997), sebagai contoh yaitu peran dari IL-8 dalam menginduksi produksi IFN- $\gamma$ . Pada sel mononuklear manusia, IFN- $\gamma$  meningkatkan ekspresi dari TLR4, MD-2 dan MyD88, serta meniadakan penurunan ekspresi TLR4 akibat induksi LPS (Bosisio, *et al.*, 2002).



**Gambar 2.16** Sepsis mengganggu keseimbangan homeostasis normal antara mekanisme prokoagulan dan antikoagulan (Cohen, 2002).

Sitokin juga berperan penting dalam menginduksi efek pro-koagulan pada sepsis. (Basisio *et al.*, 2002). Jalur koagulasi diawali oleh LPS dan komponen

mikroba yang lainnya yang menginduksi ekspresi *tissue factor* pada sel mononuklear dan sel endotel. *Tissue factor* akan mengaktifasi berbagai kaskade proteolitik yang menyebabkan peningkatan prothrombin untuk diubah menjadi thrombin. Selanjutnya thrombin akan membentuk fibrin dari fibrinogen. Regulasi normal mekanisme fibrinolitik (pemecahan fibrin oleh plasmin) menjadi tidak adekuat akibat tingginya kadar *plasminogen-activator inhibitor type-1* (PAI-1) yang mencegah pembentukan plasmin dari prekursor plasminogen. Proses tersebut menyebabkan peningkatan produksi dan penurunan degradasi fibrin sehingga menyebabkan penumpukan fibrin pada pembuluh darah, kurangnya jumlah oksigen pada jaringan, serta kerusakan organ (Cohen, 2002).

Sepsis juga menyebabkan penurunan kadar protein C dan juga antithrombin dan Tissue factor pathway inhibitor (TFPI). Protein aPC yang merupakan bentuk aktif dari protein C akan berdisosiasi dari endothelial protein C receptor (EPCR) sebelum berikatan dengan protein S sehingga menyebabkan inaktivasi faktor Va dan VIIa dan menghambat jalur koagulasi serta menghambat aktivitas PAI-1, sehingga penurunan kadar protein C akan menyebabkan efek prokoagulan lebih lanjut. Hal tersebut menyebabkan peningkatan pembentukan fibrin dalam pembuluh darah mikro, yang kemudian menyebabkan kurangnya oksigenasi jaringan dan kerusakan sel (Cohen, 2002). Pada pasien sepsis, kadar aPC adalah menurun dan ekspresi dari endothelial thrombomodulin serta EPCR juga berkurang, sehingga hal tersebut mendukung dugaan bahwa penggantian dari aPC diduga dapat digunakan untuk terapi sepsis (Faust *et al.*, 2001).

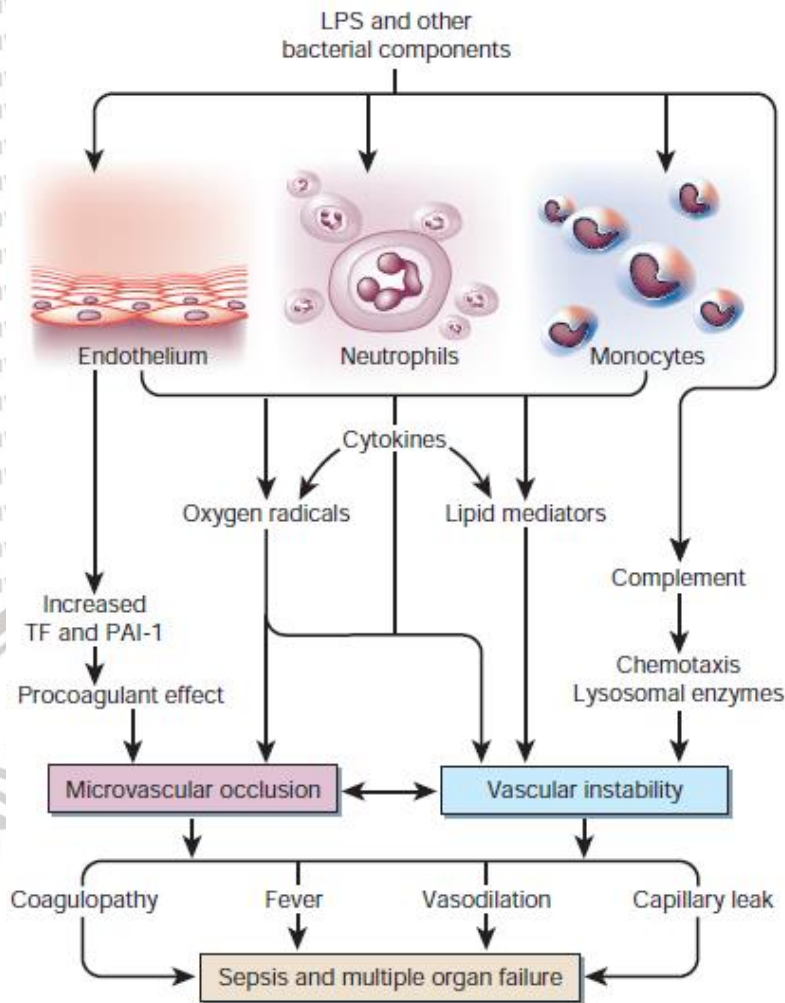
Sitokin proinflamasi seperti IL-1 dan IL-6 merupakan inducer yang kuat dalam proses koagulasi, dan sebaliknya, IL-10 meregulasi koagulasi dengan menghambat ekspresi *tissue factor* pada sel monosit (Faust *et al.*, 2001). Penyebab lain dari tahapan prokoagulasi pada sepsis yaitu adanya penurunan jumlah protein antikoagulan, yaitu antithrombin, protein C dan TFPI. Antikoagulan



alami tersebut juga mempunyai efek antiinflamasi, yaitu dengan pelepasan monocyte-derived TNF- $\alpha$  dengan menghambat aktivasi faktor transkripsi NF- $\kappa$ B dan protein aktivator (AP)-1 (Okajima, 2002).

Patogenesis dari proses disfungsi organ pada pasien sepsis terjadi karena berbagai faktor dan belum dimengerti secara lengkap, dan diduga bahwa hipoperfusi dan hipoksia jaringan merupakan faktor utama. Mekanisme-mekanisme yang terlibat antara lain yaitu peluasan penumpukan fibrin, kerusakan keseimbangan mikrovaskuler yang disebabkan karena banyaknya substansi vasoaktif seperti PAF, histamin dan prostanoïd. Infiltrasi seluler seperti neutrofil dapat merusak jaringan secara langsung melalui pelepasan enzim lisosom dan radikal bebas. Selain itu, TNF- $\alpha$  dan sitokin lain menyebabkan peningkatan produksi nitric oxide yang menyebabkan instabilitas vaskuler dan diduga merupakan penyebab depresi myocardial yang seringkali terjadi pada pasien sepsis (Landry & Oliver, 2001).





**Gambar 2.17** Lipopolisakarida (LPS) dan komponen mikrobial lain yang terlibat untuk mengaktifasi berbagai *cascade* paralel dalam patofisiologi *Adult Respiratory Distress Syndrome (ARDS)* dan sepsis (Cohen, 2002)

Sel T, khususnya sel T helper (TH)-1 dan TH-2 mempunyai peran yang penting dalam regulasi inflamasi. Pada patogenesis sepsis, respon imun dari sel TH-1 (yang dikarakterisasi dengan produksi IFN- $\gamma$  dan IL-12) akan berubah menjadi respon imun dari sel TH-2 (dikarakterisasi dengan produksi sitokin IL-4, IL-5, IL-10, dan IL-13) sehingga menyebabkan supresi sistem imun pada tahap selanjutnya. *Migration Inhibitory Factor* (MIF) merupakan sitokin pertama yang diketahui mempunyai peran dalam regulasi reaksi inflamasi sistemik dan lokal.

Endotoksin dan eksotoksin bakteri, serta sitokin proinflamasi seperti TNF, IFN- $\gamma$ ,



dan C5a merupakan induktor yang kuat untuk menstimulasi sekresi MIF dari sel neutrofil (Riedemann *et al.*, 2004).

MIF sebagai sitokin proinflamasi berperan penting dalam reaksi imun, serta menginduksi respon imun *innate* dengan mengaktivasi sel makrofag dan sel T. MIF tidak hanya meregulasi respon proinflamasi, tetapi juga menginduksi atau mengamplifikasi produksi dari sitokin proinflamasi yang lain, serta meningkatkan ekspresi TLR4 pada sel makrofag. Tingginya konsentrasi MIF dapat mencegah apoptosis pada sel makrofag sehingga menyebabkan respon inflamasi yang berkelanjutan (Calandra *et al.*, 2003). MIF merupakan sitokin yang penting karena senyawa tersebut menghubungkan antara sistem imun dengan sistem endokrin. Pada kondisi stres, hipotalamus, pituitari, dan kelenjar adrenal semuanya mensekresikan MIF, selain itu MIF menimbulkan efek anti-inflamasi dari kortisol endogen serta menghambat glukokortikoid melalui *feedback* negatif. Produksi MIF dalam jumlah yang sangat tinggi berbahaya untuk tubuh, dan kadar MIF berhubungan dengan tahap dari sepsis itu sendiri.

Netralisasi MIF atau menghambat aktivasi dari topoisomerase MIF dapat menurunkan respon inflamasi dan meningkatkan pertahanan hidup dari pasien sepsis. Terapi ini pada tahap awal dari respon inflamasi juga secara signifikan mampu meningkatkan pertahanan diri pasien sepsis, sehingga membuktikan bahwa MIF merupakan targer terapi sepsis yang penting (Chen *et al.*, 2011)

Protein *high-mobility group box 1* (HMGB1) pada awalnya diduga sebagai protein faktor transkripsi. HMGB1 dapat diekspresikan oleh berbagai tipe sel, dan pada respon inflamasi sumber utama dari protein tersebut adalah makrofag, monosit, dan neutrofil (Lotze & Tracey, 2005; Kim *et al.*, 2005). HMGB1 dapat disekresikan oleh sel imun dan sel yang mengalami nekrosis. Pada sepsis, mekanisme sekresi endokrin dari HMGB1 masih belum jelas. Sekresi HMGB1 melalui jalur sekresi eksokrin tidak secara langsung disekresikan oleh sel yang



mengalami nekrosis, melainkan melalui makrofag yang diaktivasi oleh sel yang mengalami nekrosis (Qin *et al.*, 2006). HMGB1 ekstraseluler dapat berikatan dengan PRR, khususnya TLR2 dan TLR4. Persinyalan yang diinduksi oleh HMGB1 mempunyai berbagai efek dalam sistem imun, antara lain yaitu menginduksi inflamasi serta penghancuran pelindung sel epitel. HMGB1 juga mampu berikatan dengan mediator inflamasi untuk menginduksi aktivitas mediator pro-inflamasi yang salah satunya adalah IL-1 $\beta$  (Sha *et al.*, 2008; Klune *et al.*, 2008).

HMGB1 berbeda dengan mediator inflamasi yang lainnya, yang mana sekresi HMGB1 biasanya terlihat pada akhir dari respon inflamasi, dan kadar HMGB1 tidak perlu diturunkan pada pasien yang sedang direhabilitasi. Patogen dan mediator pro-inflamasi (TNF, IL-1 $\beta$  dan IFN $\gamma$ ) dapat menginduksi produksi HMGB1 pada inflamasi. Interaksi C5a dan reseptor lain juga dapat menginduksi sekresi HMGB1 pada respon inflamasi. Sekresi HMGB1 dipengaruhi oleh sistem saraf autonom dan aktivasi dari jalur anti-inflamasi cholinergic dapat menghambat sekresi HMGB1 dari sel makrofag, serta meningkatkan pertahanan diri dari pasien sepsis (Chen *et al.*, 2011).

Fakta bahwa HMGB1 mempunyai berbagai peran dalam proses inflamasi menimbulkan dugaan bahwa terapi dengan mentarget HMGB1 dapat digunakan sebagai strategi terapi baru pasien sepsis. Pada penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, penghambatan secara langsung dari HMGB1 maupun penghambatan proses glikosilasi dari reseptornya dapat meningkatkan tingkat pertahanan hidup pasien sepsis (Liliensik *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2004), selain itu netralisasi dari HMGB1 juga mampu memperbaiki kerusakan organ dan mengurangi kematian pada sepsis (Chen *et al.*, 2011).



### 2.2.5 Sinyal Terkait Sepsis

Ligasi PRR memicu kaskade persinyalan aktivasi NF- $\kappa$ B dan AP-1 via MyD88 atau TICAM1/TRIF. NF- $\kappa$ B dan AP-1 memasuki nukleus dan mengaktivasi transkripsi untuk beberapa gen, termasuk protein fase akut, inducible nitric oxide synthase (iNOS), faktor koagulasi, serta sitokin dan kemokin pro-inflamasi, seperti tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  dan ILs-1, 6, 8, dan 12. Jalur TICAM1/TRIF menghasilkan fosforilasi interferon regulatory factor 3 dan 7 (IRF 3, IRF 7) yang memasuki nukleus dan menstimulasi transkripsi gen yang mengkode interferon (IFN) $\alpha$ , IFN $\beta$  dan gen IFN-inducible tipe 1 (Lewis *et al.*, 2012; Cinel & Opal, 2009; Bernard & Bernard, 2012).

Konsentrasi serum dari TNF- $\alpha$  berhubungan dengan kematian kasus sepsis pada manusia. TNF- $\alpha$  dominan diproduksi oleh makrofag dan sel T, tetapi juga diproduksi oleh sel mast, sel B, sel NK, neutrofil, sel endothelial, myocytes, osteoblas, dan fibroblast yang disebut precursor 26 kDa (pro-TNF) yang diekspresikan di membran plasma, kemudian pro-TNF ini dipecah oleh TNF-converting enzyme (TACE/ADAM17) sehingga menghasilkan protein soluble 17 kDa, kedua protein yaitu soluble dan membrane-bound aktif dalam proses inflamasi. TNF- $\alpha$  terekspresi sebagai efek dari interaksi dengan satu dari dua reseptor, TNF reseptor 1 dan 2 (TNFR1, TNFR2). Aktivasi TNFR1 berperan dalam memediasi proinflamasi dan jalur apoptosis yang berhubungan dengan inflamasi, dimana TNFR2 berperan dalam memicu perbaikan jaringan dan angiogenesis. Kompleksitas jalur persinyalan pada sepsis ditekankan pada observasi aktivitas NF- $\kappa$ B yang menginduksi molekul yang dapat menghambat apoptosis yang dimediasi oleh TNFR1 (Lewis *et al.*, 2012; Cinel & Opal, 2009).

Banyak ciri khusus inflamasi yang dapat diamati dari aktivasi TNF- $\alpha$  pada endothelium yang meningkatkan produksi iNOS dan cyclo-oxygenase 2 (COX-2) sehingga memicu vasodilatasi dan melambatkan aliran darah. TNF- $\alpha$  juga



menstimulasi ekspresi molekul adesi endotel seperti E-selectin, intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), dan vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1).

Ketiga molekul ini memicu ikatan leukosit kedalam dinding endothelial dan mendistribusikannya kedalam interstitium oleh makromolekul cairan dan plasma.

Upregulasi TNF- $\alpha$  dan sitokin proinflamasi lainnya pada anjing model sepsis melibatkan infusi intravena LPS dosis rendah, peningkatan konsentrasi serum

dari TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 disertai dengan peningkatan ekspresi dari E-selectin dalam paru-paru, ICAM-1 dan neutrofil, meskipun mekanisme LPS dapat

menginduksi molekul adesi secara langsung atau via sitokin proinflamasi masih belum diketahui dengan jelas. Respon inflamasi yang terjadi akibat pemberian

LPS secara intravena diketahui dengan pengukuran konsentrasi TNF- $\alpha$ , IL-1, dan IL-6 pada serum (Lewis *et al.*, 2012; Liu & Malik, 2006; Bernard & Bernard,

2012).

Aktivasi NF- $\kappa$ B menimbulkan transkripsi beberapa interleukin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, CXCL-8 (IL-8), dan IL-12. IL-1 berperan secara sinergi dengan

TNF- $\alpha$  pada periode hiperakut setelah stimulasi imun innate pada sepsis. Dua bentuk proinflamasi dari IL-1 (IL-1 $\alpha$  dan IL-1 $\beta$ ) diidentifikasi dengan induksi

sintesis molekul adesi dan sitokin oleh sel endothelial meliputi aktivasi leukosit, ikatan pada endothelial, dan mobilisasi kedalam interstitium. IL-1 juga dapat

memberikan efek upregulasi untuk produksi iNOS dan COX2 yang berperan sebagai pyrogen endogen saat demam dan meningkatkan pelepasan

corticosteroid via hypothalamic (Lewis *et al.*, 2012; Liu & Malik, 2006).

Sitokin proinflamasi yang penting dalam sepsis adalah IL-6 yang berperan dalam stimulasi aktivasi leukosit dan proliferasi sel progenitor myeloid, IL-6 juga

memicu respon fase akut dan pyrogen. Seperti TNF- $\alpha$  dan IL-1, konsentrasi IL-6 dalam plasma terjadi peningkatan pada sepsis dan diprediksikan berhubungan

dengan progresi multiple disfungsi organ dan kematian. Konsentrasi sitokin anti-



inflamasi dalam serum yaitu IL-10 juga meningkat pada sepsis. Hal ini tidak hanya menghambat pelepasan TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan IL-6 dari monosit dan makrofag, tetapi juga menginduksi produksi IL-1 receptor antagonist protein (IRAP-1) dan soluble TNFR, kemudian mereduksi konsentrasi sitokin ini. IL-10 berperan dalam mediasi keseimbangan antara proses pro dan anti inflamasi (Lewis *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2006; Bernard & Bernard, 2012).

Sitokin yang berperan penting pada sepsis diantaranya *macrophage migratory inhibitory factor* (MIF), yang diproduksi oleh kelenjar pituitari anterior dan mampu meningkatkan konsentrasi SIRS dan sepsis. Konsentrasinya dalam serum tidak hanya berhubungan dengan mortalitas tetapi penghambatan MIF juga penting dalam perlindungan terhadap SIRS dan sepsis. *High mobility group box protein 1* (HMGB-1) merupakan protein endogen yang terlibat dalam stabilisasi DNA nuklear. Setelah kematian sel apoptosis atau nekrosis, protein ini dilepaskan ke dalam sirkulasi dimana protein ini dapat mempengaruhi peran pro-inflamasi secara langsung. HMGB1 mempengaruhi efek PAMPs dan DAMPs pada TLR-2, TLR-4, dan *receptor for advanced glycation end products* (RAGE). HMGB1 terlibat sebagai mediator inflamasi akhir pada sepsis. Konsentrasi sirkulasi dari HMGB1 berhubungan dengan mortalitas pada pasien SIRS (Lewis *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2011).

Pada saat pelepasan sitokin dan kemokin dari sel imun yang teraktivasi maka akan memicu PRR melepaskan acute phase protein (APP) dalam jumlah yang besar dari hepatocytes, protein ini berfungsi dalam mengembalikan homeostasis, membantu eliminasi patogen dan mengurangi inflamasi. Respon fase akut ini dikarakterisasi dengan terjadinya demam, neutrofilia aktivasi koagulasi, dan kaskade komplemen (jalur mannose-binding lectin), serum iron dan zinc binding, peningkatan glukoneogenesis, peningkatan katabolisme otot, dan perubahan metabolisme lipid (Lewis *et al.*, 2012).



Terdapat dua grup APP yang diketahui yaitu tipe 1 yang diinduksi oleh IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , dan TNF- $\alpha$ , dan tipe 2 yang diinduksi oleh IL-6. Akibat dari upregulasi produksi APP, konsentrasi protein plasma lain seperti albumin, protein C, protein S, dan penurunan antithrombin. Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) yang dilepaskan dari monosit juga merupakan komponen yang penting dalam respon fase akut dalam memediasi perlindungan terhadap infeksi bakteri. Beberapa APP yang dikarakterisasi dari beberapa spesies yang menderita sepsis digunakan dapat sebagai biomarker inflamasi (Lewis *et al.*, 2012; Brown *et al.*, 2006).

Penelitian mengenai mekanisme molekuler pada respon SIRS akan memperkecil kegagalan terapi pengeblokan mediator proinflamasi sehingga akan memicu terjadinya mortalitas yang berhubungan dengan sepsis dan hingga saat ini masih belum bisa dijelaskan karena adanya “badai sitokin” yang tidak terkontrol. Terjadinya reaksi proinflamatori yang tidak terkontrol dalam menghadapi infeksi akan mengakibatkan disfungsi organ dan kerusakan sistem imun karena komponen sistem imun mengalami apoptosis (Lewis *et al.*, 2012; Bernard & Bernard, 2012).

Selain apoptosis atau program kematian sel tipe 1, kematian sel imun pada sepsis akan menyebabkan imunoparalisis. Autophagy adalah mekanisme seluler yang awal teraktivasi pada proses pembersihan sitoplasma. Mekanisme akhir yang menarik pada sepsis adalah terjadinya pyroptosis, terminologi yang digunakan untuk mendiskripsikan proses caspase 1 yang memediasi terjadinya kematian sel, karena pada umumnya kematian sel dimediasi oleh caspase apoptosis yaitu caspase 3, 6, dan 8. Meskipun mekanisme pyroptosis merupakan kematian sel yang unik atau lebih sederhana dibandingkan kematian sel apoptosis atau nekrosis (oncosis), pyroptosis ini dikarakterisasi melalui kerusakan membran plasma dengan cepat dan pelepasan kandungan



proinflamatori intraseluler, yang bertindak sebagai DAMPs. Salah satu target dari caspase-1 selama terjadinya sepsis adalah jalur glikolitik (Lewis *et al.*, 2012; Bernard & Bernard, 2012; Liu & Malik, 2006).

Beberapa studi menunjukkan bahwa apoptosis merupakan mekanisme yang penting dalam pathogenesis SIRS, sepsis, dan penyakit infeksius lainnya. Sel apoptosis dapat dianalisis pada liver, ginjal, timus, lambung, dan populasi limfosit. LPS dan TNF- $\alpha$  menginduksi apoptosis pada sel endothelial glomerulus, hal ini merupakan model patomekanisme yang potensial menjelaskan disfungsi ginjal pada sepsis oleh infeksi bakteri Gram negatif dan menyebabkan penghambatan glukokortikoid secara *in vitro*. Haemophilus somnus, patogen bakteri Gram negatif pada sapi dapat menyebabkan sepsis dan vaskulitis, bakteri ini dapat menginduksi caspase 3 dan 8 dan mengarahkan kepada apoptosis pada sel endothelial secara *in vitro*, selain itu, bakteri dapat menstimulasi pembentukan platelet untuk menginduksi apoptosis sel endothelial dengan mekanisme contact-dependent yang melibatkan aktivasi caspase 8 dan 9 dan sintesis reactive oxygen species (ROS). Aktivitas matrix metalloproteinase 2 dan 9 dan ekspresi Paxilin terfosforilasi menunjukkan korelasi positif pada apoptosis cardiomyocyte (sel otot jantung) dan terjadinya apoptosis pada sel darah tepi (PBMC) dan splenocytes. Infeksi bakteri juga dapat menyebabkan apoptosis pada sel T yang terlibat dalam penekanan sistem imun, selain itu dapat menyebabkan apoptosis pada sel epitel intestinal (Lewis *et al.*, 2012; Bernard & Bernard, 2012).

Selain sistem imun innate, sistem imun adaptive yaitu sel T regulator juga terlibat dalam respon sistem imun pada sepsis. Sistem imun adaptive mampu membentuk reseptor yang spesifik untuk antigen tertentu dengan diversitas spesifitas yang mampu mengenali epitop patogen yang menginfeksi. Sel T regulator dapat teraktivasi karena induksi alamiah dan induksi peripheral. Induksi



peripheral yang dapat mengaktivasi sel Treg adalah adanya transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) atau IL-10 dalam jumlah yang besar. Induksi alamiah aktivator sel Treg dapat diidentifikasi dengan ekspresi reseptor  $\alpha$ -chain IL-2 (CD25) dan Forkhead box P3 (FOXP3), faktor transkripsi yang berperan penting dalam fungsi ontogeny dan peripheral. FOXP3 juga menstabilkan transcriptome Treg dengan menekan jumlah pro-inflamatori dan growth promoting gene, contohnya IL-2 dan IFN $\gamma$  meskipun membutuhkan aktivator lain yang terlibat dalam fungsi Treg yaitu CTLA4 dan CD25. Sel Treg akan berinteraksi dengan sel baik yang termasuk sistem imun innate maupun adaptive yaitu monosit, makrofag, sel natural killer, neutrofil, sel mast, sel dendritik, dan sel T dan B, yang pada umumnya akan berperan dalam pencegahan terbentuknya respon autoagresif dan memaintain populasi sel T CD4<sup>+</sup> peripheral kemudian berperan dalam menjaga homeostasis sistem imun (Remick, 2007 ; Lewis *et al.*, 2012).

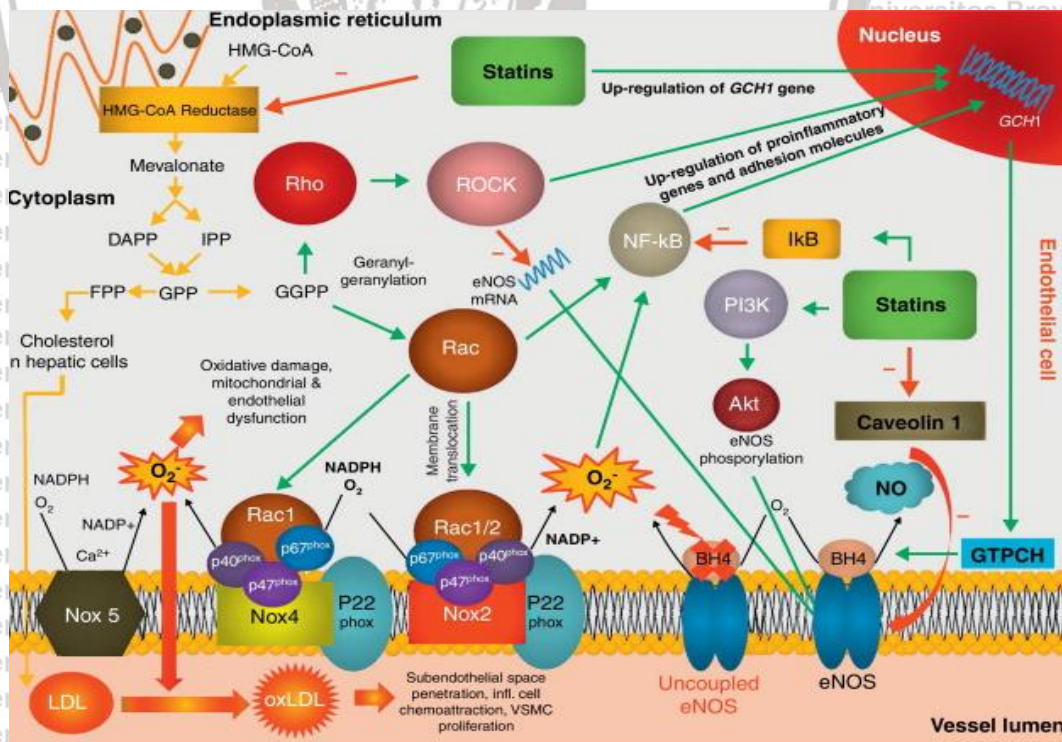
Beberapa studi menunjukkan terjadinya peningkatan sel Treg pada pasien sepsis manusia selama fase imunoparalisis. Treg dapat menginduksi jalur alternatif aktivasi makrofag dan menghambat mekanisme proapoptosis monosit yang melibatkan jalur Fas/FasL oleh induksi LPS. Oleh karena itu, sel Treg berperan penting dalam mengatasi disfungsi sistem imun pada pasien sepsis (Brown *et al.*, 2006 ; Lewis *et al.*, 2012).

### 2.3 Peran Statin pada Sepsis

Statin merupakan inhibitor dari *3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase* (HMG-CoA reductase inhibitor), merupakan senyawa obat yang digunakan untuk menurunkan kadar kolesterol. HMG-CoA reduktase melepaskan prekursor kolesterol asam mevalonik dari koenzim A. Penghambatan kompetitif oleh statin menimbulkan respon kompensasi selular, berupa peningkatan enzim



HMG-CoA reduktase dan reseptor *Low Density Lipoprotein* (LDL). Statin juga mempunyai efek antiinflamasi dan merupakan imunomodulator yang dapat menghambat sintesis senyawa produk dari *mevalonate pathway* seperti isoprenoid dan *geranyl-geranylpyrophosphate* (Goldstein & Brown, 1990). Penghambatan HMG-CoA reduktase oleh statin menyebabkan berkurangnya biosintesis kolesterol pada sel hati sehingga jumlah LDL dalam sirkulasi darah juga berkurang. Dengan mencegah secara langsung pembentukan *geranylgeranyl pyrophosphate* (GGPP) pada sel endotel, statin mendesak efek pleiotropik secara langsung pada sel endotel yaitu dengan cara menghambat aktivasi Rac1-mediated NADPH-oxidase. Selain itu statin juga mengurangi inflamasi dengan cara mencegah aktivasi NFkB, perbaikan ketersediaan NO dengan menstabilkan mRNA eNOS, meningkatkan BH4 di sirkulasi, meningkatkan fosforilasi eNOS pada asam amino ser177 dan memisahkan eNOS dari caveolin-1 (Margaritis *et al.*, 2012).



Gambar 2.18 Pathway mevalonat dan efek pleiotropik statin pada sel endotel (Margaritis, *et al.*, 2012)



Peningkatan HMG-CoA reduktase menyebabkan sintesis kolesterol seluler hanya menurun sedikit, tetapi penghilangan kolesterol melalui mekanisme reseptor LDL meningkat secara signifikan (Page *et al.*, 2006). Berkurangnya jumlah LDL menunjukkan berkurangnya akumulasi LDL pada sub-endotel sehingga menghambat pembentukan sel. Seperti halnya pada sel endotel, statin menyebabkan efek pleiotropik pada sel otot polos vaskuler dengan menghambat jalur persinyalan mevalonat. Dengan menghambat protein geranyl-geranylation, statin bersama dengan Rac1 mencegah aktivasi isoform sel otot polos vaskuler Nox, sehingga menyebabkan berkurangnya inflamasi vaskuler melalui penghambatan aktivasi NFκB. Selain itu, penghambatan pathway Rho/ROCK menyebabkan berkurangnya ekspresi *matrix metalloproteinase* (MMP) dan proses proliferasi dan migrasi sel (Margaritis *et al.*, 2012)

### 2.3.1 Efek Antiinflamasi

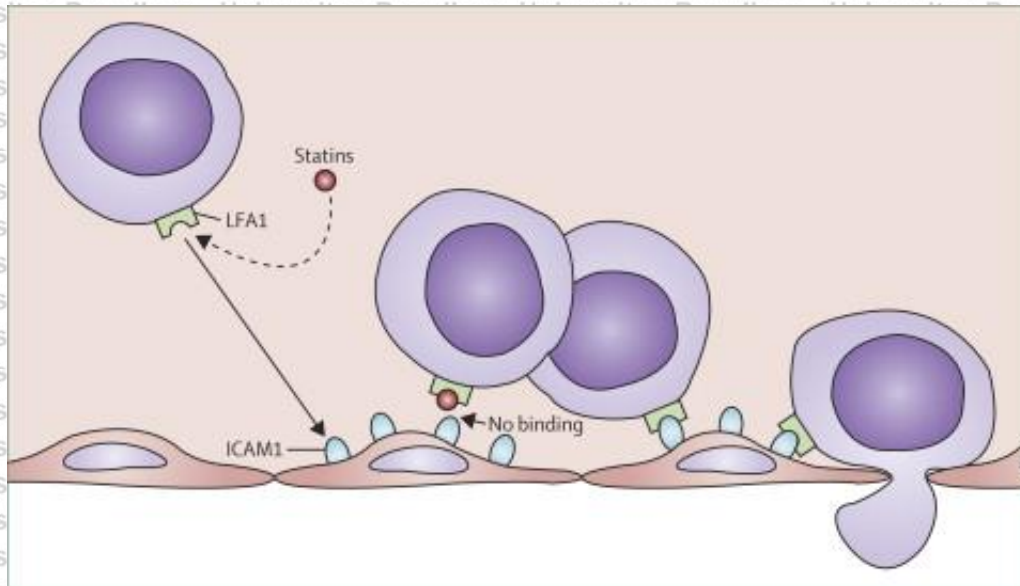
Patofisiologi sepsis berlangsung sangat kompleks karena melibatkan interaksi antara proses infeksi oleh mikroorganisme, inflamasi, dan proses koagulasi (Kristine *et al.*, 2007) yang disebabkan karena ketidakseimbangan antara kadar sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 dan IFN- $\gamma$  dengan sitokin antiinflamasi seperti IL-1, IL-4 dan IL-10 (Elena *et al.*, 2006). Produksi yang berlebihan sitokin inflamasi menyebabkan aktivasi respon sistemik berupa SIRS terutama pada paru-paru, hati, ginjal usus dan organ lainnya (Arul *et al.*, 2001) yang mempengaruhi permeabilitas vaskuler, fungsi jantung dan menginduksi perubahan metabolik sehingga terjadi apoptosis maupun nekrosis jaringan, *Multiple Organ Failure* (MOF), syok septik, serta kematian (Arul, 2001; Elena *et al.*, 2006).



Statin memiliki efek imunomodulasi, sebagaimana zat antiinflamasi yang dapat meningkatkan kadar limfosit akibat inflamasi. Terapi statin berhubungan dengan penghambatan terjadinya sepsis pada manusia. Statin terbukti dapat berperan sebagai faktor antiinflamasi dengan jalan menghambat produksi sitokin proinflamasi. Diketahui bahwa produksi molekul proinflamasi sebagian besar melalui aktivasi NF- $\kappa$ B atau AP-1. Statin berperan sebagai senyawa antiinflamasi dengan cara menghambat ekspresi TNF- $\alpha$  dan MCP-1 yang diinduksi LPS, dan menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B dan AP-1 melalui jalur yang diaktivasi oleh PPAR- $\gamma$  dan PPAR- $\alpha$ , sehingga statin dapat menghambat respon inflamasi melalui aktivasi PPAR- $\gamma$  dan PPAR- $\alpha$  (Yano *et al.*, 2007).

### 2.3.2 Efek terhadap Sel

Sepsis menyebabkan peningkatan yang signifikan pada perekrutan dan transmigrasi leukosit serta ekspresi P-selektin pada endotelium vaskuler. Statin mempunyai efek dalam mengurangi lipopolisakarida (LPS) dan *Staphylococcus aureus* a-toxin yang dapat menginduksi migrasi dan perekrutan leukosit (Pruefer *et al.*, 2002; Diomede *et al.*, 2001). Pemberian statin secara signifikan menghasilkan penurunan adhesi leukosit pada endotelium dengan cara menurunkan ekspresi dari molekul adhesi sel endotelium yaitu P-selektin, CD11b, dan CD18 dengan menghambat *lymphocyte function antigen-1* (LFA-1) yang berfungsi dalam memerantarai adhesi. Statin secara langsung berikatan dengan *leucocyte integrin LFA-1* (biasa dikenal dengan CD11a/CD18) dan mengganggu fungsi dari ICAM-1 (Weitz-Schmidt, *et al.*, 2001).



**Gambar 2.19 Penghambatan interaksi antara LFA-1 dengan ICAM1 oleh statin (Terblanche et al., 2007)**

Statin juga mempengaruhi fungsi dari monosit. Studi yang dilakukan oleh Niessner, et al (2006) menunjukkan bahwa simvastatin dengan kadar 80 mg/hari dapat menekan ekspresi reseptor toll like receptor (TLR) 4 dan 2 pada permukaan sel monosit. Penurunan ekspresi TLR4 dan TLR2 berasosiasi dengan penurunan konsentrasi TNF- $\alpha$  dan *monocyte chemoattractant protein-1* pada sirkulasi darah.

Ketika sepsis berkembang, sel endotel akan teraktivasi sehingga terlibat dalam proses inflamasi dan melepaskan berbagai mediator inflamasi, serta meningkatkan ekspresi molekul adhesi. Molekul adhesi dari sel endotel tidak hanya berfungsi mengikat leukosit, akan tetapi juga untuk mengaktivasi kaskade persinyalan transmigrasi leukosit. Berbagai studi yang telah dilakukan menunjukkan bahwa statin dapat menghambat proses tersebut (Gao et al., 2008). Penurunan aktivasi dari faktor transkripsi proinflamasi pada sel endotel juga menunjukkan bahwa statin merupakan senyawa imunomodulator. Hal tersebut terbukti dengan penurunan kadar ekspresi NF- $\kappa$ B sehingga statin dapat



menghambat efek sitokin TNF- $\alpha$  terhadap sel endotel. Selain itu, statin juga meningkatkan aktivitas endothelial NO synthase (eNOS) dan meningkatkan produksi NO. Secara fisiologi, eNOS akan diaktifkan oleh protein kinase Akt untuk memproduksi *endothelium-derived NO* untuk mengatur aktivitas vasomotor (Luo *et al.*, 2000).

Pada sepsis terjadi penurunan fungsi eNOS dan peningkatan ekspresi *inducible NO synthase* (iNOS), sehingga menyebabkan terjadinya hipotensi dan resistensi terhadap senyawa obat vasopressor yang terjadi pada syok septik (Almog *et al.*, 2003, Giusti-Paiva *et al.*, 2004). Statin dapat meningkatkan aktivitas eNOS dengan menginduksi fosforilasi Akt sehingga meningkatkan ekspresi eNOS (Kureishi *et al.*, 2000, Laufs *et al.*, 2000), serta mengaktifkan eNOS secara langsung (Kaesemeyer, *et al.*, 1999). Hal tersebut menyebabkan terjadinya proses anti-inflamasi lokal pada sel endotel sehingga nitrit oksida mencegah kemotaksis leukosit dan mengurangi ekspresi molekul adhesi sel endotel. Kajian *in vitro* tentang pengaruh statin menunjukkan bahwa aktivasi pathway Akt oleh statin juga dapat mengurangi apoptosis sel. Statin juga diketahui dapat meningkatkan jumlah *endothelial progenitor cells* (EPC) dalam sirkulasi darah (Llevadot, *et al.*, 2001), selain itu statin juga dapat menginduksi angiogenesis dengan meningkatkan proliferasi, migrasi, dan pertahanan dari EPC (Walter, *et al.*, 2004).

### 2.3.3 Efek terhadap Sitokin

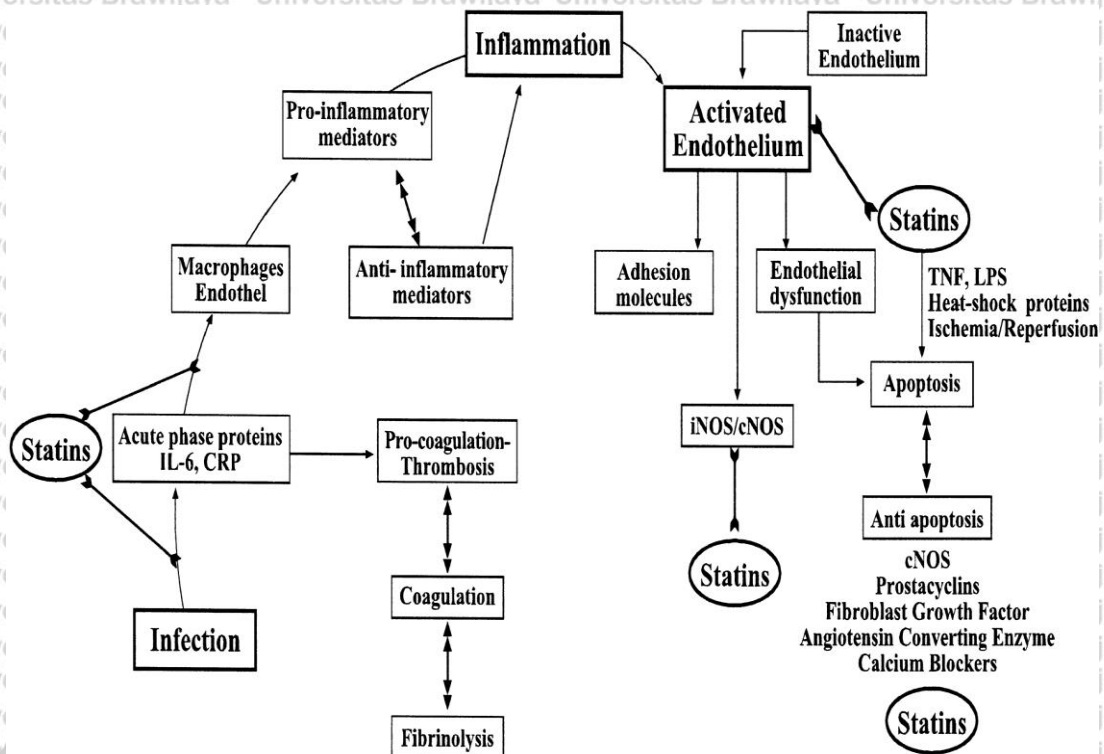
Statin berpengaruh terhadap produksi dari berbagai sitokin, antara lain IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , MCP-1 dan *C-reactive protein* (CRP). CRP terutama diproduksi oleh sel hepatosit sebagai respon terhadap IL-6. Penelitian *in vitro* oleh Arnaud *et al.* (2005) dengan menggunakan sel hepatosit manusia yang distimulasi

dengan IL-6 dan kemudian diberi perlakuan pemberian simvastatin dan atorvastatin. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa sel hepatosit yang diberi perlakuan statin menunjukkan penghambatan secara signifikan ekspresi IL-6 dalam menginduksi produksi CRP (Arnauld *et al.*, 2005; Kothe *et al.*, 2000).

#### 2.3.4 Efek terhadap Koagulasi

Peran statin dalam kaskade koagulasi berupa peningkatan fungsi platelet dan mengurangi aktivitas prokoagulan dengan cara menurunkan agregasi platelet, menurunkan aktivitas *tissue factor* (TF), mengurangi konversi prothrombin menjadi thrombin sehingga menurunkan aktivitas trombin, serta mengurangi kadar fibrinogen (Cortellaro *et al.*, 2002, Huhle *et al.*, 1999). Statin juga mampu menstimulasi fibrinolisis dengan mempengaruhi kadar dan aktivitas dari *tissue plasminogen activator* (tPA) dan PAI-1 (Dichtl *et al.*, 2003, Krysiak *et al.*, 2003). Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa statin dapat meningkatkan ekspresi dan aktivitas fungsional dari TF pada sel endotel *human umbilical vein* dan sel endotel *human coronary artery* (Shi *et al.*, 2003), sehingga mengindikasikan adanya peran penting dalam treatment defisiensi protein C. Hal tersebut meningkatkan kemungkinan bahwa statin mempunyai peluang untuk digunakan sebagai terapi bagi pasien sepsis (Gao *et al.*, 2008).





Gambar 2.20 Mekanisme penghambatan inflamasi oleh statin (Almog, 2003)

## 2.4 Tikus Sepsis

Tikus merupakan hewan model yang populer untuk segala macam penelitian terkait penyakit pada manusia oleh karena berbagai karakteristik antara lain kekerabatan genetik dengan manusia yang mencapai 75%. Salah satu penyakit yang banyak diteliti menggunakan murine (tikus) adalah sepsis.

Beberapa tahun terakhir model-model sepsis murine menjadi topik perdebatan yang cukup menarik, terutama yang berkaitan dengan penyakit manusia dan mengarah pada pengembangan terapi biologis baru. Berbagai penelitian melaporkan hubungan antara murine dan respons manusia terhadap sepsis pada tingkat genomik (Efron, *et al.*, 2015). Sebaliknya, peneliti lain berpendapat bahwa ada kesamaan biologis. Sebagai contoh, perbandingan antara sifat kompleks dari kondisi manusia dan model endotoksemia homogen dalam strain genetik tunggal tikus (Takao & Miyakawa, 2015).

Di antara model hewan sepsis, model tikus sering digunakan karena kemudahan percobaan, ketersediaan rekayasa genetika spesies, dan biaya yang relatif rendah. Gagasan bahwa model murine sepsis dapat diajukan, namun karena sifat kompleks dan kondisi heterogen pilihan yang baik untuk pemodelan ada pada fokus penelitian (Lewis, *et al.*, 2016).

#### 2.4.1 *Caecal Ligation Puncture (CLP)*

Metode *Caecal Ligation Puncture (CLP)* banyak digunakan. Model CLP sepsis melibatkan kinerja laparotomi dengan anestesi umum diikuti oleh ligasi sebagian dari sekum dalam untuk penciptaan satu atau lebih colotomy cecal melalui tusukan jarum. Model ini memiliki kekurangan terhadap host: 1) Trauma bedah pada jaringan, 2) jaringan iskemik dari cecum yang diikat, dan 3) sepsis polimikroba dari tinja setelah tusukan jarum (Dejager, *et al.*, 2011). Infeksi yang dihasilkan dari prosedur CLP dapat dimodulasi berdasarkan panjang cecum yang diikat dan ukuran serta jumlah tusukan yang dilakukan (Tabel 2.4). Hal ini merupakan kelemahan dari metode CLP, karena beragamnya lubang dan lokasi ligasi. Beberapa peneliti mengikat seluruh sekum, sedangkan yang lain mengikat pada panjang tertentu, dan yang lain lagi mengikat persentase dari total panjang sekum. Demikian pula, ukuran jarum yang digunakan untuk tusukan menggunakan ukuran yang berbeda, paling umum dalam kisaran 18 hingga 25-gauge (Lewis, *et al.*, 2016).



Tabel 2.4. Justifikasi Metode CLP (Lewis, et al., 2016)

	<i>Puncture quantity</i>	<i>Puncture diameter</i>	<i>Cecal ligation length</i>
Least severe	1	25 gauge	0.5 cm
	2	22 gauge	1.0 cm
	3	21 gauge	1.5 cm
Most severe	4+	18 gauge	Entire cecum

\*Commonly used parameters. Mortality and shock kinetics vary between reports for any given combination.

### 2.4.2 Induksi LPS (Lipopolisakarida)

Induksi lipopolysaccharide menyebabkan sepsis, model endotoksemia murine telah menjadi pilar dalam studi eksperimental sepsis dan telah digunakan selama hampir 100 tahun dalam upaya untuk mempelajari sepsis manusia.

Model ini terdiri dari injeksi lipopolysaccharide (LPS) murni, umumnya intra-peritoneal. Lipopolysaccharide adalah komponen tunggal dari molekul terkait patogen kompleks (PAMP) yang dirilis oleh organisme gram negatif (Poli-de-fegruiredo, *et al.*, 2008). Pemberian bolus LPS pada dasarnya adalah model intoksikasi daripada keadaan septik yang sebenarnya. Ketika dibandingkan dengan sepsis pada manusia, endotoksemia menyebabkan konsentrasi sitokin inflamasi plasma yang tinggi, yang memuncak lebih awal dengan kadar yang lebih besar serta menunjukkan resolusi yang lebih cepat. Lipopolysaccharide dalam dosis besar dapat menyerupai sekelompok kecil pasien sepsis manusia dengan kondisi fulminan seperti meningococemia yang berlebihan (Lewis, *et al.*, 2016)

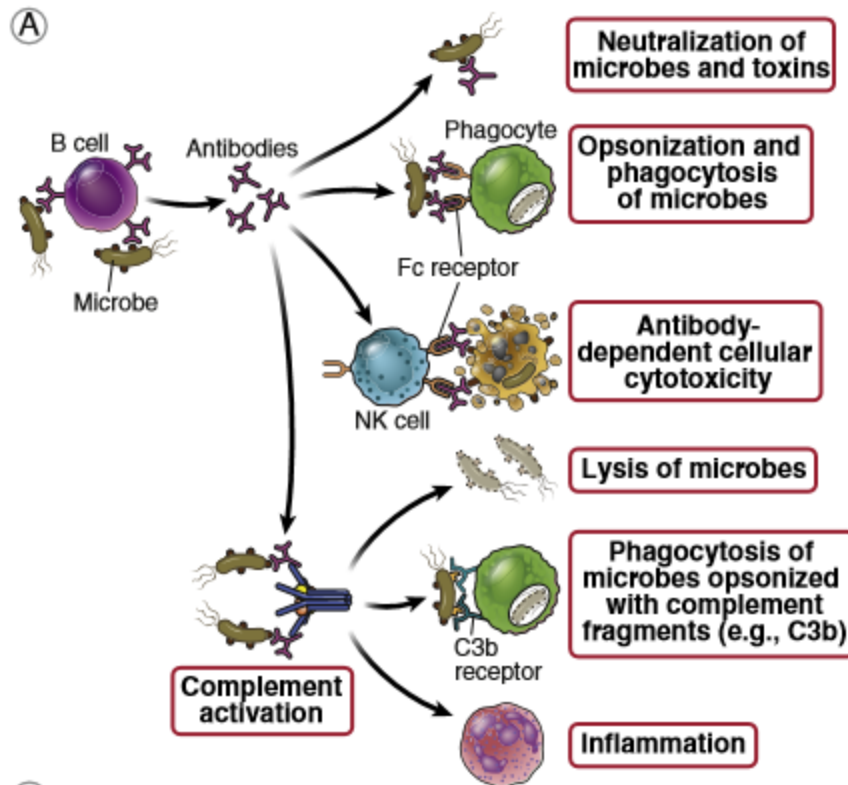
Respons tikus terhadap LPS menunjukkan spektrum yang tergantung dosis; dosis yang lebih kecil menghasilkan keadaan hyperdynamic sedangkan dosis besar menyebabkan hipotensi dan karakteristik hipotermia dari syok septik murine [6,8,20]. Dosis ini berbeda dengan yang menghasilkan efek yang sama pada manusia, karena LD50 yang jauh lebih besar untuk LPS pada tikus [16].

Satu penjelasan potensial untuk perbedaan antara respon tikus dan manusia terhadap LPS mungkin terletak pada berbagai ekspresi protein protektif seperti hemopexin (Poli-de-fegruiredo, *et al.*, 2008). Penentuan LPS mana yang digunakan menjadi penting, karena kemurnian yang bervariasi antara produk yang tersedia; produk dengan kemurnian yang lebih rendah dapat mengandung molekul lain seperti asam Deoksiribonukleat (DNA) atau asam ribonukleat (RNA), yang akan memodulasi respons imun inang (Lewis, *et al.*, 2016).

Model tikus endotoksemia berguna secara ilmiah dalam menganalisis mekanisme dan jalur biologis spesifik, seperti respons imun terhadap rangsangan prototipikal jalur Tol Like Receptor (TLR) spesifik, seperti LPS dan TLR4. Namun, jika dibandingkan dengan model yang lebih kompleks dan relevan secara fisiologis seperti model *cecal ligation and puncture* (CLP), injeksi LPS dapat dititrasi untuk mencapai angka kematian yang sama dan perubahan hematologi. Namun, pada tingkat molekuler, perbedaan penting tetap ada. Sitokin inflamasi seperti tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-6 (IL-6), keratinosit chemoattractant (KC), dan protein inflamasi makrofag-2 (MIP-2) semuanya menunjukkan profil temporal yang berbeda, dengan sitokin memuncak sebelumnya, pada konsentrasi yang lebih besar dan untuk durasi yang lebih pendek dengan endotoksemia (Remick & Ward, 2005).



## 2.5 Antibodi



Gambar 2.21. Respon antibodi terhadap antigen

Antibodi atau disebut juga immunoglobulin adalah jenis protein khusus yang penting bagi kesehatan yang membantu tubuh menyingkirkan patogen seperti virus, bakteri, dan parasit atau sering disebut antigen, sehingga kondisi tubuh bisa tetap sehat. Antibodi secara spesifik diproduksi oleh sel B. antibody akan diproduksi oleh sel B saat terdapat antigen yang terikat pada permukaan sel B. struktur dasar antibody berbentuk Y (150 kD) yang mana terdapat bagian yang disebut *heavy chains* (50 kD) dan *light chain* (25 kD) dan saling berikatan karena adanya ikatan disulfide pada masing-masing bagian. Antibody diklasifikasikan menjadi lima grup yang sering disebut immunoglobulin A (IgA), immunoglobulin G (IgG), immunoglobulin E (IgE), immunoglobulin M (IgM), immunoglobulin D (IgD).

Dalam berinteraksi dengan antigen, antibody memiliki beberapa respon, meliputi menetralkan mikroba dan zat beracun yang dibawanya.

Oponisasi antibody yang merupakan proses mencerna dan menghilangkan pathogen dengan cara fagosit. Antibody memediasi fagositosis, pada bagian ini dicontohkan dengan proses fagositosis antigen oleh sel NK yang mana dalam pengenalan sel NK terhadap antigen memerlukan antibody.

Antibody awalnya akan mengikat antigen sehingga reseptor Fc $\gamma$  pada NK sel akan mengikat antibody dan teraktivasi untuk melakukan *killing* pada antigen

tersebut. Antibody sebagai system komplemen. Dalam system komplemen terdapat tiga jalur yaitu jalur alternative, jalur klasik dan jalur lectin. Jalur alternative seperti yang terjadi pada plasma C3 yang secara otomatis akan membelah (hidrolisis) dan menyebabkan C3b berikatan pada permukaan mikroba dan mengikat factor B. factor B yang telah berikatan dengan C3b dipermukaan mikroba kemudian akan mengalami pemelahan yang dipengaruhi oleh factor D sehingga formasi C3b dan factor B akan stabil. Kondisi tersebut akan mengaktifasi factor C3 lain untuk berikatan. Sehingga dapat membentuk komplemen C5 konvertase. Jalur klasik merupakan aktivasi antibody terhadap antigen yang ditengarahi adanya isotip tertentu. Sedangkan jalur lectin yaitu aktivasi antibody oleh plasma lektin yang berikatan pada mannose di permukaan mikroba. Selain itu, aktivasi komplemen juga menstimulasi respon inflamasi dengan mengaktifasi sel mast, neutrophil dan sel endotel yang diinduksi oleh fragmen C5a, C4a, dan C3a (Gambar 2.21.).

### 2.5.1 Sifat Kimia

### 2.5.2 Interaksi Antigen-Antibodi

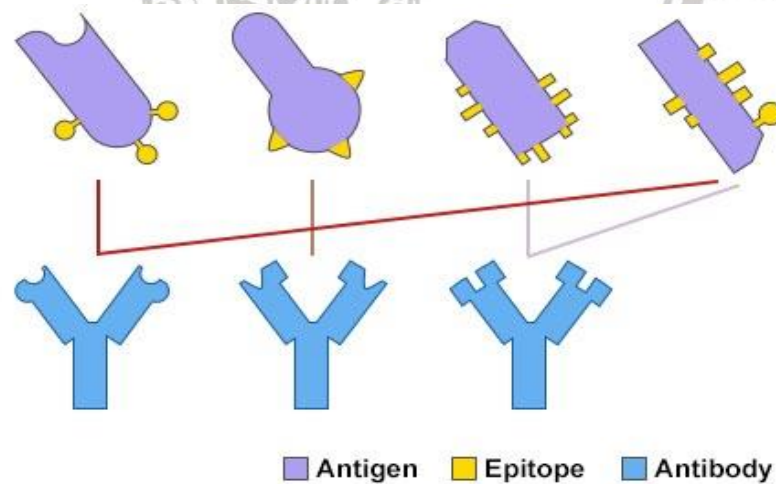
Antigen (Ag) adalah molekul yang memiliki kemampuan untuk menginduksi respon imun (untuk menghasilkan antibody) dalam organisme inang.



Antigen umumnya berupa protein, peptida, atau polisakarida. Lipid dan asam nukleat dapat bergabung dengan molekul-molekul itu untuk membentuk antigen yang lebih kompleks. Bagian dari bakteri, virus, dan mikroorganisme lainnya dapat menjadi antigen. Ketika antigen asing memasuki tubuh, ia merangsang sistem kekebalan untuk menghasilkan antibodi. Molekul antibodi pelindung membantu tubuh melawan antigen.

Terkadang antigen adalah bagian dari inang itu sendiri. Antigen ini dikenal sebagai autoantigen. Antibodi terhadap autoantigen dikenal sebagai autoantibodi. Beberapa penyakit autoimun melibatkan keberadaan autoantigen dan autoantibodi.

Antibodi mengenali antigen (biasanya protein) berdasarkan struktur dan kandungannya, dan hanya mengikat sebagian kecil antigen, yang dikenal sebagai epitop, atau penentu antigenik. Setiap jenis antibodi berikatan dengan satu epitop unik, karena situs pengikatan antigen yang unik dari suatu antibodi. Singkatnya, antibodi berikatan dengan antigen tertentu secara spesifik.



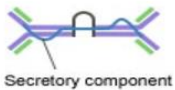




**Gambar 2.22. Epitop pada antibodi**

Di alam, kebanyakan antigen memiliki potensi untuk terikat oleh banyak antibodi, dan jika organisme inang terkena antigen, inang akan mengembangkan serangkaian antibodi yang masing-masing mengikat ke epitop antigen yang terpisah, sehingga antibodi ini akan bervariasi dalam kekhususan dan melawan antigen lebih efisien.

### 2.5.3 Klasifikasi

Antibodi juga dikenal sebagai imunoglobulin (Ig). Pada manusia, ada lima kelas utama antibodi, dengan masing-masing kelas memainkan peran yang berbeda dalam respon imun. Kelas-kelas ini diidentifikasi sebagai IgM, IgG, IgA, IgE, dan IgD, yang berbeda di wilayah konstan rantai berat mereka, seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.23.

	IgM pentamer	IgG monomer	Secretory IgA dimer	IgE monomer	IgD monomer
					
Heavy Chains	$\mu$	$\gamma$	$\alpha$	$\epsilon$	$\delta$
Number of antigen binding sites	10	2	4	2	2

Gambar 2.23. Klasifikasi imunoglobulin

**IgM:** Dari lima kelas Ig, IgM adalah yang paling masif karena merupakan pentamer dari lima bagian berbentuk Y. Setiap bagian berbentuk Y melekat pada unit bergabung yang disebut rantai J melalui ikatan disulfida. IgM adalah Ig pertama yang dibuat oleh janin dan Ig pertama yang diproduksi sebagai respons primer terhadap antigen.

**IgG:** IgG adalah yang paling banyak beredar, terhitung 75% dari semua Ig dalam serum. IgG dapat melintasi pembuluh darah dan bahkan plasenta untuk



memberikan perlindungan pada janin. IgG juga dikatakan paling serbaguna, menjalankan fungsi semua kelas Ig lainnya.

**IgA:** IgA yang ditemukan dalam serum adalah monomer tetapi IgA yang ditemukan dalam sekresi adalah dimer yang mengandung rantai J. **Gambar** hanya menunjukkan IgA sekretori. IgA adalah kelas utama Ig dalam sekresi seperti air mata, air liur, kolostrum, dan lendir, dan merupakan bagian penting dari kekebalan mukosa.

**IgE:** IgE adalah Ig serum paling sedikit karena ia terikat sangat erat dengan reseptor Fc pada sel imun termasuk basofil dan sel mast. IgE banyak ditemukan dalam air liur dan lendir. Fungsi utama IgE adalah untuk mengenali antigen selama reaksi alergi.

**IgD:** IgD terutama ditemukan pada permukaan sel B di mana ia berfungsi sebagai reseptor untuk antigen dan memberi sinyal pada sel B untuk diaktifkan. Sejauh ini, relatif sedikit yang dikenal sebagai fungsi IgD.

Untuk menyimpulkan, lima kelas Ig manusia dibedakan satu sama lain oleh jenis rantai berat dan fungsinya tidak persis sama.

#### 2.5.4 Produksi

Sifat khusus antibodi menjadikannya alat yang berguna untuk penelitian ilmiah, diagnosis dan pengobatan penyakit, dan bidang lainnya. Ada peningkatan permintaan untuk antibodi karena aplikasi mereka yang luas. Antibodi buatan manusia terutama dibagi menjadi dua jenis: antibodi monoklonal (mAb) dan antibodi poliklonal (pAb). Dengan perkembangan teknologi, jenis baru antibodi buatan manusia muncul; itu adalah antibodi rekombinan (rAb).

### a. Antibodi monoklonal

Produksi antibodi monoklonal terutama menggunakan teknologi hibridoma, yang melibatkan penyuntikan imunogen (antigen atau zat apa pun yang mampu menimbulkan respons imun) ke dalam hewan inang untuk memicu respons imun, mengisolasi sel B yang diaktifkan dari limpa, menyatukan mengisolasi sel B dengan sel myeloma untuk menghasilkan hibridoma, skринing supernatan hibridoma untuk memilih hibridoma yang berhasil yang akan menghasilkan antibodi yang diinginkan, mengkloning atau memperluas hibridoma yang dipilih untuk menghasilkan jumlah antibodi yang lebih besar, dan memurnikan serta menguji antibodi tersebut. Antibodi yang dibuat melalui prosedur ini disebut antibodi monoklonal dan hanya mengenali satu epitop pada suatu antigen.

### b. Antibodi poliklonal

Produksi antibodi poliklonal berbeda dari antibodi monoklonal tetapi juga melibatkan imunisasi hewan, sebagai berikut: menyuntikkan imunogen ke hewan inang untuk memicu respons imun, mengambil seluruh darah dari hewan yang diimunisasi, memisahkan serum dari seluruh darah, mengisolasi dan memurnikan antibodi dari serum, dan menguji antibodi yang dihasilkan. Proses ini lebih cepat dan lebih murah dibandingkan dengan produksi antibodi monoklonal. Antibodi poliklonal mengenali beberapa epitop pada suatu antigen.

### c. Antibodi rekombinan

Produksi antibodi rekombinan jauh berbeda dari produksi antibodi monoklonal atau poliklonal, tetapi sebaliknya, mirip dengan produksi protein rekombinan. Produksi antibodi rekombinan bergantung pada teknologi DNA rekombinan, yang melibatkan penggunaan rekombinasi genetik untuk



menyatukan materi genetik dari berbagai sumber, menciptakan sekuens DNA yang secara alami tidak ditemukan dalam genom, untuk menghasilkan antibodi dengan sifat yang dirancang.

### 2.5.5 Aplikasi

Antibodi dapat berikatan dengan antigen unik dengan spesifisitas tinggi.

Spesifisitas adalah andalan untuk berbagai metode eksperimental. Kemajuan dalam produksi antibodi memungkinkan produksi antibodi yang tinggi. Saat ini, antibodi terutama digunakan dalam:

#### a) Penelitian

Antibodi digunakan dalam immunoassay, seperti ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), WB (Western blotting), IHC (Immunohistochemistry), IF (Immunofluorescence), ChIP (Chromatin immunoprecipitasi), ICC (Immunocytochemistry), FC (Flow cytometry), FC dll. Metode-metode ini membantu dalam pendeteksian dan karakterisasi protein. Selain itu, antibodi juga digunakan untuk memurnikan protein, memfasilitasi produksi protein rekombinan.

#### b) Diagnosis penyakit

Beberapa immunoassay juga digunakan untuk tujuan diagnostik. Deteksi protein atau antibodi tertentu dengan immunoassays membantu menentukan adanya penyakit atau infeksi. Sebagai contoh, pengujian untuk keberadaan antibodi terhadap HCV direkomendasikan untuk mengidentifikasi orang dengan infeksi HCV.

#### c) Terapi antibodi

Antibodi monoklonal telah muncul sebagai pengobatan penting untuk berbagai macam penyakit, seperti kanker, penyakit radang kronis, penyakit autoimun, dan infeksi. Antibodi terapi bekerja dalam berbagai cara. Sebagai contoh, beberapa antibodi terapeutik merangsang sistem kekebalan tubuh pasien

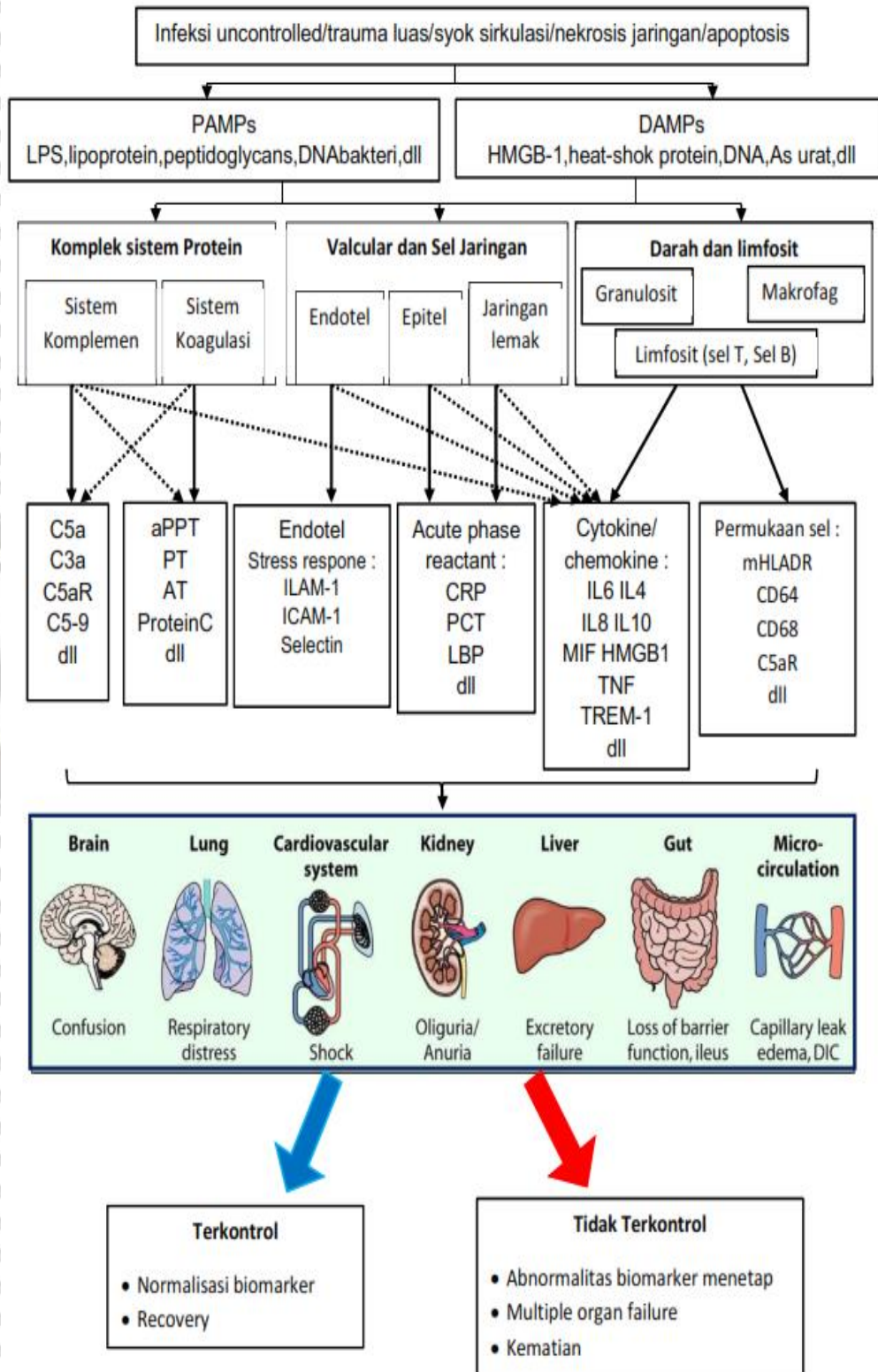
untuk menyerang sel-sel yang sakit dengan mengikat molekul spesifik, sedangkan beberapa blok molekul kritis digunakan sel kanker untuk menghindari serangan kekebalan agar tetap hidup.

Singkatnya, antibodi adalah kelompok protein pelindung yang penting dalam organisme, dengan kemampuan untuk mengikat antigen yang sesuai dengan spesifisitas tinggi. Protein pelindung ini diproduksi oleh sekelompok sel kekebalan yang dikenal sebagai sel plasma. Di dalam tubuh manusia, ada lima kelas utama antibodi, masing-masing dengan rantai berat dan fungsi yang berbeda. Karena interaksi antara antibodi dan antigen sangat spesifik, antibodi digunakan untuk banyak tujuan termasuk penelitian, diagnosis penyakit dan terapi antibodi.



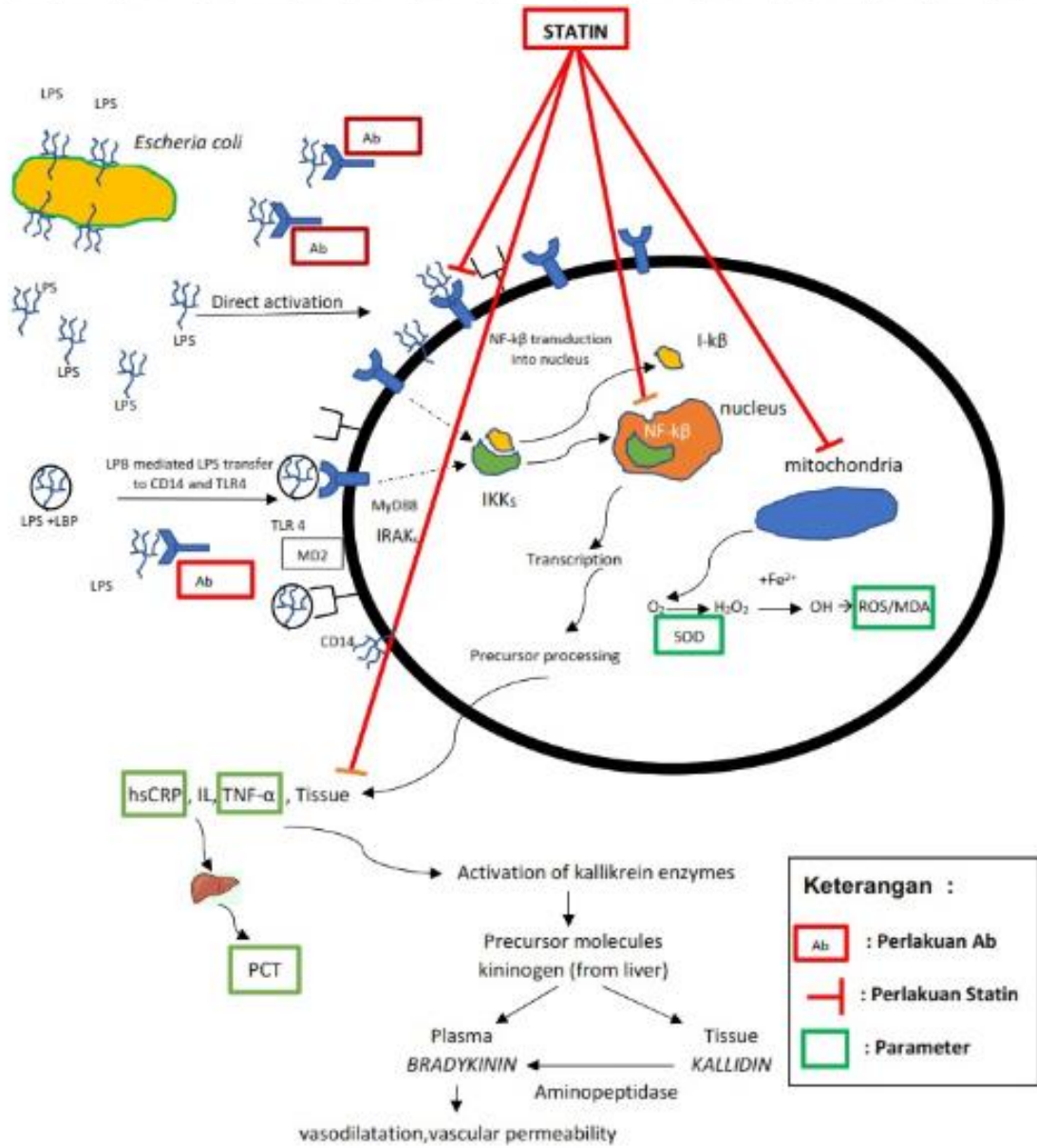


## 2.6 Kerangka Teori



# BAB III KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESA

## 3.1 Kerangka Konsep





### 3.2 Keterangan Kerangka Konsep

LPS yang diinduksi pada tikus akan dapat secara langsung mengaktifkan sel target ataupun berikatan reseptor TLR4 yang selanjutnya akan mengaktifkan respon imun dengan mengaktifkan makrofag dan komplemen. Makrofag mengaktifkan berbagai mediator inflamasi seperti  $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 yang disertai peningkatan produksi radikal bebas Reactive Oxygen species (ROS).

Sedangkan komplemen akan mengaktifkan C5a yang selanjutnya akan mengaktifkan thymocyte dan neutrofile yang berakibat menurunnya sistem imun.

Hal ini menyebabkan terjadinya chemotaxis, fagositosis, dan produksi intermediate radikal yaitu  $H_2O_2$ . Meningkatnya radikal bebas yang tidak terkontrol menyebabkan stress oksidatif yang akan merusak sel antara lain merusak membran sel melalui proses peroksidasi lipid oleh radikal hidroksil (OH) yang merupakan produk dari  $H_2O_2$  sehingga terbentuk malondealdehid (MDA) sebagai indikator terjadinya peroksidasi lipid. Sedangkan thymocyte dapat menyebabkan apoptosis. Meningkatnya stres oksidatif dan menurunnya fungsi imun inate menyebabkan keadaan yang disebut SIRS (systemic inflammatory response syndrome).

Di sisi lain infeksi juga menyebabkan gangguan fungsi dan struktur sel endotel sehingga mengganggu biosintesis dari berbagai molekul dan disintesisnya tromboxane, leukotrien dan PAF serta terekspresinya adesi molekul sebagai respon terhadap adanya infeksi. Keadaan ini akan menyebabkan terjadinya koagulasi darah dan terbentuknya *disseminated intravascular coagulation* (DIC).

Kejadian apoptosis, stres oksidatif, SIRS dan koagulasi darah menyebabkan terjadinya jejas jaringan/organ yang dapat menyebabkan disfungsi organ bahkan kematian.

### 3.3 Hipotesis

#### 3.3.1 Hipotesis Penelitian

Perlakuan IIP (Injeksi Intraperitoneal) *E. coli* mampu meningkatkan parameter proinflamasi dan fungsi organ serta pemberian kombinasi statin dan AbLPS lebih baik dalam menurunkan beberapa parameter akibat perlakuan tersebut

#### 3.3.2. Hipotesis minor

1. Terdapat peningkatan mediator proinflamasi, fungsi organ ginjal dan hepar akibat perlakuan IIP *E. coli*.
2. Terdapat penurunan Mediator Proinflamasi TNF- $\alpha$  pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
3. Terdapat penurunan Mediator Proinflamasi hs-CRP pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
4. Terdapat penurunan Mediator Proinflamasi PCT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
5. Terdapat penurunan Mediator Proinflamasi MDA pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
6. Terdapat penurunan ureum/BUN pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
7. Terdapat penurunan kreatinin pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
8. Terdapat penurunan SGPT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.
9. Terdapat penurunan SGOT pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*.



10. Terdapat penurunan total bilirubin pada pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada tikus model sepsis IIP *E.coli*



## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain experimental post test only control group design dengan menggunakan hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan. Pembagian kelompok penelitian ini meliputi kelompok kontrol (tanpa diberikan perlakuan apapun), kelompok tikus model sepsis akibat injeksi *Escherichia coli*  $10^5$  CFU, kelompok perlakuan statin, kelompok perlakuan antibodi LPS dan kelompok perlakuan kombinasi statin+antibodi LPS yang masing-masing pada jam ke nol dan jam ke tiga. Jumlah tikus per kelompok adalah 5 ekor tikus.

### 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Juni 2018 di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk pemeliharaan dan perlakuan pada tikus dan analisis kadar MDA, Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk kultur bakteri, Laboratorium Patologi Klinik untuk pengukuran kimia darah dan Laboratorium Biomedik untuk ELISA TNFa, HsCRP dan PCT.

### 4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

1. Kriteria inklusi: jenis kelamin jantan, umur 7-9 minggu, berat badan 150-170 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun, dan dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif serta bulu tidak rontok.



2. Kriteria eksklusi: tikus kelompok diabetes yang tidak mencapai kondisi hiperglikemia dan mati selama perlakuan.

**Jumlah sampel dihitung dengan rumus:**

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

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 9, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah:

$$9(n-1) \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,9 \approx 3$$

Jadi, jumlah pengulangan sampel untuk tiap perlakuan adalah minimal 3 dan cadangan 2 ekor. Total tikus yang digunakan adalah 5 ekor untuk tiap kelompok. Sehingga total tikus yang dibutuhkan sebanyak 45 ekor.

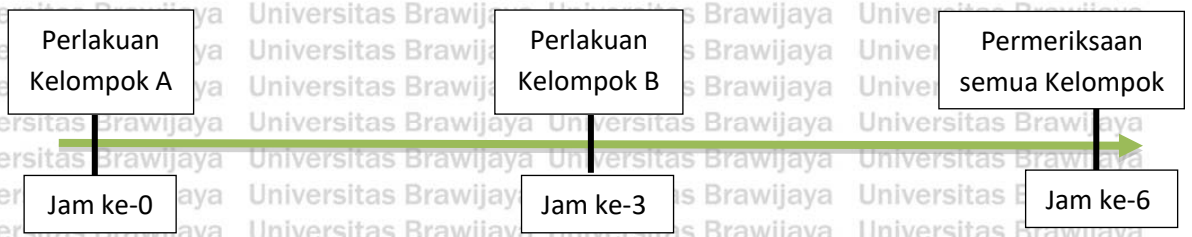
Sedangkan untuk terapi dan pencegahan terdapat 7 kelompok :

**Kelompok Tikus Penelitian**

1. Kelompok Kontrol
2. Kelompok *E. coli* jam ke-0
3. Kelompok *E. coli* + Statin jam ke-0
4. Kelompok *E. coli* + Ab LPS jam ke-0
5. Kelompok *E. coli* + Statin + Ab LPS Jam ke-0
6. Kelompok *E. coli* jam ke-3
7. Kelompok *E. coli* + Statin jam ke 3
8. Kelompok *E. coli* + Ab LPS jam ke-3
9. Kelompok *E. coli* + Statin +Ab LPS jam ke-3

**Kelompok A**

**Kelompok B**



#### 4.4 Variable penelitian

##### 4.4.1 Variable bebas

1. Simvastatin
2. AbLPS
3. IIP *E. coli*

##### 4.4.2 Variable terikat

1. TNF- $\alpha$
2. PCT
3. BUN
4. Ureum
5. Total bilirubin
6. Hs-CRP
7. SGOT
8. SGPT
9. Kreatinin

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, Waterbath, stirer, laminary air flow ELISA reader, spektrofotometri, rak tabung reaksi, tabung reaksi, mikro pipet, intragastrik sonde, neraca analitik.

##### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah SOD kit, TBA, Na Thio, TNFa kit, PCT kit, HsCRP kit, medium agar, larutan PBS, aquades, Simvastatin, Anti LPS (Sigma).



#### 4.6 Prosedur Penelitian

Dari hasil pemeriksaan metode dot blot didapatkan dosis optimum untuk *treatment E. coli* yang diinjeksikan pada tikus sebanyak  $10^5$  CFU dan dosis antibody antiLPS sebesar  $10^8$ . Sehingga dosis statin yang diberikan secara sonde sebesar 1.17 mg/kg berat badan.

##### 4.6.1 Pemberian Statin

Pemberian statin dilakukan dengan sonde. Dosis rendah pemberian simvastatin adalah 1.17 mg/kg berat badan. Dosis rendah pemberian statin adalah 0.59 mg/kg berat badan. Dosis ini merupakan ekstrapolasi alometrik dari dosis yang disarankan untuk hiperkolesterolemia pada pasien (Pachaly & Brito, 2001; Stolf *et al.*, 2012). Dosis tinggi pemberian simvastatin adalah 5.85 mg/kg berat badan. Dosis tinggi pemberian simvastatin adalah 2.95 mg/kg berat badan.

##### 4.6.2 Disfungsi organ

Disfungsi hati dievaluasi dengan pengukuran kadar total bilirubin, bilirubin direk, alanin amino transferase, dan aspartat amino transferase. Disfungsi ginjal dianalisa dengan pengukuran kadar urea nitrogen dan kreatinin. Semua pemeriksaan dianalisa dengan autoanalyzer.

##### 4.6.3 Metode Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$

Metode pemeriksaan TNF- $\alpha$  menggunakan prinsip kuantitatif teknik *sandwich enzyme immunoassay*. Prinsipnya monoklonal antibody spesifik untuk TNF- $\alpha$  dilapiskan pada *microplate* kemudian standar dan sampel dipipet ke *well* dan keberadaan TNF- $\alpha$  akan terikat oleh antibody imobilisasi. Setelah dilakukan pencucian terhadap senyawa yang tidak terikat, maka *enzyme-linked monoclonal*

*antibody* spesifik ke TNF- $\alpha$  ditambahkan ke *well*. Selama pencucian untuk menghilangkan senyawa yang tidak terikat reagen *antibody-enzyme*, larutan substrat ditambahkan ke *well* dan warna akan muncul sesuai proporsi TNF- $\alpha$  yang terikat di tahap awal. Perkembangan warna dihentikan dan diukur intensitas warna tersebut. Hasil pemeriksaan akan dibaca menggunakan spektrofotometer ( $\lambda=450$  nm). Kadar TNF- $\alpha$  dihitung berdasarkan kurva standar dan diekspresikan dalam pg/ml.

#### 4.6.4 Metode Pemeriksaan hs-CRP

Metode pemeriksaan hs-CRP menggunakan prinsip kuantitatif teknik *sandwich enzyme immunoassay*. Prinsipnya monoklonal antibodi spesifik untuk hs-CRP dilapiskan pada *microplate* kemudian standar dan sampel dipipet ke *well* dan keberadaan hs-CRP akan terikat oleh antibodi imobilisasi. Setelah dilakukan pencucian terhadap senyawa yang tidak terikat, maka *enzyme-linked monoclonal antibody* spesifik ke hs-CRP ditambahkan ke *well*. Selama pencucian untuk menghilangkan senyawa yang tidak terikat reagen *antibody-enzyme*, larutan substrat ditambahkan ke *well* dan warna akan muncul sesuai proporsi hs-CRP yang terikat di tahap awal. Perkembangan warna dihentikan dan diukur intensitas warna tersebut. Hasil pemeriksaan akan dibaca menggunakan spektrofotometer ( $\lambda=450$  nm). Kadar hs-CRP dihitung berdasarkan kurva standar dan diekspresikan dalam pg/ml.

#### 4.6.5 Metode Pemeriksaan pro-calcitonin

Metode pemeriksaan pro-calcitonin menggunakan prinsip kuantitatif teknik *sandwich enzyme immunoassay*. Prinsipnya monoklonal antibodi spesifik untuk pro-calcitonin dilapiskan pada *microplate* kemudian standar dan sampel dipipet



ke *well* dan keberadaan pro-calcitonin akan terikat oleh antibodi imobilisasi.

Setelah dilakukan pencucian terhadap senyawa yang tidak terikat, maka *enzyme-linked monoclonal antibody* spesifik ke pro-calcitonin ditambahkan ke *well*. Selama pencucian untuk menghilangkan senyawa yang tidak terikat reagen *antibody-enzyme*, larutan substrat ditambahkan ke *well* dan warna akan muncul sesuai proporsi pro-calcitonin yang terikat di tahap awal. Perkembangan warna dihentikan dan diukur intensitas warna tersebut. Hasil pemeriksaan akan dibaca menggunakan spektrofotometer ( $\lambda=450$  nm). Kadar pro-calcitonin P dihitung berdasarkan kurva standar dan diekspresikan dalam pg/ml.

#### 4.6.6 Metode Pemeriksaan Malondialdehid

Metode pemeriksaan menggunakan metode yang dikembangkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tahap persiapan: 3-4 ml darah dari tubuh hewan coba tanpa koagulan disentrifuge 1000 rpm selama 15 menit. Serum darah yang diperoleh dibagi dua sebagai serum uji dan serum kontrol. Pada serum uji dan control ditambahkan TCA 100  $\mu$ L lalu divortex kemudian ditambahkan HCl 250  $\mu$ L lalu divortex kembali. Dilakukan sentrifuge 500 rpm 10 menit, diambil supernatan kemudian disaring dengan *glass wool*. Ditambahkan *Na-thiobarbiturat* pada serum uji sebanyak 100  $\mu$ L. Pada serum uji dan kontrol dilakukan vortex, panaskan dalam waterbath 100°C selama 20 menit, angkat dan diamkan pada suhu ruang. Baca absorbansi pada panjang gelombang 529 nm.

#### 4.7 Definisi operasional variable

IIP *E. coli* adalah metode pembuatan tikus model sepsis dengan cara injeksi intraperitoneal menggunakan kultur *E. coli*.

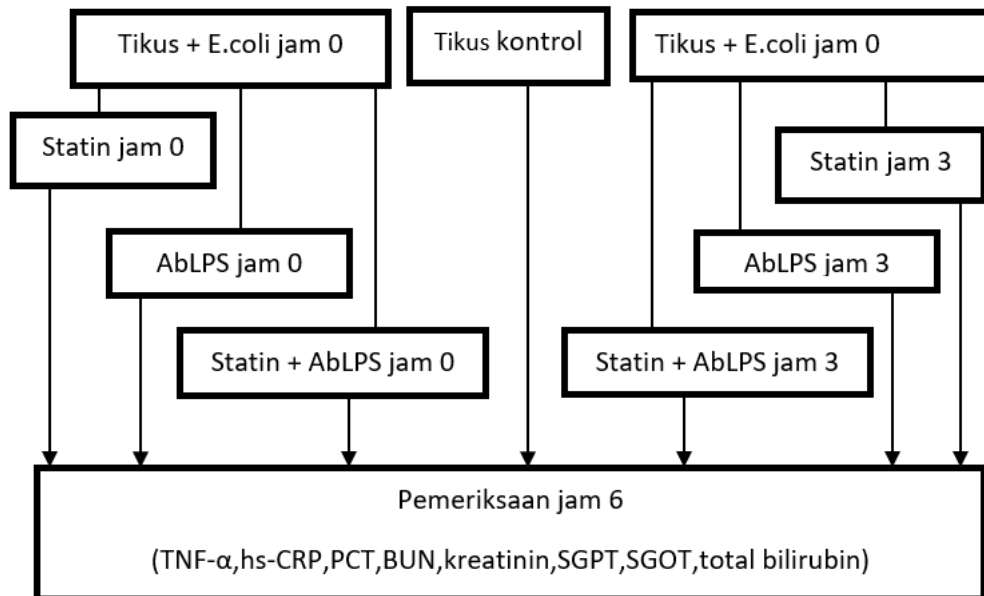
Statin

merupakan obat yang difungsikan untuk mereduksi flak pada penderita kolesterol tinggi, stroke dan aterosklerosis.

Kombinasi statin

campuran statin dengan antibody anti LPS yang digunakan untuk pencegahan dan pengobatan sepsis

#### 4.8 Alur Penelitian





## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan desain experimental post test only control group design dengan menggunakan hewan model tikus putih (*Rattus norvegicus* strain Wistar) jantan. Pembagian kelompok penelitian ini meliputi kelompok kontrol (tanpa diberikan perlakuan apapun), kelompok tikus model sepsis akibat injeksi *Escherichia coli*  $10^5$  CFU, kelompok perlakuan statin, kelompok perlakuan antibodi LPS dan kelompok perlakuan kombinasi statin+antibodi LPS yang masing-masing pada jam ke nol dan jam ke tiga. Jumlah tikus per kelompok adalah 5 ekor tikus.

### 4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret – Juni 2018 di Laboratorium Farmakologi FKUB untuk pemeliharaan dan perlakuan pada tikus dan analisis kadar MDA, Laboratorium Mikrobiologi FKUB untuk kultur bakteri, Laboratorium Patologi Klinik untuk pengukuran kimia darah dan Laboratorium Biomedik untuk ELISA TNFa, HsCRP dan PCT.

### 4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus (*Rattus norvegicus*).

1. Kriteria inklusi: jenis kelamin jantan, umur 7-9 minggu, berat badan 150-170 gram, belum mengalami perlakuan apapun atau belum mendapat asupan bahan kimia apapun, dan dalam keadaan sehat dengan ditandai bergerak aktif serta bulu tidak rontok.

2. Kriteria eksklusi: tikus kelompok diabetes yang tidak mencapai kondisi hiperglikemia dan mati selama perlakuan.

**Jumlah sampel dihitung dengan rumus:**

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

n = jumlah sampel tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan

Pada penelitian ini diketahui perlakuan (p) = 9, sehingga jumlah sampel yang dibutuhkan adalah:

$$9(n-1) \geq 15$$

$$9n \geq 24$$

$$n \geq 2,9 \approx 3$$

Jadi, jumlah pengulangan sampel untuk tiap perlakuan adalah minimal 3 dan cadangan 2 ekor. Total tikus yang digunakan adalah 5 ekor untuk tiap kelompok. Sehingga total tikus yang dibutuhkan sebanyak 45 ekor.

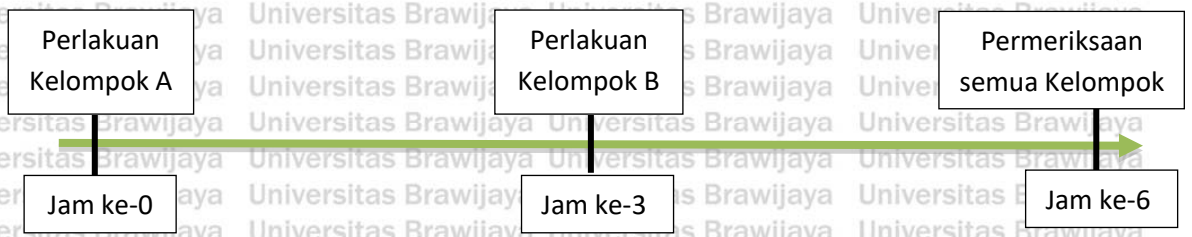
Sedangkan untuk terapi dan pencegahan terdapat 7 kelompok :

**Kelompok Tikus Penelitian**

1. Kelompok Kontrol
2. Kelompok *E. coli* jam ke-0
3. Kelompok *E. coli* + Statin jam ke-0
4. Kelompok *E. coli* + Ab LPS jam ke-0
5. Kelompok *E. coli* + Statin + Ab LPS Jam ke-0
6. Kelompok *E. coli* jam ke-3
7. Kelompok *E. coli* + Statin jam ke 3
8. Kelompok *E. coli* + Ab LPS jam ke-3
9. Kelompok *E. coli* + Statin +Ab LPS jam ke-3

**Kelompok A**

**Kelompok B**





#### 4.4 Variable penelitian

##### 4.4.1 Variable bebas

1. Simvastatin
2. AbLPS
3. IIP *E. coli*

##### 4.4.2 Variable terikat

1. TNF- $\alpha$
2. PCT
3. BUN
4. Ureum
5. Total bilirubin
6. Hs-CRP
7. SGOT
8. SGPT
9. Kreatinin

#### 4.5 Alat dan Bahan

##### 4.5.1 Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah kandang tikus, Waterbath, stirer, laminary air flow ELISA reader, spektrofotometri, rak tabung reaksi, tabung reaksi, mikro pipet, intragastrik sonde, neraca analitik.

##### 4.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah SOD kit, TBA, Na Thio, TNFa kit, PCT kit, HsCRP kit, medium agar, larutan PBS, aquades, Simvastatin, Anti LPS (Sigma).

#### 4.6 Prosedur Penelitian

Dari hasil pemeriksaan metode dot blot didapatkan dosis optimum untuk *treatment E. coli* yang diinjeksikan pada tikus sebanyak  $10^5$  CFU dan dosis antibody antiLPS sebesar  $10^8$ . Sehingga dosis statin yang diberikan secara sonde sebesar 1.17 mg/kg berat badan.

##### 4.6.1 Pemberian Statin

Pemberian statin dilakukan dengan sonde. Dosis rendah pemberian simvastatin adalah 1.17 mg/kg berat badan. Dosis rendah pemberian statin adalah 0.59 mg/kg berat badan. Dosis ini merupakan ekstrapolasi alometrik dari dosis yang disarankan untuk hiperkolesterolemia pada pasien (Pachaly & Brito, 2001; Stolf *et al.*, 2012). Dosis tinggi pemberian simvastatin adalah 5.85 mg/kg berat badan. Dosis tinggi pemberian simvastatin adalah 2.95 mg/kg berat badan.

##### 4.6.2 Disfungsi organ

Disfungsi hati dievaluasi dengan pengukuran kadar total bilirubin, bilirubin direk, alanin amino transferase, dan aspartat amino transferase. Disfungsi ginjal dianalisa dengan pengukuran kadar urea nitrogen dan kreatinin. Semua pemeriksaan dianalisa dengan autoanalyzer.

##### 4.6.3 Metode Pemeriksaan Kadar TNF- $\alpha$

Metode pemeriksaan TNF- $\alpha$  menggunakan prinsip kuantitatif teknik *sandwich enzyme immunoassay*. Prinsipnya monoklonal antibody spesifik untuk TNF- $\alpha$  dilapiskan pada *microplate* kemudian standar dan sampel dipipet ke *well* dan keberadaan TNF- $\alpha$  akan terikat oleh antibody imobilisasi. Setelah dilakukan pencucian terhadap senyawa yang tidak terikat, maka *enzyme-linked monoclonal*



*antibody* spesifik ke TNF- $\alpha$  ditambahkan ke *well*. Selama pencucian untuk menghilangkan senyawa yang tidak terikat reagen *antibody-enzyme*, larutan substrat ditambahkan ke *well* dan warna akan muncul sesuai proporsi TNF- $\alpha$  yang terikat di tahap awal. Perkembangan warna dihentikan dan diukur intensitas warna tersebut. Hasil pemeriksaan akan dibaca menggunakan spektrofotometer ( $\lambda=450$  nm). Kadar TNF- $\alpha$  dihitung berdasarkan kurva standar dan diekspresikan dalam pg/ml.

#### 4.6.4 Metode Pemeriksaan hs-CRP

Metode pemeriksaan hs-CRP menggunakan prinsip kuantitatif teknik *sandwich enzyme immunoassay*. Prinsipnya monoklonal antibodi spesifik untuk hs-CRP dilapiskan pada *microplate* kemudian standar dan sampel dipipet ke *well* dan keberadaan hs-CRP akan terikat oleh antibodi imobilisasi. Setelah dilakukan pencucian terhadap senyawa yang tidak terikat, maka *enzyme-linked monoclonal antibody* spesifik ke hs-CRP ditambahkan ke *well*. Selama pencucian untuk menghilangkan senyawa yang tidak terikat reagen *antibody-enzyme*, larutan substrat ditambahkan ke *well* dan warna akan muncul sesuai proporsi hs-CRP yang terikat di tahap awal. Perkembangan warna dihentikan dan diukur intensitas warna tersebut. Hasil pemeriksaan akan dibaca menggunakan spektrofotometer ( $\lambda=450$  nm). Kadar hs-CRP dihitung berdasarkan kurva standar dan diekspresikan dalam pg/ml.

#### 4.6.5 Metode Pemeriksaan pro-calcitonin

Metode pemeriksaan pro-calcitonin menggunakan prinsip kuantitatif teknik *sandwich enzyme immunoassay*. Prinsipnya monoklonal antibodi spesifik untuk pro-calcitonin dilapiskan pada *microplate* kemudian standar dan sampel dipipet



ke *well* dan keberadaan pro-calcitonin akan terikat oleh antibodi imobilisasi.

Setelah dilakukan pencucian terhadap senyawa yang tidak terikat, maka *enzyme-linked monoclonal antibody* spesifik ke pro-calcitonin ditambahkan ke *well*. Selama pencucian untuk menghilangkan senyawa yang tidak terikat reagen *antibody-enzyme*, larutan substrat ditambahkan ke *well* dan warna akan muncul sesuai proporsi pro-calcitonin yang terikat di tahap awal. Perkembangan warna dihentikan dan diukur intensitas warna tersebut. Hasil pemeriksaan akan dibaca menggunakan spektrofotometer ( $\lambda=450$  nm). Kadar pro-calcitonin P dihitung berdasarkan kurva standar dan diekspresikan dalam pg/ml.

#### 4.6.6 Metode Pemeriksaan Malondialdehid

Metode pemeriksaan menggunakan metode yang dikembangkan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Tahap persiapan: 3-4 ml darah dari tubuh hewan coba tanpa koagulan disentrifuge 1000 rpm selama 15 menit. Serum darah yang diperoleh dibagi dua sebagai serum uji dan serum kontrol. Pada serum uji dan control ditambahkan TCA 100  $\mu$ L lalu divortex kemudian ditambahkan HCl 250  $\mu$ L lalu divortex kembali. Dilakukan sentrifuge 500 rpm 10 menit, diambil supernatan kemudian disaring dengan *glass wool*. Ditambahkan *Na-thiobarbiturat* pada serum uji sebanyak 100  $\mu$ L. Pada serum uji dan kontrol dilakukan vortex, panaskan dalam waterbath 100°C selama 20 menit, angkat dan diamkan pada suhu ruang. Baca absorbansi pada panjang gelombang 529 nm.

#### 4.7 Definisi operasional variable

IIP *E. coli* adalah metode pembuatan tikus model sepsis dengan cara injeksi intraperitoneal menggunakan kultur *E. coli*.



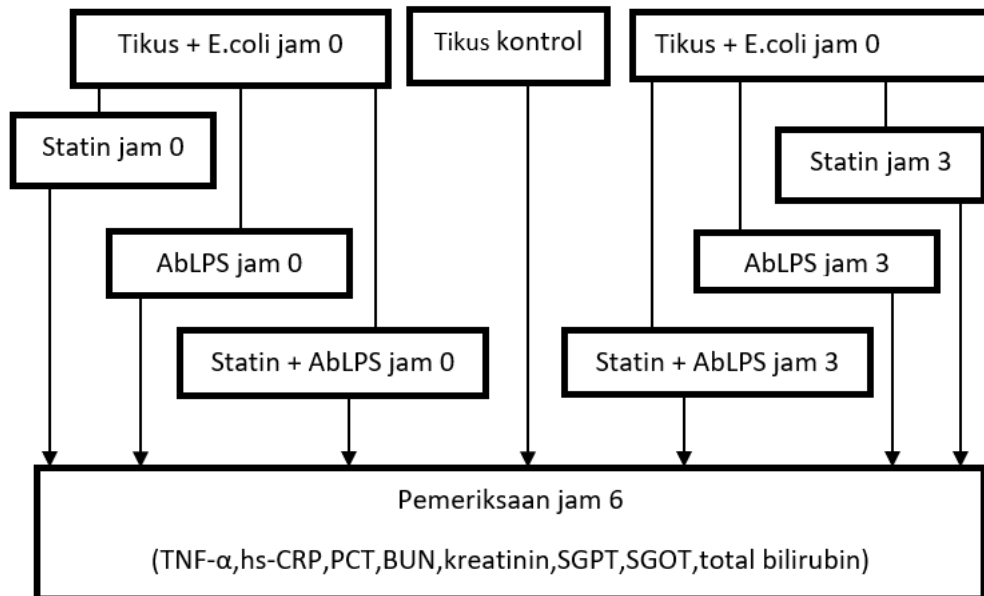
Statin

merupakan obat yang difungsikan untuk mereduksi flak pada penderita kolesterol tinggi, stroke dan aterosklerosis.

Kombinasi statin

campuran statin dengan antibody anti LPS yang digunakan untuk pencegahan dan pengobatan sepsis

#### 4.8 Alur Penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN

5.1. Perbedaan Rataan dan Simpangan Baku Variable Perlakuan Control dan IIP *E. coli*.

Perlakuan *E. coli* menyebabkan peningkatan TNF $\alpha$ , PCT, MDA, ureum, BUN yang signifikan ( $p < 0,05$ ) dan hs CRP, kreatinin dan total bilirubin yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ), sedangkan terhadap SGOT dan SGPT tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Perbedaan Rataan dan Simpangan Baku Variable perlakuan control dan *E. coli* secara rinci ditampilkan dalam Tabel 5.1.

Tabel 5.1. Perbedaan Statistk Variabel Perlakuan Kontrol dengan *E. coli*

Variabel	Kontrol		<i>E. coli</i>	
	$\bar{X} \pm sd$		$\bar{X} \pm sd$	
TNF_alfa	0.58 $\pm$ 0.16 <sup>a</sup>		0.84 $\pm$ 0.02 <sup>b*</sup>	
PCT	0.76 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>		1.06 $\pm$ 0.09 <sup>b*</sup>	
hs_CRP	0.72 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>		1.17 $\pm$ 0.10 <sup>b**</sup>	
MDA	0.13 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>		0.53 $\pm$ 0.23 <sup>b*</sup>	
Ureum	15.90 $\pm$ 3.50 <sup>a</sup>		24.46 $\pm$ 4.75 <sup>b*</sup>	
BUN	7.43 $\pm$ 1.64 <sup>a</sup>		11.44 $\pm$ 2.22 <sup>b*</sup>	
Kreatinin	0.30 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>		0.54 $\pm$ 0.05 <sup>b**</sup>	
SGOT	66.40 $\pm$ 18.04 <sup>a</sup>		95.20 $\pm$ 36.48 <sup>a</sup>	
SGPT	31.00 $\pm$ 15.08 <sup>a</sup>		42.40 $\pm$ 15.34 <sup>a</sup>	
Total bilirubin	0.24 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>		0.42 $\pm$ 0.08 <sup>b**</sup>	

Superskrip yang berbeda pada baris yang sama berbeda \*) signifikan ( $p < 0,05$ ), \*\*)sangat signifikan ( $p < 0,01$ ).



**5.2. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 terhadap mediator Proinflamasi TNF- $\alpha$  pada Model Tikus Sepsis IIP *E. coli***

Hasil analisis data penelitian menunjukkan bahwa pada jam ke nol TNF- $\alpha$  pada perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun perlakuan *E. coli* ( $p > 0,5$ ).

Perlakuan yang sama pada jam ke tiga TNF- $\alpha$  pada perlakuan *E. coli* + Statin tidak berbeda signifikan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak menunjukkan perbedaan TNF- $\alpha$  secara signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.2.; Table 5.3)

Table 5.2. Konsentrasi TNF- $\alpha$  pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol (ng-ml-1)

Perlakuan Jam 0	Hasil jam 6		
	$\bar{X} \pm Sd$		
Control	0,58	$\pm$	0,16 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	0,84	$\pm$	0,02 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	0,75	$\pm$	0,12 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPS	0,66	$\pm$	0,15 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i> + Statin + AbLPS	0,81	$\pm$	0,16 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda sangat signifikan ( $p < 0,05$ )

Table 5.3. Konsentrasi TNF- $\alpha$  pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga (ng-ml-1)

Perlakuan jam 0	Perlakuan jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		0,58	$\pm$ 0,16 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		0,84	$\pm$ 0,02 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	0,63	$\pm$ 0,12 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPS	0,76	$\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	0,76	$\pm$ 0,07 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda sangat signifikan ( $p < 0,05$ )

**5.3. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 terhadap mediator Proinflamasi hs-CRP (high-sensitivity C-reactive protein) pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS yang diberikan jam ke nol memperlihatkan hs-CRP tidak berbeda signifikan antara *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS baik dengan kontrol maupun *E. coli* ( $p > 0.05$ ). Perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS yang diberikan jam ke tiga memperlihatkan hs-CRP perlakuan *E. coli* + Statin tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Sebaliknya perlakuan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) dan tidak berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.4; Tabel 5.5)

Table 5.4. Konsentrasi hs-CRP pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

Perlakuan jam 0	Hasil jam 6		
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control	0,72	±	0,24 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	1,17	±	0,10 <sup>bc</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	0,96	±	0,15 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPS	0,96	±	0,24 <sup>bc</sup>
<i>E. coli</i> + Statin AbLPS	1,00	±	0,17 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )

Table 5.5. Konsentrasi hs-CRP pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil jam 6	
			$\bar{X} \pm Sd$
Control		0,72	± 0,24 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		1,17	± 0,10 <sup>bc</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	0,72	± 0,23 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPS	1,21	± 0,15 <sup>c</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	0,83	± 0,16 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )



**5.4. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS pada jam ke-0 dan jam ke-3 terhadap mediator Proinflamasi PCT (procalcitonin) pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

Konsentrasi PCT perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS pada jam nol tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik terhadap control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Pola berbeda pada perlakuan yang diberikan pada jam tiga yaitu PCT perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.6; Tabel 5.7).

Tabel 5.6 Konsentrasi PCT pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

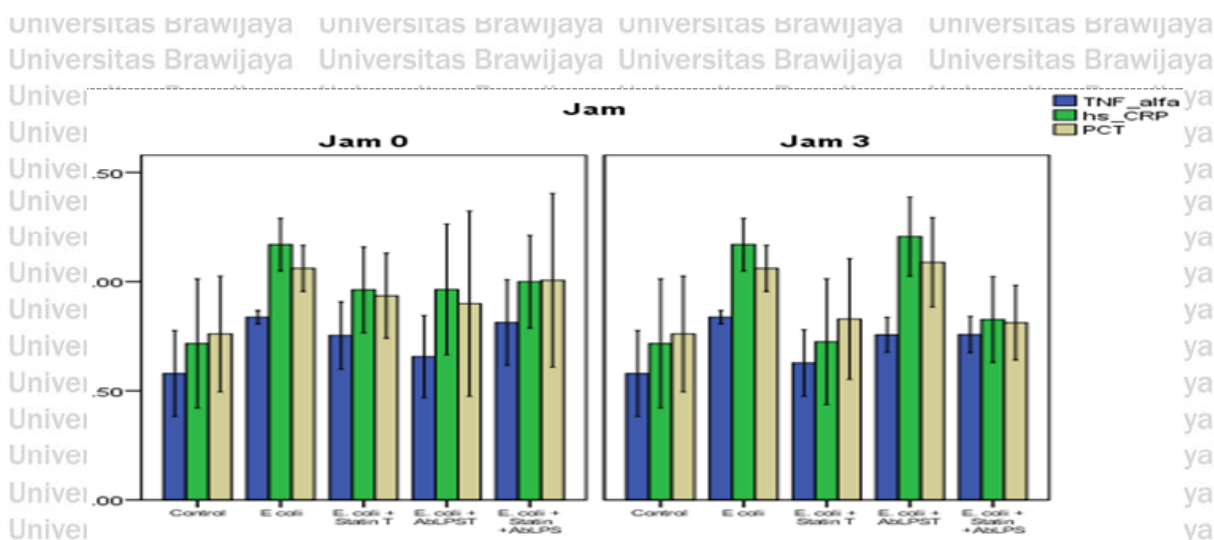
Perlakuan jam 0	Hasil jam 6		
	$\bar{X} \pm Sd$		
Control	0,76	±	0,21 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	1,06	±	0,09 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	0,94	±	0,18 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPS	0,90	±	0,34 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	1,01	±	0,32 <sup>a</sup>

Superskriptyang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )

Tabel 5.7 Konsentrasi PCT pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		0,76	± 0,21 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		1,06	± 0,09 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	0,93	± 0,25 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPS	0,83	± 0,16 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	1.05	± 0,14 <sup>ab</sup>

Superskriptyang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )



Gambar 5.1. Pengaruh waktu dan perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap TNF- $\alpha$ , hs-CRP dan PCT.

Kadar TNF- $\alpha$ , hs-CRP dan PCT perlakuan *E. coli*+Statin tidak berbeda signifikan dengan control, sedangkan terhadap *E. coli* pada variable yang sama beragam ( $p < 0,05$ ). Kadar TNF- $\alpha$  dan PCT tidak berbeda ( $p > 0,05$ ) sedangkan hs-CRP berbeda signifikan ( $p < 0,05$ ). Perlakuan *E. coli* + AbLPS tidak menunjukkan perbedaan kadar TNF- $\alpha$  dan PCT yang signifikan baik terhadap control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ), sedangkan hs-CRP menunjukkan perbedaan yang nyata  $p < 0,05$  terhadap control ( $P < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Kadar TNF- $\alpha$  perlakuan *E. coli* + Statin + AbLPS berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ), tetapi tidak berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Kadar hs-CRP tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Kadar PCT tidak menunjukkan perbedaan signifikan baik terhadap control maupun perlakuan *E. coli* ( $p > 0,05$ ).



**5.5. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap stress oksidatif ( MDA )pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS berpengaruh terhadap MDA tetapi tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) dan berbeda sangat signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ) pada jam ke nol. Pada jam ke tiga perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS menghasilkan MDA yang tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda sangat nyata dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Kadar MDA Perlakuan *E. coli* + Statin + Ab.LPS pada jam ke tiga tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun dengan *E. coli* ( $P > 0,05$ ). (Tabel 5.8; Tabel 5.9).

Table 5.8. Konsentrasi MDA pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

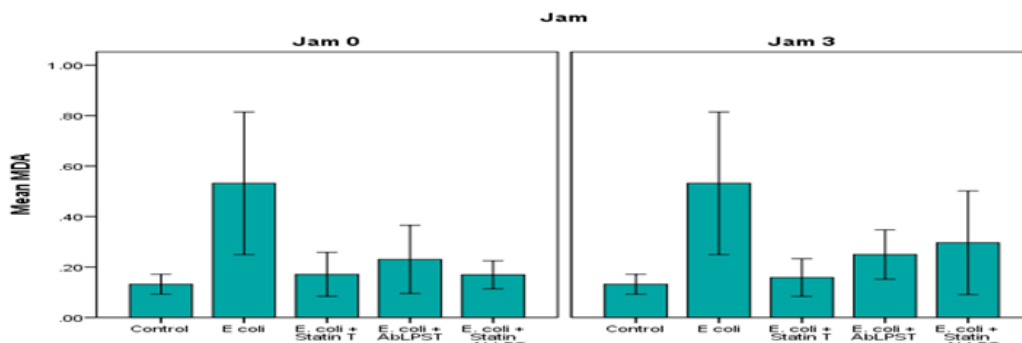
Perlakuan jam 0	Hasil Jam 6		
	$\bar{X} \pm Sd$		
Control	0,13	±	0,03 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	0,53	±	0,23 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	0,17	±	0,07 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPST	0,23	±	0,11 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	0,17	±	0,24 <sup>a</sup>

Superskriptyang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )

Table 5.9. Konsentrasi MDA pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		0,13	± 0,03 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		0,53	± 0,23 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	0,16	± 0,06 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPST	0,25	± 0,18 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	0,30	± 0,08 <sup>ab</sup>

Superskriptyang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )



Gambar 5.2. Pengaruh waktu dan perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap MDA. Keterangan: Kadar MDA perlakuan tidak berbeda signifikan dengan kadar MDA ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan kadar MDA *E. coli* ( $p < 0,05$ ).

### 5.6. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Ureum pada Tikus model sepsis IIP *E. coli*

Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Ureum pada jam ke nol diperoleh hasil berikut. Ureum perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ), sedangkan *E. coli* + Statin berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ).

Perlakuan jam ketiga menunjukkan ureum baik *E. coli* + Statin maupun *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan control atau *E. coli* ( $p > 0,05$ ).

Ureum perlakuan *E. coli* + AbLPS berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ), tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.10; Tabel 5.11)



Tabel 5.10. Konsentrasi Ureum pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

Perlakuan jam 0	Hasil Jam 6		
	$\bar{X} \pm Sd$		
Control	15,90	±	3,50 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	24,49	±	4,75 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	24,43	±	0,58 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPS	19,96	±	7,04 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	17,56	±	3,37 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,01$ )

Tabel 5.11. Konsentrasi Ureum pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		15,90	± 3,50 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		24,49	± 4,75 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	21,82	± 4,23 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPS	24,14	± 5,66 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	20,48	± 2,58 <sup>ab</sup>

### 5.7. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap BUN pada Tikus model sepsis IIP *E. coli*

Hasil analisis yang mirip dengan Ureum yaitu pada jam ke nol BUN perlakuan Ureum perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ), sedangkan *E. coli* + Statin berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Perlakuan jam ke tiga menunjukkan BUN perlakuan *E. coli* + statin dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan control atau *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Perlakuan *E. coli* + AbLPS menunjukkan perbedaan BUN yang signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ), tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.12; Tabel 5.13).

Tabel 5.12. Konsentrasi BUN pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

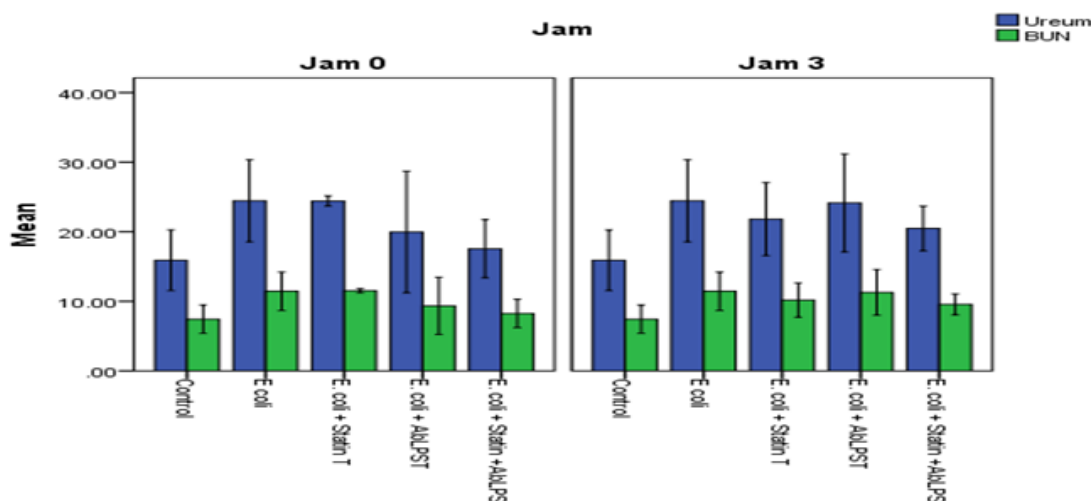
Perlakuan jam 0	Hasil Jam 6		
	$\bar{X} \pm Sd$		
Control	7,43	±	1,64 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	11,44	±	2,22 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	11,53	±	0,25 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPS	9,35	±	3,30 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	8,26	±	1,64 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,01$ )

Tabel 5.13. Konsentrasi BUN pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		7,43	± 1,64 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		11,44	± 2,22 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	10,18	± 1,97 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPS	11,27	± 2,64 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	9,57	± 1,21 <sup>ab</sup>

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,01$ )



Gambar 5.3. Pengaruh waktu dan perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Ureum dan BUN.

Pola perlakuan terhadap ureum dan BUN memberikan pola yang sama.

Kadar ureum dan BUN baik *E. coli* + Statin maupun *E. coli*+AbLPS menunjukkan perbedaan sangat nyata dengan kadar ureum dan BUN control ( $p < 0,01$ ), tetapi tidak berbeda dengan kadar BUN *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Kadar ureum



dan BUN antara keduanya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Kadar ureum dan BUN perlakuan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan kadar ureum dan BUN control, *E. coli* atau dengan perlakuan yang lain ( $p > 0,05$ ).

### 5.8. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap kreatinin pada Tikus model sepsis IIP *E. coli*

Pada jam ke nol perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak menyebabkan perbedaan kreatinin yang signifikan terhadap control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda sangat signifikan jika dibandingkan dengan *E. coli* ( $p < 0,01$ ). Kreatinin perlakuan *E. coli* + Statin berbeda signifikan jika dibandingkan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Pada jam ke tiga kreatinin perlakuan *E. coli* + Statin dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak menunjukkan perbedaan dengan control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Sebaliknya perlakuan *E. coli* + AbLPS berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.14; Tabel 5.15).

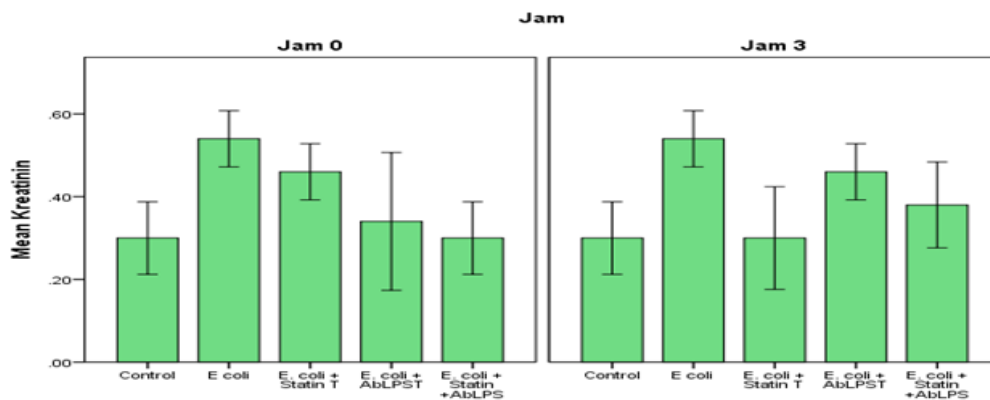
Tabel 5.14. Konsentrasi kreatinin pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

Perlakuan jam 0	Hasil Jam 6	
	$\bar{X} \pm Sd$	
Control	0,30	$\pm 0,07^a$
<i>E. coli</i>	0,54	$\pm 0,05^b$
<i>E. coli</i> + Statin	0,46	$\pm 0,05^b$
<i>E. coli</i> + AbLPS	0,34	$\pm 0,13^a$
<i>E. coli</i> + Statin + AbLPS	0,30	$\pm 0,07^a$

Superskrip yang berbeda pada lajur yang sama berbeda signifikan ( $p < 0,05$ )

Tabel 5.15. Konsentrasi kreatinin pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X}$	$\pm Sd$
Control		0,30	$\pm 0,07^a$
<i>E. coli</i>		0,54	$\pm 0,05^b$
<i>E. coli</i>	Statin	0,30	$\pm 0,10^a$
<i>E. coli</i>	AbLPS	0,46	$\pm 0,05^b$
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	0,38	$\pm 0,06^a$



Gambar 5.4. Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Kreatinin.

Pola perlakuan antara pemberian jam ke nol dan ke tiga berbeda.

Kreatinin perlakuan *E. coli* + statin yang tidak berbeda signifikan dengan control pada jam ke tiga ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ).

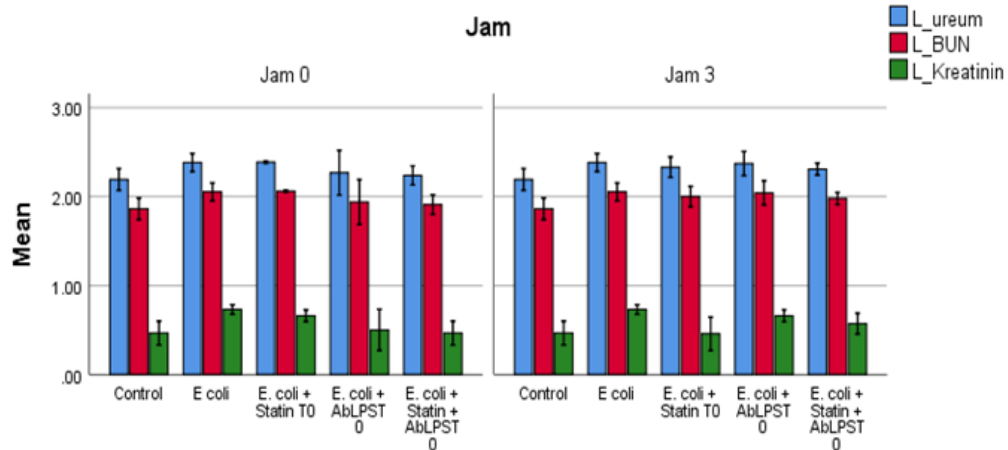
Sedangkan pada jam ke nol kreatinin perlakuan *E. coli* + Statin tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* tetapi berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ).

Kreatinin perlakuan *E. coli* + AbLPS atau *E. coli* + Statin + AbLPS jam ke nol tidak berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan

dengan kreatinin perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Pada jam ke tiga kreatinin *E. coli* + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan *E. coli*, tetapi berbeda signifikan

dengan control. Sedangkan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda dengan control, tetapi berbeda dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ).





Gambar 5.5. Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Fungsi Ginjal.

Pola perlakuan terhadap ureum dan BUN memberikan pola yang sama.

Kadar ureum dan BUN baik *E. coli* + Statin maupun *E. coli*+AbLPS menunjukkan perbedaan sangat nyata dengan kadar ureum dan BUN control ( $p < 0,01$ ), tetapi tidak berbeda dengan kadar BUN *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Kadar ureum dan BUN antara keduanya tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Kadar ureum dan BUN perlakuan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan kadar ureum dan BUN control, *E. coli* atau dengan perlakuan yang lain ( $p > 0,05$ ). Pola perlakuan antara pemberian jam ke nol dan ke tiga berbeda. Kreatinin perlakuan *E. coli* + statin yang tidak berbeda signifikan dengan control pada jam ke tiga ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Sedangkan pada jam ke nol kreatinin perlakuan *E. coli* + Statin tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* tetapi berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ). Kreatinin perlakuan *E. coli* + AbLPS atau *E. coli* + Statin + AbLPS jam ke nol tidak berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan kreatinin perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Pada jam ke tiga kreatinin *E. coli* + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan *E. coli*, tetapi berbeda signifikan dengan

control. Sedangkan *E. coli*+ Statin + AbLPS tidak berbeda dengan control, tetapi berbeda dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ).

### 5.9. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap SGPT pada Tikus model sepsis IIP *E. coli*

Perlakuan waktu atau antara waktu tidak menunjukkan perbedaan SGPT yang signifikan ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.16; Tabel 5.17).

Tabel 5.16. Konsentrasi SGPT pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

Perlakuan jam 0	Hasil Jam 5	
	$\bar{X} \pm Sd$	
Control	31,00	$\pm 15,08$
<i>E. coli</i>	42,40	$\pm 15,34$
<i>E. coli</i> + Statin	39,40	$\pm 12,22$
<i>E. coli</i> + AbLPS	28,00	$\pm 6,96$
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	38,20	$\pm 12,13$

Tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ )

Tabel 5.17. Konsentrasi SGPT pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		31,00	$\pm 15,08$
<i>E. coli</i>		42,40	$\pm 15,34$
<i>E. coli</i>	Statin	33,20	$\pm 12,99$
<i>E. coli</i>	AbLPS	38,20	$\pm 12,13$
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	31,00	$\pm 15,08$

Tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ )



**5.10. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

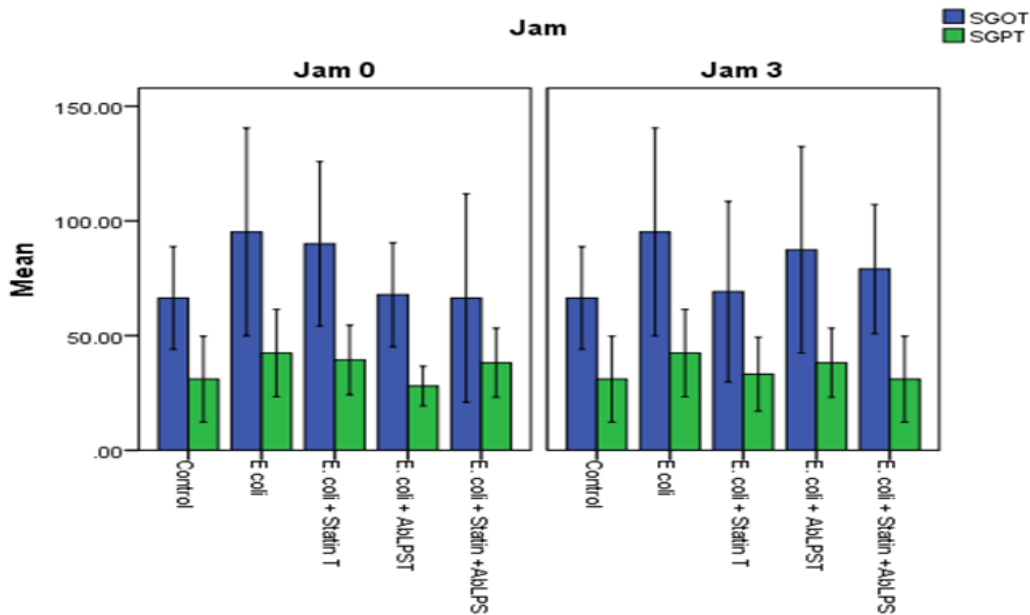
Perlakuan baik *E. coli* tunggal maupun bersama dengan Statin + AbLPS atau kombinasinya tidak berpengaruh terhadap SGOT. Hal ini ditunjukkan oleh tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $p > 0,05$ ). (Tabel 5.18; Tabel 5.19).

Tabel 5.18 Konsentrasi SGOT pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

Perlakuan jam 0	Hasil Jam 6		
	$\bar{X} \pm Sd$		
Control	66,40	±	18,04
<i>E. coli</i>	95,20	±	36,48
<i>E. coli</i> + Statin	90,00	±	28,83
<i>E. coli</i> + AbLPS	67,80	±	18,29
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	66,40	±	36,56
Tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ )			

Tabel 5.19 Konsentrasi SGOT pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 3	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		66,40	± 18,04
<i>E. coli</i>		95,20	± 36,48
<i>E. coli</i>	Statin	69,15	± 31,72
<i>E. coli</i>	AbLPS	87,40	± 36,26
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	79,00	± 22,65
Tidak berbeda signifikan ( $p > 0,05$ )			



Gambar 5.6. Pengaruh waktu dan perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap SGOT dan SGPT. Keterangan: waktu dan perlakuan tidak berpengaruh terhadap SGOT dan SGPT ( $p > 0,05$ )

### 5.11. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Total Bilirubin pada Tikus model sepsis IIP *E. coli*

Perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS pada jam ke nol menunjukkan total bilirubin yang tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan total bilirubin *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Pada jam ke tiga perlakuan *E. coli* + Statin + AbLPS menunjukkan tidak terdapat perbedaan total bilirubin signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Perlakuan *E. coli* + Statin, dan *E. coli* + AbLPS keduanya tidak menunjukkan perbedaan signifikan total bilirubin baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ) (Tabel 5.20; Tabel 5.21).



Tabel 5.20 Konsentrasi total bilirubin pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke nol

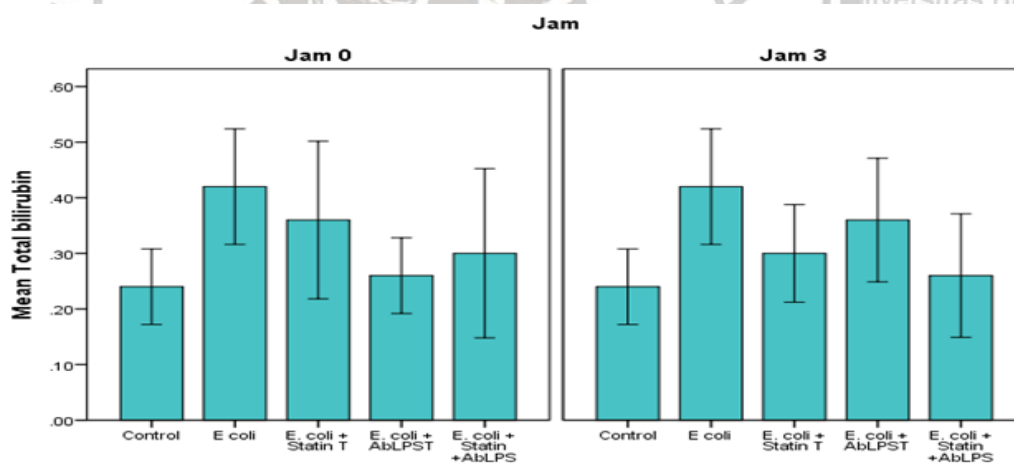
Perlakuan jam 0	Hasil Jam 6	
	$\bar{X} \pm Sd$	
Control	0,24	± 0,05 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>	0,42	± 0,08 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i> + Statin	0,36	± 0,11 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> + AbLPS	0,26	± 0,05 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i> + Statin +AbLPS	0,30	± 0,12 <sup>a</sup>

Suprskrip yang berbeda pada laur sama berbeda sangat signifikan ( $p < 0,01$ )

Tabel 5.21 Konsentrasi total bilirubin pada jam ke 6 setelah perlakuan *E. coli* dan diberikan Statin, AbLPS, dan kombinasi pada jam ke tiga

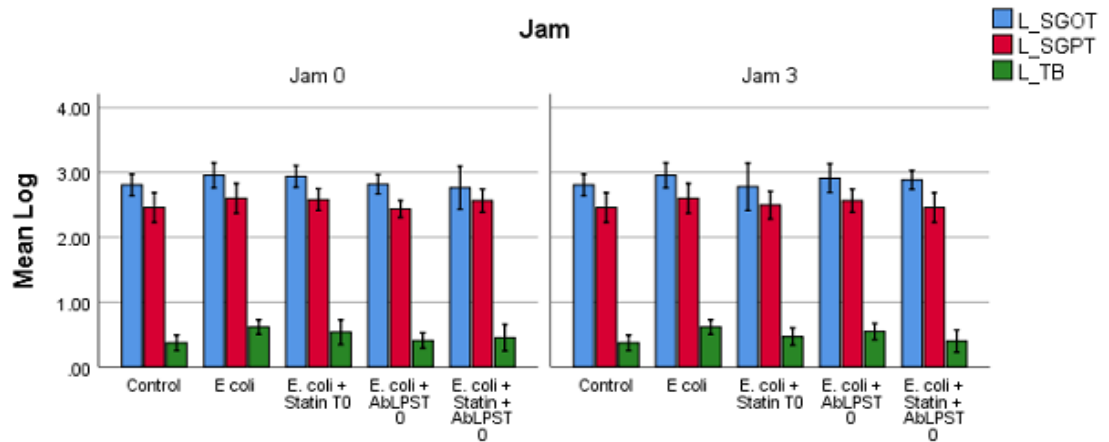
Perlakuan jam 0	Perlakuan Jam 3	Hasil Jam 6	
		$\bar{X} \pm Sd$	
Control		0,24	± 0,05 <sup>a</sup>
<i>E. coli</i>		0,42	± 0,08 <sup>b</sup>
<i>E. coli</i>	Statin	0,30	± 0,07 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	AbLPS	0,36	± 0,09 <sup>ab</sup>
<i>E. coli</i>	Statin +AbLPS	0,26	± 0,09 <sup>a</sup>

Suprskrip yang berbeda pada laur sama berbeda sangat signifikan ( $p < 0,01$ )



Gambar 5.7. Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Total Bilirubin

Total bilirubin perlakuan *E. coli*, Statin dan AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengankontrol maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ).i. total bilribun dua perlakuannya lainnya tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda sangat signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,01$ ). Beda waktu perlakuan tidak berpengaruh terhadap total bilirubin ( $p > 0,05$ ).



Gambar 5.8. Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Fungsi Hati. Perlakuan tersebut tidak berpengaruh terhadap SGOT dan SGPT tapi berpengaruh pada Total Bilirubin





## BAB VI PEMBAHASAN

Penelitian ini untuk bertujuan untuk mengetahui efektivitas terapi statin, antibodi LPS, dan kombinasi statin dengan Antibodi LPS (AbLPS) pada jam ke-0 yang diasumsikan sebagai pencegahan dan terapi, dan pada jam ke-3 yang diasumsikan sebagai terapi dengan menggunakan tikus model sepsis.

Beberapa metode dalam membuat tikus model sepsis yang sudah dilakukan antara lain metode CLP (*caecal ligation puncture*), injeksi LPS (Lipopolysaccharide) intra peritoneal, injeksi bakteri intra peritoneal, implantasi bakteri dan clot fibrin intra peritoneal, injeksi cecal slurry intra peritoneal, *Colon Ascendens Stent Peritonitis (CASP)*, pemberian bakteri intra nasal untuk membuat tikus pneumonia dan injeksi bakteri pada kandung kemih untuk membuat tikus urosepsis (Anthony J Lewis et al 2016). Pada Penelitian ini menggunakan tikus model sepsis dengan metode injeksi intra peritoneal *E. coli* (IIP *E. coli*) yang dikatakan mampu meningkatkan secara signifikan respon inflamasi sitokin TNF- $\alpha$ , meningkatkan MDA dan menurunkan SOD secara signifikan setara dengan tikus model sepsis CLP (*caecal ligation puncture*) (Samudra et al 2019).

### 6.1 Pengaruh perlakuan IIP *E. coli* terhadap kadar mediator proinflamasi (TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT), stress oksidatif (MDA), fungsi ginjal (urea, BUN, Kreatinin), fungsi hepar (SGOT, SGPT, total bilirubin)

Pada penelitian ini ingin melihat pengaruh pemberian *E. coli* terhadap control dilihat pada beberapa parameter mediator pro inflamasi, stress oksidatif dan beberapa fungsi organ antara lain fungsi ginjal dan fungsi hepar. Perlakuan *E. coli* menyebabkan peningkatan TNF- $\alpha$ , PCT, MDA, ureum, BUN yang



signifikan ( $p < 0,05$ ) dan hs CRP, kreatinin dan total bilirubin yang sangat signifikan ( $p < 0,01$ ), sedangkan terhadap SGOT dan SGPT tidak menunjukkan peningkatan yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Dapat dilihat pada tabel 5.1

Terjadinya peningkatan TNF- $\alpha$  dan MDA telah dilaporkan pada penelitian sebelumnya dimana pemberian *E. coli* dalam upaya membuat tikus model sepsis dengan cara metode tikus model sepsis CLP (*caecal ligation puncture*) dan tikus model sepsis IIP *E. coli* mampu meningkatkan kadar keduanya secara signifikan (Samudra *et al* 2019). Parameter sepsis pada manusia yang banyak dilakukan di klinis adalah hs-CRP merupakan pemeriksaan terhadap protein fase akut yang lebih sensitive dibandingkan CRP dan LED dalam menunjukkan proses peradangan akut pada manusia dan procalsitonin (PCT) untuk melihat tingkat keparahan sepsis, dimana terlihat pada penelitian ini terjadi peningkatan hs-CRP yang sangat signifikan dan peningkatan PCT yang signifikan.

Bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) umumnya sebagai agen penyebab utama infeksi ekstra intestinal, seperti meningitis neonatal, bakteremia, pielonefritis, sistitis, prostatitis, dan sepsis. Paradoksnya, mikroorganisme ini juga merupakan anggota fakultatif dominan mikrobiota usus manusia normal. Adhesi bakteri patogen ke sel inang merupakan langkah pertama dalam membangun infeksi. Peristiwa selanjutnya termasuk kolonisasi jaringan dan, dalam kasus-kasus tertentu, invasi seluler diikuti oleh perkalian atau persistensi intraseluler. Proses adhesi dimulai ketika struktur permukaan dikenal sebagai adhesin mengikat ligan spesifik mereka, sel inang reseptor atau protein matriks ekstraseluler (R.A. Conceicao *et al* 2012). Penelitian sebelumnya yang banyak melihat sepsis yang disebabkan agen penyebab *E. coli* terhadap perubahan sitokin pro inflamasi ternyata pada keadaan sepsis pada penelitian ini juga terlihat adanya perubahan fungsi ginjal, dimana terdapat peningkatan signifikan ureum, BUN dan kreatinin dan perubahan fungsi hepar dilihat dari perubahan total bilirubin yang sangat



signifikan. Dalam hal ini SGPT dan SGOT tidak terjadi perubahan, besar dugaan karena peningkatan enzyme SGPT dan SGOT terjadi setelah terjadinya kerusakan pada sel hepatosit. Berdasarkan dari hasil penelitian disebutkan peningkatan enzyme liver terjadi pada kondisi terjadi peradangan pada hepar setelah lebih dari 24 jam (LakshmanaswamyA et al 2019).

Pada perlakuan *E. coli* terhadap control terdapat peningkatan signifikan pada mediator proinflamasi TNF- $\alpha$ , procalsitonin (PCT), stress oksidatif (MDA), parameter fungsi ginjal ureum dan BUN. Sedangkan terdapat peningkatan sangat signifikan pada hs-CRP, parameter fungsi ginjal kreatinin dan parameter fungsi hepar total bilirubin.

## **6.2. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan Kombinasi Statin +AbLPS terhadap mediator Proinflamasi TNF- $\alpha$ pada tikus model sepsis IIP *E. coli***

Hasil analisis data penelitian menunjukkan bahwa pada jam ke nol TNF- $\alpha$  pada perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun perlakuan *E. coli* ( $p > 0,5$ ). Perlakuan yang sama pada jam ketiga TNF- $\alpha$  pada perlakuan *E. coli* + Statin tidak berbeda signifikan dengan kontrol ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak menunjukkan perbedaan TNF- $\alpha$  secara signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.2

Komponen penyusun dinding sel bakteri gram-negatif seperti *E. coli* yang diketahui sebagai Lipopolisakarida (LPS), telah lama diketahui sebagai komponen penginduksi sepsis *in vivo*. Hal ini dikarenakan pada jumlah LPS yang berlebihan, mampu menginduksi produksi sitokin proinflamasi (TNF- $\alpha$ , IL-6) dalam kadar tinggi di dalam peredaran darah sehingga mengakibatkan inflamasi



akut, apoptosis jaringan, hingga menginduksi terjadinya cedera organ endotoksemik (Smeding *et al.*, 2012; Hotchkiss *et al.*, 2013; Koçkara & Kayataş, 2013; Yan *et al.*, 2014). Antibodi LPS yang diharapkan menurunkan antigen *E. coli* yang akan masuk pada sel ternyata tidak mampu menurunkan proses inflamasi yang terjadi akibat pengaktifan NfKb (Md badrul alam *et al* 2019). Sedangkan kerja statin adalah menurunkan kadar sitokin proinflamasi, dengan jalur penghambatan TNF- $\alpha$  untuk menghindari apoptosis jaringan dan perlindungan organ dengan jalur yang mengarah pada aktivasi caspase-3 (Huang *et al.*, 2013). Pada penelitian ini pemberian statin baru menunjukkan efektifnya pada pemberian jam ketiga. Besar dugaan hal ini terkait dengan waktu paruh statin pada jam ketiga.

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian statin pada jam ketiga terdapat perubahan signifikan terhadap penurunan kadar TNF- $\alpha$ .

### **6.3. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan Kombinasi Statin + AbLPS terhadap hs-CRP pada tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* +AbLPS dan *E. coli* + Statin +AbLPS yang diberikan jam kenol memperlihatkan hs-CRP tidak berbeda signifikan antara *E. coli* + Statin, *E. coli* +AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0.05$ ). Pada perlakuan yang diberikan jam ketiga memperlihatkan hs-CRP perlakuan *E. coli* + Statin tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Sebaliknya perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) dan tidak berbeda signifikan dengan perlakuan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.3

Penanda Hs-CRP ini telah luas dipergunakan untuk membantu diagnosis, prognosa, atau rujukan terapi (Ridker, 2007) pada berbagai kondisi medis, salah



satunya pada pasien sepsis. Protein Hs-CRP adalah salah satu reaktan fase akut yang disintesis di hati dan diatur oleh IL-6 dan kadar hs-CRP naik jauh lebih signifikan selama peradangan akut dari pada reaktan fase akut lainnya (James D. Faix 2013). Sesuai dengan teori bahwa hs-CRP meningkat sangat signifikan pada perlakuan *E. coli*. Sedangkan pada perlakuan dengan statin, AbLPS dan kombinasi tidak menunjukkan perubahan yang signifikan pada jam ke nol, demikian juga pada pemberian kombinasi statin + AbLPS pada jam ke 3. Tetapi pemberian statin pada jam ke 3 menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan perlakuan *E. coli*. Besar dugaan hal ini terkait dengan waktu paruh statin pada jam ketiga.

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian statin pada jam ketiga terdapat perubahan signifikan terhadap penurunan kadar hs-CRP.

#### **6.4. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan Kombinasi Statin + AbLPS terhadap procalcitonin (PCT) pada tikus model sepsis IIP *E. coli***

Konsentrasi PCT perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* +AbLPS dan *E. coli* + Statin +AbLPS pada jam ke nol tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan baik terhadap control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Pola berbeda pada perlakuan yang diberikan pada jam tiga yaitu PCT perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin +AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.4

PCT adalah kelompok peptida yang terdiri dari 116 asam amino, dan prekursor kalsitonin. Protein tersebut disintesis oleh sel-C sel kelenjar tiroid, paru-paru sel neuroendokrin, dan sejumlah kecil di dalam usus halus (Mehanic & Baljic, 2013). Procalcitonin digunakan sebagai marker terjadinya infeksi yang disebabkan oleh bakteri dan berujung pada kondisi sepsis. Dalam kondisi normal, kadar PCT sangat kecil, yakni kurang dari 0,05 ng/ml atau bahkan tidak



terhitung sama sekali (Suberviola *et al*, 2012). Kadar procalsitonin meningkat pada perlakuan *E. coli* pada jam ketiga. Tetapi pada perlakuan lainnya tidak menunjukkan perbedaan baik dengan control maupun *E. coli*. Besar dugaan peningkatan kadar procalsitonin baru mulai meningkat signifikan pada jam ketiga pada keadaan sepsis.

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian statin, AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS tidak menunjukkan perubahan signifikan terhadap penurunan kadar PCT baik jam ke nol dan jam ketiga

#### **6.5. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap stress oksidatif (MDA) pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* +AbLPS serta *E. coli* + Statin +AbLPS berpengaruh terhadap MDA tetapi tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) dan berbeda sangat signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ) pada jam ke nol. Pada jam ketiga perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS menghasilkan MDA yang tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda sangat nyata dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Kadar MDA Perlakuan *E. coli* + Statin + Ab.LPS pada jam ketiga tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun dengan *E. coli* ( $P > 0,05$ ). Lihat tabel 5.5

Kadar malonyldialdehyde (MDA) sebagai penanda kerusakan oksidatif yang terjadi pada PUFA (*polyunsaturated fatty acid*) akibat induksi *E. coli*. MDA merupakan molekul aldehida yang dihasilkan dari pembentukan radikal bebas pada asam lemak tak jenuh ganda. Pengukuran MDA dapada penelitian ini digunakan sebagai penanda kerusakan oksidatif (Moustafa *et al*. 2009).

Kerusakan oksidatif adalah akibat dari ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan dan termasuk modifikasi oksidatif makromolekul seluler, induksi



kematian sel dengan apoptosis atau nekrosis, serta kerusakan jaringan struktural (Andrades *et al.* 2009; Andrades *et al.* 2011). Penelitian ini memperlihatkan perlakuan *E. coli* + statin dan *E. coli* + statin + AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap *E. coli* pada jam ke nol dan jam ketiga, tetapi perlakuan *E. coli* + statin + AbLPS hanya menunjukkan perubahan signifikan pada jam kenol ( $p < 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian kombinasi statin dan AbLPS baik diberikan pada awal atau jam ke nol untuk mencegah produksi stress oksidatif yang bertambah banyak seiring bertambahnya waktu terjadinya infeksi.

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian statin dan AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap penurunan kadar MDA pada jam ke nol dan jam ketiga, sedangkan pemberian kombinasi statin + AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap penurunan MDA pada jam ke nol.

#### **6.6. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Ureum pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan *E. coli*, *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS terhadap Ureum pada jam ke nol diperoleh hasil sebagai berikut. Ureum/BUN perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan baik dengan control maupun *E. coli* ( $p > 0,05$ ), sedangkan *E. coli* + Statin berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.6

*Blood Urea Nitrogen* (BUN) adalah ukuran untuk kandungan urea nitrogen dalam darah ( $\text{BUNmg} / \text{dL} \times 2.142 = \text{Urea mg} / \text{dL}$ ). Rasio BUN dan serum kreatinin (BUN / SCr) pada orang sehat adalah sekitar 10: 1. Retensi nitrogen terjadi ketika GFR berkurang hingga kurang dari 30%. Berbeda dengan serum kreatinin, produksi urea kurang konstan dan mudah dirubah oleh beberapa faktor di luar fungsi ginjal. Beberapa keadaan penyebab peningkatan produksi urea



antara lain diet tinggi protein, perdarahan saluran cerna, dan kerusakan jaringan akibat kekurangan gizi, trauma, glukokortikoid dan imobilisasi. Kondisi tersebut dinamakan *azotemia*, sindrom uremia terjadi bila terdapat metabolit lain yang tidak bisa diekskresi oleh ginjal, biasanya terjadi bila kadar urea lebih dari 300 mg/dl (Christian Nussaget *al* 2017). Peningkatan signifikan BUN pada kelompok *E. coli* baik pada jam ke nol dan jam ketiga terhadap kontrol ( $P < 0,05$ ) pada penelitian ini besar dugaan akibat kerusakan jaringan akibat sepsis yang terjadi pada hewan coba tikus model sepsis. Perlakuan pemberian tunggal statin atau AbLPS atau kombinasi keduanya tidak menunjukkan perubahan signifikan baik terhadap kelompok *E. coli* maupun kontrol. Besar dugaan pemberian kombinasi statin dan AbLPS tidak menunjukkan perubahan yang signifikan dikarenakan banyak faktor yang mempengaruhi peningkatan ureum/BUN sehingga kadar ureum/BUN mudah berubah pada kondisi sepsis maupun sebelum terjadinya sepsis.

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian statin, AbLPS, dan kombinasi statin + AbLPS tidak menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar ureum baik pada jam ke nol dan jam ketiga

#### **6.7. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap BUN pada Tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan jam ketiga menunjukkan ureum baik *E. coli* + Statin maupun *E. coli* + Statin + AbLPS tidak berbeda signifikan dengan control atau *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Ureum/BUN perlakuan *E. coli* + AbLPS berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ), tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.7

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian statin, AbLPS, dan kombinasi statin + AbLPS tidak menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar BUN baik pada jam kenol dan jam ketiga.



### 6.8. Pengaruh pemberian Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap Kreatinin pada Tikus model sepsis IIP *E. coli*

Pada jam ke nol perlakuan *E. coli* + AbLPS dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak menyebabkan perbedaan kreatinin yang signifikan terhadap control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda sangat signifikan jika dibandingkan dengan *E. coli* ( $p < 0,01$ ). Kreatinin perlakuan *E. coli* + Statin berbeda signifikan jika dibandingkan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan jika dibandingkan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Pada jam ketiga kreatinin perlakuan *E. coli* + Statin dan *E. coli* + Statin + AbLPS tidak menunjukkan perbedaan dengan control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Sebaliknya perlakuan *E. coli* + AbLPS berbeda signifikan dengan control ( $p < 0,05$ ) tetapi tidak berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.8

Kreatinin berasal dari metabolisme otot rangka. Secara mekanis, harus mempertimbangkan berbagai faktor yang memengaruhi konsentrasi serum kreatinin dalam darah terlepas dari fungsi ginjal antara lain peningkatan produksi kreatinin dan sekresi kreatinin oleh tubulus. Kreatinin serum dapat digunakan secara klinis untuk mendeteksi dan mengevaluasi cedera ginjal akut (AKI) dan penyakit ginjal kronis (CKD) (Kentdoi *et al* 2009). Statin yang dikenal sebagai obat anti hiperlipidemia juga diketahui dapat menghambat jalur TNF- $\alpha$ /caspase-3 pada sepsis (Zhao *et al.*, 2013). Pada penelitian ini perlakuan *E. coli* pada jam ke nol dan jam ketiga akan meningkatkan kadar kreatinin secara signifikan.

Sedangkan perlakuan kombinasi pemberian statin + AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap perlakuan *E. coli* ( $P < 0,05$ ) dan tidak terdapat perubahan signifikan terhadap kontrol ( $P > 0,05$ ). Besar dugaan pemberian AbLPS sebagai penghambatan kuman masuk ke dalam sel dan pemberian statin sebagai



anti inflamasi lebih baik untuk mencegah perburukan fungsi ginjal akibat sepsis yang disebabkan kuman *E. coli*.

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar kreatinin pada jam ke nol. Sedangkan pemberian statin dan kombinasi statin + AbLPS menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar kreatinin pada jam ketiga.

### **6.9. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap SGPT pada tikus model sepsis IIP *E. coli***

Pada penelitian ini dimana melihat kadar SGPT menunjukkan bahwa perlakuan waktu atau antara waktu tidak menunjukkan perbedaan SGPT yang signifikan ( $p > 0,05$ ) lihat tabel 5.9.

Disfungsi hati merupakan cedera permanen yang terjadi pada pada hepatosit (Jarrar & Chaudry, 2001). Disfungsi hati merupakan tanda awal terjadinya sepsis, selain juga sebagai faktor risiko spesifik dan independen (Kramer *et al*, 2007). Gagal hati didefinisikan sebagai kerusakan parah yang berkelanjutan pada hati dan hilangnya fungsi pada 80-90% sel hati (Canabal & Kramer, 2008). Disfungsi hati oleh sepsis dapat dikaitkan dengan adanya gangguan sirkulasi mikro ataupun sistemik. Disfungsi hati dapat terjadi pada sepsis awal yang disebabkan oleh induksi *CLP* pada 1,5 jam setelah perlakuan (Recknagel *et al*, 2012), dan jarang dijumpai <24 jam setelah onset penyakit pada pasien. Hal ini disebabkan karena terjadinya peradangan dan hipoperfusi sehingga mengganggu kinerja hati. Manifestasi awal dalam kasus tersebut termasuk terjadinya peningkatan kadar bilirubin serum dan alkali fosfatase. Fase lanjut dapat diketahui melalui peningkatan serum transaminase seperti SGPT dan SGOT, setelah terjadinya hipoalbuminaemia atau prothrombin time (PT) dalam jangka waktu yang lama (Brun *et al*, 2004; Vincent *et al*, 2003). Pada



penelitian ini tidak terdapat perbedaan signifikan baik perlakuan waktu dan antara waktu pada pemeriksaan SGPT dan SGOT ( $P > 0,05$ ). Besar dugaan peningkatan enzyme SGPT dan SGOT akan terjadi setelah terjadinya kerusakan pada sel hepatosit akibat inflamasi yang disebabkan oleh kuman *E. coli*. Sebuah penelitian menyebutkan peningkatan SGPT dan SGOT terjadi setelah lebih 24 jam terjadinya infeksi (Lakshmanaswamy.A *et al*/2109)

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian Statin, AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar SGPT.

#### **6.10. Pengaruh Statin, AbLPS, dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap SGOT pada tikus model sepsis IIP *E. coli***

Pada penelitian ini perlakuan waktu atau antara waktu tidak menunjukkan perbedaan SGPT yang signifikan ( $p > 0,05$ ). Demikian juga perlakuan baik *E. coli* tunggal maupun bersama dengan Statin + AbLPS atau kombinasinya tidak berpengaruh terhadap SGOT. Hal ini ditunjukkan oleh tidak ditemukan perbedaan yang signifikan antar perlakuan ( $p > 0,05$ ). Lihat tabel 5.10

Pada penelitian diatas didapatkan pemberian Statin, AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar SGOT.

#### **6.11. Pengaruh Statin, AbLPS dan kombinasi Statin + AbLPS terhadap total bilirubin pada tikus model sepsis IIP *E. coli***

Perlakuan *E. coli* + Statin, *E. coli* + AbLPS serta *E. coli* + Statin + AbLPS pada jam ke nol menunjukkan total bilirubin yang tidak berbeda signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ) tetapi berbeda signifikan dengan total bilirubin *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Pada jam ketiga perlakuan *E. coli* + Statin + AbLPS menunjukkan tidak terdapat perbedaan total bilirubin signifikan dengan control ( $p > 0,05$ ), tetapi berbeda signifikan dengan *E. coli* ( $p < 0,05$ ). Lihat tabel 5.11



Hati merupakan kelenjar terbesar di tubuh manusia dan memainkan peran utama dalam menjaga homeostasis metabolik dan imunologis tubuh. Fungsi fisiologis yang dilakukan oleh hati, menjadikan hati sebagai organ yang berperan penting dalam tubuh untuk pertahanan diri dan merespon terjadinya sepsis. Disfungsi dan kegagalan fungsi hati, termasuk ke dalam komplikasi serius pada sepsis, secara langsung berkontribusi pada perkembangan penyakit dan disfungsi organ lain, serta kematian (Canabal & Kramer, 2008). Disfungsi hati diketahui rata-rata terjadi pada pasien sepsis sebesar 39,9%. Jumlah ini diketahui lebih rendah daripada kejadian disfungsi ginjal, pernapasan, neurologis dan hampir sama dengan kejadian disfungsi kardiovaskular pada pasien sepsis akut maupun syok sepsis (Yan & Li, 2014). Disfungsi hati yang lebih rendah dibandingkan dengan kejadian pada organ lain ini terkait dengan tingginya kapasitas regenerasi serta kemampuan hati dalam menahan seragan patogen maupun produk metabolismenya.

Bilirubin merupakan produk akhir katabolisme heme pada mamalia, umumnya dianggap sebagai produk limbah yang larut dalam lemak yang perlu dikeluarkan. Semakin banyak bukti menunjukkan bahwa bilirubin pada konsentrasi tinggi dapat menyebabkan peradangan, apoptosis dan stres oksidatif. Hiperbilirubinemia atau penyakit kuning, adalah komplikasi sepsis atau infeksi non-bakteri yang sering dijumpai. Pada 20 % kasus sepsis dan infeksi bakteri akan mengalami peningkatan total bilirubin dan terjadi ikterus. Namun, tidak ada data dari penelitian prospektif besar terhadap kejadian yang tepat dan relevansi prognostik hiperbilirubinemia pada orang dewasa dengan sepsis (R Zhai *et al* 2009). Peningkatan kadar bilirubin serum dalam 72 jam dikaitkan dengan peningkatan risiko kematian pada pasien dengan sepsis berat dan syok septik (Patel JJ *et al* 2015)



Penelitian dengan menggunakan statin sebagai agen terapi pada kasus sepsis telah mampu membuktikan bahwa statin dapat meningkatkan survivalitas, kemampuan dan fungsi organ, serta proteksi dari cedera organ pada tikus model sepsis yang diinduksi LPS ataupun akibat CLP (Merx *et al.*, 2004; Shinozaki *et al.*, 2010; Slotta *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2018). Sehingga penggunaan statin diperlukan untuk memberikan proteksi terhadap sel-sel hepatosit. Uji klinis yang dilakukan pada banyak penelitian menunjukkan bahwa mengendalikan sitokin pro-inflamasi saja belum cukup dalam mengobati sepsis, sehingga terapi kemudian difokuskan pada menjaga atau memperpanjang kelangsungan hidup sel (Cohen *et al.*, 2012; Marshall, 2014).

Pada penelitian ini pemberian perlakuan *E. coli* meningkatkan signifikan total bilirubin ( $P < 0,05$ ). Dan perlakuan pemberian kombinasi statin + AbLPS mampu menurunkan total bilirubin akibat perlakuan dengan *E. coli* secara signifikan ( $P < 0,05$ ) dan tidak signifikan terhadap kontrol ( $P > 0,05$ ). Sedangkan perlakuan terhadap pemberian statin atau AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap perlakuan *E. coli* pada jam ke nol ( $P < 0,05$ ), tetapi tidak menunjukkan perubahan signifikan pada jam ketiga ( $P > 0,05$ ). Besar dugaan pemberian AbLPS sebagai pencegahan masuknya kuman ke dalam sel dan kombinasi dengan statin sebagai anti inflamasi dapat menurunkan jumlah kuman *E. coli* sebagai penyebab terjadinya sepsis.

Pada penelitian diatas didapatkan bahwa pemberian statin, AbLPS menunjukkan perubahan signifikan dalam penurunan kadar total bilirubin pada jam ke nol sedangkan pemberian kombinasi statin + AbLPS menunjukan perubahan signifikan dalam penurunan kadar total bilirubin pada jam ke nol dan jam ketiga.

## 6.12. Keterbatasan Penelitian

Terdapat beberapa keterbatasan pada studi ini. Pertama, apabila AbLPS digunakan untuk tujuan mencegah masuknya LPS kedalam makrofag (vaksinasi) seharusnya diberikan sebelum adanya *E.coli*, yang sulit menentukan kapan *E.coli* tersebut masuk kedalam host. Kedua, untuk melihat efektifitas kombinasi statin + AbLPS diberikan pada keadaan setelah terjadinya sepsis.

## 6.13. Kebaruan Penelitian

1. Tikus model sepsis IIP *E. coli*  $10^5$  dapat digunakan sebagai tikus model sepsis yang lebih mudah dilakukan dan tidak melukai hewan coba dibandingkan dengan metode CLP.
2. Pemberian kombinasi statin dan AbLPS lebih baik dalam menurunkan pengaruh akibat perlakuan *E. coli* (tikus model sepsis) terhadap penurunan kreatinin dan total bilirubin pada jam ke nol dan jam ketiga.
3. Melihat pengaruh pemberian perlakuan terapi pada jam ke nol yang diasumsikan sebagai pencegahan dan terapi sedangkan jam ketiga sebagai terapi.



## BAB VII KESIMPULAN

### 7.1 Kesimpulan

Pada penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan *E. coli* berpengaruh terhadap peningkatan kadar mediator proinflamasi yang meliputi TNF- $\alpha$ , hs-CRP, PCT, MDA dan peningkatan fungsi ginjal yang meliputi ureum, BUN dan kreatinin serta peningkatan fungsi hepar yaitu total bilirubin. Meskipun demikian secara keseluruhan pemberian statin, AbLPS, dan kombinasi statin + AbLPS secara angka menunjukkan penurunan setelah perlakuan *E. coli*. Untuk lebih jelasnya diuraikan di bawah ini.

1. Pada perlakuan *E. coli* terhadap control terdapat peningkatan signifikan pada mediator proinflamasi TNF- $\alpha$ , procalsitonin (PCT), stress oksidatif (MDA), parameter fungsi ginjal ureum dan BUN. Sedangkan terdapat peningkatan sangat signifikan pada hs-CRP, parameter fungsi ginjal kreatinin dan parameter fungsi hepar total bilirubin
2. Pemberian statin pada jam ketiga terdapat perubahan signifikan terhadap penurunan kadar TNF- $\alpha$
3. Pemberian statin pada jam ketiga terdapat perubahan signifikan terhadap penurunan kadar hs-CRP
4. Pemberian statin, AbLPS, dan kombinasi statin + AbLPS tidak menunjukkan perubahan signifikan terhadap penurunan kadar PCT baik jam ke nol dan jam ketiga
5. Pemberian statin, AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap penurunan kadar MDA pada jam kenol dan jam ketiga, sedangkan

pemberian kombinasi statin + AbLPS menunjukkan perubahan signifikan terhadap penurunan MDA pada jam ke nol.

6. Pemberian statin, AbLPS, dan kombinasi statin + AbLPS tidak menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar Ureum/BUN baik pada jam ke nol dan jam ketiga.

7. Pemberian AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar kreatinin pada jam ke nol. Sedangkan pemberian statin dan kombinasi statin + AbLPS menunjukkan penurunan signifikan terhadap kadar kreatinin pada jam ketiga.

8. Pemberian Statin, AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar SGPT.

9. Pemberian Statin, AbLPS dan kombinasi statin + AbLPS tidak berpengaruh terhadap penurunan kadar SGOT.

10. Pemberian statin, AbLPS menunjukkan perubahan signifikan dalam penurunan kadar total bilirubin pada jam ke nol. Sedangkan pemberian kombinasi statin + AbLPS menunjukan perubahan signifikan dalam penurunan kadar total bilirubin pada jam ke nol dan jam ketiga.

## 7.2. Saran

1. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai efektifitas kombinasi terapi statin dan AbLPS pada kejadian sepsis terhadap angka mortalitas.

2. Perlu dilakukan pemeriksaan dan monitoring secara time series pada tikus model sepsis *in vivo* sehingga diketahui progresifitas sepsis.



## DAFTAR PUSTAKA

- Abraham E, Singer M. 2007. *Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction*. Crit Care Med; 35(10):1-9.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. 2006. *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell; 124:783-801.
- Alberti C, Brun-Buisson C, Chevret S, Antonelli M, Goodman SV, Martin C, Moreno R, Ochagavia AR, Palazzo M, Werdan K, et al. 2005. *Systemic inflammatory response and progression to severe sepsis in critically ill infected patients*. Am J Respir Crit Care Med; 171: 461-8.
- Almog YM. 2003. *Statins, inflammation, and sepsis: hypothesis*. Chest; 124:740-3.
- Anand D, Das S, Srivastava LM. *Procalcitonin: a novel sepsis biomarker*. Asian Journal of Medical Research; 1(1):6-8.
- Andrades MÉ, Morina A. 2011. *Spasić S, Spasojević I. Bench-to-bedside review: sepsis - from the redox point of view*. Crit Care.;15(5):230.
- Andrades ME, Ritter C, Dal-Pizzol F. 2009. *The role of free radicals in sepsis development*. Front Biosci (Elite Ed); 1():277-87.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med; 29: 1303-1310.
- Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. 2005. *Septic shock*. Lancet; 365:63-78.
- Arnauld C, Burger F, Steffens S. 2005. *Statins reduce interleukin-6-induced C-reactive protein in human hepatocytes: new evidence for direct antiinflammatory effects of statins*. Arterioscler Thromb Vasc Biol; 25: 1231-6.
- Arul MC, Markus HL, Chandan KS, Terrence RB, Sunita SS, Vidya JS. 2001. *Molecular signatures of sepsis multiorgan gene expression profiles of systemic inflammation*. Am J Pathol; 159(4):1199-1209.
- Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. *Death receptors: signaling and modulation*. Science; 281:1305-1308.
- Bagshaw SM, George C, Bellomo R, Committee ADM. 2008. *Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation*. Crit Care;12(2):R47.
- Balk R, Goyette RE. 2001. *Multiple organ dysfunction syndrome in patients with severe sepsis: more than just inflammation*. Int Congress and Symposium Series 249. Published by The Royal Society of Medicine Press Limited. p:1-37.



Baptiste ED. 2007. *Cellular mechanisms in sepsis*. Journal of Intensive Care Medicine; 22(2):63-72.

Barbar SD, Binquet C, Monchi M, Bruyère R, Quenot JP. 2014. *Impact on mortality of the timing of renal replacement therapy in patients with severe acute kidney injury in septic shock: the IDEAL-ICU study (initiation of dialysis early versus delayed in the intensive care unit): study protocol for a randomized controlled trial*. Trials; 15:270.

Bashir A, Mujeeb Z B, Ehtishamul Haq. 2011. *Lipopolysaccharide, mediator of sepsis enigma: recognition and signaling*. Int J Biochem Res & Rev; 1(1):1-13.

Basisio D. 2002. *Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide*. Blood; 99: 3427–3431.

Becker KL, Nylén ES, White JC, Müller B, Snider RH Jr. 2004. *Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors*. J Clin Endocrinol Metab.; 89(4):1512-25.

Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P, Acute Dialysis Quality Initiative workgroup. 2004. *Review Acute renal failure - definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group*. Crit Care; 8(4):R204-12

Benjamin CF, Hogaboam CM, Kunkel SL. 2004. *The chronic consequences of severe sepsis*. J Leuko Biol; 75:1-5.

Bernard AM, Bernard GR. 2012. *The immune response: targets for the treatment of severe sepsis*. Int Journal of Inflammation; :1-9.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 1992. *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. Chest; 101:1644–1655.

Boyd S. 2004. *Treatment of physiological and pathological neonatal jaundice*. Nurs Times; 100(13):40-3.

Brown KA, Brain SD, Pearson JD, Edgeworth JD, Lewis SM, Treacher DF. 2006. *Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis*. Lancet; 368:157-169.

Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, Vallet B, EPISEPSIS Study Group. 2004. *EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units*. Intensive Care Med.; 30(4):580-8.



Brunkhorst FM, Wegscheider K, Forycki ZF, Brunkhorst R. Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Intensive Care Med.* 2000 Mar; 26 Suppl 2():S148-52.

Calandra T, Roger T. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Rev Immunol*; 3:791-800.

Canabal JM, Kramer DJ. 2008. Review Management of sepsis in patients with liver failure. *Curr Opin Crit Care*;14(2):189-97.

Carcillo JA. 2003. Pediatric septic shock and multiple organ failure. *Crit Care Clin*; 19:413-440.

Chen H, Cowan MJ, Hasday JD, Vogel SN, Medvedev AE. 2007. Tobacco smoking inhibits expression of proinflammatory cytokines and activation of IL-1R-associated kinase, p38, and NF-kappaB in alveolar macrophages stimulated with TLR2 and TLR4 agonists. *J Immunol.*; 179(9):6097-106.

Chen X, Yong-jie Y, Jing-xiao Z. 2011. Sepsis and Immune response. *World J Emergency Med*; 2(2):88-92.\

Cinel I, Opal SM. 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer. *Crit Care Med*; 37(1):291-304.

Cohen J. 2002. The Immunopathogenesis of sepsis. *Nature*; 430:885–891.

Cohen J., Opal S., Calandra T. 2012. Sepsis studies need a new direction. *Lancet Infect. Dis.*;12 503–505.

Coopersmith CM, Stromberg PE, Dunne WM. 2002. Inhibition of intestinal epithelial apoptosis and survival in a murine model of pneumonia-induced sepsis. *JAMA* 287:1716–1721.

Cortellaro M, Cofrancesco E, Arbustini E. 2002. Atorvastatin and thrombogenicity of the carotid atherosclerotic plaque: the ATROCAP study. *Thromb Haemost*; 88:41–47.

Cowling V, Downward J. 2002. Caspase-6 is the direct activator of caspase-8 in the cytochrome c-induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase-6 prodomain. *Cell Death Differ*; 9:1046–1056.

Cross AS, Opal S, Cook P, Drabick J, Bhattacharjee A . 2004. Development of an anti-core lipopolysaccharide vaccine for the prevention and treatment of sepsis. *Vaccine*; 22(7):812-817.

Das S, Bhargava S, Manocha A, Kankra M, Ray S, Srivastava LM. 2011. The prognostic value of hypocholesterolemia in sepsis. *Asian J Pharmacol Biol Res*; 1(1):41-46.

De Gaudio AR. 1999. Severe sepsis. In: Berstein AD, Soni N eds. *Oh's Intensive care manual*. 6th ed. Elsevier Limited. Philadelphia.



Deans KJ, Haley M, Natanson C, Eichacker PQ, Minneci PC. Novel therapies for sepsis: a review. *J Trauma*. 2005;58:867–874.

Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011;19:198–208

Desai CS, Martin SS, Blumenthal RS. 2014. Non-cardiovascular effects associated with statins. *Brit Med J*; 349:g3743.

Di Sano F, Ferraro E, Tufi R, Achsel T, Piacentini M, Cecconi F. 2006. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism. *J Biol Chem*; 281: 2693–2700.

Dichtl W, Dulak J, Frick M. 2003. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 23:58–63.

Dinarello CA. 1997. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*; 112:321S–329S.

Diomedede L, Albani D, Sottocorno M. 2001. In vivo antiinflammatory effect of statins is mediated by nonsterol mevalonate products. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 21:1327–1332.

Efron PA, Mohr AM, Moore FA, Moldawer LL., 2015. The future of murine sepsis and trauma research models. *J Leukoc Biol* ;98:1–8

Elena GR, Alejo C, Gema R, Mario D. 2006. Cortistatin, a new antiinflammatory peptide with therapeutic effect on lethal endotoxemia. *J Exp Med*; 203(2):563-571.

Falagas ME, Makris GC, Matthaïou DK, Rafailidis PI. 2008. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence. *J Antimicrob Chemother*; 61:774.

Fan H, Cook JA. 2004, Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res*; 10:71–84.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. 2005. Caspase family protease and apoptosis. *Acta Biochimica et Biophys Sinica*; 37(11):719 –727.

Faust SN. 2001. Dysfunction of endothelial protein C activation in severe meningococcal sepsis. *N Engl J Med*; 345:408–416.

Finberg RW, Kurt-Jones EA. 2006. CD14: chaperone or matchmaker?. *Immunity*; 24: 127-129.

Gao F, Linhartova L, Johnston AM, Thickett DR. 2008. Statins and sepsis. *Br J Anaesthesia*; 100(3):288–298.



Ge Z, Jiang G, Zhao Y, Wang G, Tan Y. 2010. Systemic perfluorohexane attenuates lung injury induced by lipopolysaccharide in rats: the role of heme oxygenase-1. *Pharmacol Rep*; 62:170–177.

Giusti-Paiva A, Martinez MR, Cestari Felix JV. 2004. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. *Shock*; 21:271–275.

Goldstein JL, Brown MS. 1990. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343:425–430.

Gomez H, Ince C, De Backer D, Pickkers P, Payen D, Hotchkiss J, Kellum JA. Review A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury. *Shock*. 2014 Jan; 41(1):3-11.

Green DR, Beere HM. 2000. Apoptosis gone but not forgotten. *Nature*; 405:28–29.

Gryglewski RJ, Wolkov PP, Uraz W, Janowska E, Bartus JB, Balbatun O, Patton S. 1998. Protective role of pulmonary nitric oxide in the acute phase of endotoxemia in rats. *Circulatory Res*; 82:819–827.

Guidet B, Aegerter P, Gauzit R, Meshaka P, Dreyfuss D. 2005. Incidence and impact of organ dysfunctions associated with sepsis. *Chest*; 127:942-51.

Gutsmann T, Muller M, Carroll SF, MacKenzie RC, Wiese A, Seydel U. 2001. Dual role of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein in neutralization of LPS and enhancement of LPS-induced activation of mononuclear cells. *Infect Immun*; 69:6942-6950.

Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, et al. 2001. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*; 164:396–402.

Harlow E, Lane D. 1988. Antibody: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp: 386.

Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M. 2008. Development of cellselective targeting systems of NFkappaB decoy for inflammation therapy. *Yakugaku Zasshi* 128:209–218.

Hobbs S, Reynoso M, Geddis AV, Mitrophanov AY, Matheny RW Jr. LPS-stimulated NF- $\kappa$ B p65 dynamic response marks the initiation of TNF expression and transition to IL-10 expression in RAW 264.7 macrophages. *Physiol Rep*. 2018;6(21):e13914. doi:10.14814/phy2.13914



Hotchkiss R. S., Monneret G., Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13 862–874.

Hotchkiss R. S., Monneret G., Payen D. 2013. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13 862–874.

Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*; 348:138-150.

Hotchkiss RS, Nicholson DW. 2006. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol*; 6:813–822.

Huang N., Wang F., Wang Y., Hou J., Li J., Deng X. 2013. Ulinastatin improves survival of septic mice by suppressing the inflammatory response and lymphocyte apoptosis. *J. Surg. Res.* 182 296–302.

Huber M, Kalis C, Keck S, Jiang Z, Georgel P, Du X, Shamel L, Sovath S, Mudd S, Beutler B, Galanos C, Freudenberg MA. 2006. R-form LPS, the master key to the activation of TLR4/MD-2-positive cells. *Eur J Immunol*; 36:701-711.

Huhle G, Abletshauer C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. 1999. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res*; 95: 229–234.

Imboden JB. 1994. T Lymphocytes & Natural Killer Cells. In *Basic and Clinical Immunology* 8<sup>th</sup> edition. Appleton & Lange. London.

Jarrar DWP, Chaudry IH. 2001. *Hepatocellular dysfunction—basic considerations.* In: Holzheimer RGMJ, editor. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented.* Munich: Zuckschwerdt.

Kaesemeyer WH, Caldwell RB, Huang J, Caldwell RW. 1999. Pravastatin sodium activates endothelial nitric oxide synthase independent of its cholesterol-lowering actions. *J Am Coll Cardiol*; 33:234–241.

Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV. 1994. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*; 73: 2013-2026.

Kim JY, Park JS, Strassheim D, Douglas I, Diaz del Valle F, Asehnoune K. 2005. HMGB1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 288:L958-L965.

Klionsky DJ. 2004. Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature*; 431:31–32.

Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. 2008. HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med*; 14:476-484.

Koçkara A., Kayataş M. 2013. *Renal cell apoptosis and new treatment options in sepsis-induced acute kidney injury.* *Ren. Fail.*;35 291–294.



Kothe H, Dalhoff K, Rupp J. 2000. Hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors modify the inflammatory response of human macrophages and endothelial cells infected with *Chlamydia pneumoniae*. *Circulation*; 101: 1760–1763.

Kramer L, Jordan B, Druml W, Bauer P, Metnitz PG. 2007. *Austrian Epidemiologic Study on Intensive Care, ASDI Study Group. Incidence and prognosis of early hepatic dysfunction in critically ill patients--a prospective multicenter study. Crit Care Med.*;35(4):1099-104.

Kristine MJ, Sarah BL, Anncatrine LP, Jesper EO and Thomas B. 2007. Common TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PAI-1, uPA, CD14 dan TLR4 polymorphisms are not associated with disease severity or outcome from Gram negative sepsis. *BMC Infect Dis*; 7:108.

Krysiak R, Okopien B, Herman ZS. 2003. Effects of HMG-CoA reductase inhibitors on coagulation and fibrinolysis processes. *Drugs*; 63:1821–1854.

Kumar A. 2009. *Optimizing antimicrobial therapy in sepsis and septic shock. Crit Care Clin.*; 25(4):733-51, viii.

Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I. 2000. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med*; 6:1004–1010.

La Mura V., Pasarín M., Meireles C. Z., Miquel R., Rodríguez-Vilarrupla A., Hide D., et al. 2013. *Effects of simvastatin administration on rodents with lipopolysaccharide-induced liver microvascular dysfunction. Hepatology*;57:1172–1181.

Laemli UK. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*; :680-686.

Landry DW, Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med*; 345:588–595.

Laufs U, Endres M, Custodis F. 2000. Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation*; 102: 3104–3110.

Le Tulzo Y, Pangault C, Gacouin A. 2002. Early circulating lymphocyte apoptosis in human septic shock is associated with poor outcome. *Shock*; 18:487–494.

Lee DK, Park EJ, Kim EK, Jin J, Kim JS, Shin IJ, et al. 2012. *Atorvastatin and simvastatin, but not pravastatin, up-regulate LPS-induced MMP-9 expression in macrophages by regulating phosphorylation of ERK and CREB. Cell Physiol Biochem*; 30:499–511.

Lever A, Mackenzie I. 2007. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ*; 335:879-883.



Lewis DH, Chan DL, Pinheiro D, Armitage-Chan E, Gardenm OA. 2012. The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T Cells. *J Vet Intern Med*; 26:457-482.

Lewis AJ, Seymour CW, Rosengart MR. Current Murine Models of Sepsis. *Surg Infect (Larchmt)*. 2016 Aug 1;17(4):385-93. doi: 10.1089/sur.2016.021. PubMed PMID: 27305321; PubMed Central PMCID: PMC4960474.

Li W, Li J, Ashok M, Wu R, Chen D, et al. 2007. A cardiovascular drug rescues mice from lethal sepsis by selectively attenuating a late-acting proinflammatory mediator, high mobility group box 1. *J Immunol*; 178: 3856–3864.

Liliensiek B, Liliensiek B, Weigand MA, Bierhaus A, Nicklas W, Kasper M. 2004. Receptor for advanced glycation end products (RAGE) regulates sepsis but not the adaptive immune response. *J Clin Invest*; 113:1641-1650.

Limet J, Plommet AM, Dubray G, Plommet M. 1987. Immunity conferred upon mice by anti-LPS monoclonal antibodies in murine Brucellosis. *Annales de l'Institut Pasteur/Immunologie*. (138)3:417-424.

Liu SF, Malik AB. 2006. NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 290:1622-1645.

Llevadot J, Murasawa S, Kureishi Y. 2001. HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 108:399–405.

Lloyd-Jones DM, Liu K, Tian L, Greenland P. 2006. Narrative review: Assessment of C-reactive protein in risk prediction for cardiovascular disease. *Ann Intern Med*; 145: 35–42. [PubMed]

Lopes JA, Jorge S, Resina C, Santos C, Pereira A, Neves J, Antunes F, Prata MM. 2007. Acute renal failure in patients with sepsis. *Crit Care*; 11:411.

Lotze MT, Tracey KJ. 2005. High mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nature Rev Immunol*; 5:331-342.

Luk JMC, Nhalue NA, Lindberg AA. 1990. Efficient production of mouse and rat monoclonal antibodies against the O antigens of Salmonella serogroup C<sub>1</sub>, using LPS-coated bacteria as immunogen. *J Immunol Methods*; (129)2:243-250.

Luo Z, Fujio Y, Kureishi Y. 2000. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo. *J Clin Invest*; 106:493–499.



Macdonal F, Ford CHJ, Casson AG. 2004. Molecular biology of Cancer, 2nd Edition Garland science/BIOS scientific. London and New York.

Mahreen R, Mohsin M, Nasreen Z, Siraj M, Ishaq M. 2010. Significantly increased levels of serum malonaldehyde in type 2 diabetics with myocardial infarction. *Int J Diabetes Dev Ctries.*;30(1):49-51.

Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. 2012. Statins and vein graft failure in coronary bypass surgery. *Curr Opin Pharmacol*; 12(2):172–180.

Marik VE, Varon J. 2008. The management of sepsis. Lippincot Williams & Wilkins. Philadelphia.

Marshall J. C. 2014. Why have clinical trials in sepsis failed? *Trends Mol Med.*;20 195–203

Marshall JC. 2004. Sepsis: current status, future prospects. Lippincott Williams & Wilkins.

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*; 348:1546-1554.

Mehanic S, Baljic R. 2013. The importance of serum procalcitonin in diagnosis and treatment of serious bacterial infections and sepsis. *Mater Sociomed.*;25(4):277-81.

Merx M. W., Liehn E. A., Janssens U., Luticken R., Schrader J., Hanrath P., et al. 2004. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin profoundly improves survival in a murine model of sepsis. *Circulation*;109:2560–65.

Merx MW, Liehn EA, Graf J, van de Sandt A, Schaltenbrand M, Schrader J, Hanrath P, Weber C. 2005. **Statin treatment after onset of sepsis in a murine model improves survival.** *Circulation*;112:117-124

Merx MW, Weber C. 2007. Sepsis and the heart. *Circulation*; 116:793-802.

Mickells GE, Moge MA, Smith CM. 2014. Acute kidney injury in pediatric sepsis. *Clin pediatr Emerg Med.*;15(2):185–192.

Mishra V, Baines M, Wenstone R, Shenkin A. 2005. Markers of oxidative damage, antioxidant status and clinical outcome in critically ill patients. *Ann Clin Biochem*; 42(Pt 4):269-76.

Moustafa AH, Ali EM, Mohamed TM, Abdou HI. 2009. Oxidative stress and thyroid hormones in patients with liver diseases. *Eur J Intern Med.*; 20(7):703-8.

Mullen GE, Kennedy MN, Visintin A, Mazzoni A, Leifer CA, Davies DR, Segal DM. 2003. The role of disulfide bonds in the assembly and function of MD-2. *Proc Natl. Acad Sci U S A*; 100:3919-3924.



Munford RS. 2005. Severe sepsis and septic shock. In: Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Braunwald E, Hauser SL eds. Harrison's principles of internal medicine. 16<sup>th</sup> ed. The McGraw-Hill. New York.

Nakagawa T, Zhu H, Morishima N. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* 403:98–103.

Nasronudin. Kemajuan dalam penatalaksanaan medis penderita imunokompromail dan sepsis. Dalam: Nasronudin, Hadi U, Vitanata M, Triyono EA, Bramantono, Suharto, Soewandojo E, Rahayu ARP, Tantular IS. Editor. Penyakit infeksi di Indonesia: solusi kini dan mendatang. Edisi Kedua. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR; 2011a. p.313.

Nasronudin. Sindrom disfungsi multiorgan pada penyakit infeksi. Dalam: Nasronudin, Hadi U, Vitanata M, Triyono EA, Bramantono, Suharto, Soewandojo E, Rahayu ARP, Tantular IS. Editor. Penyakit infeksi di Indonesia: solusi kini dan mendatang. Edisi Kedua. Surabaya: Pusat Penerbitan dan Percetakan UNAIR; 2011b. p.301.

Nduka OO, Parrillo JE. The pathophysiology of septic shock. *Crit Care Clin.* 2009;25:677–702.

Nežić L, Amidžić L, Škrbić R, et al. 2019. *Simvastatin Inhibits Endotoxin-Induced Apoptosis in Liver and Spleen Through Up-Regulation of Survivin/NF-κB/p65 Expression.* *Front Pharmacol.*;10:54.

Nežić L., Škrbić R., Dobrić S., Stojiljković M. P., Jačević V., Satara S. S., et al. 2009. *Simvastatin and indomethacin have similar anti-inflammatory activity in a rat model of acute local inflammation.* *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*;104:185–191.

Niessner A, Steiner S, Speidl WS. 2006. Simvastatin suppresses endotoxin-induced upregulation of toll-like receptors 4 and 2 in vivo. *Atherosclerosis*; 189:408–413.

Ohto U, Fukase K, Miyake K, Satow Y. 2007. Crystal structures of human MD-2 and its complex with antiendotoxic lipid IVA. *Sci*; 316:1632-1634.

Okajima K. 2002. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants. *Immunol Rev*; 184:258–274.

Okazaki Y. Matsukawa A. 2009. Pathophysiology of sepsis and recent patent on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis. *Recent Patents on Inflamm & Allergy Drug Discov.*; 3(1):26-32.

Oppert M, Engel C, Brunkhorst FM, et al. 2008. *Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock – a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study.* *Nephrol Dial Transplant.* 23(3):904–909.

Oyadomari S, Mori M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differentiation*; 11:381–389.



Pachaly JR, Brito HFV. 2001. Interspecific allometric scaling. In: Fowler ME, Cubas PR, editors. *Biology, medicine and surgery of South American wild animals*. Ames (IA): Iowa University; p. 475e81.

Page C, Curtis M, Walker M, Hoffman B. 2006. *Integrated Pharmacology* 3rd edition. Mosby Elsevier; p. 325–326.

Pecorico L. 2005. *Molecular biology of cancer, mechanism, targets and therapeutics*. Oxford University Press Inc. New York.

Perl M, Chung CS, Lomas-Neira J. 2005. Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. *Am J Pathol*; 167:1545–1559.

Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* 2008;30(Suppl 1):53–59

Pradipta IS. 2009. Evaluation of antibiotic use in sepsis patients at ward of internal medicine Dr. Sardjito Hospital, Yogyakarta September–November 2008. M.Sc Thesis, Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Indonesia.

Pruefer D, Makowski J, Schnell M, et al. 2002. Simvastatin inhibits inflammatory properties of *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. *Circulation* 2002; 106: 2104–2110.

Qin S, Qin S, Wang H, Yuan R, Li H, Ochani M. 2006. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*; 203:1637-1642.

Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. 1995. *The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study*. *JAMA*;273:117-123.

Recknagel P, Gonnert FA, Westermann M, Lambeck S, Lupp A, Rudiger A, Dyson A, Carré JE, Kortgen A, Krafft C, Popp J, Sponholz C, Fuhrmann V, Hilger I, Claus RA, Riedemann NC, Wetzker R, Singer M, Trauner M, Bauer M. 2012. Liver dysfunction and phosphatidylinositol-3-kinase signalling in early sepsis: experimental studies in rodent models of peritonitis. *PLoS Med.*;9(11):e1001338.

Reinhardt K, Bloos K, Brunkhorst FM. 2005. Pathophysiology of sepsis and multiple organ dysfunction. In: Fink MP, Abraham E, Vincent JL, eds. *Textbook of critical care*. 15<sup>th</sup> ed. Elsevier Saunders. London.

Remick DG, Ward PA. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. *Shock* 2005;24(Suppl 1):7–11

Remick DG. 2007. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*; 170:1435–1444.



Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, et al. 2003. IFN-gamma induces high mobility group box 1 protein release partly through a independent mechanism. *J Immunol*; 170:3890–3897.

Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, MacFadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ, JUPITER Study Group. 2008. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med.*;359(21):2195-207.

Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. 2002. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med*;347:1557–1565.

Ridker PM. 2007. Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. *Nutr Rev*;65:S253–259.

Ridker PM. 2007. Inflammatory biomarkers and risks of myocardial infarction, stroke, diabetes, and total mortality: implications for longevity. *Nutr Rev.*;65(12 Pt 2):S253-9.

Riedemann NC, Guo RF, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ. 2004. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *J Immunol*; 173:1355-1359.

Rittirsch D, L. Marco Hoesel, Peter A Ward. 2007. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leuko Biol*; 81:137-143.

Rock KL, Kono H. 2008. The inflammatory response to cell death. *Annu Rev Pathol*; :99–126.

Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK. 2006. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature*; 440:1064–1068.

Sattar R, Ali SA, Abbasi A. 2003. Molecular mechanism of apoptosis: Prediction of three-dimensional structure of caspase-6 and its interactions by homology modeling. *Biochem Biophys Res Commun*; 308:497–504.

Schrier RW, Wang W. 2004. Review Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med*; 351(2):159-69.

Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. 2008. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *J Immunol*; 180:2531-2537.

Shankar R, Melstrom KA, Gamelli RL. 2007. Inflammation and sepsis: past, present, and the future. *American Burn Association*. 1559-047X. DOI:10.1097/BCR.0B013E318092DF16.

Shao Q, Shen LH, Hu LH, Pu J, Jing Q, He B. 2012. Atorvastatin suppresses inflammatory response induced by oxLDL through inhibition of ERK



phosphorylation, IkappaBalpha degradation, and COX-2 expression in murine macrophages. *J Cell Biochem*; 113:611–618.

Shi J, Wang J, Zheng H. 2003. Statins increase thrombomodulin expression and function in human endothelial cells by a nitric oxide-dependent mechanism and counteract tumor necrosis factor alpha-induced thrombomodulin downregulation. *Blood Coagul Fibrinolysis*; 14:575–585.

Shinozaki S., Inoue Y., Yang W., Fukaya M., Carter E. A., Yu Y. M., et al. 2010. Farnesyltransferase inhibitor improved survival following endotoxin challenge in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*;391:1459–64.

Shinozaki S., Inoue Y., Yang W., Fukaya M., Carter E. A., Yu Y. M., et al. 2010. Farnesyltransferase inhibitor improved survival following endotoxin challenge in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*;391:1459–1464.

Shyamsundar M, McKeown ST, O'Kane CM, et al. 2009. Simvastatin decreases lipopolysaccharide-induced pulmonary inflammation in healthy volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.*;179(12):1107-14.

Silva FP, Victor N. 2009. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis* 14:509-521.

Slotta J. E., Laschke M. W., Schilling M. K., Menger M. D., Jeppsson B., Thorlacius H. 2010. Simvastatin attenuate hepatic sensitization to lipopolysaccharide after partial hepatectomy. *J. Surg. Res.*;162:184–92.

Smeding L., Plötz F. B., Groeneveld A. J., Kneyber M. C. 2012. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. *Shock*;37:449–456.

Soedjito UH, Joewono S, Suharto AR, Eddy S. 1998. The prognostic factors in sepsis. *Folis Med Indones*; 34:14–20.

Sridharan P, Chamberlain RS. 2013. The efficacy of procalcitonin as a biomarker in the management of sepsis: slaying dragons or tilting at windmills? *Surg Infect (Larchmt.)*;14(6):489-511.

Stolf AM, dos Reis Livero, Dreifuss AA, Bastos-Pereira AL, Fabosi IA, de Souza CEA, de Oliveira Gomez L, Chicorski R, Brandt AP, Cadena SMS, Telles JEQ, Hauser AB, Elferink RO, Zampronio AR, Acco A. 2012. Effects of statins on liver function and inflammation in septic rats. *J Surg Res*; 178:888-897.

Su X, Zhang L, Lv J, et al. 2016. Effect of statins on kidney disease outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.*;67:881-892.

Suberviola B, Castellanos-Ortega A, Llorca J, Ortiz F, Iglesias D, Prieto B. 2012. Prognostic value of proadrenomedullin in severe sepsis and septic shock patients with community-acquired pneumonia. *Swiss Med Wkly*;9(142):w13542.



Sudhir U, Venkatachalaiah RK, Kumar TA, Rao MY, Kempegowda P. 2011. Significance of serum procalcitonin in sepsis. *Indian J Crit Care Med*;15(1):1-5.

Sumarno. 2004. Molecular weight of vibrio cholera receptor 01 M094V in enterocyte of white rats. *YARSI Med J*

Takao K, Miyakawa T., 2015. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci* 112:1167–1172.

Tandon P, Tsao GG. 2008. Bacterial infections, sepsis, and multiorgan failure in cirrhosis. *Seminars in Liver Dis*; 28(1):26-42.

Terblanche M, Yaniv A, Robert SR, Terry SS, Daniel GH. 2007. Statin and sepsis: multiple modifications at multiple levels. *Infect Dis*; 7(5):358-368.

Tergaonkar V. 2006. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol* 38:1647–1653.

Thorley AJ, Ford PA, Giembycz MA, Goldstraw P, Young A, Tetley TD. 2007. Differential regulation of cytokine release and leukocyte migration by lipopolysaccharide-stimulated primary human lung alveolar type II epithelial cells and macrophages. *J Immunol*. Jan 1; 178(1):463-73.

Thornberry NA, Lazebnik Y. 1998. Caspases: enemies within. *Science* 281:1312–1316.

Tiwari SC, Vikrant S. 2002. Sepsis and the kidney. *J Indian Acad Clin Med*; 5(1):44-54.

Trzeciak S, Rivers EP. 2005. Clinical manifestations of disordered microcirculatory perfusion in severe sepsis. *Critical Care* 9(4):20-26.

Vincent JL, Abraham E. 2006. The last 100 years in sepsis. *Am J Resp Crit Care Med*; 173:256–63.

Vincent JL, Angus DC, Artigas A, Kalil A, Basson BR, Jamal HH, Johnson G 3rd, Bernard GR., 2003. Recombinant Human Activated Protein C Worldwide Evaluation in Severe Sepsis (PROWESS) Study Group. Effects of drotrecogin alfa (activated) on organ dysfunction in the PROWESS trial. *Crit Care Med*;31(3):834-40.

Walter DH, Zeiher AM, Dimmeler S. 2004. Effects of statins on endothelium and their contribution to neovascularization by mobilization of endothelial progenitor cells. *Coron Artery Dis*; 15:235–42.

Wang XQ, Luo NS, Salah ZQ, Lin YQ, Gu MN, Chen YX. 2014. Atorvastatin attenuates TNF-alpha production via heme oxygenase-1 pathway in LPS-stimulated RAW264.7 Macrophages. *Biomed Environ Sci*; 27:786–793.



Wang Y., Yang W., Zhao X., Zhang R. 2018. Experimental study of the protective effect of simvastatin on lung injury in rats with sepsis. *Inflammation*;41:104–113.

Weber AN, Moncrieffe MC, Gangloff M, Imler JL, Gay NJ. 2005. Ligand-receptor and receptor-receptor interactions act in concert to activate signaling in the Drosophila toll pathway. *J Biol Chem*; 280:22793-22799.

Weiss YG, Bellin L, Kim PK, Andrejko KM, Haaxma CA, Raj N, Furth EE, Deutschman CS. 2001. Compensatory hepatic regeneration after mild, but not fulminant, intraperitoneal sepsis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.*;280(5):G968-73.

Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V. 2001. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med*; 7:687–692.

Wesche-Soldato DE, Chung CS, Gregory SH, Salazar-Mather TP, Ayala CA, Ayala A. 2007. CD8 T cells promote inflammation and apoptosis in the liver after sepsis: role of Fas-FasL. *Am J Pathol*; 171:87–96.

West MA, Heagy W. 2002. Endotoxin tolerance: a review. *Crit Care Med*; 30(1 supp):S64–73.

Yan J, Li S, Li S. 2014. The role of the liver in sepsis. *Int Rev Immunol.* 33(6):498-510.

Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101:296-301.

Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K. 2007. Statin activate Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  through extracellular signal-regulated kinase-1 or -2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res*; 100:1442-1451.

Yasuhara S, Asai A, Sahani ND, Martyn JA. 2007. Mitochondria, endoplasmic reticulum, and alternative pathways of cell death in critical illness. *Crit Care Med* 35:488–495.

Yoshida T, Hayashi M. Pleiotropic effects of statins on acute kidney injury: involvement of Krüppel-like factor 4. *Clin Exp Nephrol.* 2016;21:175-181. doi:10.1007/s10157-016-1286-4.

Yuan CQ, Ding ZH. 2002. Structure and function of caspases. 24:146–151.

Zhang S., Luo L., Wang Y., Rahman M., Lepsenyi M., Syk L., et al. 2012. Simvastatin protects against T cell immune dysfunction in abdominal sepsis. *Shock* 38 524–531.

Zhao G., Yu Y. M., Kaneki M., Bonab A. A., Tompkins R. G., Fischman A. J. 2015. Simvastatin reduces burn injury-induced splenic apoptosis via

down-regulation of the TNF- $\alpha$ / NF- $\kappa$ B pathway. Ann. Surg. 261 1006–1012.

Zhao G., Yu Y. M., Kaneki M., Tompkins R. G., Fischman A. J. 2013. Simvastatin protects hepatocytes from apoptosis by suppressing the TNF- $\alpha$ /caspase-3 signalling pathway in mice with burn injury. Ann. Surg. 257 1129–1136.





LAMPIRAN 1. Keterangan Laik Etik



**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS WIJAYA KUSUMA SUARABAYA**

**KETERANGAN KELAIKAN ETIK  
"ETHICAL CLEARANCE"**

No.46/SLE/FK/UWKS/VI/2013

**KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS WIJAYA KUSUMA SURABAYA  
TELAH MEMPLEJARI SECARA SEKSAMA RANCANGAN PENELITIAN  
YANG DIUSULKAN, MAKA DENGAN INI MENYATAKAN BAHWA**

**PENELITIAN BERJUDUL:  
"ATORVASTATIN DAN ANTIBODI LPS MENURUNKAN NFkB, TNF- A,  
OSIDATIF STRESS DAN PENANDA BIOKIMIAWI DARI DISFUNGSI ORGAN PADA  
MODEL TIKUS SEPSIS AKUT"**

**PENELITI UTAMA:  
dr. Dian Samudra**

**UNIT / LEMBAGA / TEMPAT PENELITIAN  
Laboratorium Fakultas Kedokteran  
Universitas Brawijaya Malang**

**MENYATAKAN:  
LAIK ETIK**

Surabaya, 18 Juni 2013

**Mengetahui  
Dekan**

**Prof. Dr. H. Djangan Sargowo, dr.  
Sp.PD, Sp.JP(K), FIHA, FACC,  
FCAPC, FESC, FASCC**



**Ketua Unit,**

**Dr. Erny, dr., Sp. A (K)**



## Lampiran 2. Perhitungan SPSS

```

USE ALL.
COMPUTE filter_$=(Jam = 1).
VARIABLE LABELS filter_$ 'Jam = 1 (FILTER)'.
VALUE LABELS filter_$ 0 'Not Selected' 1 'Selected'.
FORMATS filter_$ (f1.0).
FILTER BY filter_$.
EXECUTE.
T-TEST GROUPS=Perlakuan(1 2)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=TNF_alfa PCT hs_CRP MDA Ureum BUN Kreatinin SGOT SGPT TB
/CRITERIA=CI(.95).
    
```

## T-Test

### Notes

Output Created		27-NOV-2019 05:30:57
Comments		
Input	Data	G:\data dian disertasi.sav
	Active Dataset	DataSet1
	Filter	Jam = 1 (FILTER)
	Weight	<none>
	Split File	<none>
	N of Rows in Working Data File	25
Missing Value Handling	Definition of Missing	User defined missing values are treated as missing.



Cases Used		
Syntax		
Resources	Processor Time	00:00:00.02
	Elapsed Time	00:00:00.05

Statistics for each analysis are based on the cases with no missing or out-of-range data for any variable in the analysis.

```
T-TEST GROUPS=Perlakuan(1 2)
/MISSING=ANALYSIS
/VARIABLES=TNF_alfa PCT
hs_CRP MDA Ureum BUN
Kreatinin SGOT SGPT TB
/CRITERIA=CI(.95).
```

[DataSet1] G:\data dian disertasi.sav

Group Statistics

	Perlakuan	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
TNF_alfa	Control	5	.5790	.15849	.07088
	<i>E. coli</i>	5	.8372	.02489	.01113
PCT	Control	5	.7600	.21343	.09545
	<i>E. coli</i>	5	1.0608	.08524	.03812
hs_CRP	Control	5	.7166	.23790	.10639
	<i>E. coli</i>	5	1.1698	.09721	.04348
MDA	Control	5	.1318	.03185	.01424
	<i>E. coli</i>	5	.5320	.22746	.10172
Ureum	Control	5	15.9000	3.50214	1.56621
	<i>E. coli</i>	5	24.4600	4.75058	2.12452
BUN	Control	5	7.4300	1.63622	.73174
	<i>E. coli</i>	5	11.4400	2.22413	.99466
Kreatinin	Control	5	.3000	.07071	.03162
	<i>E. coli</i>	5	.5400	.05477	.02449
SGOT	Control	5	66.4000	18.03607	8.06598
	<i>E. coli</i>	5	95.2000	36.47876	16.31380
SGPT	Control	5	31.0000	15.08310	6.74537
	<i>E. coli</i>	5	42.4000	15.33949	6.86003
Total bilirubin	Control	5	.2400	.05477	.02449
	<i>E. coli</i>	5	.4200	.08367	.03742



**Independent Samples Test**

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
TNF_alfa	Equal variances assumed	29.387	.001	-	8	.007	-.25820	.07175	-.42365	-.09275
	Equal variances not assumed			3.599	4.197	.021	-.25820	.07175	-.45376	-.06264
PCT	Equal variances assumed	1.936	.202	-	8	.019	-.30080	.10278	-.53781	-.06379
	Equal variances not assumed			2.927	5.245	.031	-.30080	.10278	-.56134	-.04026
hs_CRP	Equal variances assumed	1.737	.224	-	8	.004	-.45320	.11493	-.71823	-.18817
	Equal variances not assumed			3.943	5.300	.010	-.45320	.11493	-.74369	-.16271
MDA	Equal variances assumed	5.887	.041	-	8	.005	-.40020	.10271	-.63706	-.16334
	Equal variances not assumed			3.896	4.157	.016	-.40020	.10271	-.68119	-.11921
Ureum	Equal variances assumed	1.278	.291	-	8	.012	-8.56000	2.63943	-14.64654	-2.47346
	Equal variances not assumed			3.243	7.356	.013	-8.56000	2.63943	-14.74049	-2.37951

BUN	Equal variances assumed	1.273	.292	-	8	.012	-4.01000	1.23482	-6.85751	-1.16249
	Equal variances not assumed			3.247						
Kreatinin	Equal variances assumed	.103	.757	-	8	.000	-.24000	.04000	-.33224	-.14776
	Equal variances not assumed			6.000						
SGOT	Equal variances assumed	4.285	.072	-	8	.152	-28.80000	18.19890	-70.76674	13.16674
	Equal variances not assumed			1.583						
SGPT	Equal variances assumed	.006	.938	-	8	.270	-11.40000	9.62081	-33.58563	10.78563
	Equal variances not assumed			1.185						
Total bilirubin	Equal variances assumed	.640	.447	-	8	.004	-.18000	.04472	-.28313	-.07687
	Equal variances not assumed			4.025						
	Equal variances assumed			-						
	Equal variances not assumed			4.025						