



Direktorat Riset dan Pengabdian Masyarakat Direktorat Jenderal Riset dan Pengembangan  
Kementerian Riset, Teknologi, dan Pendidikan Tinggi  
Gedung BPPT II Lantai 19, Jl. MH. Thamrin No. 8 Jakarta Pusat  
<https://simlitabmas.ristekdikti.go.id/>

## PROTEKSI ISI LAPORAN AKHIR PENELITIAN

Dilarang menyalin, menyimpan, memperbanyak sebagian atau seluruh isi laporan ini dalam bentuk apapun kecuali oleh peneliti dan pengelola administrasi penelitian

## LAPORAN AKHIR PENELITIAN

ID Proposal: 5a07bf17-c1d5-4b87-a9c4-5fc1b850425c  
laporan akhir Penelitian: tahun ke-1 dari 1 tahun

### 1. IDENTITAS PENELITIAN

#### A. JUDUL PENELITIAN

EFEK PREVENTIF EKSTRAK DAUN KENTUT (*Paederia foetida* L.) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-6 DAN EKSPRESI CASPASE-3 PADA LIMPA MENCIT MODEL SEPSIS YANG DIINDUKSI *Escherichia coli*

#### B. BIDANG, TEMA, TOPIK, DAN RUMPUN BIDANG ILMU

Bidang Fokus RIRN / Bidang Unggulan Perguruan Tinggi	Tema	Topik (jika ada)	Rumpun Bidang Ilmu
Kesehatan	-		Biologi Farmasi

#### C. KATEGORI, SKEMA, SBK, TARGET TKT DAN LAMA PENELITIAN

Kategori (Kompetitif Nasional/ Desentralisasi/ Penugasan)	Skema Penelitian	Strata (Dasar/ Terapan/ Pengembangan)	SBK (Dasar, Terapan, Pengembangan)	Target Akhir TKT	Lama Penelitian (Tahun)
Penelitian Kompetitif Nasional			SBK Riset Pembinaan/ Kapasitas	3	1

### 2. IDENTITAS PENGUSUL

Nama (Peran)	Perguruan Tinggi/ Institusi	Program Studi/ Bagian	Bidang Tugas	ID Sinta	H-Index
LISA SAVITRI - Ketua Pengusul	Universitas Kadiri	Teknologi Laboratorium Medis	1. Menyiapkan mencit jantan sebagai objek penelitian 2. Melakukan perlakuan pada mencit (normal, kontrol negatif,	6707039	1

			<p>kontrol positif, P1, P2, dan P3)</p> <p>3. Melakukan pengambilan darah jantung dan fiksasi limpa mencit</p> <p>4. Melakukan uji ELISA untuk pengecekan kadar IL-6 dan imunohistokimia untuk pengecekan ekspresi caspase-3</p> <p>5. Melakukan analisis data</p> <p>6. Menyusun laporan akhir dan feasibility study produk</p> <p>7. Menyusun artikel untuk publikasi di Jurnal Quangga (terakreditasi Sinta 4)</p> <p>8. Menyusun buku ber-ISBN</p> <p>9. Melakukan pengurusan pengajuan HKI</p>		
<p>ELFRED RINALDO KASIMO - Anggota Pengusul</p>	<p>Universitas Kadiri</p>	<p>Teknologi Laboratorium Medis</p>	<p>1. Membantu menyiapkan mencit jantan sebagai objek penelitian</p> <p>2. Menginjeksi mencit dengan Escherichia coli pada bagian intraperitoneal</p> <p>3. Melakukan pembedahan mencit yang telah diberikan perlakuan</p> <p>4. Membantu melakukan pengambilan darah jantung mencit</p> <p>5. Membantu menyusun laporan akhir dan feasibility study produk</p> <p>6. Membantu menyusun artikel untuk publikasi di Jurnal Quangga (terakreditasi Sinta 4)</p> <p>7. Membantu menyusun buku ber-ISBN</p>	6680416	0

### 3. MITRA KERJASAMA PENELITIAN (JIKA ADA)

Pelaksanaan penelitian dapat melibatkan mitra kerjasama, yaitu mitra kerjasama dalam melaksanakan penelitian, mitra sebagai calon pengguna hasil penelitian, atau mitra investor

Mitra	Nama Mitra
-------	------------

#### 4. LUARAN DAN TARGET CAPAIAN

##### Luaran Wajib

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya)
--------------	--------------	--	---

##### Luaran Tambahan

Tahun Luaran	Jenis Luaran	Status target capaian (accepted, published, terdaftar atau granted, atau status lainnya)	Keterangan (url dan nama jurnal, penerbit, url paten, keterangan sejenis lainnya)
--------------	--------------	--	---

#### 5. ANGGARAN

Rencana anggaran biaya penelitian mengacu pada PMK yang berlaku dengan besaran minimum dan maksimum sebagaimana diatur pada buku Panduan Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Total RAB 1 Tahun Rp. 0

Tahun 1 Total Rp. 0

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
--------------------	----------	------	--------	------	--------------	-------

Tahun 2 Total Rp. 0

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
--------------------	----------	------	--------	------	--------------	-------

Tahun 3 Total Rp. 0

Jenis Pembelanjaan	Komponen	Item	Satuan	Vol.	Biaya Satuan	Total
--------------------	----------	------	--------	------	--------------	-------

#### 6. KEMAJUAN PENELITIAN

##### A. RINGKASAN

Sepsis adalah keadaan darurat medis yang menggambarkan respons imunologis sistemik tubuh terhadap proses infeksi yang dapat menyebabkan disfungsi organ stadium akhir dan kematian. Ancaman serius penyebab sepsis salah satunya adalah bakteri *Escherichia coli*. Beberapa penelitian telah mendeteksi perubahan nukleotida pada gen yang mengkodekan interleukin-6 (IL-6) menghasilkan polimorfisme yang akan meningkatkan faktor risiko atau pelindung untuk mengembangkan sepsis, syok sepsis, dan bahkan kematian karena sepsis. Salah satu penyebabnya adalah peningkatan apoptosis pada sel imun pada sepsis. Peran caspase 3 dianggap penting karena merupakan caspase effector terjadinya apoptosis. Terlepas dari semua upaya penelitian eksperimental dan klinis selama tiga dekade terakhir, kemampuan untuk mempengaruhi perjalanan bakteri masih terbatas. Terapi berbasis imunoterapi yang ditargetkan sebagian besar belum terbukti efektivitasnya sejauh ini. Sehingga, diperlukan tindakan yang

lebih mengarah pada tindakan preventif, terutama dengan menggunakan bahan herbal, karena dipercaya memiliki efek samping yang rendah. Salah satu tanaman tradisional yang dipercaya masyarakat zaman dahulu untuk menyembuhkan gangguan pencernaan seperti diare adalah daun kentut (*Paederia foetida* L.). Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek preventif ekstrak daun kentut terhadap kadar IL-6 dan ekspresi caspase 3 pada limpa mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli*. Tujuan penelitian ini sesuai dengan Rencana Induk Riset Nasional 2017-2045 dengan teknologi yang dikembangkan berupa teknologi kemandirian bahan baku obat. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan perlakuan sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal (N), yaitu mencit yang tidak diberikan sonde lambung, 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif (K-), yaitu mencit diberikan aquades dengan volume 0,5 mL, 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif (K+), yaitu mencit diberikan ciprofloxacin dengan dosis 500 mg/kgBB dengan volume 0,26 mL, 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1 (P1), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 100 mg/kgBB dengan volume 0,5 mL, 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2 (P2), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 300 mg/kgBB dengan volume 0,5 mL, 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3 (P3), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 500 mg/kgBB dengan volume 0,5 mL. Mencit yang telah diberikan perlakuan selama 14 hari, kemudian diinjeksi pada bagian peritoniumnya dengan *E. coli* dengan dosis  $1 \times 10^6$  CFU/mL. Mencit setelah 24 jam pasca pemaparan polimikroba sepsis akan memperlihatkan kejadian apoptosis pada limpa, sehingga setelah 24 jam mencit dibedah untuk dilihat jumlah sel yang terapoptosis pada organ limpa. Setelah mencit dibedah kemudian mengambil darah dari jantung, selanjutnya serum darah diambil sebanyak 100  $\mu$ l untuk pengujian kadar IL-6 dengan metode ELISA. Pengamatan ekspresi caspase-3 pada limpa mencit dilakukan dengan imunohistokimia menggunakan polyclonal antibody caspase 3. Data yang diperoleh dari penelitian ini berupa kadar IL-6 (pg/ml) melalui hasil indirect ELISA dan ekspresi caspase 3 pada limpa (%) melalui hasil imunohistokimia. Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Analisis Varian Tunggal Satu Jalur (One Way Anova) pada taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ), apabila hasil perhitungan Anava menunjukkan signifikansi, maka perhitungan dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). Analisis statistik dilakukan dengan menggunakan software Graphad Prism 9 for windows. Data disajikan dalam bentuk rerata  $\pm$  standar error (SE). Luaran yang ditargetkan dari penelitian ini adalah laporan feasibility study produk, publikasi artikel di "Indonesian Journal of Natural Science Education (IJNSE) (Sinta 4)", menerbitkan buku ber-ISBN bekerjasama dengan Penerbit Buku Deepublish, dan HKI dengan status telah bersertifikat.

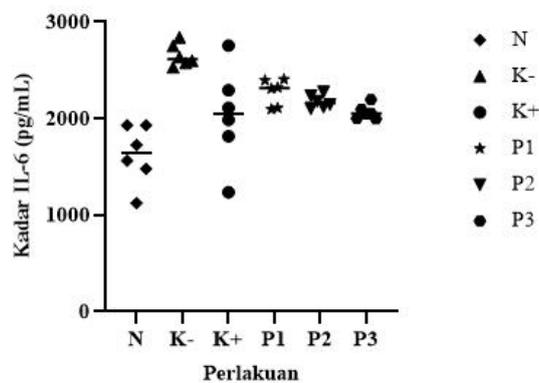
## **B. KATA KUNCI**

Efek preventif ekstrak daun kentut (*Paederia foetida* L.); kadar interleukin-6; ekspresi caspase 3, sepsis; *Escherichia coli*

Pengisian poin C sampai dengan poin H mengikuti template berikut dan tidak dibatasi jumlah kata atau halaman namun disarankan ringkas mungkin. Dilarang menghapus/memodifikasi template ataupun menghapus penjelasan di setiap poin.

**C. HASIL PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan secara ringkas hasil pelaksanaan penelitian yang telah dicapai sesuai tahun pelaksanaan penelitian. Penyajian meliputi data, hasil analisis, dan capaian luaran (wajib dan atau tambahan). Seluruh hasil atau capaian yang dilaporkan harus berkaitan dengan tahapan pelaksanaan penelitian sebagaimana direncanakan pada proposal. Penyajian data dapat berupa gambar, tabel, grafik, dan sejenisnya, serta analisis didukung dengan sumber pustaka primer yang relevan dan terkini.

Berdasarkan hasil ELISA didapatkan kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *Escherichia coli*, sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal (N) sebesar 1625,83 pg/mL, 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif (K-) sebesar 2656,17 pg/mL, 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif (K+) sebesar 2033,21 pg/mL, 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1 (P1) sebesar 2272,67 pg/mL, 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2 (P2) sebesar 2175,83 pg/mL, 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3 (P3) sebesar 2064,83 pg/mL.



**Gambar 1.** Diagram Pengaruh Ekstrak Daun Kentut terhadap Kadar IL-6 pada Mencit Model Sepsis yang Diinduksi *E. coli*

Dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa kadar IL-6 terendah adalah pada kelompok N, karena pada kelompok tersebut mencit sama sekali tidak diberikan paparan *E. coli*, sehingga mencit tidak mengalami sepsis. Pada mencit model sepsis, efek preventif yang ditunjukkan dengan kadar IL-6 paling rendah adalah kelompok K+, karena mencit tersebut diberikan obat ciprofloxacin, di mana obat tersebut merupakan bahan kimia yang tentunya memiliki efek samping jika dikonsumsi secara terus-menerus. Sedangkan untuk perlakuan dengan ekstrak daun kentut, didapatkan bahwa yang paling mampu untuk menurunkan IL-6 adalah pada P3, yaitu ekstrak daun kentut dosis 500 mg/kgBB.

Dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap penurunan kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* dapat diketahui dengan melakukan analisis secara statistik dengan metode ANOVA pada tingkat kepercayaan 95%. Dari hasil analisis dengan *GraphPad Prism* versi 9.3.1 (471) menunjukkan bahwa F hitung 10,35 > 0,6330 (taraf 0,05), sehingga menunjukkan bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel. Hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* dengan kata lain terdapat pengaruh antar dosis. Kelompok dosis pemberian yang mempunyai pengaruh antar dosis, dapat diketahui dengan uji lanjutan yaitu *Brown-Forsythe test* yang menunjukkan bahwa F (DFn, DFd) 3,477 (5,30) > P value 0,0135 dan *Bartlett's test* yang menghasilkan nilai *Bartlett's statistic (corrected)* 28,74 dengan P value < 0,0001.

Mekanisme antiinflamasi pada sepsis diduga disebabkan adanya kandungan saponin, flavonoid, dan minyak atsiri yang terdapat di dalam ekstrak daun kentut. Mekanisme antiinflamasi yang paling mungkin adalah diduga saponin mampu berinteraksi dengan banyak membran lipid, seperti fosfolipid yang merupakan prekursor prostaglandin dan mediator inflamasi lainnya [1]. Mekanisme ini juga didukung oleh flavonoid yang dilakukan melalui jalur penghambatan aktivitas enzim COX dan/atau lipooksigenase, karena penghambatan COX atau lipooksigenase. Penghambatan jalur COX dan lipooksigenase ini secara langsung juga menyebabkan

penghambatan biosintesis eikosanoid dan leukotrien, yang merupakan produk akhir dari jalur COX dan lipooksigenase [2].

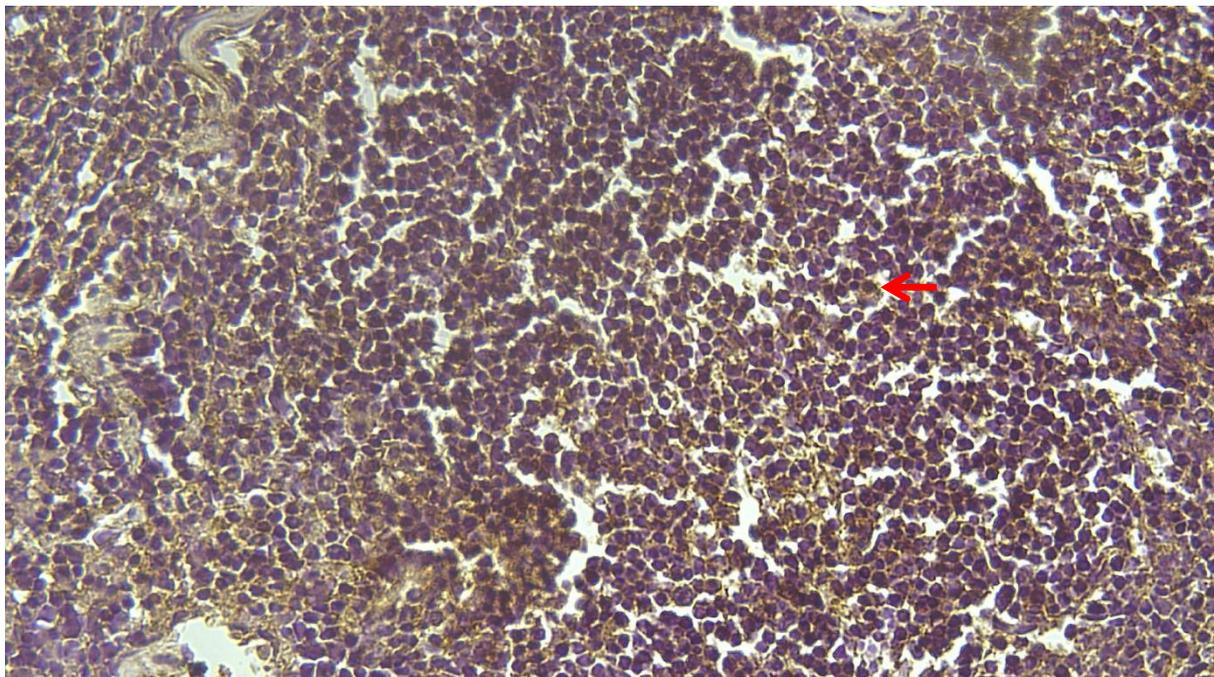
Selain itu, flavonoid dapat menurunkan jumlah leukosit immobil dan mengurangi aktivasi komplemen sehingga menurunkan adhesi leukosit ke endotel dan mengakibatkan penurunan respon inflamasi tubuh. Penghambatan degranulasi netrofil. Flavonoid juga berperan untuk menghambat pelepasan histamin. Efek antiinflamasi flavonoid didukung oleh aksinya sebagai antihistamin [3]. Histamin adalah salah satu mediator inflamasi yang pelepasannya distimulasi oleh pemompaan kalsium ke dalam sel. Flavonoid dapat menghambat enzim c-AMP fosfodiesterase, sehingga kadar c-AMP dalam sel mast meningkat, dengan demikian kalsium dicegah masuk ke dalam sel yang berarti juga mencegah pelepasan histamin dan dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan bereaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif [4].

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa ekspresi caspase 3 pada limpa mencit kelompok K- lebih tinggi daripada kelompok P1, P2, dan P3. Berikut ini adalah data rerata dan simpangan baku ekspresi caspase 3 pada limpa mencit kelompok N, K-, K+, P1, P2, dan P3 (Tabel 1)

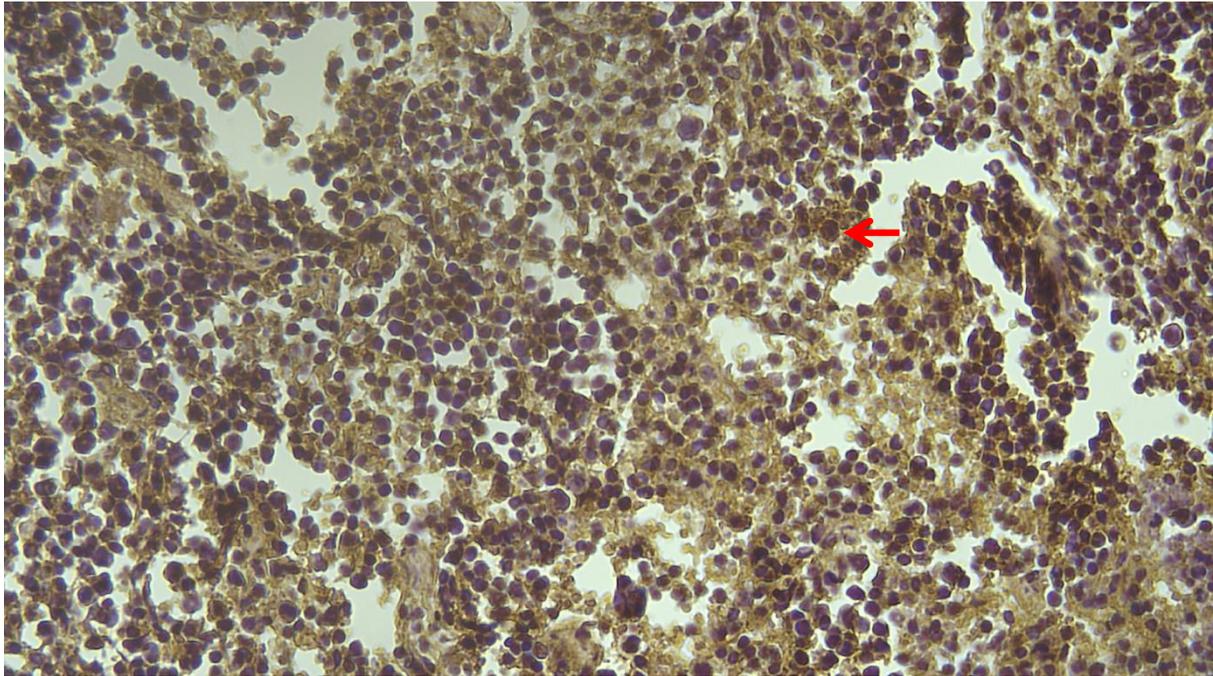
**Tabel 1.** Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Mencit (%)

Kelompok	Mean $\pm$ SD (%)
N	27,167 $\pm$ 4,956
K-	44,167 $\pm$ 1,941
K+	33,833 $\pm$ 8,329
P1	37,833 $\pm$ 2,317
P2	36,167 $\pm$ 1,169
P3	34,333 $\pm$ 1,505

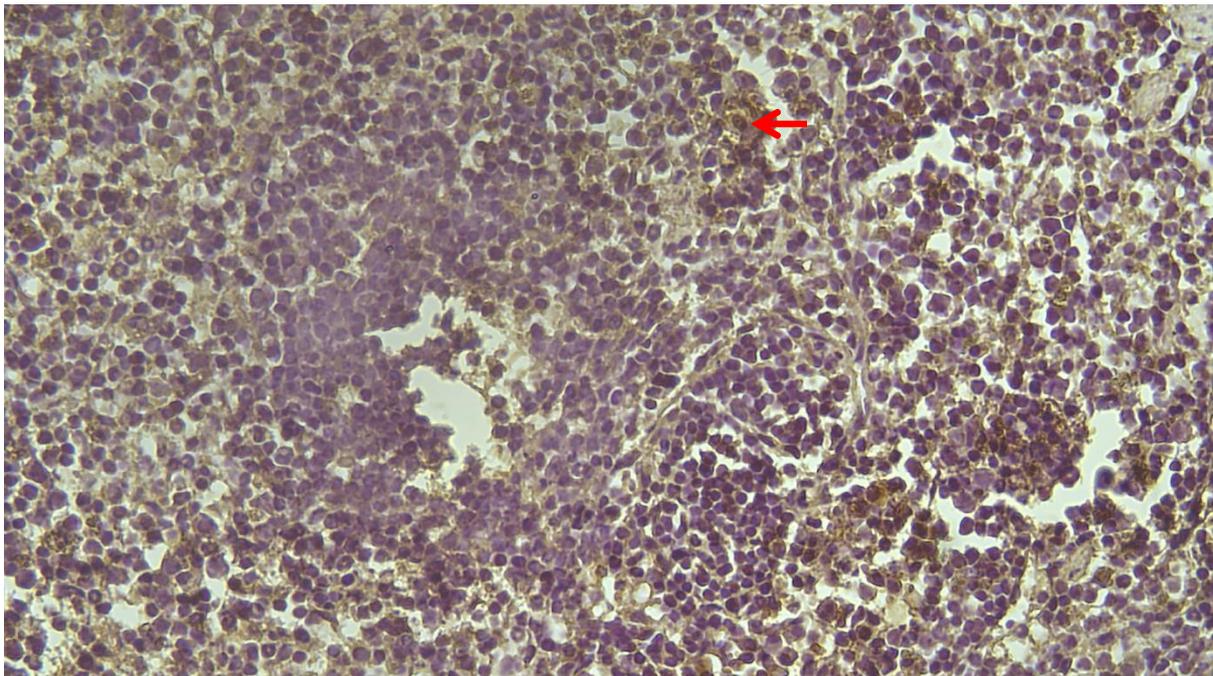
Berdasarkan data pada Tabel 1, dapat diketahui bahwa ekspresi caspase 3 pada limpa mencit yang paling tinggi adalah kelompok mencit K-, yaitu kelompok mencit yang diinfeksi *E. coli* tanpa diberikan preventif, yaitu sebesar 44,167  $\pm$  1,941%, sedangkan ekspresi caspase 3 pada limpa mencit yang paling rendah adalah kelompok N, yaitu kelompok mencit normal. Perbedaan ekspresi caspase 3 pada limpa mencit kelompok N, K-, K+, P1, P2, dan P3 dapat dilihat pada Gambar 2-7.



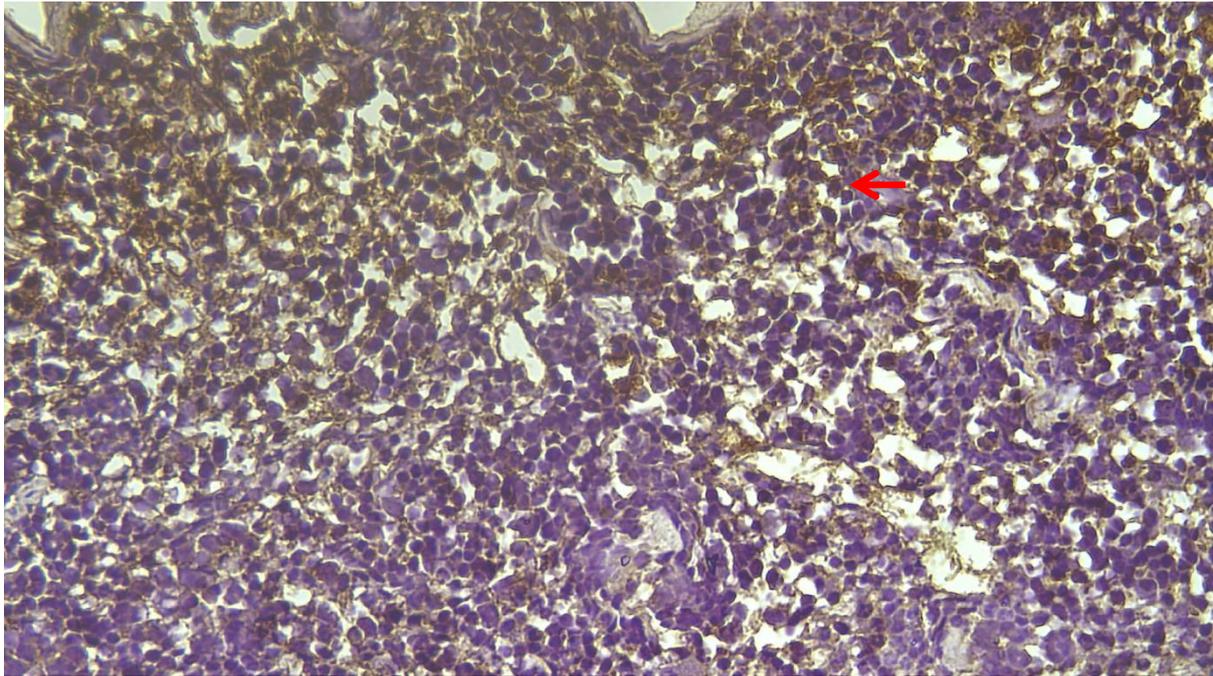
**Gambar 2.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa mencit yang Diinduksi *E. coli* pada Kelompok N dengan Perbesaran 400 $\times$  (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



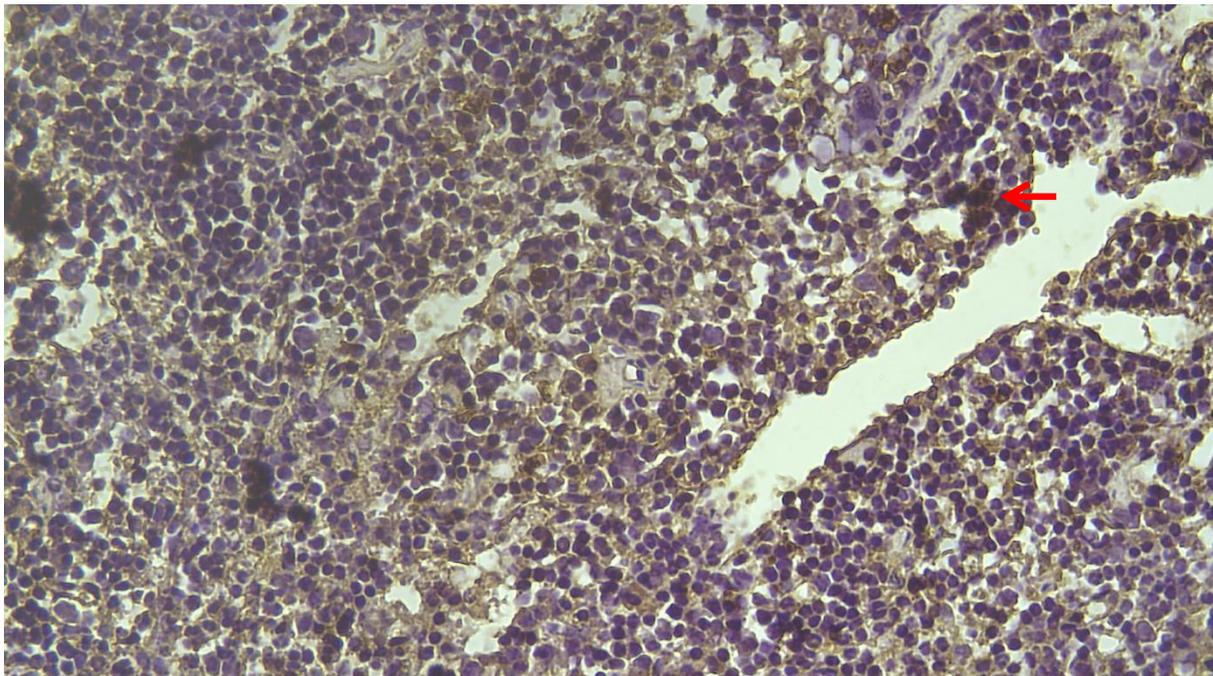
**Gambar 3.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa mencit yang Diinduksi *E. coli* pada Kelompok K- dengan Perbesaran 400× (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



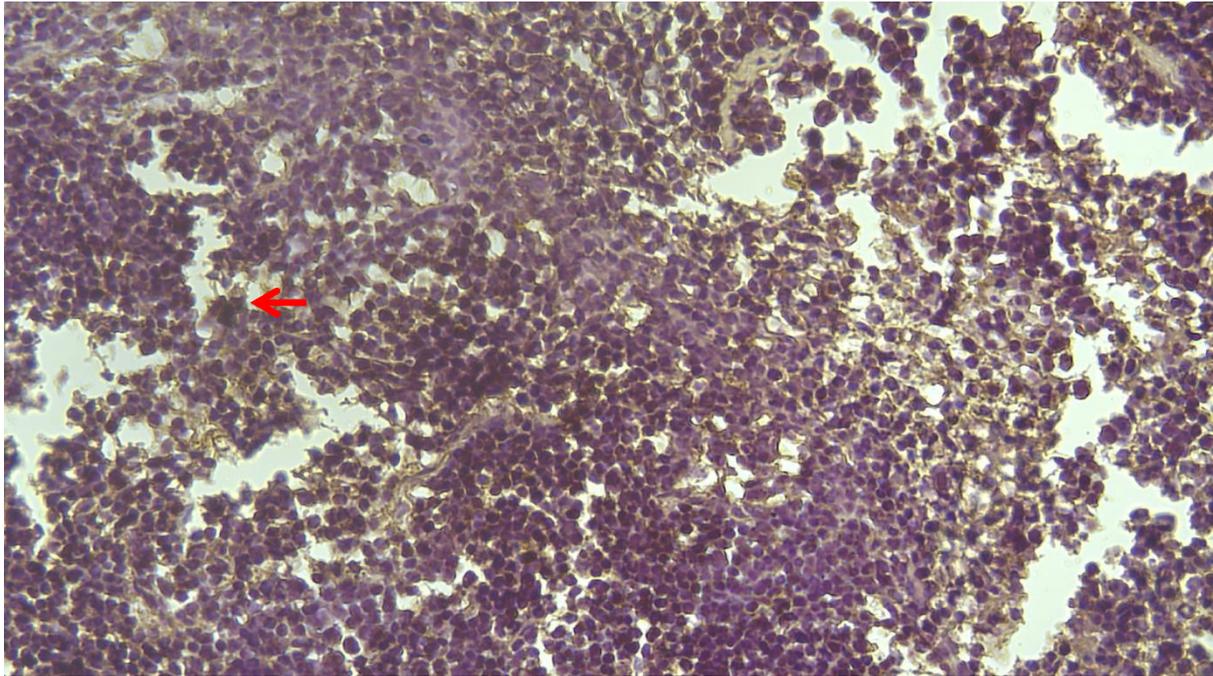
**Gambar 4.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa mencit yang Diinduksi *E. coli* pada Kelompok K+ dengan Perbesaran 400× (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 5.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa mencit yang Diinduksi *E. coli* pada Kelompok P1 dengan Perbesaran 400× (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

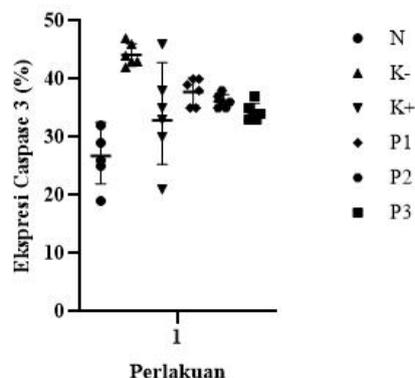


**Gambar 6.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa mencit yang Diinduksi *E. coli* pada Kelompok P2 dengan Perbesaran 400× (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 7.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa mencit yang Diinduksi *E. coli* pada Kelompok P3 dengan Perbesaran 400× (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

Berdasarkan hasil pengamatan imunohistokimia (IHK) didapatkan ekspresi caspase 3 pada limpa mencit, sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal (N) sebesar  $27,167 \pm 4,956\%$ , 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif (K-) sebesar  $44,167 \pm 1,941\%$ , 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif (K+) sebesar  $33,833 \pm 8,329\%$ , 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1 (P1) sebesar  $37,833 \pm 2,317\%$ , 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2 (P2) sebesar  $36,167 \pm 1,169\%$ , 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3 (P3) sebesar  $34,333 \pm 1,505\%$  seperti yang tertera pada Gambar 8.



**Gambar 8.** Diagram Pengaruh Ekstrak Daun Kentut terhadap Ekspresi Caspase 3 pada Mencit Model Sepsis yang Diinduksi *E. coli*

Dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap penurunan ekspresi caspase 3 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* dapat diketahui dengan melakukan analisis secara statistik dengan metode ANOVA pada tingkat kepercayaan 95%. Dari hasil analisis dengan *GraphPad Prism* versi 9.3.1 (471) menunjukkan bahwa F hitung  $10,43 > 0,0001$  (taraf 0,05), sehingga menunjukkan bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel. Hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap ekspresi caspase 3 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* dengan kata lain terdapat pengaruh antar dosis. Kelompok dosis pemberian yang mempunyai pengaruh antar dosis, dapat diketahui dengan uji lanjutan yaitu *Brown-Forsythe test* yang menunjukkan bahwa F (DFn, DFd)  $3,410 (5,30) > P \text{ value } 0,0148$  dan *Bartlett's test* yang menghasilkan nilai *Bartlett's statistic (corrected)*  $26,40$  dengan  $P \text{ value} < 0,0001$ .

Fungsi dari limpa berpusat pada sirkulasi sistemik. Limpa memiliki dua kompartemen yang secara fungsional dan morfologis berbeda, yaitu pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah adalah filter darah yang menghilangkan bahan asing dan eritrosit yang rusak, selain itu juga merupakan tempat penyimpanan untuk zat besi, eritrosit, dan trombosit. Limpa merupakan situs hematopoiesis pada mencit, terutama pada janin dan neonatal animals. Limpa juga merupakan organ limfoid terbesar yang mengandung sekitar seperempat dari limfosit dan memulai tanggapan kekebalan terhadap antigen yang ditularkan melalui darah [5,6].

Peningkatan ekspresi caspase 3 pada limpa mencit kelompok K- sangat signifikan, hal tersebut dapat dipengaruhi karena selama infeksi bakteri, faktor virulen diproduksi dan disekresikan oleh patogen dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum sel mengalami apoptosis dua jalur utama, jalur ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (jalur mitokondria) [7,8]. Reseptor *Tumor Necrosis Factor* (TNF) adalah reseptor membran sel spesifik, yang termasuk dalam *family* TNF secara kolektif dikenal sebagai reseptor kematian, termasuk TNF-reseptor 1, yang mengikat ligan spesifik, seperti TNF- $\alpha$ . Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraseluler khusus mengikuti ligan [9]. Perubahan konformasi pada domain intraseluler reseptor menunjukkan adanya “*death domain*” seperti TNFR-*associated death domain* (TRADD), yang memungkinkan rekrutmen dari berbagai protein apoptosis ke reseptor. Langkah terakhir dalam proses ini adalah rekrutmen salah satu caspase, biasanya caspase 8 ke DISC. Hal ini menyebabkan aktivasi caspase 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga bisa diasosiasikan dengan FAS-*associated death domain* (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui rekrutmen dan pembelahan procaspase 8.

Jalur ekstrinsik umumnya diperantarai oleh aktivasi reseptor kematian melalui interaksi antara ligan alaminya atau dengan menginduksi *cluster* reseptor kematian. Reseptor kematian adalah sel reseptor permukaan yang menjadi anggota keluarga TNF dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian, seperti reseptor TNF 1 (p55)/TNF dan limfotoksin. Setelah aktivasi ekstrinsik, intraseluler death domain (DD) dari *death receptor* berhubungan dengan protein adaptor yang disebut Fas-*associated death domain* (FADD) secara langsung atau tidak langsung melalui reseptor TNF-*associated death domain* [10].

*Death receptor associated*-FADD intraseluler berinteraksi dengan procaspase 8 untuk membentuk pemicu kematian sinyal kompleks yang diperlukan untuk mengaktifasi caspase 8 [10]. *Family* dari protein Bid yang menjadi *truncated Bid* (tBid), yang translokasi ke luar membran mitokondria memungkinkan hilangnya potensial transmembran mitokondria dan merangsang pelepasan sitokrom c. tBid akan menginduksi protein domain BH3 proapoptosis (Bid, Bad, Noxa, dan p53-*up-regulated* modulator apoptosis) untuk mentransfer sinyal ke mitokondria. Protein domain BH3 hanya memfasilitasi perakitan protein proapoptosis seperti Bax dan Bak, ke dalam pori-pori di luar membran mitokondria, dan mengubah permeabilitas mitokondria untuk melepaskan berbagai faktor yang menginduksi apoptosis, termasuk sitokrom c melalui transisi permeabilitas mitokondria. Secara umum pengurangan potensi transmembran mitokondria diikuti pelepasan sitokrom c yang mengikat Apaf-1 dan mempromosikan aktivasi caspase 9 dan caspase 3 [11]. Peran sentral mitokondria dalam apoptosis adalah melalui jalur intrinsik.

Setelah melepaskan protein spesifik pro-apoptosis, seperti sitokrom c, *Smac*/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi dimulai dengan aktivasi caspase 3. Jalur intrinsik terutama didominasi oleh *family* protein Bcl-2. Tujuan utama dari *family* Bcl-2 adalah untuk melepaskan sinyal apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) melalui pembukaan permeabilitas membran transisi pori-pori. Hal ini dapat tercapai melalui oligomerisasi anggota Bcl-2 proapoptosis pada membran mitokondria terluar yang berinteraksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Kelompok protein pertama yang dilepaskan adalah sitokrom c dan *Smac*/ DIABLO, dan ini adalah caspase-*dependent*, artinya mereka bekerja di hilir dari *cascade* caspase yang menyebabkan apoptosis. Tujuan utamanya adalah untuk mengikat dan mengaktifkan caspase *recruitment domain* (CARD), Apaf-1, dan procaspase 9, yang mengarah pada pembentukan apoptosome. Selanjutnya mengarah ke aktivasi caspase 9 dan selanjutnya mengaktifasi efektor caspase 3, yang menyelesaikan jalur apoptosis. Ini adalah formasi apoptosome dan aktivasi efektor caspase yang menyebabkan kejadian apoptosis, seperti kondensasi kromatin, asimetri membran plasma, dan *blebbing* seluler [12,9].

**D. STATUS LUARAN:** Tuliskan jenis, identitas dan status ketercapaian setiap luaran wajib dan luaran tambahan (jika ada) yang dijanjikan. Jenis luaran dapat berupa publikasi, perolehan kekayaan intelektual, hasil pengujian atau luaran lainnya yang telah dijanjikan pada proposal. Uraian status luaran harus didukung dengan bukti kemajuan ketercapaian luaran sesuai dengan luaran yang dijanjikan. Lengkapi isian jenis luaran yang dijanjikan serta mengunggah bukti dokumen ketercapaian luaran wajib dan luaran tambahan melalui BIMA.

**LUARAN WAJIB**

**Artikel di Jurnal Nasional Terakreditasi Peringkat 1-6**

Status Artikel : *Accepted*  
Status Penulis : *First Author*  
Nama Jurnal : Indonesian Journal of Natural Science Education (IJNSE)  
ISSN/EISSN : 2621-8747/ 2621-8755  
Lembaga Pengindek : Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Riset dan Teknologi  
Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi Republik Indonesia  
URL Jurnal : <https://jom.untidar.ac.id/index.php/ijnse>  
Judul Artikel : Efek Preventif Ekstrak Daun Kentut (*Paederia foetida* L.) terhadap Kadar Interleukin-6 pada Mencit Model Sepsis yang Diinduksi *Escherichia coli*

**LUARAN TAMBAHAN**

**Buku (Berupa Buku Ajar, Monograf, atau Buku Referensi)**

Status Buku : *Draft*  
Nama Ciptaan : Buku Sepsis: Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3  
Pemegang Hak Cipta : Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.

**Buku Referensi**

Status Buku : *Editing*  
Judul Buku : Sepsis: Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3  
Nama Penerbit : Deepublish  
URL Website Penerbit : <https://penerbitdeepublish.com/>

**E. PERAN MITRA:** Tuliskan realisasi kerjasama dan kontribusi Mitra baik *in-kind* maupun *in-cash* (untuk Penelitian Terapan, Penelitian Pengembangan, PTUPT, PPUPT serta KRUPPT). Bukti pendukung realisasi kerjasama dan realisasi kontribusi mitra dilaporkan sesuai dengan kondisi yang sebenarnya. Bukti dokumen realisasi kerjasama dengan Mitra diunggah melalui BIMA.

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

**F. KENDALA PELAKSANAAN PENELITIAN:** Tuliskan kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan, termasuk penjelasan jika pelaksanaan penelitian dan luaran penelitian tidak sesuai dengan yang direncanakan atau dijanjikan.

Kesulitan atau hambatan yang dihadapi selama melakukan penelitian dan mencapai luaran yang dijanjikan sebagai berikut:

**1. Penentuan Dosis**

Pada proposal penelitian awalnya dituliskan bahwa perlakuan hewan coba dilakukan selama 14 hari pada mencit yang telah diadaptasikan dengan variasi sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal, yaitu mencit yang tidak diberikan sonde lambung, 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif, yaitu mencit diberikan aquades, 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif, yaitu mencit diberikan ciprofloxacin, 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1, yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 0,15 mg/gBB, 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2, yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 0,30 mg/bBB, 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3, yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 0,45 mg/gBB, tetapi ternyata dosis tersebut terlalu kecil, sehingga dilakukan perubahan dosis pada ekstrak daun kentut yang digunakan, karena dikhawatirkan jika dosis terlalu kecil, maka tidak memberikan efek sama sekali pada hewan coba.

Berdasarkan hal tersebut, maka perlakuan pada hewan coba dilakukan selama 14 hari pada mencit yang telah diadaptasikan dengan variasi sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal (N), yaitu mencit yang tidak diberikan sonde lambung, 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif (K-), yaitu mencit diberikan aquades dengan volume 0,5 mL, 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif (K+), yaitu mencit diberikan ciprofloxacin dengan dosis 500 mg/kgBB dengan volume 0,26 mL, 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1 (P1), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 100 mg/kgBB dengan volume 0,5 mL, 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2 (P2), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 300 mg/kgBB dengan volume 0,5 mL, 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3 (P3), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 500 mg/kgBB dengan volume 0,5 mL.

## **2. Pembuatan Ekstrak Daun Kentut**

Proses ekstraksi daun kentut ini sebenarnya tidak susah, hanya saja beberapa alat yang dibutuhkan tidak ada di instansi sendiri, sehingga peneliti melakukannya dengan bantuan instansi lain (Materia Medica Batu). Proses pengeringan daun kentut ini dilakukan dengan cara pengeringan angin, tetapi dikarenakan di lokasi penelitian sering hujan, maka proses pengeringan daun juga agak lama. Ekstrak yang digunakan adalah ekstrak kental, karena ekstrak kental ini dianggap mengandung semua senyawa seperti flavonoid, saponin, tanin, dan lain sebagainya, sehingga penggunaannya dianggap efektif. Tetapi kelemahannya di sini adalah ekstrak kental daun kentut ini tidak larut secara homogen pada aquades, karena pengaruh perbedaan kepolarannya, sehingga untuk menghomogenkannya membutuhkan tenaga dan waktu yang ekstra.

## **3. Analisis Sampel**

Analisis sampel kadar interleukin-6 (menggunakan ELISA) dan ekspresi caspase-3 (menggunakan imunohistokimia) pada limpa mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* tidak dapat dilakukan di instansi sendiri, sehingga harus melakukan analisis sampel di instansi lain (Universitas Brawijaya). Selain itu proses analisis sampelnya harus antre terlebih dahulu, karena banyak yang melakukan analisis sampel di instansi tersebut. Proses analisis sampelnya pun lama, sehingga tidak bisa langsung sampel diantar, ditunggu untuk pengerjaan, dan pulang membawa hasil analisis, melainkan sampel diantar dahulu, kemudian peneliti kembali pulang dan menunggu kabar untuk pengambilan sampel, jika sudah diinformasikan untuk mengambil hasil analisis, barulah peneliti mengambil hasil analisis sampelnya. Hal tersebut menyebabkan biaya transportasi menjadi tinggi, karena frekuensi perjalanan ke luar kota pun tinggi, belum lagi untuk kebutuhan ketika di luar kota.

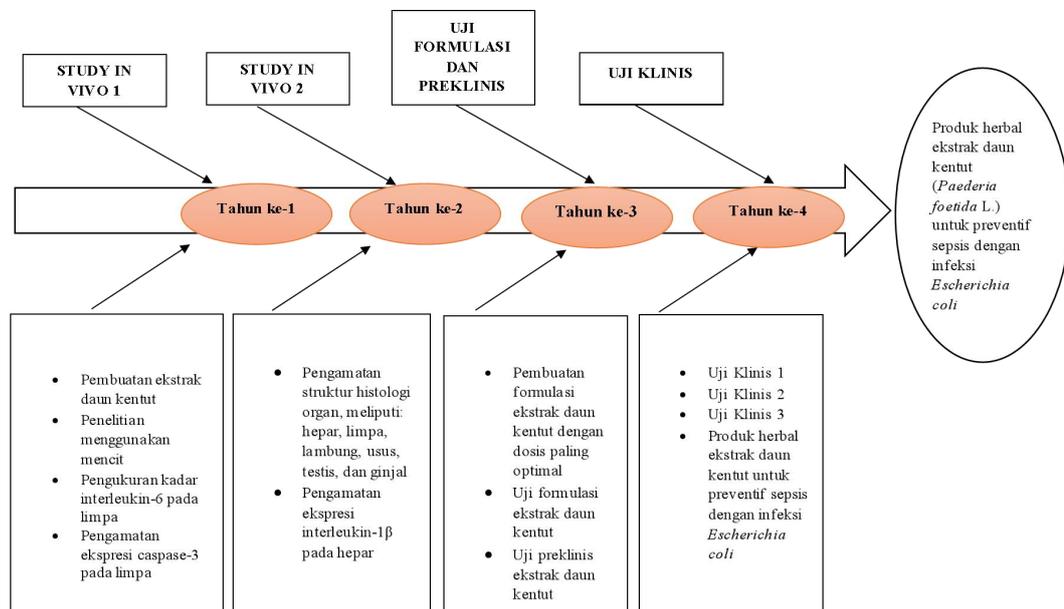
## **4. Dokumentasi *Slide* Imunohistokimia Ekspresi Caspase-3**

Dokumentasi hasil *slide* imunohistokimia untuk ekspresi caspase-3 tidak dapat dilakukan di instansi sendiri, sehingga harus dilakukan di instansi lain (Universitas Brawijaya). Hal tersebut menjadi salah satu kendala karena untuk proses dokumentasi/foto *slide* tersebut harus antre terlebih dahulu dan prosesnya pun lama dan ternyata harga foto per *slide* nya tidak sama dengan brosur awal yang dikirimkan melalui *whatsApp*, harga yang tertera pada brosur adalah Rp 5.000,00/*slide*, tetapi ternyata harganya adalah Rp 25.000,00/*slide*. Hal tersebut juga menyebabkan pembengkakan pengeluaran menjadi tidak sesuai dengan rencana anggaran belanja (RAB).

**G. RENCANA TAHAPAN SELANJUTNYA:** Tuliskan dan uraikan rencana penelitian di tahun berikutnya berdasarkan indikator luaran yang telah dicapai, rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya serta *roadmap* penelitian keseluruhan. Pada bagian ini diperbolehkan untuk melengkapi penjelasan dari setiap tahapan dalam metoda yang akan direncanakan termasuk jadwal berkaitan dengan strategi untuk mencapai luaran seperti yang telah dijanjikan dalam proposal. Jika diperlukan, penjelasan dapat juga dilengkapi dengan gambar, tabel, diagram, serta pustaka yang relevan. Jika laporan kemajuan merupakan laporan pelaksanaan tahun terakhir, pada bagian ini dapat dituliskan rencana penyelesaian target yang belum tercapai.

Rencana penelitian di tahun berikutnya adalah pengamatan struktur histologi organ, meliputi: hepar, limpa, lambung, usus, testis, dan ginjal dan pengamatan ekspresi interleukin-1 $\beta$  pada hepar. Hal tersebut dikarenakan perlunya diketahui efek pemberian ekstrak tersebut terhadap organ tubuh, sehingga bisa diketahui efek samping dari ekstrak daun kentut tersebut. Rencana realisasi luaran wajib yang dijanjikan dan tambahan (jika ada) di tahun berikutnya adalah publikasi di jurnal ber-Sinta dan *feasibility study* produk (luaran wajib) dan penerbitan buku ber-ISBN dan HKI (luaran tambahan).

*Roadmap* penelitian keseluruhan mengenai efek preventif ekstrak daun kentut (*Paederia foetida* L.) pada sepsis dengan infeksi *Escherichia coli* sebagai berikut.



**H. DAFTAR PUSTAKA:** Penyusunan Daftar Pustaka berdasarkan sistem nomor sesuai dengan urutan pengutipan. Hanya pustaka yang disitasi pada laporan kemajuan yang dicantumkan dalam Daftar Pustaka.

1. Savitri, L. & Ihsan, K. Aktivitas Triterpenoid Kulit Batang Waru Jawa (*Hibiscus tiliaceus* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kesehatan Perintis (Perintis's Health Journal)*, 7 (1) 2020: 41-50.
2. Savitri, Lisa. (2022). Perbandingan Tingkat Keganasan Bakteri Berdasarkan Lama Waktu Kematian pada Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. *Quagga: Jurnal Pendidikan dan Biologi*. 14. 67-72. 10.25134/quagga.v14i1.5065.
3. Savitri, Lisa; Maslikah, Siti & Susilowati,. (2020). Effect of red betel leaf extract (*Piper crocatum*) against interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) levels and thickness of feet oedema in *Mus musculus* (swiss strain) rheumatoid arthritis model. *AIP Conference Proceedings*. 2231. 040012. 10.1063/5.0002562.
4. Savitri, L., Sandhika, W., & Wahyu Widodo, A. D. (2019). Perbedaan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan dengan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. *Prosiding Seminar Nasional Multidisiplin*, 2(1), 300–306. Retrieved from <https://ejournal.unwaha.ac.id/indexphp/snami/article/view/705>
5. Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. (2002). The strict regulation of lymphocyte migration to

splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology*, 106: 299-307.

6. Balogh P, Horváth G, Szakal AK. (2004). Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem Cytochem.*, 52:1287-1298.
7. Jin and El-Deiry, W. S. (2005). Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2171-2181.
8. Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung C . (2007). Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis Novartis Found Symp USA.
9. Nikitakis NG, Sauk JJ, and Papanicolaou SI. (2004). The Role of Apoptosis in Oral Disease: Mechanisms; Aberrations in Neoplastic, Autoimmune, Infectious, Hematologic, and Developmental Diseases; and Therapeutic Opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 97: 476-490.
10. Ashkenazi A. and Dixit VM. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281, 1305-1308.
11. Green DR and Reed JC. (1998). Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281:1309-12.
12. Abud HE. (2004). Shaping Developing Tissues by Apoptosis. *Cell Death Differ*, 11: 3155-62.

Ringkasan eksekutif maksimum 500 kata: memberikan gambaran umum tentang isi yang terkandung dalam dokumen studi kelayakan. Bagian ini merupakan ringkasan poin penting dari detail yang terkandung dalam keseluruhan dokumen studi kelayakan dan deskripsi singkat tentang produk dan/atau jasa yang dianggap sudah melalui tahapan kajian sebelumnya.

Ringkasan: Hasil penelitian ini layak untuk dilanjutkan ke tahapan penelitian *in vivo* dengan hewan coba yang lebih tinggi, untuk selanjutnya dilakukan uji toksisitas, uji klinis, dan uji preklinisnya. Produk yang dihasilkan dari penelitian ini adalah obat herbal yang dapat digunakan sebagai tindakan preventif terhadap sepsis yang disebabkan oleh *Escherichia coli*, karena berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kentut (*Paederia foetida* L.) ini dapat menurunkan ekspresi caspase 3 sebagai caspase efektor dalam terjadinya apoptosis, sehingga hal tersebut menunjukkan ekstrak ini dapat mencegah terjadinya apoptosis pada sel. Selain itu ekstrak daun kentut juga terbukti dapat menurunkan interleukin-6 yang bertugas sebagai sitokin proinflamasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun ini dapat mencegah terjadinya inflamasi akibat sepsis.

Pasar Produk/Layanan maksimum 500 kata: menjelaskan pasar yang ada untuk produk dan/atau jasa yang sedang dikembangkan. Peneliti sebaiknya memaparkan keunggulan-keunggulan kompetitif dan komparatif produk/jasa yang sedang dikembangkan, dengan membandingkannya dengan calon pesaing, mampu menawarkan nilai yang lebih besar kepada calon konsumen dari pada yang ditawarkan pesaing, serta keunikan-keunikan tertentu dari produk/hasil penelitiannya yang sulit ditiru produsen lain, perkiraan pasar yang bisa direbut.

Pasar Produk/Layanan: Produk yang dihasilkan dari penelitian ini adalah obat herbal yang dapat digunakan sebagai tindakan preventif terhadap sepsis yang disebabkan oleh *E. coli*, karena berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun kentut ini dapat menurunkan ekspresi caspase 3 sebagai caspase efektor dalam terjadinya apoptosis, sehingga hal tersebut menunjukkan ekstrak ini dapat mencegah terjadinya apoptosis pada sel. Selain itu ekstrak daun kentut juga terbukti dapat menurunkan interleukin-6 yang bertugas sebagai sitokin proinflamasi. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak daun ini dapat mencegah terjadinya inflamasi akibat sepsis. Keunggulan dari produk ini adalah belum ada pesaingnya, karena sejauh ini belum ada obat yang mengklaim sebagai preventif sepsis, karena yang beredar di masyarakat adalah obat untuk menanggulangi sepsis, bukan untuk mencegah sepsis.

Pertimbangan Teknologi/Sosial maks 500 kata: menjelaskan pertimbangan apa saja yang dibuat oleh peneliti terkait dengan aspek teknologi, lingkungan, sosial, dan hukum. Peneliti perlu menjelaskan bahwa teknologi atau solusi teknis yang diusulkan implementatif dan kompetitif, serta apakah saat ini mereka menguasai teknologi dan keahlian teknis yang diperlukan tersebut. Peneliti perlu ~~memaparkan sumber dari teknologi yang dipakai, apakah dari internal atau~~ eksternal, serta HKI dari teknologi-teknologi tersebut. Perlu dijelaskan apakah perlu mengembangkan teknologi baru, atau cukup menggunakan teknologi yang ada, serta kemungkinan untuk membeli teknologi yang sudah ada.

Pertimbangan Teknologi/Sosial: Teknologi yang digunakan untuk produk ini adalah proses ekstraksi yang digunakan harusnya canggih dan steril, karena produk ini ditujukan untuk dikonsumsi manusia. Secara sosial produk ini lebih mudah diterima oleh masyarakat, karena daun kentut sudah biasa dikonsumsi oleh masyarakat, biasanya daun kentut ini dikenal sebagai daun sembukan yang biasa dimakan langsung sebagai pelengkap makanan.



REPUBLIK INDONESIA  
KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA

# SURAT PENCATATAN CIPTAAN

Dalam rangka perlindungan ciptaan di bidang ilmu pengetahuan, seni dan sastra berdasarkan Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta, dengan ini menerangkan:

Nomor dan tanggal permohonan : EC00202303967, 13 Januari 2023

## Pencipta

Nama : **Lisa Savitri**  
Alamat : Jalan Masjid Al Huda No. 93, RT 05 RW 02, Kelurahan Ngadirejo, Kecamatan Kota, Kota Kediri, Jawa Timur, Kediri, JAWA TIMUR, 64122  
Kewarganegaraan : Indonesia

## Pemegang Hak Cipta

Nama : **Lisa Savitri**  
Alamat : Jalan Masjid Al Huda No. 93, RT 05 RW 02, Kelurahan Ngadirejo, Kecamatan Kota, Kota Kediri, Jawa Timur, Kediri, JAWA TIMUR, 64122  
Kewarganegaraan : Indonesia

Jenis Ciptaan : **Buku**  
Judul Ciptaan : **Sepsis: Menilik Apoptosis Dari Ekspresi Caspase 3**

Tanggal dan tempat diumumkan untuk pertama kali di wilayah Indonesia atau di luar wilayah Indonesia : 13 Januari 2023, di Kediri

Jangka waktu perlindungan : Berlaku selama hidup Pencipta dan terus berlangsung selama 70 (tujuh puluh) tahun setelah Pencipta meninggal dunia, terhitung mulai tanggal 1 Januari tahun berikutnya.

Nomor pencatatan : 000436889

adalah benar berdasarkan keterangan yang diberikan oleh Pemohon.  
Surat Pencatatan Hak Cipta atau produk Hak terkait ini sesuai dengan Pasal 72 Undang-Undang Nomor 28 Tahun 2014 tentang Hak Cipta.



a.n Menteri Hukum dan Hak Asasi Manusia  
Direktur Jenderal Kekayaan Intelektual  
u.b.  
Direktur Hak Cipta dan Desain Industri

Anggoro Dasananto  
NIP.196412081991031002

Disclaimer:

Dalam hal pemohon memberikan keterangan tidak sesuai dengan surat pernyataan, Menteri berwenang untuk mencabut surat pencatatan permohonan.



Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.

# Sepsis:

Menilik Apoptosis  
dari Ekspresi Caspase 3

# **SEPSIS**

Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3

## UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

### **Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4**

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

### **Pembatasan Pelindungan Pasal 26**

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

### **Sanksi Pelanggaran Pasal 113**

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

# SEPSIS

Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3

Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.



**SEPSIS: MENILIK APOPTOSIS DARI EKSPRESI CASPASE 3**

**Lisa Savitri**

Editor :  
**Tiara Azhari**

Desain Cover :  
**Ali Hasan Zein**

Sumber :  
Penulis & Drew Hays (unsplash)

Tata Letak :  
**Zulita A.**

Proofreader :  
**A. Timor Eldian**

Ukuran :  
**xiv, 76 hlm, Uk: 15.5x23 cm**

ISBN :  
**978-623-02-5818-3**

Cetakan Pertama :  
**Januari 2023**

Hak Cipta 2023, Pada Penulis

---

Isi diluar tanggung jawab percetakan

---

**Copyright © 2023 by Deepublish Publisher**  
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang.  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau  
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**PENERBIT DEEPUBLISH**  
**(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)**

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman

Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581

Telp/Faks: (0274) 4533427

Website: [www.deepublish.co.id](http://www.deepublish.co.id)

[www.penerbitdeepublish.com](http://www.penerbitdeepublish.com)

E-mail: [cs@deepublish.co.id](mailto:cs@deepublish.co.id)

# KATA PENGANTAR

---

Puji syukur kepada Allah Swt. karena berkat rahmat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan buku ini dengan judul *Sepsis: Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3*. Penulis mengucapkan terima kasih kepada orang tua tercinta dan keluarga yang selalu memberikan doa, motivasi, dan dukungan baik moril maupun materiil kepada penulis, sehingga penulis mampu menyelesaikan buku ini. Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian buku ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu per satu.

Mengingat keterbatasan yang dimiliki, Penulis menyadari bahwa buku ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu Penulis menerima segala kritik yang bersifat membangun dan saran dari pembaca untuk dapat menyempurnakan penulisan selanjutnya. Akhir kata, Penulis menyampaikan mohon maaf apabila terdapat kesalahan dalam penulisan buku ini.

Kediri, 2 Desember 2022

Penulis

# DAFTAR ISI

---

<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB 1 PRELUDE.....</b>	<b>1</b>
<b>BAB 2 MENGENAL RESISTEN ANTIBIOTIK BETA- LAKTAMASE .....</b>	<b>6</b>
2.1. Bakteri <i>Enterobacteriaceae</i> Resisten .....	6
2.1.1. <i>Escherichiacoli</i> Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) .....	7
2.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase.....	11
<b>BAB 3 SEPSIS DAN APOPTOSIS .....</b>	<b>14</b>
3.1. Sepsis.....	14
3.1.1. <i>LPS-Induced Signaling Pathway</i> .....	14
3.1.2. <i>Nuclear Factor</i> $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan Sepsis.....	15
3.2. Apoptosis.....	16
3.2.1. Apoptosis Dependent Caspase .....	17
<b>BAB 4 KORELASI LIMPA DAN HATI PADA SEPSIS DAN SYOK SEPSIS .....</b>	<b>20</b>
4.1. Fungsi Limpa pada Sepsis dan Syok Sepsis.....	20
4.2. Fungsi Hati pada Sepsis dan Syok Sepsis .....	21
<b>BAB 5 SKETSA PAHAM DAN KONTEMPLASI PEMIKIRAN... 23</b>	
5.1. Sketsa Paham.....	23
5.2. Kontemplasi Pemikiran .....	27

<b>BAB 6</b>	<b>DAYA TARIK .....</b>	<b>28</b>
6.1.	Strategi Pendalaman .....	28
6.2.	Lapangan Pelaksanaan.....	29
6.3.	Elemen, Jumlah, dan Proses Penindaklanjutan .....	29
6.3.1.	Elemen Penindaklanjutan.....	29
6.3.2.	Jumlah Elemen Penindaklanjutan .....	29
6.3.3.	Proses Pengambilan Elemen Penindaklanjutan .....	29
6.4.	Gambaran Unsur Pemengaruh.....	30
6.5.	Jabaran Dasar Ekspikasi.....	30
6.6.	Pendukung Pelaksanaan .....	31
6.6.1.	Alat .....	31
6.6.2.	Bahan.....	31
6.7.	Perlakuan pada Hewan Coba.....	32
6.7.1.	Pemrosesan Jaringan .....	33
6.7.2.	Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus.....	33
6.8.	Skenario Tindakan.....	34
6.9.	Paradigma Konsep.....	34
<b>BAB 7</b>	<b>KUPAS TUNTAS .....</b>	<b>35</b>
7.1.	Kematian Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	35
7.2.	Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	35
7.3.	Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> .....	40
7.4.	Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	43
7.5.	<i>Differential Count</i> pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	44

<b>BAB 8</b>	<b>SEGMENT DISKUSI .....</b>	<b>47</b>
8.1.	Kematian Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	47
8.2.	Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	50
8.3.	Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	52
8.4.	<i>Diffcount</i> pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	57
<b>BAB 9</b>	<b>INTIHA .....</b>	<b>58</b>
9.1.	Inferensi.....	58
9.2.	Gagasan Usul.....	58
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>59</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>69</b>

# DAFTAR TABEL

---

Tabel 1.	Klasifikasi Beta-Laktamase pada <i>Enterobacteriaceae</i> .....	7
Tabel 2.	Data Kematian Tikus pada Jam ke 2-8 dan Jam ke 8-24 Setelah Diinfeksi Bakteri <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase.....	35
Tabel 3.	Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL, dan Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (%).....	36
Tabel 4.	Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL, dan Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (%).....	40
Tabel 5.	Data Rerata dan Simpangan Baku <i>Diffcount</i> pada Kelompok Kontrol, Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL, dan Tikus dengan Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (%).....	45

# DAFTAR GAMBAR

---

Gambar 1.	Skema rancangan.....	28
Gambar 2.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus.....	36
Gambar 3.	Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	37
Gambar 4.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 100x (GC = <i>germinal center</i> ) (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	38
Gambar 5.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 400x (LF= <i>lymphoid follicel</i> ) (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	38
Gambar 6.	Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	39
Gambar 7.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 100x (GC = <i>germinal center</i> ) (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	39
Gambar 8.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 400x (LF = <i>lymphoid follicel</i> ) (sitoplasma sel	

	berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	40
Gambar 9.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus .....	41
Gambar 10.	Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	42
Gambar 11.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 100x (PV = <i>portal vein</i> , CV = <i>central vein</i> , Si = sinusoid) (seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	42
Gambar 12.	Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah) .....	43
Gambar 13.	Grafik Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus .....	44
Gambar 14.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Neutrofil .....	45
Gambar 15.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Limfosit.....	46

# DAFTAR SINGKATAN

---

AP-1	: <i>activator protein 1</i>
BH	: <i>Bcl-2 Homology</i>
CAD	: <i>Caspase Activated Deoxyribonuclease</i>
CARD	: <i>Caspase Recruitment Domain</i>
EAEC	: <i>Enteroadgregative Escherichia coli</i>
EHEC	: <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EIEC	: <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>
EPEC	: <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
ESBLs	: <i>Extended Spectrum Beta-Lactamases</i>
ETEC	: <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
FADD	: <i>FAS-Associates Death Domain</i>
ICU	: <i>Intensive Care Unit</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon gamma</i>
IKK	: <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
iNOS	: <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRAK	: <i>IL-1 receptor associated kinase</i>
KPCs	: <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemases</i>
LBP	: <i>LPS-binding protein</i>
LPS	: <i>lipopolisakarida</i>
MBLs	: <i>Metallo-Beta-Laktamases</i>
mCD14	: <i>membrane bound CD14</i>
MODS	: <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
MOMP	: <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
MyD88	: <i>myeloid differentiation factor 88</i>
NAPK	: <i>nitrogen-activated protein kinase</i>
NDM	: <i>New Delhi metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i>
NF-IL6	: <i>nuclear factor-interleukin 6</i>
NF $\kappa$ B	: <i>nuclear factor kappa B</i>

NIK	: <i>NFκB-inducible kinases</i>
NLCR	: <i>neutrophil to lymphocyte count ratio</i>
PAMPs	: <i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
sCD14	: <i>soluble CD14</i>
SES	: <i>sel endotel sinusoidal</i>
SK	: <i>sel Kupffer</i>
tBid	: <i>truncated Bid</i>
TLR 4	: <i>Toll-like receptor 4</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRADD	: <i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF 6	: <i>TNF receptor associated factor</i>



# BAB 1

## PRELUDE

---

Sepsis adalah sindrom klinis yang terjadi akibat respons tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroba (Guntur, 2007). Sepsis adalah penyebab utama kematian di dunia dan penyebab utama kematian di *Intensive Care Unit* (ICU). Diperkirakan sekitar 1.400 pasien meninggal karena sepsis di ICU (Poeze *et al.*, 2004). Tingginya kejadian sepsis didukung oleh penelitian profesor tentang tingkat penularan sepsis di RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado menunjukkan bahwa 27,08% pasien dengan sepsis berat, 14,58% pasien dengan syok septik, dan 58,33% pasien dengan sepsis (Tambajong *et al.*, 2016).

Meskipun kemajuan dalam pengobatan, sepsis tetap menjadi masalah klinis yang penting. Peningkatan bakteri multiresisten terhadap berbagai antibiotik memperparah sepsis, sehingga membutuhkan kombinasi antibiotik dalam penatalaksanaan sepsis. Spesies *Enterobacteriaceae* patogen manusia memiliki sejumlah besar strain resisten antibiotik yang telah terdeteksi di seluruh dunia. Resistensi antibiotik yang paling umum di *Enterobacteriaceae* adalah beta-laktam, fluoroquinolones, aminoglikosida, dan baru-baru ini, resistensi terhadap polymyxins juga telah ditemukan. Resistensi beta-laktam adalah resistensi yang disebabkan oleh bakteri yang memiliki beta-laktamase, sehingga mampu menghidrolisis antibiotik beta-laktam. Beta-laktamase yang paling penting adalah *sefalosporinase*, misalnya *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) dan *carbapenemases*, misalnya *Metallo-Beta-Laktamases* (MBLs), *Klebsiella pneumoniae carbapenemases* (KPCs), dan enzim oxacillinase Oxa-48 (Kocsis and Szabo, 2013). Berdasarkan penelitian yang dilakukan di RSUP Dr. Kariadi Semarang, dari 141 pasien sepsis yang terinfeksi bakteri penghasil ESBL, diketahui 57,4% terinfeksi *Escherichia*

*coli*, 21,35% terinfeksi *Enterobacteriaceae*, dan 21,3% terinfeksi spesies *Klebsiella* (Pajariu *et al.*, 2010).

*Escherichia coli* dan *Klebsiella spp.* biasanya membawa gen beta-laktamase pada plasmidnya. Enzim ini dinamai untuk aktivitas hidrolitik *cefotaxime*, meskipun spektrumnya meliputi *sefalosporin* spektrum luas dan *aztreonam* (Paterson dan Bonomo, 2005). *Carbapenemases* adalah beta-laktamase dengan spektrum hidrolitik yang luas. Enzim ini menonaktifkan hampir semua beta-laktam terhidrolisis, termasuk karbapenem sebagai substrat tambahan yang unik (Queenan dan Bush, 2007). *Escherichia coli* yang resisten terhadap beta-laktam disebut *Escherichia coli* ESBL, sedangkan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap karbapenem disebut *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Selain memiliki enzim yang membuatnya kebal terhadap antibiotik tertentu, *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemases* juga memiliki endotoksin berupa *lipopolisakarida* (LPS).

LPS adalah komponen utama membran luar bakteri Gram-negatif. LPS adalah komponen penting dari dinding sel untuk menjaga kelangsungan hidup bakteri. LPS tidak toksik jika tetap menjadi bagian dari membran luar bakteri, tetapi menjadi toksik ketika dilepaskan dari dinding sel sebagai lipid A yang dikenali oleh sistem imun dan menyebabkan timbulnya respons inflamasi (Edwin *et al.*, 2003). Produk yang berperan penting terhadap sepsis terutama kandungan lipid A dalam LPS tersebut. LPS atau kompleks glikoprotein endotoksin merupakan komponen utama membran luar bakteri Gram negatif (Guntur, 2006). Bakteri gram negatif (terutama *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, dan *Pseudomonas aeruginosa*) dan kokus Gram positif (terutama *staphylococcus* dan *streptococcus*) paling sering diisolasi dari pasien dengan sepsis dan syok sepsis dari mikroba. Jamur yang paling umum adalah *Candida*, terhitung hanya 5% dari semua kasus sepsis (Bochud dan Calandra, 2003).

LPS yang ada dalam aliran darah akan berikatan dengan protein yang bersirkulasi dan kemudian berinteraksi dengan reseptor makrofag, limfosit dan monosit, serta sel lain dalam sistem retikuloendotelial. Hal ini menyebabkan pelepasan sitokin dan aktivasi komplemen dan jalur koagulasi. Serangkaian kejadian dapat diamati secara klinis, seperti demam,

leukopenia, hipoglikemia, hipotensi, syok, koagulasi intravaskular, dan kematian akibat disfungsi organ (Brooks *et al.*, 2003).

Translokasi bakteri merupakan bagian dari komunitas mikroba melalui lamina propria ke kelenjar getah bening mesenterika lokal dan organ lain seperti hati dan limpa (Alexander *et al.*, 1990). Apoptosis adalah proses penting dalam kematian sel spesifik organ dan kegagalan multi organ. Di hadapan translokasi bakteri, terutama sepsis, memperlambat dan menunda apoptosis neutrofil memperburuk respons imun, mendukung terjadinya *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS).

Salah satu organ yang berperan penting dalam sistem imun adalah limpa, karena fungsinya membantu membersihkan dan menyimpan sel darah merah, serta membantu mengenali dan menyerang bahan pantogen. Untuk menjaga sistem kekebalan tubuh, limpa juga membantu menjaga mikroba berbahaya keluar dari darah. Secara alami, tubuh memiliki sistem kekebalan yang menetralkan dan menonaktifkan molekul asing (molekul yang disediakan oleh virus, bakteri, dan parasit) dan menghancurkan mikroba atau sel asing (sel yang terinfeksi virus, sel dalam transplantasi organ, dan sel kanker). Sel kekebalan beredar dalam darah, limpa, sel epitel, dan jaringan ikat. Sel yang terlibat dalam respons imun adalah limfosit, sel plasma, sel mast, neutrofil, eosinofil dan sel yang berperan dalam fagositosis (Luiz dan Jose, 2005). Limfosit yang merupakan 20% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah orang dewasa terdiri limfosit T dan limfosit B yang merupakan pengendali sistem kekebalan tubuh (Guntur, 2008). Proses patologis utama dari sepsis adalah apoptosis sel efektor imun, termasuk limfosit (Chang *et al.*, 2007). Limpa terlibat dalam produksi limfosit, sehingga limpa merupakan bagian integral dari sistem kekebalan tubuh karena limfosit bertanggung jawab untuk memproduksi antibodi terhadap molekul asing.

Jika limpa rusak dan tidak dapat menjalankan fungsinya dengan baik, fungsi tersebut diambil alih oleh hati. Hati diduga mempengaruhi metabolisme dan mekanisme pertahanan inang selama sepsis. Organ ini secara aktif mengatur proses inflamasi dengan menyaring, menonaktifkan dan menghilangkan bakteri, produk bakteri (endotoksin), zat vasoaktif dan mediator inflamasi. Hati juga dirangsang untuk memproduksi dan

melepaskan berbagai sitokin, lipid bioaktif, dan protein fase akut dalam jumlah besar. Disfungsi hepatic dini terjadi dalam beberapa jam pertama sepsis dan berhubungan dengan hipoperfusi jeroan hati. Penyakit ini dapat menyebabkan peningkatan dramatis pada biomarker kerusakan hati (transaminase, laktat dehidrogenase, dan bilirubin). Disfungsi hati lanjut adalah proses yang lambat dan sulit. Proses ini ditandai dengan kerusakan struktural dan fungsional dan dapat menyebabkan limpahan bakteri, endotoksin, dan molekul inflamasi yang dapat memicu atau mempertahankan kerusakan multi-organ (Sumantri, 2012).

Apoptosis sering terlibat dalam infeksi bakteri dan patogenesis. Selama infeksi bakteri, patogen menghasilkan dan mengeluarkan faktor virulensi (terutama endotoksin) dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum, sel mengalami apoptosis melalui dua jalur utama, yaitu jalur ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (jalur mitokondria). Penghambatan pensinyalan apoptosis dianggap memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri yang disebabkan oleh sepsis.

Jalur ekstrinsik biasanya diprakarsai oleh aktivasi reseptor kematian melalui interaksi antara ligan alami atau dengan induksi pengelompokan reseptor kematian. Reseptor kematian adalah reseptor permukaan milik keluarga *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian (Lin *et al.*, 2010). Reseptor kematian memainkan peran penting dalam apoptosis, mengaktifkan *cascade caspase* dalam beberapa detik setelah pengikatan ligan. Oleh karena itu, induksi apoptosis melalui mekanisme ini sangat cepat (Ghatage *et al.*, 2013).

Mekanisme lain dari apoptosis yang bergantung pada *caspase* adalah jalur intrinsik. Apoptosis melalui jalur ini diinduksi oleh sinyal intraseluler seperti hipoksia, radiasi, infeksi virus, dan terutama kerusakan DNA. Keluarga protein Bcl-2 adalah mediator utama dari proses ini. Setelah penghilangan protein spesifik pro-apoptosis seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi diakhiri dengan aktivasi *caspase 3* (Ghatage *et al.*, 2013).

Semua *caspase* disintesis di dalam sel sebagai zimogen, yang secara katalitik tidak aktif dan harus menjalani proses aktivasi. Aktivasi *caspase* efektor (seperti *caspase 3* atau *caspase 7*) dilakukan oleh *caspase* inisiator

(seperti caspase 9). Memulai *caspases* secara otomatis diaktifkan di bawah kondisi apoptosis, sebuah proses yang sering membutuhkan dan difasilitasi oleh kompleks multikomponen, seperti apoptosome yang bertanggung jawab untuk aktivasi *caspase* 9. Peninjauan tentang *caspase* 3 dianggap penting karena *caspase* 3 adalah *caspase* efektor terpenting yang bertanggung jawab atas perubahan morfologis dan biologis yang diamati pada sel apoptosis (Ghatage *et al.*, 2013), meskipun *caspase* 6 dan 7 adalah *caspase* efektor, posisi jalur *caspase* berada pada posisi awal, sehingga masih ada kemungkinan bahwa meskipun *caspase* diaktifkan, apoptosis gagal terjadi karena pelepasan protein Bcl-2 anti-apoptosis, sehingga menghambat apoptosis.

Berdasarkan fenomena ini, diperlukan penindaklanjutan untuk menentukan peningkatan ekspresi *caspase* 3 di limpa dan hati tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Topik bahasan dalam buku ini adalah perbedaan peningkatan ekspresi *caspase* 3 pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*. Adanya buku ini diharapkan dapat bermanfaat, yakni berbagai kasus sepsis akibat infeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* diharapkan dapat diketahui tingkat keparahannya melalui peningkatan ekspresi *caspase* 3 pada limpa dan hati. Manfaat lain yang dapat diambil dari buku ini adalah dapat memberikan ilmu tentang perbedaan peningkatan ekspresi *caspase* 3 pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya untuk pengobatan sepsis yang disebabkan oleh bakteri dengan resistensi yang lebih baik terhadap beta-laktam dan *karbapenemase*, sehingga mengurangi morbiditas dan mortalitas sepsis.

## BAB 2

# MENGENAL RESISTEN ANTIBIOTIK BETA-LAKTAMASE

---

### 2.1. Bakteri *Enterobacteriaceae* Resisten

Sejumlah besar strain spesies *Enterobacteriaceae* yang kebal antibiotik yang bersifat patogen bagi manusia telah terdeteksi di seluruh dunia. Resistensi antibiotik yang paling umum di *Enterobacteriaceae* adalah resistensi terhadap beta-laktam, fluoroquinolones, aminoglikosida dan, baru-baru ini, resistensi terhadap polimiksin. Resistensi beta-laktam disebabkan karena bakteri memiliki beta-laktamase, sehingga mampu menghidrolisis antibiotik beta-laktam. Beta-laktamase yang paling penting adalah sefalosporin seperti *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) dan *Carbapenemase* Seperti *Metallo-Beta-Lactamase* (MBL), *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase* (KPC), dan *oxacillinase* Oxa-48 (Kocsis dan Szabo, 2013).

Mekanisme resistensi terhadap beta-laktam diubah permeabilitas membran luar dan pompa penghabisan. Enzim yang mengaktifkan antibiotik dapat dimodifikasi dengan asetilasi, adenilasi, atau fosforilasi. Latar belakang genetik mekanisme resistensi beragam karena dapat terjadi pada kromosom, plasmid, integron, dan transposon (Kocsis dan Szabo, 2013).

*Enterobacteriaceae* adalah Gram-negatif, berbentuk batang, berukuran 1-3  $\mu\text{m}$ , bakteri anaerob fakultatif, mendiami saluran usus manusia dan hewan, di mana hospes memiliki hubungan komensalisme dengan flora mikroba, seperti: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Providentia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* (Murray *et al.*, 2005; Paterson, 2006; Falagas and Bliziotis, 2007). Memiliki aktivitas antibakteri yang cukup besar terhadap bakteri enterik. *Enterobacteriaceae* dapat mengembangkan berbagai mekanisme untuk menghindari efek

penghambatan antibiotik dan dengan demikian mengembangkan resistensi (Murray *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2007).

Resistensi *Enterobacteriaceae* terhadap beta-laktam terutama disebabkan oleh adanya beta-laktamase. Enzim ini menonaktifkan antibiotik beta-laktam melalui hidrolisis. Ada dua klasifikasi beta-laktamase yang diketahui, Ambler dan Bush-Jacoby-Medeiros (Tabel 1). Kelas Ambler didasarkan pada homologi asam amino, di mana mereka dibagi menjadi empat kelas molekul, A, B, C, dan D. Kelas A, C, dan D termasuk beta-laktamase dengan serin di situs aktifnya, sedangkan molekul kelas B mewakili *Metallo-Beta-Laktamase* (MBLs), dan klasifikasi Bush-Jacoby-Medeiros mengklasifikasikan beta-laktam Enzim dibagi menjadi tiga kelompok utama dan 16 subkelompok. Klasifikasi didasarkan pada substrat dan penghambat (inhibitor) enzim (Bush dan Fisher, 2011; Ambler, 1980).

**Tabel 1. Klasifikasi Beta-Laktamase pada *Enterobacteriaceae***

Bush-Jacoby-Medeiros Classification	Ambler Classification	Distinctive Substrate	Inhibitor	Representative Enzyme
1	C	Cefalosporins	None	AmpC
2b	A	Penicillins, early cefalosporins	Beta-lactamase inhibitors	TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1
2be	A	Extended-spectrum cefalosporins and aztreonam	Beta-lactamase inhibitors	TEM-3, SHV-2, PER, VEB, CTX-M-15
2d	D	Cloxacillin	Beta-lactamase inhibitors	OXA-1, OXA-10
2de	D	Extended-spectrum cefalosporins	Beta-lactamase inhibitors	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	Beta-lactamase inhibitors	OXA-23, OXA-48
2f	A	Carbapenems	Beta-lactamase inhibitors	KPC, IMI, SME, NMC
3a	B	Carbapenems	EDTA	MBL

### 2.1.1. *Escherichia coli* Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL)

*Escherichia coli* adalah bakteri komensal berpotensi patogen yang merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia

(Tenailon *et al.*, 2010). Menurut Todar (2008), klasifikasi dan taksonomi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut

Kingdom : *Bacteria*  
Divisio : *Proteobacteria*  
Kelas : *Gamma Proteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*  
Famili : *Enterobacteriaceae*  
Genus : *Esherichia*  
Spesies : *Esherichia coli*

*Escherichia coli* pertama kali diisolasi dari kotoran bayi pada tahun 1885 oleh Theodore Escherich (Merchant dan Parker, 1961). Pada umumnya bakteri membutuhkan kelembaban yang cukup tinggi sekitar 85% (Madigan dan Martinko, 2005). *Escherichia coli* merupakan bakteri anaerob fakultatif dengan metabolisme fermentasi dan respirasi, namun sebagian besar tumbuh dalam kondisi anaerobik, namun beberapa *Escherichia coli* juga dapat tumbuh dengan baik dalam kondisi aerobik (Meng dan Schroeder, 2007).

Ukuran sel *E. coli* biasanya berukuran panjang 2,0–6,0  $\mu\text{m}$  dan lebar 1,1–1,5  $\mu\text{m}$ , dan bentuk selnya bulat dan sering kali berbentuk batang panjang (Melliawati, 2009). Struktur sel dari bakteri *E. coli* terdiri dari dinding sel, membran plasma, sitoplasma, flagela, nukleus (inti sel), dan kapsul. Membran sel terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *E. coli* ditutupi oleh dinding sel yang melapisi kapsul. Flagela dan *E. coli* berfilamen menonjol dari permukaan sel. Tiga struktur antigen permukaan utama yang digunakan untuk membedakan serotipe koliform adalah antigen O (antigen lipopolisakarida somatik pada dinding sel), antigen K (antigen polisakarida kapsular) dan antigen H (antigen flagellin) (Todar, 2008).

*E. coli* memiliki dinding sel yang kaku dan berpori yang berfungsi untuk membentuk sel dan bertindak sebagai pelindung. Dinding sel diklasifikasikan sebagai antigen O. *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai bakteri Gram-negatif berdasarkan komposisi dinding sel dan pewarnaannya. Bakteri gram negatif diketahui resisten terhadap penanganan fisik (bakteri mati pada suhu 60°C selama 30 menit), namun bakteri ini lebih resisten terhadap antibiotik golongan lain seperti penisilin dan streptomisin. Kapsul pada *E. coli* terbentuk akibat media pertumbuhan dan kondisi lingkungan.

Kapsul terdiri dari polisakarida atau polisakarida-protein kompleks yang melindungi membran luar dari fagositosis dan sistem komplemen. Kapsul ini diklasifikasikan sebagai Antigen *K. Flagella* dari *Escherichia coli* bersifat antigenik dan karenanya disebut antigen H, sedangkan membran sel terdiri dari beberapa lipid dan protein dalam persentase yang hampir sama, dengan lipid membentuk fase nonpolar yang berkelanjutan (Todar, 2008).

*Escherichia coli* merupakan salah satu jenis bakteri mesofilik, yaitu bakteri dengan suhu pertumbuhan optimum 15-45°C dan nilai pH 5,5-8. Suhu optimum pertumbuhan *E. coli* adalah 27°C. Menurut Hawa, dkk (2011), suhu maksimum pertumbuhan *E. coli* adalah 40-45°C, di atas suhu tersebut bakteri akan dinonaktifkan. *Escherichia coli* biasanya menjajah saluran pencernaan dan membangun hubungan mutualistik dalam beberapa jam setelah memasuki tubuh manusia, tetapi strain *Escherichia coli* non-patogen dapat menyebabkan penyakit ketika terjadi gangguan pencernaan dan immunosupresi inang.

Menurut Jawetz *et al* (1996), *Escherichia coli* dibagi menjadi lima kelompok menurut sifat dan sifat virulensinya, yaitu

1. *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), ini menyerang sel epitel mukosa usus dan menyebabkan penyakit yang menyerupai shigellosis.
2. *Enteroadgregative E. coli* (EAEC), menempel pada mukosa intestinal, menghasilkan enterotoksin dan sitotoksin, menyebabkan kerusakan mukosa, mengeluarkan banyak lendir, menyebabkan diare akut dan kronis (lebih dari 14 hari).
3. *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), adalah penyebab penting diare pada bayi, terutama di negara berkembang. Bakteri ini menempel pada usus kecil. Infeksi EPEC dapat menyebabkan diare cair yang kronis dan sulit disembuhkan.
4. *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), MENGHASILKAN eksotoksin yang labil terhadap panas (LT) dan eksotoksin yang stabil terhadap panas (ST). Infeksi ETEC dapat menyebabkan gejala sakit perut, terkadang disertai demam, muntah, dan darah pada tinja.
5. *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), serotipenya menghasilkan verotoksin yaitu EHEC O157:H7. Toksin yang dihasilkan oleh EHEC secara kualitatif mirip dengan toksin Shiga yang dihasilkan

oleh strain *Shigella dysenteriae*. Verotoksin yang diproduksi merusak dinding mukosa, menyebabkan pendarahan.

*Escherichia coli* sering digambarkan sebagai agen penyebab utama infeksi ekstraintestinal seperti meningitis neonatal, bakteremia, pielonefritis, sistitis, prostatitis, dan sepsis (Mokady *et al.*, 2005). Adhesi bakteri patogen ke sel inang adalah langkah pertama dalam membangun infeksi. Peristiwa selanjutnya termasuk kolonisasi jaringan. Proses adhesi dimulai ketika struktur permukaan yang disebut adhesin berikatan dengan ligan spesifiknya, reseptor sel inang, atau protein matriks ekstraselular (Mokady *et al.*, 2005; Bian *et al.*, 2000)

Resistensi antibiotik merupakan masalah penting pada kesehatan hewan dan manusia. Bakteri yang secara alami memiliki gen resistensi antibiotik dapat mentransfer gen tersebut ke bakteri lain. Selain itu, bakteri mampu menghasilkan enzim yang menghambat kinerja antibiotik (Aidara-Kane *et al.*, 2013). Umadevi *et al.*, (2011) mencatat bahwa perkembangan resistensi antibiotik telah menyebar secara global. Resistensi terhadap antibiotik beta-laktam umumnya terjadi pada bakteri Gram-negatif. Bakteri penghasil ESBL seperti *E. coli* dapat diisolasi dari berbagai hewan pakan yang diketahui menjadi reservoir bagi *E. coli* penghasil ESBL (Schmid *et al.*, 2013).

ESBL adalah beta-laktamase yang memberikan resistensi terhadap penisilin, sefalosporin, dan aztreonam (tetapi bukan sefamisin atau karbapenem), yang merupakan penghambatan hidrolisis antibiotik oleh beta-laktamase seperti asam klavulanat, sulbaktam, dan tazobaktam (Bush dan Fisher, 2011). Enterobacteriaceae, seperti *Escherichia coli* dan *Klebsiella spp.* membawa gen beta-laktamase pada plasmidnya. Enzim ini dinamai untuk aktivitas hidrolitik cefotaxime. Secara kolektif, enzim CTX-M diidentifikasi dan semua ESBL (Paterson dan Bonomo, 2005).

Gen untuk enzim ESBL ditemukan setelah penemuan sefalosporin spektrum luas dan pertama kali diperkenalkan ke Eropa pada 1980-an. Gen pembentuk ESBL dapat ditemukan pada isolat *E. coli* dari berbagai negara. Selain itu, ESBL adalah bentuk mutan dari TEM-1, TEM-2, dan SHV-1. Biasanya, gen pembentuk ESBL berubah dari bentuk aslinya dengan mengubah hanya 1 atau beberapa sekuens asam amino (Parasakthi *et al.*,

2001). Enzim ESBL ini telah tersebar di berbagai organisme. Enzim ini tidak hanya dapat menghidrolisis penisilin, tetapi juga antibiotik terbaru, sefalosporin kelompok 3 dan monolaktam. *E. coli* penghasil ESBL dapat ditemukan pada manusia, ternak dan hewan liar, pada jaringan saluran pencernaan, dan pada jaringan urin yang terinfeksi (Schauffler *et al.*, 2015).

Studi dengan bakteri ESBL menunjukkan bahwa penundaan kemoterapi antimikroba yang memadai dapat menjadi faktor penting dalam kematian (Rottier *et al.*, 2012; Schwaber dan Carmeli, 2007; Tumbarello *et al.*, 2007). Efek ini tampaknya paling menonjol pada kondisi syok sepsis atau kegagalan organ (Kumar *et al.*, 2009).

### **2.1.2. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase**

Bakteriolog Jerman Edwin Klebs (1834-1913) pertama kali mempelajari dan menamai *Klebsiella*. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini antara lain bronkopneumoniae dan pneumonia. Hampir semua pneumonia disebabkan oleh bakteri ini. *Klebsiella pneumoniae* hadir di saluran pernapasan dan feses sekitar 5% individu normal dan dapat menyebabkan pneumonia bakterial (Patrick, 2005; Elmer, 2006).

*Klebsiella sp* merupakan bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* yang dapat ditemukan pada traktus gastrointestinal dan traktus respiratori. Beberapa spesies *Klebsiella* antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Pada manusia, *Klebsiella pneumoniae* hadir dalam sistem pernapasan dalam bentuk saprofit, membentuk 5% kotoran manusia normal, di mana 1% di antaranya dapat menyebabkan pneumonia. *Klebsiella* adalah bakteri anaerob fakultatif berdasarkan kebutuhannya akan oksigen.

*Klebsiella sp* adalah bakteri berbentuk batang pendek tanpa spora dan tanpa flagela. Bakteri *Klebsiella* memecah laktosa in vivo atau in vitro dan membentuk kapsul, dan koloninya berlendir. Kapsul *Klebsiella sp* terdiri dari antigen O, liposakarida yang terdiri dari unit polisakarida berulang. Polisakarida O-spesifik mengandung gula unik. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol, dan dapat dideteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O sebagian besar adalah IgM. Antigen kedua adalah antigen K, yang terletak di luar antigen O dan merupakan polisakarida kapsular.

Antigen K dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O dan berhubungan dengan virulensi. Kedua antigen meningkatkan patogenisitas *Klebsiella sp.* Klasifikasi dan taksonomi *K. pneumoniae* sebagai berikut.

Kingdom : *Bacteria*  
Divisio : *Proteobacteria*  
Kelas : *Gamma Proteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*  
Famili : *Enterobacteriaceae*  
Genus : *Klebsiella*  
Spesies : *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* adalah bakteri Gram-negatif, berukuran 2,0-3,0x0,6 µm, flora normal usus dan saluran pernapasan, anaerob fakultatif. *K. pneumoniae* memiliki kapsul yang besar, sehingga biakan koloni tampak berlendir (mukoid). *K. pneumoniae* menyebabkan infeksi paru-paru seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, dan sepsis pada pasien dengan sistem kekebalan yang lemah (Brooks *et al.*, 2005).

Faktor yang terkait dengan virulensi *Klebsiella pneumoniae* termasuk serotipe kapsuler, lipopolisakarida, sistem ironscavenging, adhesin fimbrial dan non-fimbrial. Kapsul polisakarida yang mengelilingi *K. pneumoniae*, yang melindungi dirinya dari fagositosis dan aksi bakterisidal oleh serum, dapat dianggap sebagai penentu virulensi *K. pneumoniae* yang paling penting (Brisse *et al.*, 2009).

Isolat rumah sakit seringkali menunjukkan fenotipe yang resisten terhadap antibiotik, sedangkan isolat yang resisten dan unsur-unsur genetik juga dapat menyebar ke masyarakat, salah satunya adalah *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotik carbapenem. Infeksi nosokomial disebabkan oleh beragam jenis *Klebsiella pneumoniae*, yang lebih bersifat oportunistik daripada patogen sebenarnya karena terutama menyerang pasien dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah. Sebaliknya, infeksi komunitas serius yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* menyerang orang sehat. *Klebsiella pneumoniae* secara historis digambarkan sebagai agen penyebab pneumonia Friedlanders, pneumonia lobar yang parah dengan tingkat kematian yang tinggi. *Klebsiella pneumoniae* tetap menjadi

salah satu penyebab utama pneumonia yang didapat masyarakat di beberapa negara (Brisse *et al.*, 2009).

*Carbapenemase* adalah beta-laktamase dengan spektrum hidrolitik yang luas. Enzim ini menonaktifkan hampir semua beta-laktam terhidrolisis, termasuk karbapenem sebagai substrat tambahan yang unik (Queenan dan Bush, 2007). Karbapenem termasuk dalam kelas Ambler A, B dan D dari beta-laktamase (Ambler, 1980). Di kelas A, *karbapenemase* utama adalah KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), terdeteksi terutama pada plasmid dari *Klebsiella pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001; Nordman *et al.*, tahun 2011). Sampai saat ini, enzim KPC memiliki 15 varian asam amino yang berbeda dan memiliki aktivitas hidrolitik terhadap sefalosporin spektrum luas, karbapenem, dan aztreonam (Bush dan Fisher, 2011).

## BAB 3

# SEPSIS DAN APOPTOSIS

---

### 3.1. Sepsis

#### 3.1.1. LPS-Induced Signaling Pathway

Aktivasi sistem kekebalan dan inflamasi merupakan respons terhadap rangsangan infeksi dan non infeksi. Bakteri gram negatif dan positif adalah agen-agen kausatif. Infeksi merangsang respons imun pada innate, biasanya di mediasi oleh sirkulasi dan sel inflamatori jaringan seperti monosit/makrofag dan neutrofil. Sel-sel ini biasanya ditemukan dalam sistem peredaran darah dan jaringan dan dapat diaktifkan dengan cepat sebagai respons terhadap bakteri. Sel-sel ini menghasilkan mediator inflamasi, yang dapat sangat aktif dalam fagositosis, dan juga dapat meningkatkan kerusakan jaringan yang disebabkan oleh mediator inflamasi yang diproduksi oleh sitokin dan kerusakan yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Mekanisme molekuler yang terjadi karena pelepasan mediator inflamasi dan ekspresi gen yang dapat diinduksi oleh LPS baru-baru ini menjadi objek penelitian yang sering dilakukan (Victor *et al.*, 2005). Selama fase plasma akut, LPS berikatan dengan protein dalam bentuk LPS-binding protein (LBP). LBP sangat penting untuk munculnya respons inflamasi yang di induksi LPS. Saat ini, banyak reseptor endotoksin telah diidentifikasi, seperti  $\beta$ 2-integrin CD11/CD18, macrophage scavenger receptor for acetylated LDL, L-selectin, dan CD14. Dari ke semua reseptor tersebut, CD14 dianggap sebagai yang paling penting. Di mana reseptor ini ditemukan dalam dua bentuk, yaitu membrane bound CD14 (mCD14) dan soluble CD14 (sCD14). LPS juga dapat berinteraksi dengan transmembrane signal transduction receptor Toll-like Receptor 4 (TLR4), di mana reseptor ini berada pada kompleks accessory protein MD-2. Walaupun TLR2 dianggap

ikut berperan pada proses signaling LPS, diduga TLR4 memiliki peran kunci dalam respons imun terhadap bakteri Gram negatif pada innate. LPS yang terikat pada reseptor ini akan mengaktifkan beberapa jalur signaling intraseluler, termasuk jalur I $\kappa$ B kinase (IKK)-Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan berbagai jalur Nitrogen Activated Protein Kinase (NAPK). Jalur-jalur ini akan menfosforilasi dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi, termasuk NF $\kappa$ B/Rel protein, Activator Protein 1 (AP-1) dan Nuclear Factor-interleukin 6 (NF-IL6), yang akan menyebabkan induksi gen serta ekspresi mediator inflamasi dengan cepat, termasuk cytokines, lipid mediators, inducible nitric oxide synthase (iNOS), dan molekul adhesi. Sitokin memiliki berbagai sel target, dan tindakan spesifik sitokin ini bergantung pada stimulus, tipe sel, dan mediator dan reseptor inflamasi lainnya yang ada.

Meskipun beberapa faktor transkripsi telah diidentifikasi yang mungkin terkait dengan perubahan aktivasi gen pada sepsis, termasuk AP-1 dan NF-IL-6, NF $\kappa$ B adalah faktor yang paling baik dijelaskan. Baik studi in vitro dan in vivo telah menunjukkan peran penting NF $\kappa$ B dalam sepsis dan syok endotoksik.

### **3.1.2. Nuclear Factor $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan Sepsis**

NF $\kappa$ B adalah faktor transkripsi yang penting untuk fungsi normal sel imun dan mengatur aktivasi gen yang diperlukan untuk respons cepat, tetapi meningkatkan dan/atau memperpanjang durasi aktivasi NF $\kappa$ B akan menyebabkan ekspresi berlebih dari protein mediator dan akan menghasilkan efek yang merusak selama periode sepsis.

Jalur NF $\kappa$ B dapat bervariasi dengan efek yang berbeda pada regulasi gen, tergantung pada kombinasi spesifik yang terjadi (Abraham, 2005). NF $\kappa$ B tidak aktif dalam sitoplasma dan disertai dengan protein inhibitor yang berasal dari family I $\kappa$ B, termasuk I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , dan I $\kappa$ B $\epsilon$ . LPS akan merangsang aktivasi NF $\kappa$ B melalui mediator inflamasi, termasuk sitokin (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), ROS (terutama hidrogen peroksida), aktivator protein kinase C, virus, sinar ultraviolet, dan radiasi pengion (Barnes, 1997).

Aktivasi NF $\kappa$ B dicapai melalui fosforilasi dan degradasi protein penghambat I $\kappa$ B melalui aksi kinase spesifik, kinase penginduksi NF $\kappa$ B (NIK), IKK1, dan IKK-2 (Abraham, 2003). IKK $\alpha$  dan IKK $\beta$  dapat

memfosforilasi I $\kappa$ B in vitro, tetapi studi genetik menunjukkan bahwa IKK $\beta$  memainkan peran utama dalam aktivasi NF $\kappa$ B yang diinduksi oleh sitokin. Degradasi I $\kappa$ B terjadi melalui penambahan residu ubiquitin, diikuti oleh proses proteolitik. Setelah NF $\kappa$ B memasuki nukleus, ia dapat berikatan dengan gen target untuk memulai transkripsi, translasi, dan sintesis protein. Kompleks IKK adalah pengatur utama aktivasi NF $\kappa$ B oleh rangsangan mediator inflamasi. Ada banyak gen yang mengandung urutan spesifik untuk mengikat NF $\kappa$ B ke wilayah promoter.

Mekanisme umpan balik telah diidentifikasi yang dapat menjelaskan modulasi yang terjadi sebagai respons terhadap rangsangan awal (umpan balik positif) atau dalam aktivasi NF $\kappa$ B (umpan balik negatif) (Blackwell dan Christman, 1997). LPS dapat menginduksi sintesis mediator sitokin antiinflamasi, seperti IL-10 (serta IL-4 dan IL-13), yang akan menghambat aktivasi NF $\kappa$ B dan menekan produksi sitokin (Wang *et al.*, 2003), yang membutuhkan mekanisme penghambatan umpan balik.

NF $\kappa$ B memainkan peran sentral dalam mengatur ekspresi mediator imunomodulator yang terlibat dalam stres oksidatif dan sepsis. Beberapa penelitian pada hewan telah menunjukkan hubungan antara sepsis dan aktivasi NF $\kappa$ B dan stres oksidatif. Pada tikus, pemberian LPS ditemukan menyebabkan aktivasi NF $\kappa$ B di banyak organ, yang dikaitkan dengan peningkatan mRNA dan ekspresi protein dari berbagai sitokin yang diatur NF $\kappa$ B, termasuk di antaranya Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dan IL-6 (Victor *et al.*, 2005)

### 3.2. Apoptosis

Mekanisme molekuler apoptosis sangat dilestarikan melalui evolusi organisme yang lebih tinggi termasuk manusia dan mamalia lainnya. Banyak rangsangan fisiologis dan patologis termasuk kekurangan nutrisi, aktivasi reseptor kematian permukaan sel, bahan kimia, radiasi pengion dan aktivitas fisik dapat mengaktifkan program apoptosis. Stimulasi ini mengaktifkan jalur berbeda yang mengarah ke apoptosis (Nikitakis *et al.*, 2004).

Setelah sel menerima sinyal instruksi khusus, mereka akan mengalami apoptosis, dan sel mengalami perubahan yang khas. Keluarga protein yang disebut *caspases* biasanya diaktifkan pada tahap awal apoptosis. *Caspases*

juga mengaktifkan enzim, seperti DNases, yang mulai memotong DNA di dalam nukleus. Sel-sel apoptosis menunjukkan morfologi khas selama apoptosis. Biasanya, sel mulai menyusut setelah mitosis laminin dan aktin di sitoskeleton. Untuk memfasilitasi fagositosis oleh makrofag, sel-sel apoptosis sering mengalami perubahan membran plasma dan memicu respons makrofag. Salah satu perubahan yang terjadi adalah perpindahan fosfatidilserin dari dalam sel ke luar sel (Ghatage *et al.*, 2013).

### 3.2.1. Apoptosis Dependent Caspase

*Caspases* adalah keluarga enzim yang dilestarikan yang sangat penting untuk inisiasi dan pelaksanaan apoptosis. Istilah *caspases* berasal dari ketergantungan pada *caspases* tertentu. Semua *caspase* disintesis di dalam sel sebagai zimogen, yang secara katalitik tidak aktif dan harus menjalani proses aktivasi. Aktivasi *caspase* efektor (seperti *caspase 3* atau *caspase 7*) dilakukan oleh *caspase* inisiator (seperti *caspase 9*). Initiator *caspases* secara otomatis diaktifkan di bawah kondisi apoptosis, misalnya apoptosome bertanggung jawab atas aktivasi *caspase 9*. *Caspases* efektor, yang paling penting *caspase 3*, bertanggung jawab atas perubahan morfologis dan biologis sel apoptosis. Mereka menargetkan komponen struktural (aktin dan laminin), protein pengatur dan *Caspase Activated Deoxyribonuclease* (CAD) yang diaktifkan *caspase*. CAD bertanggung jawab atas degradasi kromosom, kromatin, kondensasi, dan pembentukan DNA dengan fragmen unik. Penyelesaian jalur eksekutif menyebabkan fagositosis di akhir apoptosis (Ghatage *et al.*, 2013).

*Caspases* adalah protease sistein. Ini adalah mediator kunci dari apoptosis. *Caspases* sangat penting untuk inisiasi dan eksekusi apoptosis. *Caspases* biasanya tidak aktif tetapi dapat diaktifkan oleh berbagai rangsangan apoptosis. Kunci pemecahan protein ini juga mengaktifkan enzim lain. Apoptosis yang bergantung pada *caspase* dibagi menjadi jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik (Nikitakis *et al.*, 2004).

#### 1. Jalur Ekstrinsik

Jalur ekstrinsik di mediasi oleh reseptor kematian. Mereka memainkan peran penting dalam apoptosis dan dapat mengaktifkan *caspase*

*cascade* dalam beberapa detik setelah pengikatan ligan. Oleh karena itu, induksi apoptosis melalui mekanisme ini sangat cepat. Reseptor TNF adalah reseptor membran sel spesifik milik keluarga TNF. Reseptor kematian diduga termasuk reseptor TNF 1, Fas, DR3, DR4, DR5, dan DR6, yang mengikat ligan spesifik seperti TNF $\alpha$ , limfotoksin, ligan Fas, dan TRAIL. Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraselular khusus (Nikitakis *et al.*, 2004).

Perubahan konformasi dalam domain intraselular reseptor menunjukkan adanya domain kematian, seperti TNFR-Associated Death Domain (TRADD), yang memungkinkan perekrutan berbagai protein apoptosis ke reseptor. Kompleks protein ini biasanya disebut sebagai *Death Inducing Signaling Complex* (DISC). Langkah terakhir dalam proses ini adalah perekrutan salah satu *caspase*, biasanya *caspase* 8. Ini mengarah pada aktivasi *caspase* 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga dapat dikaitkan dengan FAS-Associated Death Domain (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui perekrutan dan pembelahan procaspase 8 (Ghatage *et al.*, 2013).

## 2. Jalur Intrinsik

Mekanisme lain dari apoptosis yang bergantung pada *caspase* adalah jalur intrinsik, juga dikenal sebagai apoptosis yang di mediasi mitokondria. Jalur ini di induksi oleh sinyal intraselular seperti hipoksia, radiasi, infeksi virus, dan terutama kerusakan DNA. Keluarga protein Bcl-2 adalah mediator utama dari proses ini. Mengikuti pelepasan protein spesifik pro-apoptosis seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekutif dimulai dengan aktivasi *caspase* 3. Jalur intrinsik didominasi oleh keluarga protein Bcl-2. Keluarga Bcl-2 memiliki sebanyak 4 domain yang di konservasi yang dikenal sebagai Bcl-2 Homology (BH). Keluarga Bcl-2 termasuk anggota proapoptosis dan antiapoptosis. Anggota pro-apoptosis dapat dibagi lagi menjadi protein multidomain (juga dikenal sebagai keluarga Bax), termasuk Bax, Bok, dan Bak, dan protein khusus BH-3, seperti Bid, Bad, dan Bim. Dalam sel normal, Bax hadir dalam sitosol. Kedua protein mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka menjadi aktif setelah stimulasi apoptosis. Anggota keluarga Bcl-2 antiapoptosis mengandung 4

domain yang di konservasi, seperti Bcl-2 dan Bcl-xl. Bcl-2 hanya ada di membran intraselular dan sitosol. Protein ini bertindak dengan mencegah apoptosis melalui heterodimerisasi dan ekspresi protein pro-apoptosis.

Tujuan akhir dari keluarga Bcl-2 adalah untuk melepaskan faktor pensinyalan apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dengan membuka pori transisi membran permeabel. Hal ini dicapai melalui oligomerisasi anggota pro-apoptosis Bcl-2 di membran luar mitokondria, interaksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Ini melepaskan dua kelompok protein pro-apoptosis dari ruang antarmembran ke dalam sitosol. Kelompok pertama dari protein yang dilepaskan adalah sitokrom c, Smac/DIABLO, dan HtrA2/Omi, yang bergantung pada *caspase*, artinya mereka bertindak di hilir *cascade caspase* yang mengarah ke apoptosis. Peran utamanya adalah mengikat dan mengaktifkan Apaf-1 dan procaspase 9, yang mengarah pada pembentukan badan apoptosis. Ini menghasilkan aktivasi *caspase* 9, diikuti oleh aktivasi efektor *caspase* 3 dan *caspase* 7, sehingga menyelesaikan jalur apoptosis (Abud, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004).

## BAB 4

# KORELASI LIMPA DAN HATI PADA SEPSIS DAN SYOK SEPSIS

---

### 4.1. Fungsi Limpa pada Sepsis dan Syok Sepsis

Limpa adalah kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam suatu organisme, dan karena mengandung banyak fagosit, limpa merupakan alat pertahanan penting terhadap mikroba yang memasuki sirkulasi. Selain itu, limpa merupakan satu-satunya organ yang memiliki kemampuan menyaring darah, sehingga limpa memiliki fungsi sistem imun dan sistem hematopoietik (Junqueira, 1995).

Fungsi sistem imun meliputi produksi limfosit, produksi antibodi dan perpindahan antigen dari darah, sedangkan fungsi sistem hematopoetik adalah pembentukan sel darah fetus, destruksi eritrosit dan platelet yang sudah tua, rusak, dan abnormal dalam sinus venosus pulpa merah, serta sebagai tempat penyimpanan eritrosit (reservoir) yang elastis dan terkendali yang mampu mengeluarkan sel darah ke dalam sirkulasi serta menyesuaikan volume sirkulasi (Junqueira, 1995).

Limpa berwarna merah keunguan karena banyaknya darah yang disimpan, dan lunak serta mudah ruptur. Limpa ditutupi oleh simpai padat jaringan ikat, dan trabekula membagi parenkim atau limpa menjadi kompartemen (Leeson, *et al.*, 1996). Limpa juga mengandung sejumlah besar limfosit dan sejumlah besar makrofag yang memantau darah. Strukturnya terdiri dari serat, sel *reticular meshwork*, kapsul fibrosa, dan trabekula yang mengandung miofibroblas kontraktile (Junqueira, 1995).

Parenkim limpa terdiri dari pulp merah, yang terdiri dari struktur memanjang, korda Bilroth yang terletak di antara sinusoid. Pulp merah mengandung sel plasma, makrofag, trombosit, granulosit, dan limfosit. Trombosit dan eritrosit tua, rusak, atau abnormal dihancurkan

(hemocatheresis). Sel darah merah (eritrosit) dihancurkan oleh fagosit, dan besi yang diturunkan dari hemoglobin disimpan di dalam sel. Besi dilepaskan saat hemoglobin baru perlu dibentuk (Leeson *et al.*, 1996).

Pulpa putih terdiri dari jaringan limfoid yang menutupi arteri sentral, yang disebut periarteriolar lymphoid sheath (PALS), dan nodulus limfatikus yang ditambahkan pada selubung. (Junqueira, 1995; Leeson, *et al.*, 1996). Limfosit T terdapat di sekitar arteri sentral, sedangkan limfosit B terdapat pada nodulus limfatikus (Leeson, *et al.*, 1996). Jika ada benda asing di dalam darah maka akan merangsang limfosit T dan limfosit B untuk menghasilkan antibodi (Junqueira, 1995). Daerah perbatasan pulpa merah dan pulpa putih disebut Zona Marginalis yang terdiri atas banyak sinus dan jaringan ikat longgar (Leeson, *et al.*, 1996).

Fungsi limpa berpusat pada sirkulasi sistemik. Limpa memiliki dua kompartemen yang berbeda secara fungsional dan morfologis, pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah adalah penyaring darah yang menghilangkan benda asing dan sel darah merah yang rusak dan merupakan tempat penyimpanan zat besi, sel darah merah dan trombosit. Limpa adalah tempat hematopoiesis pada tikus, terutama pada janin dan hewan yang baru lahir. Limpa juga merupakan organ limfoid terbesar, mengandung sekitar seperempat dari semua limfosit dan memulai respons imun terhadap antigen yang dibawa darah (Nolte *et al.*, 2002; Balogh *et al.*, 2004).

#### **4.2. Fungsi Hati pada Sepsis dan Syok Sepsis**

Hati diperkirakan mempengaruhi mekanisme metabolisme dan pertahanan tuan rumah selama sepsis. Organ ini secara aktif mengatur proses inflamasi dengan menyaring, menonaktifkan, dan menghilangkan bakteri, produk bakteri (misalnya endotoksin), zat vasoaktif, dan mediator inflamasi. Selain itu, hati yang terstimulasi sendiri memproduksi dan melepaskan berbagai sitokin, lipid bioaktif, dan protein fase akut dalam jumlah besar.

Disfungsi hepatic dini terjadi dalam beberapa jam pertama sepsis dan berhubungan dengan hipoperfusi hepatosplanknik. Penyakit ini dapat menyebabkan peningkatan akut penanda-penanda biologis kerusakan hati (transaminase, dehidrogenase laktat, bilirubin). Namun, mereka biasanya pulih dengan cepat dengan perawatan suportif yang memadai. Sebaliknya,

disfungsi hati lanjut adalah proses yang lebih lambat dan lebih parah. Proses ini ditandai dengan kerusakan struktural dan fungsional dan dapat menyebabkan pelepasan bakteri, endotoksin, dan molekul inflamasi yang dapat memulai atau mempertahankan kerusakan multiorgan.

Disfungsi hepatic awal dan akhir dikaitkan dengan perubahan global dalam perfusi hati dan mikrosirkulasi. Sepsis dapat menyebabkan perubahan besar pada mikrosirkulasi semua organ dalam yang tidak dapat diprediksi dari perubahan aliran darah regional atau sistemik. Redistribusi sirkulasi intrahepatik mengalirkan darah dari pembuluh darah yang berkontraksi ke pembuluh darah yang terdilatasi, menyebabkan terjadinya penurunan daerah total sinusoidal yang terperfusi. Sel endotel sinusoidal hati (SES) dan sel Kupffer (SK) merupakan jalur utama kontak untuk bakteri, produk bakteri, dan debris mikrobial, yang diangkut oleh darah portal dan arteri hepatica. Respons mikrovaskular hati terhadap zat-zat ini berkorelasi dengan status aktivasi, jumlah, dan distribusi SK di lobulus hepar. Setelah terstimulasi, SK melepaskan berbagai mediator inflamasi, toksik, dan vasoaktif, yang semuanya menyebabkan kerusakan jaringan secara langsung atau tidak langsung.

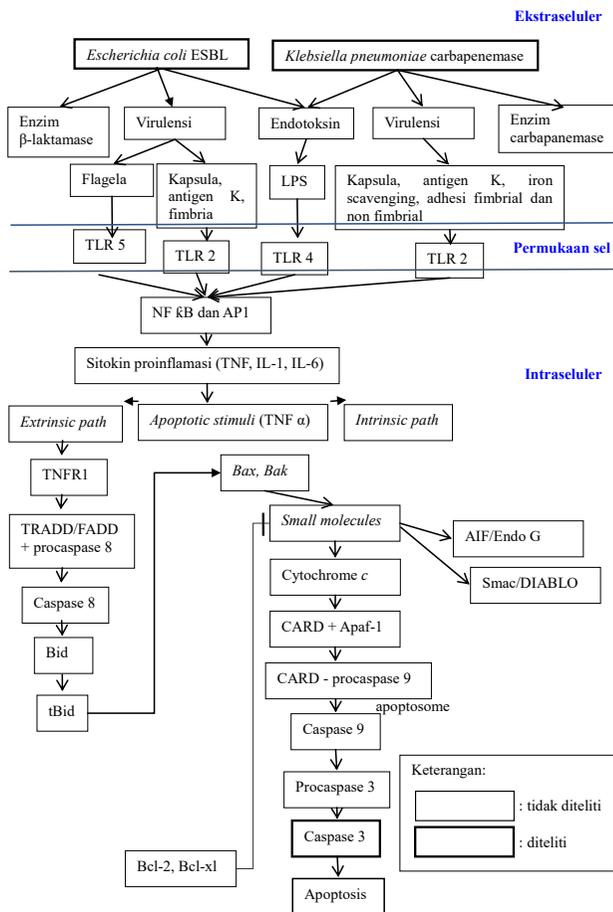
Sel endotel sinusoid hati menghasilkan zat vasoaktif, seperti prostasiklin dan oksida nitrat, yang mengatur tonus pembuluh darah dalam makrosirkulasi hati dan mikrosirkulasi. Di sisi lain, SES telah mengalami perubahan struktural dan fungsional yang signifikan. Pembengkakan, distensi, dan penghancuran SES menyebabkan kebocoran albumin, plasma, dan sel inflamasi ke dalam interstitium, mengakibatkan kerusakan jaringan secara langsung. Sel endotel sinusoid kehilangan sifat antikoagulannya dan mengekspresikan molekul adhesi permukaan, yang menarik sejumlah besar trombosit dan leukosit. Akhirnya, sinus tersumbat oleh gumpalan fibrin dan kumpulan sel darah merah. Pengurangan aliran darah yang dihasilkan akan memperburuk keadaan hipoperfusi sinusoidal. Dalam keadaan inflamasi yang tidak terkontrol dan koagulopati persisten, proses di atas menyebabkan iskemia dan disfungsi mikrovaskular, yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan dan kegagalan hepatoselular (Ardie dan Pinsky, 2000; Ramalho, et al., 2006; Spapen, 2008).

# BAB 5

## SKETSA PAHAM DAN KONTEMPLASI PEMIKIRAN

---

### 5.1. Sketsa Paham



Tujuan penindaklanjutan untuk menghitung jumlah apoptosis dan menghitung ekspresi caspase 3 pada limpa dan hati tikus yang diinjeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, keduanya merupakan bakteri yang mengandung lipopolisakarida (LPS) yang dikenali oleh sistem kekebalan sebagai *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs). *Escherichia coli* ESBL memiliki flagela, fimbria, kapsula, dan antigen K selain LPS, sedangkan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* memiliki adhesi fimbrial dan non-fimbrial, iron scavenging, kapsula, dan antigen K yang bersifat virulen. ESBL *Escherichia coli* yang digunakan dalam penelitian ini resisten terhadap beta-laktam dan *K. pneumoniae carbapenemase* resisten terhadap karbapenem. Bakteri yang disuntikkan ke tikus akan dikenali oleh Pattern Recognition Receptors (PRR), yaitu TLR2 yang terletak di permukaan sel mengenali mikroorganisme melalui polipeptida, sehingga mengenali komponen bakteri, seperti fimbria, kapsula, antigen K, adhesi fimbrial dan non-fimbrial, dan iron scavenging. Selanjutnya, TLR4 adalah reseptor untuk LPS, sedangkan TLR5 dikhususkan untuk pengenalan flagellar. Selama pengenalan struktur mikroba, pensinyalan oleh TLR mengarah pada perlekatan ligan ke permukaan sel, yang memunculkan respons dari molekul pensinyalan sitoplasma. Respons pertama adalah faktor diferensiasi myeloid protein adaptor 88 (MyD88) dan aktivasi molekul pensinyalan seperti kinase terkait IL-1 *Receptor Associated Kinase* (IRAK) dan *TNF Receptor Associated Factor* (TRAF 6). IRAK menyebabkan autofosforilasi untuk mengaktifkan molekul pensinyalan lain seperti reseptor TNF- $\alpha$  (TNF-R). Gen yang diekspresikan oleh TLRs penting untuk menghasilkan berbagai komponen respons imun bawaan, yaitu sitokin inflamasi (TNF, IL-1, IL-8 dan IL-12), *endothelial adhesion molecules* (E-selection), dan protein yang berperan dalam mekanisme pembunuhan mikroba (termasuk iNOS). Gen spesifik yang diekspresikan tergantung pada jenis sel. Faktor transkripsi, seperti *activating protein-1* (AP-1) melalui jun kinase dan nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), yang diaktifkan dan ditranslokasikan di dalam nukleus, akan merangsang produksi sitokin dan aktivitas fagositik (Abbas, *et al.*, 2000; Shizuo, 2000). Sitokin dominan yang diproduksi adalah sitokin pro-inflamasi, termasuk TNF, IL-1, dan IL-6. Sitokin yang berperan sebagai stimulator apoptosis adalah TNF $\alpha$ .

Selama infeksi bakteri, patogen menghasilkan dan mengeluarkan faktor virulensi (terutama endotoksin) dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum, sel mengalami apoptosis dalam dua cara utama, ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (mitokondria) (Jin dan El-Deiry, 2005; Ayala *et al.*, 2007). Penghambatan sinyal apoptosis ini dianggap memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri yang diinduksi sepsis (Wesche-Soldato *et al.*, 2007; Ayala *et al.*, 2007).

Reseptor TNF adalah reseptor membran sel spesifik, yang termasuk dalam family *Tumor Necrosis Factor* (TNF), secara kolektif dikenal sebagai reseptor kematian, termasuk reseptor TNF 1, yang berikatan dengan ligan spesifik, seperti TNF- $\alpha$ . Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraselular spesifik di belakang ligannya (Nikitakis *et al.*, 2004). Perubahan konformasi dalam domain intraselular reseptor menunjukkan adanya “*death domain*”, seperti TNFR-Associated Death Domain (TRADD), yang memungkinkan perekrutan berbagai protein apoptosis ke reseptor. Langkah terakhir dalam proses ini adalah perekrutan *caspase*, biasanya *caspase* 8, ke DISC. Ini mengarah pada aktivasi *caspase* 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga dapat dikaitkan dengan FAS-Associated Death Domain (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui perekrutan dan pembelahan procaspase 8.

Jalur ekstrinsik biasanya di mediasi melalui interaksi antara ligan alami reseptor kematian atau melalui induksi gugus reseptor kematian untuk mengaktifkan reseptor kematian. Reseptor kematian adalah reseptor permukaan sel yang merupakan anggota keluarga TNF dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian, seperti reseptor TNF 1(p55)/TNF dan limfotoksin. Setelah aktivasi ekstrinsik, intraselular *Death Domain* (DD) dari *death receptor* berhubungan dengan protein adaptor yang disebut Fas-Associated Death Domain (FADD) secara langsung atau tidak langsung melalui reseptor TNF-Associated Death Domain (Ashkenazi and Dixit, 1998).

FADD intraselular terkait reseptor kematian berinteraksi dengan procaspase 8 untuk membentuk kompleks pensinyalan pemicu kematian yang diperlukan untuk aktivasi *caspase* 8 (Ashkenazi dan Dixit, 1998). Family protein Bid menjadi *truncated* Bid (tBid), yang translokasinya di

luar membran mitokondria mengakibatkan hilangnya potensi transmembran mitokondria dan merangsang pelepasan sitokrom c. tBid akan menginduksi protein domain BH3 proapoptosis (Bid, Bad, Noxa, dan p53-up-regulated modulator apoptosis) untuk memberi sinyal ke mitokondria. Protein domain BH3 hanya mempromosikan perakitan protein pro-apoptosis seperti Bax dan Bak ke dalam pori-pori di luar membran mitokondria dan mengubah permeabilitas mitokondria untuk melepaskan berbagai faktor pemicu apoptosis, termasuk sitokrom c melalui transisi permeabilitas mitokondria. Secara umum, penurunan potensi transmembran mitokondria melepaskan sitokrom c, yang mengikat Apaf-1 dan mendorong aktivasi *caspase* 9 dan 3 (Green dan Reed, 1998). Peran sentral mitokondria dalam apoptosis adalah melalui jalur intrinsik.

Jalur intrinsik juga dikenal sebagai apoptosis yang di mediasi mitokondria. Jalur ini di induksi oleh sinyal intraselular, terutama kerusakan DNA. Keluarga protein Bcl-2 adalah mediator utama dari proses ini. Mengikuti pelepasan protein pro-apoptosis spesifik seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi dimulai dengan aktivasi *caspase* 3. Jalur intrinsik didominasi oleh family protein Bcl-2. Target utama family Bcl-2 adalah melepaskan sinyal apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dengan membuka pori transisi membran permeabilitas. Hal ini dapat dicapai melalui oligomerisasi anggota Bcl-2 pro-apoptosis di membran luar mitokondria yang berinteraksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Kelompok pertama dari protein yang dilepaskan adalah sitokrom c dan Smac/DIABLO, yang bergantung pada *caspase*, artinya mereka bertindak di hilir *cascade caspase*, yang mengarah ke apoptosis. Tujuan utamanya adalah untuk mengikat dan mengaktifkan *Caspase Recruitment Domain* (CARD), Apaf-1 dan procaspase 9, yang mengarah pada pembentukan apoptosom. Hal ini pada gilirannya menyebabkan aktivasi *caspase* 9 dan aktivasi efektor *caspase* 3 lebih lanjut, sehingga menyelesaikan jalur apoptosis. Pembentukan apoptosom dan aktivasi kaspase efektorlah yang menyebabkan peristiwa apoptosis seperti kondensasi kromatin, asimetri membran plasma, dan blebbing sel (Abud, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004).

## 5.2. Kontemplasi Pemikiran

Hipotesis penindaklanjutan ini terdapat dua perbedaan peningkatan, yakni jumlah apoptosis pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase, serta ekspresi caspase 3 pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase.

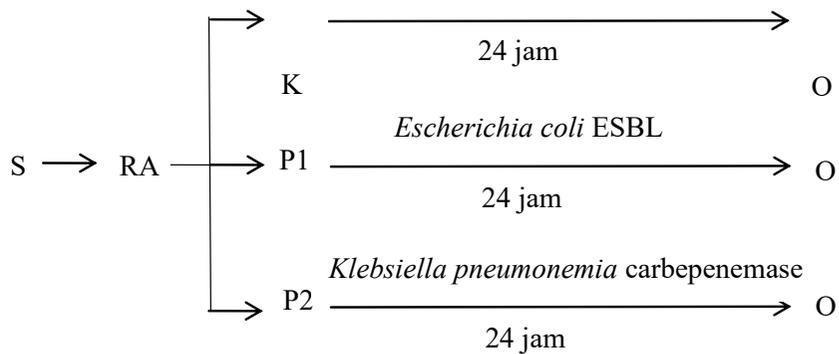
# BAB 6

## DAYA TARIK

---

### 6.1. Strategi Pendalaman

Jenis penindaklanjutan buku ini adalah murni laboratorium (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan tatanan *post test only control group design* (pengumpulan data dilakukan setelah diberikan perlakuan) dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Skema rancangan dapat digambarkan sebagai berikut.



**Gambar 1.** Skema rancangan

Keterangan:

S : Sampel

RA : Random alokasi

K : Kelompok 1, kontrol normal diinjeksi aqua pro *injection* bebas pirogen

P1 : Kelompok 2, perlakuan 1 diinjeksi *E. coli* ESBL

P2 : Kelompok 3, perlakuan 2 diinjeksi *K. pneumoniae* carbapenemase

O : Observasi

## **6.2. Lapangan Pelaksanaan**

Lokasi penindaklanjutan ini dilakukan di beberapa tempat, yang pertama yaitu Unit Hewan Coba Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya sebagai tempat pemeliharaan, perlakuan, pembedahan, pengambilan limpa, hati, dan darah, serta pembuatan hapusan darah tikus. Kedua, Laboratorium Mikrobiologi RSUD dr. Soetomo sebagai tempat mengkultur isolat klinis (*wild type*) *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Ketiga, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat pemrosesan jaringan dan pengecekan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus. Penindaklanjutan ini dilakukan kurang lebih selama 3 bulan.

## **6.3. Elemen, Jumlah, dan Proses Penindaklanjutan**

### **6.3.1. Elemen Penindaklanjutan**

Objek penindaklanjutan yang digunakan dalam buku ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur sekitar delapan sampai dua belas minggu dengan berat badan 150-200 gram yang berasal dari unit hewan coba laboratorium ilmu biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya.

### **6.3.2. Jumlah Elemen Penindaklanjutan**

Jumlah tikus dalam penindaklanjutan ini adalah 12 ekor dan terdapat 3 perlakuan. Perlakuan pada penindaklanjutan ini adalah: 1) Kelompok 1 sebagai kontrol normal, tikus disuntik aqua pro injeksi bebas pirogen, 2) Kelompok 2 sebagai perlakuan 1, tikus disuntik *E. coli* ESBL, dan 3) Kelompok 3 Kelompok sebagai perlakuan 2, tikus disuntik dengan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

### **6.3.3. Proses Pengambilan Elemen Penindaklanjutan**

Teknik pemilihan objek penindaklanjutan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengalokasian acak. Pengacakan dilakukan dengan menomori semua tikus, yaitu 1-12, kemudian mengacak jumlahnya. Empat angka pertama yang muncul digunakan sebagai grup 1, empat

angka berikutnya digunakan sebagai grup 2, dan empat angka berikutnya digunakan sebagai grup 3.

Pemilihan objek penindaklanjutan ditentukan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi meliputi tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus strain wistar, tikus jantan, tikus berumur 8-12 minggu dengan berat antara 150-200 gram, dan tikus yang digunakan dalam penindaklanjutan ini harus sehat yang ditandai dengan bulu yang mengilat, gerakannya aktif, dan tidak terdapat luka.

Sedangkan penentuan sampel yang dikecualikan, yaitu jika ada tikus dalam penindaklanjutan ini yang mati tanpa sepengetahuan penulis, menyebabkan penundaan pembedahan dan pengangkatan hati dan limpa (dengan asumsi terjadi autolisis). Jika ada tikus dalam penindaklanjutan ini yang terinfeksi sebelum menerima pengobatan. Jika tikus memiliki kelainan anatomi (cacat). Setelah diperoleh sampel yang homogen, kelompok sampel secara acak dibagi menjadi beberapa kelompok, dan setiap subjek penindaklanjutan mempunyai kesempatan yang sama untuk menduduki setiap kelompok.

#### **6.4. Gambaran Unsur Pemengaruh**

Variabel yang digunakan dalam penindaklanjutan ini terbagi menjadi 3 variabel, yakni variabel bebas, terikat, dan kendali. Variabel bebas berupa *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase, variabel terikat berupa ekspresi caspase 3, dan variabel kendali berupa umur tikus, frekuensi suntikan yang diberikan, kondisi kandang, jenis kelamin, pakan yang diberikan, serta minum yang diberikan.

#### **6.5. Jabaran Dasar Eksplikasi**

ESBL *E. coli* yang dimaksud dalam penelitian ini adalah isolat klinis (wild-type) *E. coli* ESBL yang disuntikkan secara intraperitoneal ke tikus dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase yang dimaksud dalam penelitian ini adalah *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase isolat klinis (wild type) yang disuntikkan secara intraperitoneal ke tikus dengan dosis

1x10<sup>5</sup> CFU/ml, dari diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.

Ekspresi *caspase 3* pada penelitian ini mengacu pada ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL dan terinfeksi *K. pneumoniae carbapenem* menggunakan subunit antibodi *caspase 3* p12 yang diproduksi oleh Bioss Antibodies (bs-0087R) untuk deteksi imunohistokimia, kemudian gunakan perhitungan persentase.

## 6.6. Pendukung Pelaksanaan

### 6.6.1. Alat

1. *Disposable syringe* 1 ml One Med Health Care produksi PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia, digunakan sebagai penginjeksian *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenem* pada peritonium tikus.
2. *Disposable syringe* 5 ml One Med Health Care produksi PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia, digunakan sebagai pengambilan darah jantung tikus.
3. *Urine container* 60 ml One Med Health Care produksi PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia, digunakan sebagai tempat organ hati dan limpa tikus.
4. Vaculab EDTA K3 3 ml One Med produksi PT. Jayamas Medica Industri Indonesia, digunakan sebagai penyimpanan darah jantung tikus.
5. *Rotary microtome* atau *sliding microtome*, kuas, *waterbath*, *object glass*, oven digunakan sebagai pemrosesan organ limpa dan hati tikus.
6. Mikroskop cahaya binokuler Olympus dan kamera mikroskop OptiLab sebagai pengamatan dan pendokumentasian ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus.
7. Kamera Samsung Galaxy J7 12 megapixel digunakan sebagai pendokumentasian kegiatan selama penindaklanjutan.

### 6.6.2. Bahan

1. Tikus jantan strain Wistar berusia kira-kira 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram yang berasal dari laboratorium ilmu biokimia

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya.

2. Isolat klinis (*wild type*) *E. coli* ESBL dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.
3. Isolat klinis (*wild type*) *K. pneumoniae* carbapenemase dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.
4. Physiologic Zur (PZ) yang digunakan dalam penindaklanjutan ini yakni aqua pro *injection* bebas pirogen produksi PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories Jakarta, Indonesia.
5. Pakan ternak merk Hi-Pro-Vite medicated 593 produksi PT. Charoen Pokphan Indonesia, Tbk., Surabaya, Indonesia, digunakan dalam pemeliharaan tikus.
6. Metanol, giemsa, dan aquades digunakan dalam fiksasi dan pewarnaan hapusan darah tikus.
7. Larutan  $H_2CO$  (formaldehyde) 37% produksi PT. Katalis Datesa Prima digunakan dalam larutan fiksasi organ limpa dan hati tikus.
8. *Buffer formalin*, sodium hidrogen fosfat dibasik ( $Na_2HPO_4$ ) 6,5 gram, aquadestilata 900 ml, dan *formaldehyde* 37-40%), etanol 80%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, larutan *clearing*, paraffin, poly L-Lysin, perekat jaringan digunakan dalam pemrosesan organ limpa dan hati tikus.
9. *Primary antibody* caspase 3 p12 subunit *antibody* (*host: rabbit*, target protein: caspase 3 p12 subunit, *clonality: polyclonal*, *isotype: IgG*, *entrez gene: 836*, *source: KLH conjugated synthetic peptide derived from human caspase 3 p12 subunit*, *purification: purified by protein A*) produksi Bioass Antibodies digunakan dalam pengecekan *caspase 3* oleh organ limpa dan hati tikus.

#### 6.7. Perlakuan pada Hewan Coba

Sesuai dengan tikus dengan perlakuan berikut dengan injeksi intraperitoneal: 1) Kelompok 1 digunakan sebagai kontrol normal, yaitu tikus disuntik dengan injeksi aqua pro bebas pirogen, 2) Kelompok 2 digunakan sebagai perlakuan 1, yaitu tikus disuntik *Escherichia coli* ESBL

dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml, dan 3) Kelompok 3 sebagai perlakuan 2 yaitu tikus disuntik *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml.

Hewan percobaan menunjukkan kejadian apoptosis pada limpa dan hati 24 jam setelah terpapar berbagai mikroorganisme pada sepsis, sehingga tikus dapat dibunuh setelah 24 jam untuk melihat jumlah sel apoptosis pada hati dan limpa. Jika tikus mati dalam waktu 24 jam, operasi harus segera dilakukan untuk mengangkat limpa dan hati untuk mencegah autolisis. Irisan organ diambil pada bagian tengah, kiri, dan kanan.

### 6.7.1. Pemrosesan Jaringan

Limpa tikus dan organoid hati difiksasi dalam buffer formalin dengan tujuan mempertahankan morfologi sel normal untuk mencegah autolisis dan mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur. Tahap selanjutnya adalah pembuatan blok parafin. Setelah blok parafin dibuat, sayat jaringan dengan mikrotom putar atau mikrotom geser dengan ketebalan 4-6 mikron. Sayatan yang diperoleh kemudian dihilangkan dengan kuas yang dibasahi air dan diletakkan di permukaan *waterbath*. Jaringan yang bengkak kemudian diangkat dengan *object glass* yang telah dilapisi dengan perekat jaringan, kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan ditempatkan dalam oven semalaman.

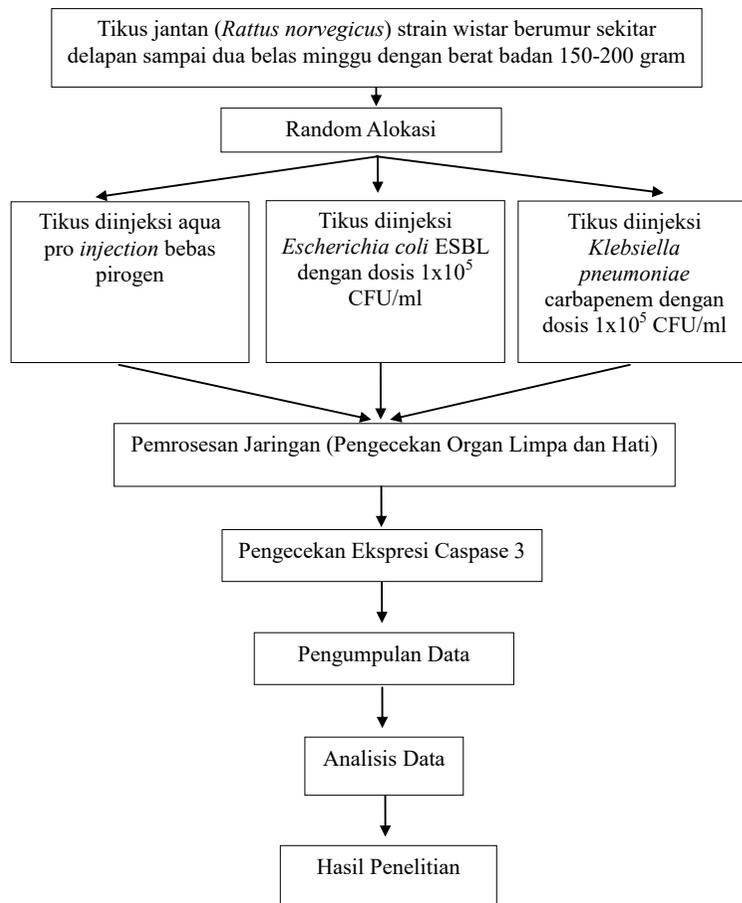
### 6.7.2. Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus

Pengamatan ekspresi *caspase 3* pada hati dan limpa tikus dilakukan dengan pengecatan menggunakan *primary antibody caspase 3 p12 subunit antibody (host: rabbit, target protein: caspase 3 p12 subunit, clonality: polyclonal, isotype: IgG, entrez gene: 836, source: KLH conjugated synthetic peptide derived from human caspase 3 p12 subunit, purification: purified by protein A)* produksi *Bioss Antibodies*. Ekspresi *Caspase 3* diamati dengan metode imunohistokimia. *Caspase 3* diekspresikan ketika sitoplasma berwarna coklat, tetapi jika sitoplasma transparan, dapat dikatakan bahwa *caspase 3* tidak diekspresikan. Ekspresi *caspase 3* dihitung dengan membagi sel pengekspresian *caspase 3* dengan semua sel yang diawetkan dan dikalikan dengan 100% untuk menyatakan data sebagai persentase.

## 6.8. Skenario Tindakan

Hasil yang diperoleh ditinjau lebih lanjut dengan menghitung besarnya pemusatan (*mean*, *median*, dan *modus*) dan titik sebar (standar deviasi dan koefisien variasi), kemudian dibandingkan antara 3 kelompok, yang pertama adalah tikus kontrol dengan tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL. Kedua, tikus kontrol dengan tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase. Ketiga, tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase. Data ditinjau lebih lanjut dengan tabel dan grafik menggunakan aplikasi Graphad Prism.

## 6.9. Paradigma Konsep



# BAB 7

## KUPAS TUNTAS

---

### 7.1. Kematian Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Menurut penelitian yang telah selesai, ditunjukkan bahwa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* memiliki tingkat kematian yang lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi ESBL *E. coli*. Di bawah ini adalah data kematian tikus pada jam ke 2-8 dan jam ke 8-24 setelah injeksi bakteri *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* (Tabel 2).

**Tabel 2. Data Kematian Tikus pada Jam ke 2-8 dan Jam ke 8-24 Setelah Diinfeksi Bakteri *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Kelompok	Tikus Hidup	Tikus Mati Jam ke 2-8	Tikus Mati Jam ke 8-24
Kontrol (n=4)	4 (100%)	0	0
<i>E.coli</i> ESBL (n=4)	4 (100%)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (n=4)	1 (25%)	0	3 (75%)

Berdasarkan Tabel 2, semua tikus yang terinfeksi *E.coli* ESBL bertahan hidup, sedangkan hanya satu mencit yang terinfeksi *K.pneumoniae carbapenemase* yang bertahan hidup lebih dari 24 jam.

### 7.2. Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

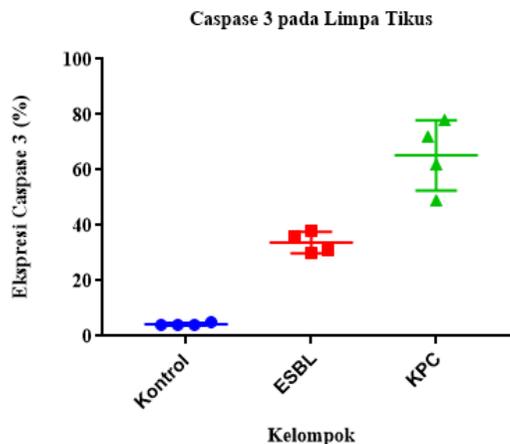
Berdasarkan penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL. Di bawah ini adalah data rata-rata dan standar deviasi (simpangan

baku) ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus kontrol, tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* (Tabel 3).

**Tabel 3. Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Infeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (%)**

Kelompok	$\bar{x} \pm SD$	Median	Max-Min
Kontrol (n=4)	4,25±0,5	4	5-4
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	33,75±3,862	33,5	38-30
<i>K. pneumoniae carbapenemase</i> (n=4)	65,25±12,69	67	78-49

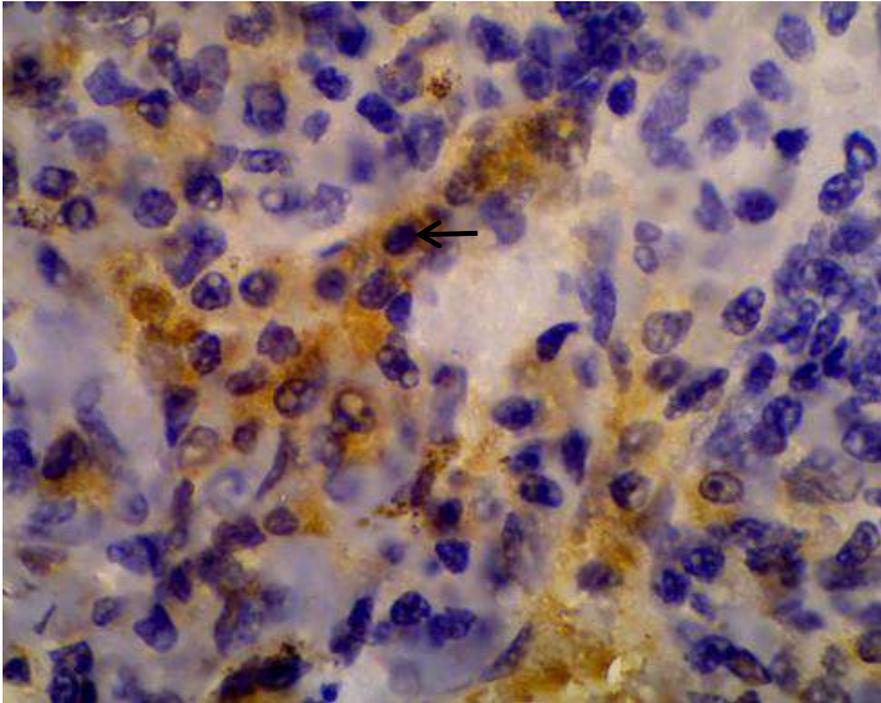
Berdasarkan data pada Tabel 3 terlihat bahwa tingkat ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* paling tinggi yaitu 65,25±12,69%, sedangkan tingkat ekspresi *caspase 3* lebih rendah dari tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL pada limpa tikus sebesar 33,75 ± 3,862%. Perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol berdasarkan ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus ditunjukkan pada Gambar 2. Ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* ditunjukkan pada Gambar 3-8.



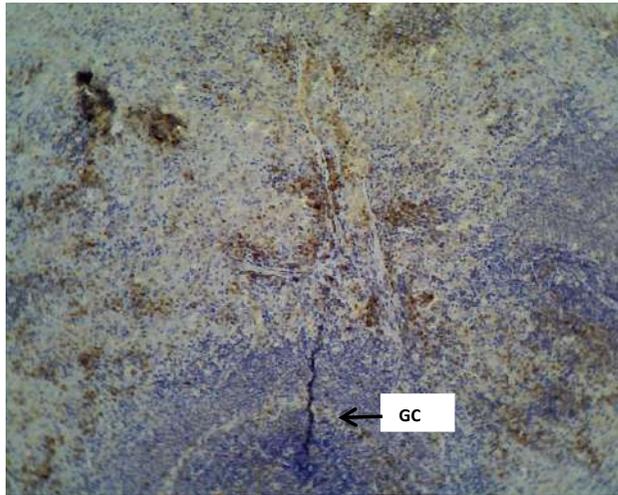
**Gambar 2. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus**

Keterangan:

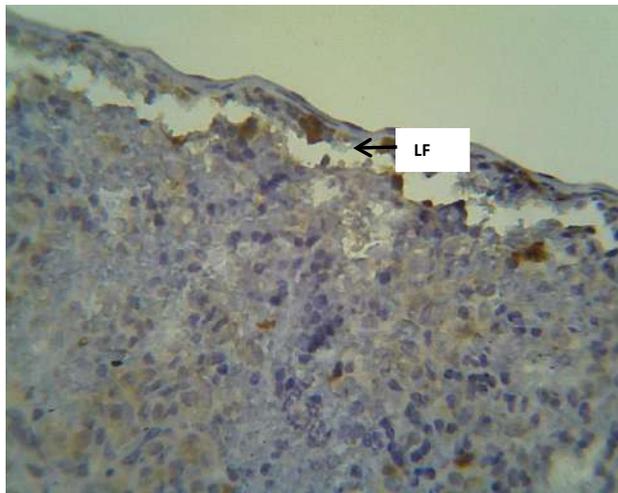
- = Ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus kontrol
- = Ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL



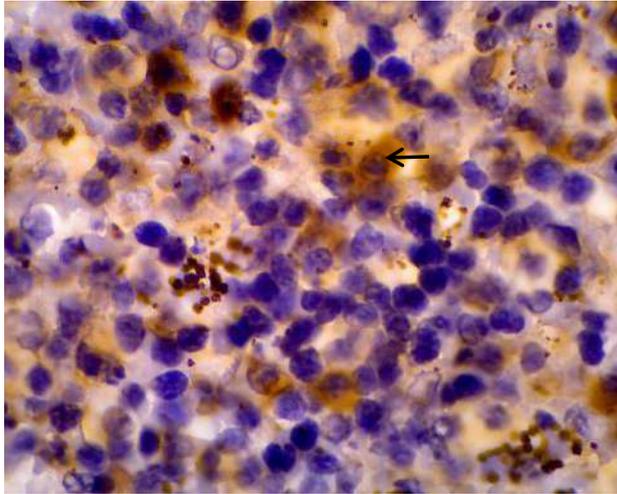
**Gambar 3.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



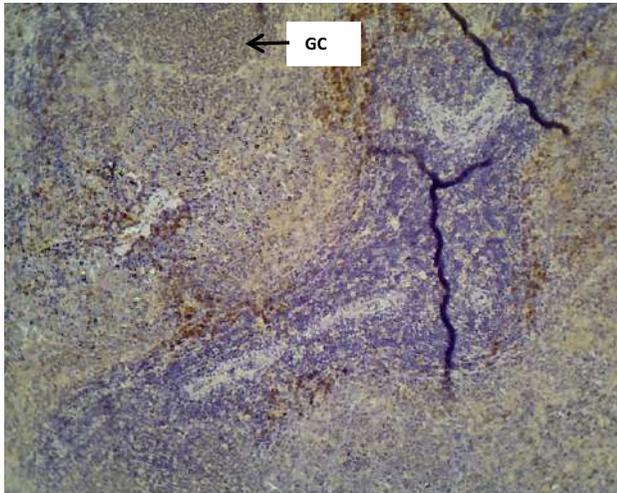
**Gambar 4.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 100x (GC = *germinal center*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



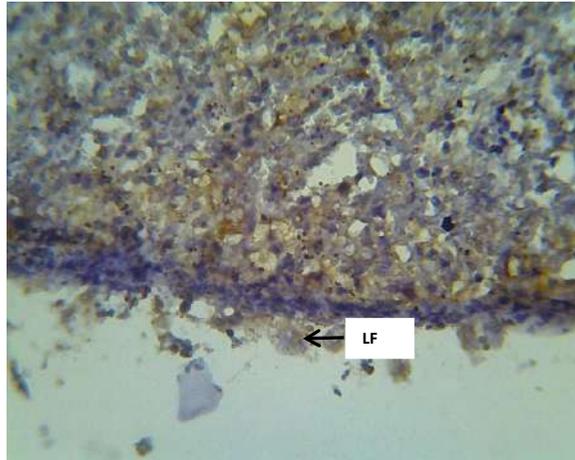
**Gambar 5.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 400x (LF= *lymphoid follicel*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 6.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 7.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 100x (GC = *germinal center*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 8.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* dengan Perbesaran 400x (LF = *lymphoid follicel*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

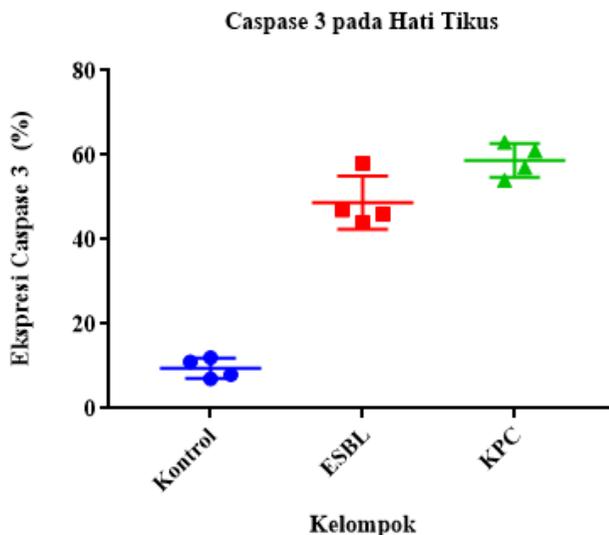
### 7.3. Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

Berdasarkan penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL. Rata-rata dan standar deviasi (simpangan baku) ekspresi *caspase 3* pada hati tikus kontrol, tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* ditunjukkan di bawah ini (Tabel 4).

**Tabel 4.** Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Infeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (%)

Kelompok	$\bar{x} \pm SD$	Median	Max-Min
Kontrol (n=4)	9,5±2,38	9,5	12-7
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	48,75±6,292	46,5	58-44
<i>K. pneumoniae carbapenemase</i> (n=4)	58,75±4,031	59	63-54

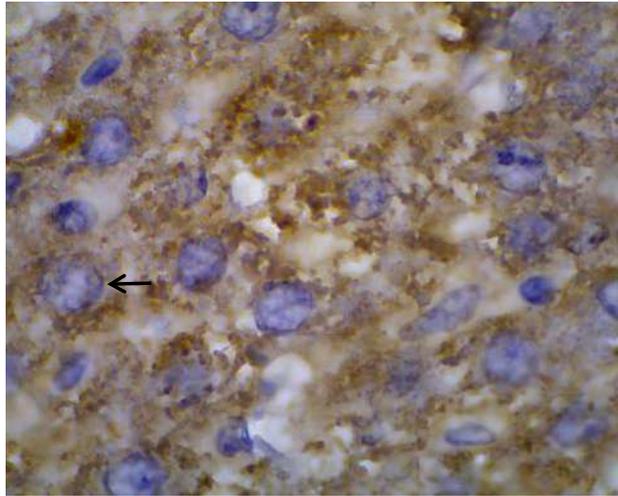
Berdasarkan data pada Tabel 4, tingkat ekspresi *caspase 3* pada kelompok *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* paling tinggi yaitu  $58,75 \pm 4,031\%$ , dan tingkat ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* paling tinggi. *Escherichia coli* ESBL adalah  $48,75 \pm 6,292\%$ . Perbedaan perlakuan dan kontrol berdasarkan ekspresi *caspase 3* pada hati tikus dapat dilihat pada Gambar 9. Ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* dapat dilihat pada Gambar 10-12.



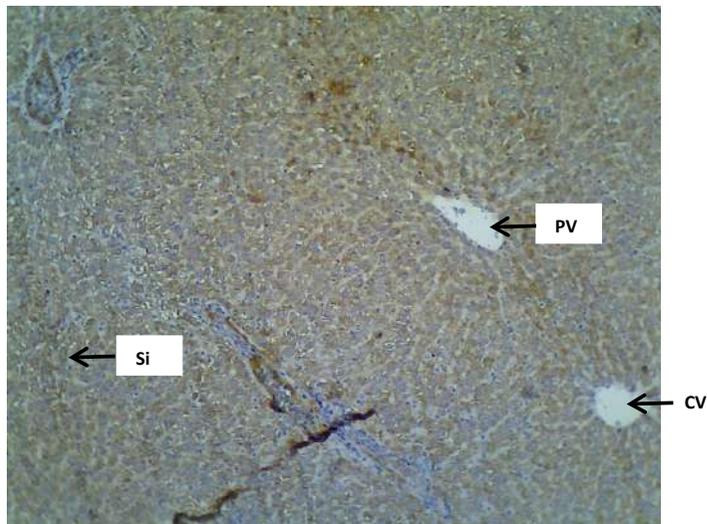
**Gambar 9.** Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus

Keterangan:

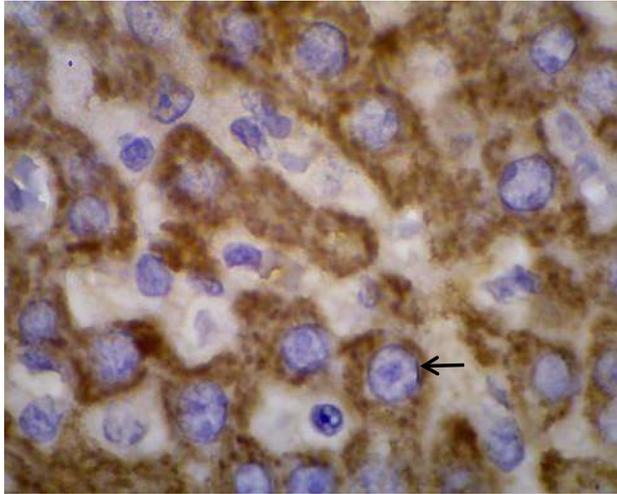
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus kontrol
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL



**Gambar 10.** Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



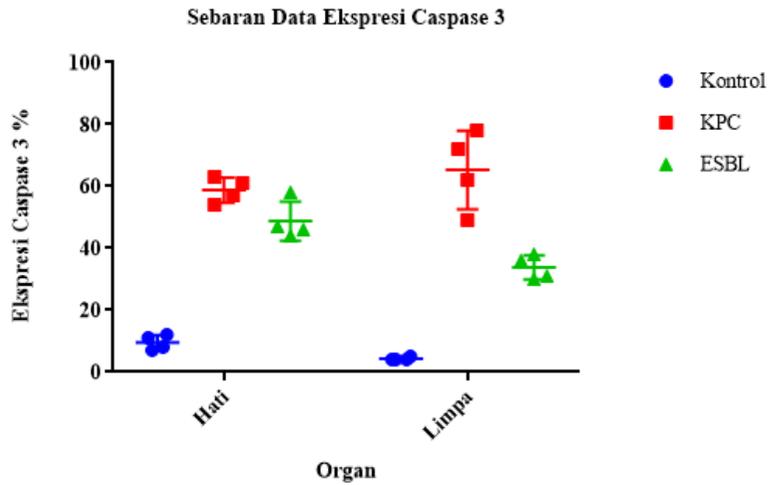
**Gambar 11.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 100x (PV = *portal vein*, CV = *central vein*, Si = *sinusoid*) (seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 12.** Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

#### **7.4. Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Menurut penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase 3* lebih tinggi pada limpa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* dibandingkan pada hati tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL. Gambar di bawah ini menunjukkan distribusi data ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati kelompok kontrol, mencit yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (Gambar 13).



Gambar 13. Grafik Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus

Keterangan:

- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus kontrol
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL

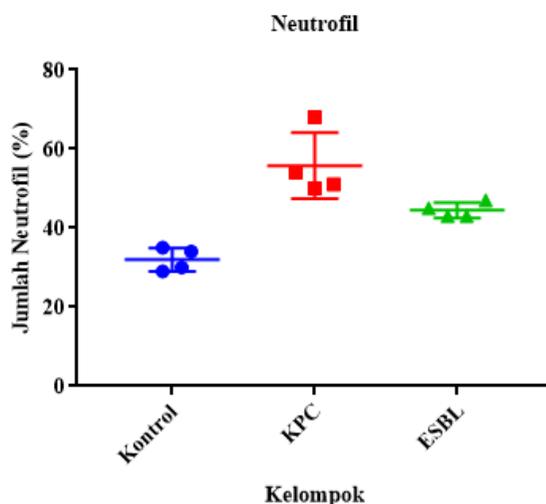
### 7.5. *Differential Count* pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Menurut penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa nilai neutrofil dan limfosit tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL yang diekstraksi dari darah tepi pada saat tikus mati (baik tikus yang mati kurang dari 24 jam ataupun tikus yang mati pada saat 24 jam). Di bawah ini adalah rata-rata dan standar deviasi diffcount untuk tikus kontrol, tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase (Tabel 5).

**Tabel 5. Data Rerata dan Simpangan Baku *Diffcount* pada Kelompok Kontrol, Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Tikus dengan Infeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (%)**

Kelompok	Neutrofil	Limfosit
Kontrol (n=4)	32,0±2,944	67,0±2,449
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	44,5±1,915	77,5±3,109
<i>K. pneumoniae carbapenemase</i> (n=4)	55,75±8,342	91,25±7,588

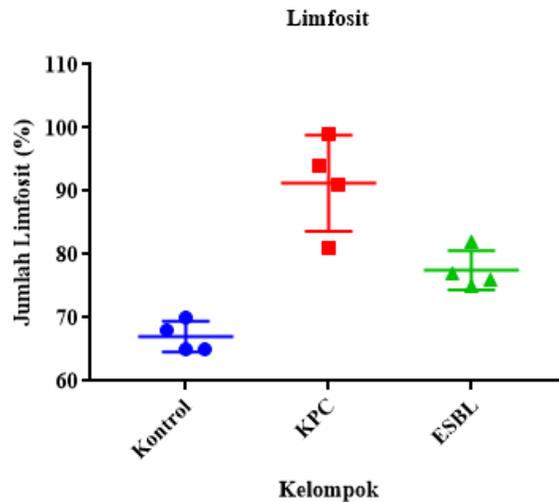
Terlihat dari data rata-rata pada Tabel 5 bahwa jumlah neutrofil pada kelompok ESBL *Escherichia coli* masih dalam nilai rata-rata normal, yaitu lebih rendah dari jumlah neutrofil pada kelompok *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* 44,5 ± 1,915%, sedangkan jumlah neutrofil pada *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* adalah 55,75 ± 8,342%. Jumlah limfosit pada kelompok *E. coli* ESBL juga memiliki rerata nilai normal yang lebih rendah dibandingkan pada kelompok *K. pneumoniae carbapenemase* yaitu sebesar 77,5 ± 3,109%, sedangkan limfosit pada *K. pneumoniae carbapenemase* sebesar 91,25 ± 7,588%. Perbedaan antara perlakuan dan kontrol berdasarkan jumlah neutrofil dapat dilihat pada Gambar 14, dan perbedaan antara perlakuan dan kontrol berdasarkan jumlah limfosit dapat dilihat pada Gambar 15.



**Gambar 14. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Neutrofil**

Keterangan:

- = Jumlah neutrofil pada kelompok tikus kontrol
- = Jumlah neutrofil pada kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Jumlah neutrofil pada kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL



Gambar 15. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Limfosit

Keterangan:

- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus kontrol
- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL

## BAB 8

### SEGMENT DISKUSI

---

#### 8.1. Kematian Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Berdasarkan data penelitian, didapatkan bahwa tikus kelompok kontrol dan tikus kelompok infeksi *Escherichia coli* ESBL bertahan selama 24 jam, sedangkan tikus kelompok infeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase hanya bertahan lebih dari 24 jam. Selain endotoksik dan gen ESBL yang dimiliki *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase*, kontributor kematian lainnya pada hewan percobaan adalah ketidakstabilan kardiovaskular dan syok septik, yang menyebabkan kematian pada infeksi gram negatif bakteri.

Bakteri *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* merupakan bakteri gram negatif dengan komposisi molekul lipopolisakarida (LPS) yang terikat dengan protein dalam bentuk *LPS-Binding Protein* (LBP). LBP sangat penting untuk munculnya respons inflamasi yang diinduksi LPS. Saat ini, banyak reseptor endotoksin telah diidentifikasi, seperti  $\beta$ 2-integrin CD11/CD18, *macrophage scavenger receptor for acetylated LDL*, *L-selectin*, dan CD14. CD14 dianggap sebagai yang paling penting. Reseptor ini ditemukan dalam dua bentuk, yaitu *membrane bound CD14* (mCD14) dan *soluble CD14* (sCD14). LPS juga dapat berinteraksi dengan *transmembrane signal transduction receptor Toll-like Receptor 4* (TLR4), yang terletak di kompleks protein aksesori MD-2. Meskipun TLR2 dianggap berperan dalam pensinyalan LPS, diduga TLR4 memiliki peran kunci dalam respon imun terhadap bakteri Gram negatif pada innate. LPS yang terikat pada reseptor ini mengaktifkan beberapa jalur pensinyalan intraseluler, termasuk jalur I $\kappa$ B kinase (IKK *Nuclear Factor*  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan berbagai jalur *Nitrogen Activated Protein Kinase* (NAPK). Jalur-jalur ini akan menfosforilasi dan

mengaktifkan berbagai faktor transkripsi, termasuk NFκB/Rel protein, *Activator Protein 1* (AP-1) dan *Nuclear Factor-interleukin 6* (NF-IL6), yang akan menyebabkan induksi gen serta ekspresi mediator inflamasi dengan cepat, termasuk *cytokines*, *lipid mediators*, *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), dan molekul adhesi. Sitokin memiliki berbagai sel target, dan tindakan spesifik sitokin ini bergantung pada stimulus, tipe sel, dan mediator dan reseptor inflamasi lainnya yang ada. Meskipun beberapa faktor transkripsi telah diidentifikasi yang mungkin terkait dengan perubahan aktivasi gen pada sepsis, termasuk AP-1 dan NF-IL-6, NFκB adalah faktor yang paling baik dijelaskan.

Menurut perkiraan global resistensi antibiotik yang diterbitkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia pada tahun 2014, *Klebsiella pneumoniae* dan *Escherichia coli* terdaftar sebagai dua dari tiga patogen yang paling memprihatinkan, terkait dengan infeksi yang didapat di rumah sakit dan masyarakat (WHO, 2014). *Escherichia coli* menghasilkan vitamin B dan K, yang menghambat pertumbuhan patogen di usus dan berubah menjadi berbagai patogen genetik dan oportunistik dengan menggabungkan gen patogenisitas dan virulensi yang berbeda, misalnya *Escherichia coli enterotoksigenik* (ETEC) dengan gen untuk toksin yang tahan panas dan panas labil toksin, *enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) dengan gen Shiga toxin I dan II dan *E. coli enteropatogenik* (EPEC) dengan gen untuk pilus berbentuk bundar. Munculnya bakteri *multidrug-resistant* (MDR), salah satunya *Escherichia coli* ESBL, yaitu bakteri yang mampu menghidrolisis cincin  $\beta$ -laktam *cephalosporins* spektrum luas (kecuali *cephamisin* dan *carbapenems*) dan *monobactams*, kemudian menginaktivasi senyawa ini (Su, *et al.*, 2016).

Beberapa keluarga gen ESBL (blaCTX-M, blaSHV, blaTEM, dan blaOXA) dikodekan pada plasmid. Peninjauan sebelumnya telah menunjukkan bahwa beberapa plasmid pembawa ESBL mempengaruhi faktor selain resistensi, seperti kemampuan strain *Klebsiella* untuk menyerang sel epitel. Plasmid ESBL ini memiliki kemampuan untuk mencegah sel dari “post-segregational killing”, sehingga bakteri selalu menjalani pemeliharaan plasmid selama replikasi. Sistem antitoksin tipe I adalah molekul RNA antisense kecil yang terutama menghambat penerjemahan mRNA toksin

atau menurunkan mRNA toksin, sedangkan protein sistem antitoksin tipe II berinteraksi dengan protein toksin pasca-translasi.

Replikasi dalam plasmid-free sel puter tipe I molekul antitoksin RNA tidak stabil (mis. sok) menurun dengan cepat, sedangkan toksin yang stabil seperti hok menginduksi pembentukan membran, yang mengganggu sintesis ATP dan selanjutnya menyebabkan kematian sel bakteri. Di antara plasmid ESBL, sistem yang paling sering muncul tidak hanya mencakup hok/sok, tetapi juga pemK/I dan ccdA/B, yang tampaknya terkait dengan CTX-M-15 dan CTX-M-9 encoding plasmid dari jenis replika IncF (Schauffer *et al.*, 2013).

*K. pneumoniae carbapenemase* memberikan perlawanan terhadap hampir semua  $\beta$ -laktam, termasuk karbapenem. Gen blaKPC tertanam dalam transposon Tn3 yang sangat mobile, Tn4401, dan telah di-genotipe terhadap sejumlah plasmid dari kelompok yang berbeda (Chavda *et al.*, 2015; Mathers *et al.*, 2015). Di antara banyak bakteri Gram-negatif yang penting secara medis, *Enterobacteriaceae* adalah anggota yang paling umum dan penting. Resistensi terhadap karbapenem pada *Enterobacteriaceae* dapat terjadi melalui sejumlah mekanisme yang berbeda, termasuk hilangnya porins, mempengaruhi permeabilitas membran luar, peningkatan regulasi sistem penghabisan dalam hubungannya dengan *hyperproduction* dari *AmpC- $\beta$ -lactamases* atau *extended spectrum- $\beta$ -lactamase* (ESBLs), dan produksi karbapenemase seperti KPC dan New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) (Chen *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2015).

Penyebab utama kematian pada tikus adalah kegagalan multi-organ. Ada hubungan yang kuat antara tingkat resistensi disfungsi organ terhadap perawatan intensif dan kemungkinan bertahan hidup, dan antara jumlah organ yang gagal dan risiko kematian. Mekanismenya melibatkan deposisi fibrin yang ekstensif yang menyebabkan oklusi mikrovaskular, produksi eksudat jaringan yang selanjutnya mengganggu oksigenasi adekuat dan gangguan hemostasis mikrovaskular yang timbul dari elaborasi zat-zat vasoaktif seperti PAF, histamin dan prostanoi. Infiltrasi seluler, terutama neutrofil, secara langsung merusak jaringan dengan melepaskan enzim lisosom dan radikal bebas turunan superoksida. TNF- $\alpha$  dan sitokin lainnya meningkatkan ekspresi nitrit oksida sintase yang diinduksi, dan peningkatan

produksi nitrit oksida selanjutnya berkontribusi terhadap ketidakstabilan vaskular dan juga depresi miokard yang terjadi pada sepsis (Aird, 2003; Elbers & Ince, 2006)

Tingkat kematian hewan percobaan tidak hanya bergantung pada jumlah endotoksin dan keberadaan gen ESBL pada bakteri, tetapi juga pada kemampuan respons tubuh hewan percobaan terhadap infeksi bakteri Gram-negatif.

## **8.2. Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Menurut hasil penindaklanjutan yang telah selesai, ditemukan bahwa ekspresi *caspase* 3 meningkat secara signifikan pada kelompok tikus yang terinfeksi ESBL E. Fungsi limpa berpusat pada sirkulasi sistemik. Limpa memiliki dua kompartemen yang berbeda secara fungsional dan morfologis, pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah adalah penyaring darah yang menghilangkan bahan asing dan sel darah merah yang rusak dan merupakan tempat penyimpanan zat besi, sel darah merah dan trombosit. Limpa adalah tempat hematopoiesis pada tikus, terutama pada janin dan hewan yang baru lahir. Limpa juga merupakan organ limfoid terbesar, mengandung sekitar seperempat dari semua limfosit dan memulai respons imun terhadap antigen yang dibawa darah (Nolte *et al.*, 2002; Balogh *et al.*, 2004).

Tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* memiliki ekspresi *caspase* 3 hati yang lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, yang mungkin dipengaruhi oleh adanya perbedaan antigen yang dimiliki oleh *K. pneumoniae carbapenemase* dengan *E. coli* ESBL. Kapsul *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* terdiri dari antigen O, yang merupakan liposakarida yang terdiri dari unit polisakarida berulang. Polisakarida O-spesifik mengandung gula unik. Antigen O tahan panas dan alkohol. Antigen kedua adalah antigen K, yang terletak di luar antigen O dan merupakan polisakarida kapsular. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O dan berhubungan dengan virulensi. Kedua antigen meningkatkan patogenisitas *K. pneumoniae carbapenemase*.

Selama infeksi bakteri, patogen menghasilkan dan mengeluarkan faktor virulensi dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum, sel mengalami apoptosis dalam dua cara utama, ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (mitokondria) (Jin dan El-Deiry, 2005; Ayala *et al.*, 2007). Reseptor TNF adalah reseptor membran sel spesifik yang termasuk dalam family *Tumor Necrosis Factor* (TNF), secara kolektif dikenal sebagai reseptor kematian, termasuk reseptor TNF 1, yang berikatan dengan ligan spesifik, seperti TNF- $\alpha$ . Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraseluler spesifik di belakang ligannya (Nikitakis *et al.*, 2004). Perubahan konformasi dalam domain intraseluler reseptor menunjukkan adanya “*death domain*”, seperti domain kematian terkait TNFR (TRADD), yang memungkinkan perekrutan berbagai protein apoptosis ke reseptor. Langkah terakhir dalam proses ini adalah perekrutan *caspase*, biasanya *caspase* 8, ke DISC. Ini mengarah pada aktivasi *caspase* 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga dapat dikaitkan dengan *FAS-Associated Death Domain* (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui perekrutan dan pembelahan procaspase 8.

Jalur ekstrinsik biasanya di mediasi melalui interaksi antara ligan alami reseptor kematian atau melalui induksi gugus reseptor kematian untuk mengaktifkan reseptor kematian. Reseptor kematian adalah reseptor permukaan sel yang merupakan anggota keluarga TNF dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian, seperti reseptor TNF 1(p55)/TNF dan limfotoksin. Mengikuti aktivasi ekstrinsik, intraseluler *Death Domain* (DD) dari *death receptor* berhubungan dengan protein adaptor yang disebut *FAS-Associated Death Domain* (FADD) secara langsung atau tidak langsung melalui reseptor *TNF-Associated Death Domain* (Ashkenazi and Dixit, 1998).

*Death receptor associated FADD* intraseluler berinteraksi dengan *procaspase* 8 untuk membentuk kompleks pensinyalan pemicu kematian yang diperlukan untuk aktivasi *caspase* 8 (Ashkenazi dan Dixit, 1998). Keluarga protein Bid menjadi *truncated* Bid (tBid), yang translokasinya di luar membran mitokondria mengakibatkan hilangnya potensi transmembran mitokondria dan merangsang pelepasan sitokrom c. tBid akan menginduksi protein domain BH3 pro-apoptosis (Bid, Bad, Noxa, dan p53-up-regulated

modulator apoptosis) untuk memberi sinyal ke mitokondria. Protein domain BH3 hanya mempromosikan perakitan protein pro-apoptosis seperti Bax dan Bak ke dalam pori-pori di luar membran mitokondria dan mengubah permeabilitas mitokondria untuk melepaskan berbagai faktor pemicu apoptosis, termasuk sitokrom c melalui transisi permeabilitas mitokondria. Secara umum, penurunan potensi transmembran mitokondria melepaskan sitokrom c, yang mengikat Apaf-1 dan mendorong aktivasi *caspase* 9 dan 3 (Green dan Reed, 1998). Peran sentral mitokondria dalam apoptosis adalah melalui jalur intrinsik.

Mengikuti pelepasan protein pro-apoptosis spesifik seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi dimulai dengan aktivasi *caspase* 3. Jalur intrinsik didominasi oleh family protein Bcl-2. Target utama family Bcl-2 adalah melepaskan sinyal apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dengan membuka pori transisi membran permeabel. Hal ini dapat dicapai melalui oligomerisasi anggota Bcl-2 pro-apoptosis di membran luar mitokondria yang berinteraksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Kelompok pertama dari protein yang dilepaskan adalah sitokrom c dan Smac/DIABLO, yang bergantung pada *caspase*, artinya mereka bertindak di hilir *cascade caspase*, yang mengarah ke apoptosis. Tujuan utamanya adalah untuk mengikat dan mengaktifkan *Caspase Recruitment Domain* (CARD), Apaf-1 dan *procaspase* 9, yang mengarah pada pembentukan apoptosom. Hal ini pada gilirannya menyebabkan aktivasi *caspase* 9 dan aktivasi efektor *caspase* 3 lebih lanjut, sehingga menyelesaikan jalur apoptosis. Pembentukan apoptosom dan aktivasi *caspase* efektorlah yang menyebabkan peristiwa apoptosis seperti kondensasi kromatin, asimetri membran plasma, dan blebbing sel (Abud, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004).

### **8.3. Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Menurut penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase* 3 meningkat pada hati kelompok mencit yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

Tikus disuntik dengan bakteri melalui rute intraperitoneal. Bakteri yang disuntikkan ke dalam rongga peritoneal diserap ke dalam sirkulasi portal dan diangkut ke hati. Sebagai organ penerima vena portal dan darah arteri, hati merupakan bagian penting dari pertahanan terhadap infeksi yang ditularkan melalui darah.

Hati diduga mempengaruhi metabolisme dan mekanisme pertahanan inang selama sepsis. Organ ini secara aktif mengatur proses inflamasi dengan menyaring, menonaktifkan dan menghilangkan bakteri, produk bakteri (endotoksin), zat vasoaktif dan mediator inflamasi. Hati juga diuji untuk produksi dan pelepasan berbagai sitokin, lipid bioaktif, dan protein fase akut dalam jumlah besar. Disfungsi hepatic dini terjadi dalam beberapa jam pertama sepsis dan berhubungan dengan hipoperfusi hepatosplanknik. Gangguan ini dapat menyebabkan peningkatan akut penanda-penanda biologis kerusakan hati (transaminase, dehidrogenase laktat, dan bilirubin). Disfungsi hati lanjut adalah proses yang berjalan secara perlahan dan berat. Proses ini ditandai dengan kerusakan struktural dan fungsional dan dapat menyebabkan limpahan bakteri, endotoksin, dan molekul inflamasi yang dapat memicu atau mempertahankan kerusakan multi-organ (Sumantri, 2012).

Peningkatan ekspresi *caspase 3* pada hati mencit yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL, yang kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan faktor larut bakteri yang dapat diinduksi oleh sel inang. Faktor-faktor yang mempengaruhi virulensi strain *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* meliputi serotipe kapsuler, lipopolisakarida, sistem ironscavenging, adhesin fimbrial dan non-fimbrial. Kapsul polisakarida yang mengelilingi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* melindungi dirinya dari fagositosis dan aksi bakterisidal oleh serum dan dapat dianggap sebagai penentu virulensi terpenting dari *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

Kerusakan hati dikaitkan dengan terjadinya apoptosis hepatosit (Mordue *et al.*, 2001). Apoptosis hepatosit dapat terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Apoptosis melalui jalur intrinsik pada hepatosit diinduksi oleh faktor terlarut pada bakteri yang dapat menginduksi sel inang dan menjadikannya toksik bagi sel lain. Faktor-faktor terlarut ini menyebabkan

pelepasan ROS dari mitokondria. Infeksi bakteri menyebabkan mitokondria memproduksi ROS dan memicu pelepasan sitokrom c (Nomura *et al.*, 2000). Sitokrom c memicu pengikatan *caspase 9* ke efektor *caspase caspase 3*, yang mengarah ke apoptosis (Yoon, *et al.*, 2002).

Apoptosis hepatosit terjadi karena kelebihan produksi sitokin pro-inflamasi (Mordue *et al.*, 2001). Aktivasi sitokin ini, IL-18 dan IL-2, menghasilkan interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  memicu makrofag untuk memproduksi TNF- $\alpha$ . Denkers dan Gazzinalli (1998) menunjukkan bahwa makrofag yang diaktivasi oleh IFN- $\gamma$  menghasilkan TNF- $\alpha$ . Seperti yang dinyatakan oleh Gucciardi *et al.*, (2005), bagian dari efek sitotoksik langsung pada hepatosit adalah TNF- $\alpha$  atau TNFR-1. Interaksi antara TNF dan TNFR-1 dapat memicu terjadinya apoptosis di hati (Yoon *et al.*, 2002). Selain TNF dan TNFR-1, pengikatan antara FAS-L yang diproduksi oleh sel T sitolitik dan sel NK serta FAS milik hepatosit juga memicu pengikatan apoptosis (Mordue *et al.*, 2001). TNF- $\alpha$  adalah mediator apoptosis yang juga dapat memicu sel untuk mengekspresikan FAS, yang mengarah ke apoptosis (Gucciardi *et al.*, 2005).

Hepatosit, jenis sel utama hati, memiliki kemampuan regenerasi yang kuat saat rusak oleh berbagai faktor, salah satunya adalah infeksi bakteri. Berbagai mode kematian sel dapat terjadi pada hepatosit, termasuk apoptosis, nekroptosis, nekrosis, dan *autophagic-dependent cell death*. Apoptosis hepatosit memainkan peran protektif penting dalam menghilangkan mikroorganisme eksternal melalui penghancuran diri. Apoptosis hepatosit melibatkan dua jalur fundamental: jalur ekstrinsik yang mentransmisikan sinyal kematian melalui *death receptor* (DR) dan jalur intrinsik yang diprakarsai oleh rangsangan intraseluler. Jalur apoptosis ekstrinsik diaktifkan oleh ligan kematian yang mengikat DR pada membran plasma. Ligan kematian termasuk dalam superfamili tumor necrosis factor (TNF) dan termasuk FasL, TNF- $\alpha$ , dan ligan penginduksi apoptosis terkait TNF (TRAIL). Demikian, DR termasuk Fas, TNF-receptor 1 dan TRAIL-R.

Pengikatan kematian ligan ke DR menginduksi trimerisasi dan konformasi perubahan DR. Perubahan ini merekrut protein adaptor sitoplasma (seperti protein *FAS-Associated Protein With Death Domain* [FADD]), yang merekrut molekul pensinyalan apoptosis (seperti *caspase*

8). DR, protein adaptor, dan molekul pensinyalan apoptosis yang terkait menginduksi *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC), menghasilkan aktivasi *cascade caspase* efektor, biasanya melibatkan *caspase 3, 6, dan 7* (Hillebrandt *et al.*, 2005); Pritchard *et al.*, 2007; Gustot *et al.*, 2006). Selain apoptosis, mode kematian sel lainnya juga terlibat dalam crosstalk dan tumpang tindih kematian hepatosit dan cedera hati, menghasilkan proses kematian yang sangat beragam.

Aktivasi *caspase* secara signifikan berkorelasi dengan aktivitas inflamasi. Aktivasi *caspase* terdeteksi di sebagian besar hepatosit. Pembelahan *Caspase 3* menandai peristiwa awal dalam proses apoptosis. Sedikit imunoreaktivitas ditunjukkan pada jaringan hati yang sehat menggunakan antibodi spesifik untuk *caspase 3 dan 7* yang diaktifkan. Menariknya, *caspases 3 dan 7* yang diaktifkan tampaknya memiliki lokalisasi subseluler yang sedikit berbeda. Mengaktifkan *caspase 3* terutama ditemukan di nukleus, sedangkan antibodi pengaktif *caspase 7* biasanya memberi label pada daerah perinuklear. *Caspase 7* yang teraktivasi sebelumnya telah diamati pada hati tikus dan sel Jurkat T untuk mengikat sebagian mikrosomal atau mentranslokasi ke retikulum endoplasma setelah induksi apoptosis (Chandler *et al.*, 1998; Zhivotovsky *et al.*, 1999).

Penghambatan aktivasi *caspase 3* mencegah cedera hepatosit, kematian sel, dan pensinyalan pro-inflamasi, terutama perekrutan monosit inflamasi pro-fibrotik. Efek ini ditemukan tidak bergantung pada akumulasi trigliserida hati. Aktivasi *caspase 3* dalam hepatosit memainkan peran sentral dalam steatohepatitis dan fibrosis (Thapaliya *et al.*, 2014).

Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa dua jalur utama apoptosis, yang disebut jalur ekstrinsik (di mediasi reseptor kematian) dan jalur intrinsik (diprakarsai oleh organel), berkontribusi. Kedua jalur ini cenderung menyatu pada tingkat mitokondria, yang mengarah ke permeabilisasi membran luar mitokondria dan pelepasan beberapa protein dari ruang mitokondria antar membran ke dalam sitoplasma (Li *et al.*, 2008; Feldstein *et al.*, 2004).

Konsekuensi utama dari proses ini adalah aktivasi *caspase* efektor (terutama *caspase 3*), yang kemudian membelah banyak substrat berbeda dalam sel, yang mengarah ke karakteristik perubahan morfologis dari

apoptosis (Green, 2005; Chowdhury *et al.*, 2008). Apoptosis dianggap non-inflamasi, dan jelas bahwa peningkatan patologis dalam apoptosis dalam konteks penyakit kronis dapat secara langsung atau tidak langsung meningkatkan peradangan (Alkhoury *et al.*, 2010; Syn *et al.*, 2009).

Peradangan persisten pada cedera hati kronis diketahui terutama menginduksi perkembangan fibrosis hati, dan penelitian terbaru menunjukkan bahwa makrofag hati melakukan ini hanya sebagian, tetapi sangat bergantung pada perekrutan monosit ke hati (Imamura *et al.*, 2005; Tacke *et al.*, 2012). Aktivasi *caspase* 3 di hepatosit secara signifikan mempengaruhi produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF dan IL 6.

Apoptosis sel efektor bakteri dan pengukuran *caspase* 3 tidak mengherankan, karena kemampuan untuk mengoordinasikan kelangsungan hidup atau kematian sel dalam kondisi terkendali memberikan manfaat yang jelas bagi mikroorganisme yang menyerang. Tampaknya aktivasi *caspase* 3 selama infeksi bakteri adalah produk sampingan dari invasi bakteri, kemungkinan dipicu oleh tekanan sel inang berikutnya yang terkait dengan replikasi intraseluler. Contohnya adalah toksin bakteri dengan berat molekul besar yang dapat menargetkan siklus sel atau integritas sel dengan efek di luar target yang menyebabkan stres seluler dan kematian sel selanjutnya melalui *caspase* apoptosis (Cheung *et al.*, 2009).

Aktivasi *caspase* 3 oleh bakteri patogen semakin dikenal sebagai strategi infeksi bakteri, tetapi mekanisme interaksi langsung bakteri dengan *caspase* 3 kurang dipahami. Karena gangguan jalur multiseluler, *caspase* promotor hulu (seperti *caspase* 8 dan 9) sering diaktifkan selama infeksi, seringkali secara bersamaan, yang mengarah ke induksi tidak langsung aktivitas *caspase* 3 dan luapan sel. Sementara aktivasi ini dapat dilacak dari waktu ke waktu, memberikan indikasi jalur dan bagaimana *caspase* diaktifkan, aktivasi *caspase* 3 langsung atau alternatif, seperti yang dijelaskan selama infeksi bakteri, lebih sulit dipahami secara mekanis (Zhu *et al.*, 2013).

Jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik dianggap sebagai cara kebanyakan apoptosis terjadi, tetapi aktivasi *caspase* 3 independen dari jalur ini menunjukkan jalur alternatif yang menginduksi aktivasi *caspase* 3 selama infeksi bakteri. Dengan demikian, jalurnya tidak dapat diidentifikasi; tidak dapat diabaikan bahwa efektor langsung dari interaksi enzim juga

dapat menyebabkan aktivasi *caspase 3* (Kobayashi *et al.*, 2013). Kehadiran motif asam efektor asam amino pendek yang dikenal untuk merangsang aktivasi caspase-3 juga dapat berkontribusi pada aktivasinya, dan memang, konservasi evolusi aktivitas prokariotik *caspase 3* juga telah dijelaskan, yang mungkin berperan (Bidle *et al.*, 2010).

#### **8.4. Diffcount pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase***

Hasil penindaklanjutan didapatkan bahwa jumlah neutrofil pada kelompok ESBL *Escherichia coli* masih berada pada rata-rata normal yaitu lebih rendah dari pada kelompok *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, dan jumlah limfosit pada kelompok ESBL *Escherichia coli* juga memiliki nilai yang masih rata-rata dan lebih rendah dari jumlah limfosit pada kelompok *K. pneumoniae carbapenemase*.

Sel yang terlibat dalam respons imun adalah limfosit, sel plasma, sel mast, neutrofil, eosinofil dan sel yang berperan dalam fagositosis (Luiz dan Jose, 2005). Limfosit menyusun 20% dari seluruh sel darah putih yang bersirkulasi pada orang dewasa dan terdiri dari limfosit T dan B yang merupakan pengendali sistem kekebalan tubuh (Guntur, 2008). Proses patologis utama dari sepsis adalah apoptosis sel efektor imun, termasuk limfosit (Chang, *et al.*, 2007).

Neutropenia dan limfopenia diakui sebagai tanda infeksi bakteri yang parah. Zahorec *et al* (2001) mendokumentasikan rasio jumlah neutrofil-ke-limfosit (NLCR) sebagai parameter yang mudah diukur yang menunjukkan tingkat keparahan peradangan sistemik dan sepsis pada 90 pasien onkologi. Bahkan, NLCR adalah parameter yang berguna untuk memprediksi bakteremia dalam keadaan darurat (Jager *et al.*, 2010). Namun, sedikit informasi yang tersedia tentang potensi penggunaan NLCR untuk membedakan infeksi bakteri parah dari virus.

Neutrofil adalah garis pertahanan pertama melawan infeksi bakteri dan dapat dengan cepat direkrut ke tempat infeksi. Menanggapi infeksi lokal, neutrofil dan fagosit lainnya direkrut dari jaringan lokal untuk memediasi pertahanan inang. Selanjutnya, dalam situasi “darurat” tertentu, infeksi lokal dapat menginduksi rekrutmen kronis neutrofil ke jaringan hematopoietik (Furze, *et al.*, 2008).

# BAB 9

## INTIHA

---

### 9.1. Inferensi

Ekspresi caspase 3 meningkat pada limpa tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*, dibandingkan dengan tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, hal tersebut diduga dapat dipengaruhi karena adanya perbedaan antigen yang dimiliki oleh kedua bakteri tersebut, sehingga kemungkinan apoptosis yang terjadi pada sel limfosit yang disebabkan oleh *K. pneumoniae carbapenemase* akan lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL.

Terjadi peningkatan ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL, hal tersebut dapat dipengaruhi karena perbedaan faktor soluble dari kedua bakteri tersebut, jadi, dibandingkan dengan hepatosit yang terinfeksi *E. coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae carbapenemases* lebih cenderung menginduksi apoptosis pada hepatosit.

### 9.2. Gagasan Usul

Penindaklanjutan lebih lanjut diperlukan untuk menentukan perbedaan ekspresi *caspase 3* di limpa dan hati tikus yang terinfeksi ESBL *E. coli* dan tikus yang terinfeksi *E. coli*. Penindaklanjutan lebih lanjut diperlukan untuk menentukan perbedaan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* dan dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae*. Indikator apoptosis pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* memerlukan penindaklanjutan lebih lanjut untuk mengetahui korelasinya dengan ekspresi *caspase 3*.

## DAFTAR PUSTAKA

---

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia. Pp: 91,110, 111, 150, 203, 236, 262-263, 276, 277, 303, 332
- Abraham E. 2003. Nuclear factor-kB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis*, 187: S364-9.
- Abraham P. 2000. Nitro-Arginine Methyl Ester, A Non-Selective Inhibitor of Nitric Oxide Synthase Reduce Ibuprofen-Induced Gastric Mucosal Injury In the Rat. *Digestive Diseases and Sciences*. 50(9): 1632-1640.
- Abud HE. 2004. Shaping Developing Tissues by Apoptosis. *Cell Death Differ*, 11: 3155-62.
- Adrie C, Pinsky MR. 2000. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med.*, 26:364-75.
- Aidara-Kane A, Andremont A, Collignon P. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain and the AGISAR initiative. *J Infect Pub Hea*. 6. 162-165.
- Aird WC. 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 101:3765-77.
- Akira Shizuo. 2000. A Toll-Like Receptor Recognized Bacteri. Research Institute for Microbial Disease, Osaka University; Erato of Japan. *Nature*, 408:740-745.
- Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. 1990. The process of microbial translocation. *Ann Surg.*, 212: 496-510.
- Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP. 2010. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *The Journal of biological chemistry.*, 285:3428–3438.

- Ambler RP. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 289: 321–331
- Ashkenazi A. and Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation *Science*, 281, 1305-1308.
- Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung C. 2007.
- Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis NovartisFound Symp USA
- Balogh P, Horváth G, Szakal AK. 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem Cytochem.*, 52:1287-1298.
- Barnes PJ. 1997. Nuclear factor  $\kappa$ B. *Int J Biochem Cell*, 29: 867-70.
- Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis*, 181: 602-612.
- Bidle KA., Haramaty L, Baggett N, Nannen J, and Bidle KD. 2010. Tantalizing evidence for caspase-like protein expression and activity in the cellular stress response of Archaea. *Environ Microbiol* 12: 1161–1172.
- Blackwell TS, Christman JW. 1997. The role of nuclear factor  $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 3-9.
- Bochud PY., Calandra T. 2003. Science, medicine, and the future, Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*. 326:262–6.
- Brisse S, Grimont F, and Grimon, PAD. 2009. The Genus *Klebsiella*. *The Prokaryotes*. 6(3): 159–196.
- Brooks G. F., Butel J., Morse A.S. 2003. *Medical Microbiology*. 22th ed. Singapore: Mc Graw Hill Co, p: 217.
- Brooks GF, JS. Butel, dan SA Morse. 2005. *Medical Microbiology* 23rd Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. Pp 661-701.
- Bush K, Fisher JF. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from Gramnegative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 65: 455-478.

- Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. 1998. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem*, 273:10815-10818.
- Chang KC., Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS. 2007. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrialmediated apoptosis. *FASEB J*. 21: 708-19.
- Chavda KD, Chen L, Jacobs MR, Rojtman AD, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2015. Complete sequence of a bla(KPC)-harboring cointegrate plasmid isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 2956–2959.
- Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*, 22:686–696.
- Cheung, GYC., Kelly, SM, Jess, TJ, Prior S, Price NC, Parton R., and Coote JG. 2009. Functional and structural studies on different forms of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 46: 36–42.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2008. Caspases-an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 151:10–27.
- Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli. 1988. Regulation and Function of T-Cell-mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clinical Microbiology Review*, 11 (4): 569-588.
- Elbers PW, Ince C. 2006. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit. Care*, 10:221.
- Falagas ME, Bliziotis IA. 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*, 29: 630-636.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40:185–194.
- Furze RC, Rankin SM. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125, 281–288.

- Ghatage DD, Gosavi SR, Ganvir SM, and Hazarey VK. 2013. Apoptosis: Molecular Mechanism. *Journal of Orofacial Sciences.*, 4: 103-107.
- Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA. 2007. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy*. 37th Edition, Sperryville, VA, USA
- Green DR and Reed JC. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281:1309-12. Green DR. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.*, 121:671–674.
- Guacciardi, M., E. Gores, G., J. 2005. Apoptosis: A Mechanism of Acute Chronic Liver Injury. *Recent Advance in Basic Science*, 54:1024–1033.
- Guntur AH. 2006. *Sirs & Sepsis: Immunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan*. Surakarta: Sebelas Maret University Press, pp: 1-14.
- Guntur AH. 2007. Immunopatobiologi sepsis dan penatalaksananya. *Simposium Nasional SEPSIS dan Antimikrobal Terkini*. Surakarta: PETRI, pp: 31-6.
- Guntur AH. 2008. *Sepsis*. Dalam: Prasetyo DH, penyunting. SIRS, sepsis, dan syok septik (imunologi, diagnosis, dan penatalaksanaan). Surakarta: Sebelas Maret University Press, hlm. 1-15.
- Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C. 2006. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology*, 43:989-1000.
- Hawa LC, Susilo, Bambang, Jayasari NE. 2011. Studi Komparasi Inaktivasi *Escherichia coli* Dan Perubahan Sifat Fisik Pada Pasteurisasi Susu Sapi Segar menggunakan Metode Pemanasan Dan Tanpa Pemanasan Dengan Kejut Medan Listrik. *Jurnal Keteknik Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang*. P. 34.
- Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A. 2015. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet*, 37:835-843.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. 2005. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology.*, 128:138–146.

- Jawetz, Melnick dan Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi 20, EGC, Jakarta.
- Jin and El-Deiry, W. S. 2005. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2171-2181.
- Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. 1995. *Basic Histology. 8th Ed.* London: Prentice Hall International inc. pp: 423-446.
- Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H. 2013. The Shigella OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. *Cell Host Microbe* 13: 570– 583.
- Kocsis B and Szabo D. 2013. Antibiotic Resistance Mechanisms in Enterobacteriaceae. *Formatex*, 251-257.
- Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. 2009. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136(5):1237–48. Epub 2009/08/22. doi: 10.1378/chest.09-0087 PMID: 19696123.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. 1996. *Buku Ajar Histologi. Edisi 5.* Jakarta: EGC. hlm. 291-303.
- Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. 2008. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology*, 47:1495–1503.
- Lin Chung-Wei C, Taylor Deborah, A Sita M, Zeindra Bierma, Maher Christoper G. 2010. Exercise for Osteoarthritis of the Knee, Physical Therapy June 2010, Volume 90 No. 6 839-842, *journal of the American Physical Therapy*
- Madigan MT dan Martinko JM. 2005. *Brock Biology of Microorganisms 11th ed.*, Prentice Hall, New Jersey.
- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrugresistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 28:565–591.
- Meng J, Schroeder CM. 2007. *Eschericia coli*. Dalam Simjee S, editor. *Foodborne Diseases*. Totowa: Humana Pr.

- Melliawati, R. 2009. *E. coli* dalam kehidupan manusia. *Bio trends/Vol.4/ No.1/Th.2009*
- Merchant IA dan Parker RA. 1961. *Veterinary Bacteriology and Virology*. The Iowa State University Press: Ames, Iowa.Pp 306-308.
- Mokady D, Gophna U, Ron EZ. 2005. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol*, 295: 455-462.
- Mordue, D.G., F. Monroy., M.L. Regina., C.A. Dinarello and L.D. Sibley. 2001. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *The American Association of Immunologists*, 167: 4574-4584.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2005. *Medical Microbiology* 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania USA.
- Nikitakis NG, Sauk JJ, and Papanicolaou SI. 2004. The Role of Apoptosis in Oral Disease: Mechanisms; Aberrations in Neoplastic, Autoimmune, Infectious, Hematologic, and Developmental Diseases; and Therapeutic Opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 97: 476-490.
- Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. 2002. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology*, 106: 299-307.
- Nomura, K., H. Imai, T. Koumura, T.Koebayashi and Y. Nakagawa. 2000. Mitochondrial Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia induced apoptosis. *Biochem J.*, 351: 183-193.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 17: 1791-1798.
- Pajariu A, Firmanti SC, & Isbandrio B. 2010. *Infeksi oleh Bakteri Penghasil Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (ESBL) di RSUP Dr. Kariadi Semarang: Faktor Risiko Terkait Penggunaan Antibiotik*. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Parasakthi N, Arrifin H, Kamarulzaman A, Ibrahim HSM, Adnan A, Choeng I. 2001 Consensus guidelines for the management of infections by

- ESBL-producing bacteria. Kuala Lumpur (MY): Malaysian Society of Infectious Disease and Chemotherapy.
- Paterson D, Bonomo R. 2005. Extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiology Review*, 18: 657-686.
- Paterson DL. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med*, 119: 20-28.
- Patrick D. 2005. *Medicine At A Glance*. Alih Bahasa: Rahmalia. A, dkk. Jakarta: Erlangga Elmer G.W., McFarland L.V., McFarland M, 2006. *Meta-analysis of probiotics for the prevention and treatment of acute pediatric diarrhea*.
- Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59:5873–5884.
- Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. 2004. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Critical Care*. 8(6): 409-13.
- Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JI, Lin F, Medof ME. 2007. Differential contributions of C3, C5, and decay-accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. *Gastroenterology*, 132:1117-1126.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20: 440–458.
- Ramalho FS, Fernandez-Monteiro I, Rosello-Catafau J, Peralta C. 2006. Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir Bras*, 1:48-53.
- Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ. 2012. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and patient outcome: a meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(6):1311–20.
- Savitri, L. 2018. Perbedaan Peningkatan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia Coli* ESBL dan dengan yang Diinfeksi *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase. *Disertasi*. Universitas Airlangga.
- Schauffler K, Wieler LH, Semmler T, Ewers C, and Guenther S. 2013. ESBL-

- plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be “cured” of wild-type *Escherichia coli* using a heat technique. *Gut Pathogens*, 5:34
- Schaufler K, Bethe A, Lübke-Becker A, Ewers C, Kohn B, Wieler LH, Geunther S. 2015 Putative connection between zoonotic multiresistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs. *Infect Ecol Epidemiol*. 5(4):25334-25339.
- Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld, R. 2013 Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environment Microbiol*. 79(9):3027-3032.
- Schwaber MJ, Carmeli Y. 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(5):913–20.
- Spapen H. 2008. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anat Rec (Hoboken)*, 291:714-20.
- Su Y, Yu CY, Tsai Y, Wang SH, Lee C, and Chu C. 2016. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49, 892e901
- Sumantri, Sunarsih ES, Hakim L, and Sugiyanto. 2012. Protective Effect of Brassica oleracea var. Botrytis L. against theophylline-induced hepatocellular abnormalities in Rats. *Univera Medicina* 31 (1): 12-19.
- Syn WK, Choi SS, Diehl AM. 2009. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.*, 13:565–580. [PubMed: 19818305]
- Tacke F. 2012. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis & tissue repair.*, 5(Suppl 1):S27. [PubMed: 23259611]
- Tambajong RN, Lalenoh DC, Kumaat L. 2014. Profil penderita sepsis di ICU RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado periode Desember

- 2014-2015. Jurnal e-Clinic (eCl), 4 (1)
- Tenaillon O, D Skurnik B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:207-217. [PubMed]
- Thapaliya S, Wree A, Povero D, Inzaugarat M.E, Berk M, Dixon L, Papouchado BG, and Feldstein AE. 2014. Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet induced NASH model. *Dig Dis Sci.*, 59(6): 1197–1206. doi:10.1007/s10620-014-3167-6.
- Todar K. 2008. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal disease. Todar's Online textbook of Bacteriology.
- Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, et al. 2007. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial agents an chemotherapy*, 51(6):1987–94. Epub 2007/03/28. doi: 10.1128/aac.01509-06 PMID: 17387156; PubMed Central PMCID: PMCPMC1891412.
- Umadevi S, Kandhakumari G, Joseph NM, Kumar S, Easow JM, Stephen S, Singh UK. 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of ESBL producing Gram negative bacilli. *J Clin Diagnos Res.* 5(2):236-239.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20: 440–458.
- Victor M. 2005. Role of Free Radicals in Sepsis: Antioxidant Therapy. *Current Pharmaceutical Design.* 11: 3141-3158
- Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, et al. 2003. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*; 284: 352-7.
- Wesche-Soldato CE, Lomas-Neira JL, Perl M, Jones L, Chung C, Ayala A. 2007. The role and regulation of apoptosis in sepsis *J of Endotoxin Res USA*
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global re-port

- on surveillance. Geneva. *WHO Press*: 17-19.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapene-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-1161.
- Yoon, J.H. and G.J. Gores. 2002. Death Receptor-mediated apoptosis and the liver. *J. Hepatology*. 37: 400-410.
- Zahorec R. 2001. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts – rapid and simple parameter of systemic inflammation and stress in critically ill [Article in English and Slovak]. *Bratisl Med J*, 102: 5-14
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahn A, Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ*, 6:644-651.
- Zhu, W, Hammad LA, Hsu F, Mao Y, and Luo ZQ. 2013. Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell Microbiol* 15: 1783–1795.

# LAMPIRAN

---

## Lampiran 1

### Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus yang telah diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian siap diberikan perlakuan. Tikus di berikan injeksi pada bagian peritoniumnya dan dimasukkan satu kelompok di infeksi *Escherichia coli* ESBL dan kelompok lain diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Masing-masing dosisnya adalah  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Irisan organ yang akan diambil adalah pada bagian tepi kiri dan kanan. Deteksi adanya apoptosis dilakukan dengan menempatkan potongan setebal 4-6  $\mu\text{m}$  dan diletakkan di atas *slide* polylysin kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45°C. Setelah itu merehidrasi preparat organ dengan aquades steril, kemudian ditambah dengan 50  $\mu\text{l}$  TUNEL *label mix* (campuran 5  $\mu\text{l}$  *enzyme solution* dan 45  $\mu\text{l}$  *labeling solution*) dengan TdT. Preparat ditutup dengan *siliconized cover slip*. Preparat diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit di dalam *moist chamber*. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan *RNase solution* pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian preparat dicuci lagi dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan larutan Propidium iodida pada suhu ruang selama 10 menit. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat ditutup dengan *cover slide* diameter 18 mm dan *immumount*. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluoresen. Sel yang mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi warna hijau sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi merah.

## Lampiran 2

### Pemrosesan Jaringan

Jaringan organ tikus difiksasi ke dalam *buffer formalin* dengan tujuan untuk mempertahankan morfologi sel seperti semula, untuk mencegah terjadinya *otolisis*, dan untuk mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur. *Buffer formalin* yang digunakan terdiri dari sodium hidrogen fosfat mono basik ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 4 gram, sodium hidrogen fosfat dibasik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 6,5 gram, aquadestilata 900 ml, dan *formaldehyde* 37-40% 100 ml. Tahap selanjutnya adalah *dehidrasi* dengan *etanol* yang konsentrasinya dinaikkan secara bertahap, yaitu 80% selama 1 jam, 95% sebanyak 2 kali masing-masing selama 2 jam dan 1 jam, dan etanol absolut sebanyak 3 kali masing-masing selama 1 jam untuk menarik air dari dalam jaringan secara perlahan agar jaringan tidak mengalami pengerutan. Proses dehidrasi selesai lalu dilanjutkan dengan proses *clearing* yaitu dengan menggunakan bahan *xylol* untuk memediasi antara bahan dehidrasi dengan bahan *embedding* yang akan digunakan. Larutan *clearing* dapat melarutkan larutan dehidran dan juga dapat larut dengan bahan *embedding*, sehingga diperlukan proses penghilangan larutan dehidran dalam jaringan yang disertai dengan proses infiltrasi larutan *embedding* ke dalam jaringan. Proses ini dikenal dengan impregnasi. Bahan impregnasi yang digunakan adalah paraffin. Jaringan yang sudah dibuat blok paraffin selanjutnya dilakukan penyayatan jaringan dengan menggunakan *rotary microtome* atau *sliding microtome* dengan ketebalan 4-6 mikron. Bahan yang digunakan adalah poly L-Lysin. Bahan ini sangat baik digunakan untuk melekatkan sayatan jaringan untuk pewarnaan yang sering mengalami pencucian, seperti pewarnaan imunohistokimia. Sayatan yang diperoleh kemudian diambil dengan kuas yang telah dibasahi dengan air dan diletakkan pada permukaan *waterbath*. Jaringan yang mengembang kemudian diambil dengan *object glass* yang telah dilapisi dengan perekat jaringan, lalu dikeringkan pada suhu kamar dan dimasukkan ke dalam oven semalam.

### Lampiran 3

#### Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi Caspase 3

Langkah-langkah pemeriksaan imunohistokimia sebagai berikut:

1. Xylol : 3-5 menit
2. Xylol : 3-5 menit
3. Xylol : 3-5 menit
4. Xylol : 3-5 menit
5. Ethanol absolut : 1-3 menit
6. Ethanol absolut : 1-3 menit
7. Ethanol absolut : 1-3 menit
8. Ethanol 70% : 1-3 menit
9. Ethanol 70% : 1-3 menit
10. Cuci 3x Aquabidest, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue*
11. Teteskan Proteinase K, inkubasi suhu ruangan selama 20 menit
12. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
13. Teteskan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubasi suhu ruangan selama 5-10 menit
14. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
15. Teteskan Reaction Buffer inkubasi suhu ruangan selama 10-30 menit
16. Tanpa dicuci, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
17. Teteskan Complete Labelling Reaction Mixture inkubasi suhu 37°C selama 1-1,5 jam (masukkan inkubator dengan suhu yang sudah diatur 37°C)
18. Dikeluarkan dari inkubator cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
19. Teteskan Blocking Buffer inkubasi suhu ruangan selama 10 menit
20. Tanpa dicuci, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
21. Teteskan Antibody Solution inkubasi suhu ruangan selama 1-1,5 jam (kondisi gelap, bagian atas chamber ditutup dengan kain supaya tidak ada sinar yang masuk)
22. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
23. Teteskan Blocking Buffer inkubasi suhu ruangan selama 10 menit
24. Tanpa dicuci, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
25. Teteskan 200X Conjugate inkubasi suhu ruangan selama 30 menit
26. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering

27. Teteskan DAB Solution inkubasi suhu ruangan selama 15 menit
28. Cuci Aquabidest 3x, bersihkan pinggir sliide dengan *tissue* kering
29. Teteskan Counterstain Methyl Green inkubasi suhu ruangan selama 3 menit
30. Cuci air mengalir 3x, pencucian terakhir biarkan selama 10 menit
31. Keringkan-Mounting

**Lampiran 4**  
**Foto Kegiatan**



**Tikus yang digunakan untuk penelitian, yaitu tikus strain Wistar**



**Isolat bakteri yang digunakan untuk penelitian, yaitu *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**



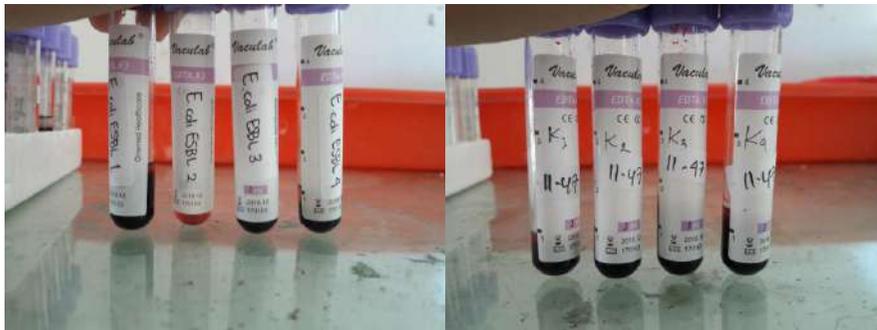
**Proses penyuntikan bakteri dan pembedahan tikus**



**Penyimpanan darah dan pembuatan hapusan darah**



**Hati dan limpa tikus**



**Darah dari tikus yang diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**



**Hati dan limpa dari tikus yang diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

**Sepsis** adalah suatu sindroma klinik yang terjadi karena adanya respons tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme. Sepsis dapat diperberat oleh peningkatan kuman yang multiresisten terhadap bermacam antibiotik, seperti *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC). *Carbapenemases* adalah beta-laktamase dengan spektrum hidrolitik yang luas. *Escherichia coli* yang resisten terhadap beta-laktam disebut *Escherichia coli* ESBL, sedangkan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap karbapenem disebut *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Organ yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh adalah limpa dan hati. Limpa merupakan situs hematopoiesis pada tikus dan merupakan organ limfoid terbesar yang memulai tanggapan kekebalan terhadap antigen yang ditularkan melalui darah. Injeksi bakteri pada tikus dilakukan melalui jalur injeksi intraperitoneal.

Buku ini berisi penguraian akan perbedaan peningkatan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*. Adanya buku ini diharapkan dapat bermanfaat, yakni berbagai kasus sepsis akibat infeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* diharapkan dapat diketahui tingkat keparahannya melalui peningkatan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati. Manfaat lain yang dapat diambil dari buku ini adalah dapat memberikan ilmu tentang perbedaan peningkatan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya untuk pengobatan sepsis yang disebabkan oleh bakteri dengan resistensi yang lebih baik terhadap beta-laktam dan *carbapenemase*, sehingga mengurangi morbiditas dan mortalitas sepsis.



**Lisa Savitri** merupakan dosen di salah satu perguruan tinggi ternama di Indonesia. Beliau menyelesaikan pendidikan sarjana pada Program Studi Biologi, Universitas Negeri Malang dan pendidikan magister pada Program Studi Imunologi, Universitas Airlangga. Saat ini, beliau aktif sebagai *board of advisor* di Synbio Indonesia dan menjadi peneliti di Bioinformatics Research Center, Inbio Indonesia. Selain aktif melakukan kegiatan tri dharma perguruan tinggi, beliau juga aktif menjadi pembicara dalam pertemuan ilmiah nasional dan menulis beberapa buku, seperti Panduan Ringkas Desain Vaksin Berbasis Bioinformatika (2021) dan Langkah Mudah Membuat Professional Science Figures Bebas Plagiasi (2022).

**Penerbit Deepublish (CV BUDI UTAMA)**

Jl. Kaliurang Km 9,3 Yogyakarta 55581

Telp/Fax : (0274) 4533427

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

cs@deepublish.co.id

Penerbit Deepublish

@penerbitbuku\_deepublish

www.penerbitdeepublish.com



Kategori : Biologi

ISBN 978-623-02-5818-3



9 786230 258183



deepublish|publisher

(Penerbit Buku Pendidikan Anggota IKAPI)

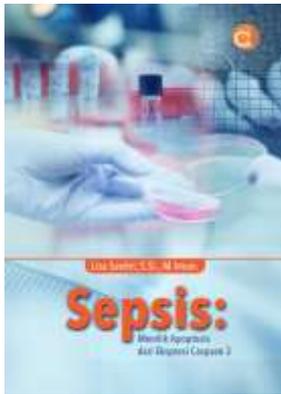
**SURAT PERNYATAAN PENERBITAN**

Nomor: 011/DAN-02/Dee/I/2023

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Muhammad Rizky, S.S.  
Jabatan : Author and Netpromoter Manager  
Nama Perusahaan : CV. BUDI UTAMA (PENERBIT DEEPUBLISH)  
Alamat Kantor : Jl. Rajawali Gg. Elang 6 No. 3 Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman, Yogyakarta 55581  
No Anggota IKAPI : 076/DIY/2012  
E-mail : cs@deepublish.co.id

Dengan ini menyatakan dengan sesungguhnya bahwa buku berjudul:



Judul : Sepsis: Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3  
Penulis : Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.  
Ukuran : 15.5 x 23 cm  
Jumlah Halaman : xiv, 76 hlm  
Terbit : Januari 2023  
No. ISBN : 978-623-02-5818-3  
Desain Cover : Ali Hasan Zein  
Jumlah Cetak : 50 Eksemplar

Telah diterbitkan secara nasional yang merupakan karya asli dari penulis:

Nama : Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.  
Alamat : Jalan Masjid Al Huda No 93 RT 05 RW 02, Kel Ngadirejo, Kec Kota, Kediri, Jawa Timur. 64122  
No. Handphone : 085785920951  
Email : [lisasavitri@unik-kediri.ac.id](mailto:lisasavitri@unik-kediri.ac.id)

Yogyakarta, 10 Januari 2023



(Muhammad Rizky, S.S.)  
Author and Netpromoter Manager

**Kantor Pusat:**

Jl. Rajawali, Gg.Elang 6 no 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman – Daerah Istimewa Yogyakarta 55581,  
Telp/Fax: 0274-4533427 ; 08122837922 ; 0811295716

Email: cs@deepublish.co.id; website: www.penerbitdeepublish.com; Facebook: Penerbit Deepublish

**Cabang Cirebon**

Jalan Saladra No.18, Karyamulya, Kesambi - Cirebon 45135; 081324918200; deepublish.editor@gmail.com



Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.

# Sepsis:

Menilik Apoptosis  
dari Ekspresi Caspase 3

# **SEPSIS**

Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3

## UU No 28 tahun 2014 tentang Hak Cipta

### **Fungsi dan sifat hak cipta Pasal 4**

Hak Cipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 3 huruf a merupakan hak eksklusif yang terdiri atas hak moral dan hak ekonomi.

### **Pembatasan Pelindungan Pasal 26**

Ketentuan sebagaimana dimaksud dalam Pasal 23, Pasal 24, dan Pasal 25 tidak berlaku terhadap:

- i. Penggunaan kutipan singkat Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait untuk pelaporan peristiwa aktual yang ditujukan hanya untuk keperluan penyediaan informasi aktual;
- ii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk kepentingan penelitian ilmu pengetahuan;
- iii. Penggandaan Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait hanya untuk keperluan pengajaran, kecuali pertunjukan dan Fonogram yang telah dilakukan Pengumuman sebagai bahan ajar; dan
- iv. Penggunaan untuk kepentingan pendidikan dan pengembangan ilmu pengetahuan yang memungkinkan suatu Ciptaan dan/atau produk Hak Terkait dapat digunakan tanpa izin Pelaku Pertunjukan, Produser Fonogram, atau Lembaga Penyiaran.

### **Sanksi Pelanggaran Pasal 113**

1. Setiap Orang yang dengan tanpa hak melakukan pelanggaran hak ekonomi sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf i untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 1 (satu) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp100.000.000 (seratus juta rupiah).
2. Setiap Orang yang dengan tanpa hak dan/atau tanpa izin Pencipta atau pemegang Hak Cipta melakukan pelanggaran hak ekonomi Pencipta sebagaimana dimaksud dalam Pasal 9 ayat (1) huruf c, huruf d, huruf f, dan/atau huruf h untuk Penggunaan Secara Komersial dipidana dengan pidana penjara paling lama 3 (tiga) tahun dan/atau pidana denda paling banyak Rp500.000.000,00 (lima ratus juta rupiah).

# SEPSIS

Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3

Lisa Savitri, S.Si., M.Imun.



**SEPSIS: MENILIK APOPTOSIS DARI EKSPRESI CASPASE 3**

**Lisa Savitri**

Editor :  
**Tiara Azhari**

Desain Cover :  
**Ali Hasan Zein**

Sumber :  
Penulis & Drew Hays (unsplash)

Tata Letak :  
**Zulita A.**

Proofreader :  
**A. Timor Eldian**

Ukuran :  
**xiv, 76 hlm, Uk: 15.5x23 cm**

ISBN :  
**978-623-02-5818-3**

Cetakan Pertama :  
**Januari 2023**

Hak Cipta 2023, Pada Penulis

---

Isi diluar tanggung jawab percetakan

---

**Copyright © 2023 by Deepublish Publisher**  
All Right Reserved

Hak cipta dilindungi undang-undang.  
Dilarang keras menerjemahkan, memfotokopi, atau  
memperbanyak sebagian atau seluruh isi buku ini  
tanpa izin tertulis dari Penerbit.

**PENERBIT DEEPUBLISH**  
**(Grup Penerbitan CV BUDI UTAMA)**

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

Jl.Rajawali, G. Elang 6, No 3, Drono, Sardonoharjo, Ngaglik, Sleman

Jl.Kaliurang Km.9,3 – Yogyakarta 55581

Telp/Faks: (0274) 4533427

Website: [www.deepublish.co.id](http://www.deepublish.co.id)

[www.penerbitdeepublish.com](http://www.penerbitdeepublish.com)

E-mail: [cs@deepublish.co.id](mailto:cs@deepublish.co.id)

# KATA PENGANTAR

---

Puji syukur kepada Allah Swt. karena berkat rahmat dan anugerah-Nya sehingga penulis dapat menyusun dan menyelesaikan buku ini dengan judul *Sepsis: Menilik Apoptosis dari Ekspresi Caspase 3*. Penulis mengucapkan terima kasih kepada orang tua tercinta dan keluarga yang selalu memberikan doa, motivasi, dan dukungan baik moril maupun materiil kepada penulis, sehingga penulis mampu menyelesaikan buku ini. Ucapan terima kasih juga penulis haturkan kepada semua pihak yang telah membantu dalam penyelesaian buku ini yang tidak mungkin penulis sebutkan satu per satu.

Mengingat keterbatasan yang dimiliki, Penulis menyadari bahwa buku ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu Penulis menerima segala kritik yang bersifat membangun dan saran dari pembaca untuk dapat menyempurnakan penulisan selanjutnya. Akhir kata, Penulis menyampaikan mohon maaf apabila terdapat kesalahan dalam penulisan buku ini.

Kediri, 2 Desember 2022

Penulis

# DAFTAR ISI

---

<b>KATA PENGANTAR.....</b>	<b>v</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>vi</b>
<b>DAFTAR TABEL .....</b>	<b>viii</b>
<b>DAFTAR GAMBAR.....</b>	<b>ix</b>
<b>DAFTAR SINGKATAN.....</b>	<b>xi</b>
<b>BAB 1 PRELUDE.....</b>	<b>1</b>
<b>BAB 2 MENGENAL RESISTEN ANTIBIOTIK BETA- LAKTAMASE .....</b>	<b>6</b>
2.1. Bakteri <i>Enterobacteriaceae</i> Resisten .....	6
2.1.1. <i>Escherichiacoli</i> Extended-SpectrumBeta-Lactamases (ESBL) .....	7
2.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase.....	11
<b>BAB 3 SEPSIS DAN APOPTOSIS .....</b>	<b>14</b>
3.1. Sepsis.....	14
3.1.1. <i>LPS-Induced Signaling Pathway</i> .....	14
3.1.2. <i>Nuclear Factor</i> $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan Sepsis.....	15
3.2. Apoptosis.....	16
3.2.1. Apoptosis Dependent Caspase .....	17
<b>BAB 4 KORELASI LIMPA DAN HATI PADA SEPSIS DAN SYOK SEPSIS .....</b>	<b>20</b>
4.1. Fungsi Limpa pada Sepsis dan Syok Sepsis.....	20
4.2. Fungsi Hati pada Sepsis dan Syok Sepsis .....	21
<b>BAB 5 SKETSA PAHAM DAN KONTEMPLASI PEMIKIRAN... 23</b>	
5.1. Sketsa Paham.....	23
5.2. Kontemplasi Pemikiran .....	27

<b>BAB 6</b>	<b>DAYA TARIK .....</b>	<b>28</b>
6.1.	Strategi Pendalaman .....	28
6.2.	Lapangan Pelaksanaan.....	29
6.3.	Elemen, Jumlah, dan Proses Penindaklanjutan .....	29
6.3.1.	Elemen Penindaklanjutan.....	29
6.3.2.	Jumlah Elemen Penindaklanjutan .....	29
6.3.3.	Proses Pengambilan Elemen Penindaklanjutan .....	29
6.4.	Gambaran Unsur Pemengaruh.....	30
6.5.	Jabaran Dasar Ekspikasi.....	30
6.6.	Pendukung Pelaksanaan .....	31
6.6.1.	Alat .....	31
6.6.2.	Bahan.....	31
6.7.	Perlakuan pada Hewan Coba.....	32
6.7.1.	Pemrosesan Jaringan .....	33
6.7.2.	Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus.....	33
6.8.	Skenario Tindakan.....	34
6.9.	Paradigma Konsep.....	34
<b>BAB 7</b>	<b>KUPAS TUNTAS .....</b>	<b>35</b>
7.1.	Kematian Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	35
7.2.	Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	35
7.3.	Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> .....	40
7.4.	Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> .....	43
7.5.	<i>Differential Count</i> pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i> .....	44

<b>BAB 8</b>	<b>SEGMENT DISKUSI .....</b>	<b>47</b>
8.1.	Kematian Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	47
8.2.	Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	50
8.3.	Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	52
8.4.	<i>Diffcount</i> pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	57
<b>BAB 9</b>	<b>INTIHA .....</b>	<b>58</b>
9.1.	Inferensi.....	58
9.2.	Gagasan Usul.....	58
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>		<b>59</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>		<b>69</b>

# DAFTAR TABEL

---

Tabel 1.	Klasifikasi Beta-Laktamase pada <i>Enterobacteriaceae</i> .....	7
Tabel 2.	Data Kematian Tikus pada Jam ke 2-8 dan Jam ke 8-24 Setelah Diinfeksi Bakteri <i>Escherichia coli</i> ESBL dan <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase.....	35
Tabel 3.	Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL, dan Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (%).....	36
Tabel 4.	Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL, dan Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (%).....	40
Tabel 5.	Data Rerata dan Simpangan Baku <i>Diffcount</i> pada Kelompok Kontrol, Tikus dengan Infeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL, dan Tikus dengan Infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (%).....	45

# DAFTAR GAMBAR

---

Gambar 1.	Skema rancangan.....	28
Gambar 2.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus.....	36
Gambar 3.	Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	37
Gambar 4.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 100x (GC = <i>germinal center</i> ) (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	38
Gambar 5.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 400x (LF= <i>lymphoid follicel</i> ) (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	38
Gambar 6.	Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	39
Gambar 7.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 100x (GC = <i>germinal center</i> ) (sitoplasma sel berwarna cokelat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	39
Gambar 8.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 400x (LF = <i>lymphoid follicel</i> ) (sitoplasma sel	

	berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	40
Gambar 9.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus .....	41
Gambar 10.	Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	42
Gambar 11.	Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Escherichia coli</i> ESBL dengan Perbesaran 100x (PV = <i>portal vein</i> , CV = <i>central vein</i> , Si = sinusoid) (seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah).....	42
Gambar 12.	Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah) .....	43
Gambar 13.	Grafik Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus .....	44
Gambar 14.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Neutrofil .....	45
Gambar 15.	Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Limfosit.....	46

# DAFTAR SINGKATAN

---

AP-1	: <i>activator protein 1</i>
BH	: <i>Bcl-2 Homology</i>
CAD	: <i>Caspase Activated Deoxyribonuclease</i>
CARD	: <i>Caspase Recruitment Domain</i>
EAEC	: <i>Enteroadgregative Escherichia coli</i>
EHEC	: <i>Enterohemorrhagic Escherichia coli</i>
EIEC	: <i>Enteroinvasive Escherichia coli</i>
EPEC	: <i>Enteropathogenic Escherichia coli</i>
ESBLs	: <i>Extended Spectrum Beta-Lactamases</i>
ETEC	: <i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
FADD	: <i>FAS-Associates Death Domain</i>
ICU	: <i>Intensive Care Unit</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon gamma</i>
IKK	: <i>I<math>\kappa</math>B kinase</i>
iNOS	: <i>inducible nitric oxide synthase</i>
IRAK	: <i>IL-1 receptor associated kinase</i>
KPCs	: <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemases</i>
LBP	: <i>LPS-binding protein</i>
LPS	: <i>lipopolisakarida</i>
MBLs	: <i>Metallo-Beta-Laktamases</i>
mCD14	: <i>membrane bound CD14</i>
MODS	: <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
MOMP	: <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i>
MyD88	: <i>myeloid differentiation factor 88</i>
NAPK	: <i>nitrogen-activated protein kinase</i>
NDM	: <i>New Delhi metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i>
NF-IL6	: <i>nuclear factor-interleukin 6</i>
NF $\kappa$ B	: <i>nuclear factor kappa B</i>

NIK	: <i>NFκB-inducible kinases</i>
NLCR	: <i>neutrophil to lymphocyte count ratio</i>
PAMPs	: <i>Pathogen associated molecular patterns</i>
PRR	: <i>Pattern Recognition Receptors</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
sCD14	: <i>soluble CD14</i>
SES	: <i>sel endotel sinusoidal</i>
SK	: <i>sel Kupffer</i>
tBid	: <i>truncated Bid</i>
TLR 4	: <i>Toll-like receptor 4</i>
TNF	: <i>Tumor Necrosis Factor</i>
TRADD	: <i>TNFR-associated death domain</i>
TRAF 6	: <i>TNF receptor associated factor</i>



# BAB 1

## PRELUDE

---

Sepsis adalah sindrom klinis yang terjadi akibat respons tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroba (Guntur, 2007). Sepsis adalah penyebab utama kematian di dunia dan penyebab utama kematian di *Intensive Care Unit* (ICU). Diperkirakan sekitar 1.400 pasien meninggal karena sepsis di ICU (Poeze *et al.*, 2004). Tingginya kejadian sepsis didukung oleh penelitian profesor tentang tingkat penularan sepsis di RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado menunjukkan bahwa 27,08% pasien dengan sepsis berat, 14,58% pasien dengan syok septik, dan 58,33% pasien dengan sepsis (Tambajong *et al.*, 2016).

Meskipun kemajuan dalam pengobatan, sepsis tetap menjadi masalah klinis yang penting. Peningkatan bakteri multiresisten terhadap berbagai antibiotik memperparah sepsis, sehingga membutuhkan kombinasi antibiotik dalam penatalaksanaan sepsis. Spesies *Enterobacteriaceae* patogen manusia memiliki sejumlah besar strain resisten antibiotik yang telah terdeteksi di seluruh dunia. Resistensi antibiotik yang paling umum di *Enterobacteriaceae* adalah beta-laktam, fluoroquinolones, aminoglikosida, dan baru-baru ini, resistensi terhadap polymyxins juga telah ditemukan. Resistensi beta-laktam adalah resistensi yang disebabkan oleh bakteri yang memiliki beta-laktamase, sehingga mampu menghidrolisis antibiotik beta-laktam. Beta-laktamase yang paling penting adalah *sefalosporinase*, misalnya *Extended Spectrum Beta-Lactamases* (ESBLs) dan *carbapenemases*, misalnya *Metallo-Beta-Laktamases* (MBLs), *Klebsiella pneumoniae carbapenemases* (KPCs), dan enzim oxacillinase Oxa-48 (Kocsis and Szabo, 2013). Berdasarkan penelitian yang dilakukan di RSUP Dr. Kariadi Semarang, dari 141 pasien sepsis yang terinfeksi bakteri penghasil ESBL, diketahui 57,4% terinfeksi *Escherichia*

*coli*, 21,35% terinfeksi *Enterobacteriaceae*, dan 21,3% terinfeksi spesies *Klebsiella* (Pajariu *et al.*, 2010).

*Escherichia coli* dan *Klebsiella spp.* biasanya membawa gen beta-laktamase pada plasmidnya. Enzim ini dinamai untuk aktivitas hidrolitik *cefotaxime*, meskipun spektrumnya meliputi *sefalosporin* spektrum luas dan *aztreonam* (Paterson dan Bonomo, 2005). *Carbapenemases* adalah beta-laktamase dengan spektrum hidrolitik yang luas. Enzim ini menonaktifkan hampir semua beta-laktam terhidrolisis, termasuk karbapenem sebagai substrat tambahan yang unik (Queenan dan Bush, 2007). *Escherichia coli* yang resisten terhadap beta-laktam disebut *Escherichia coli* ESBL, sedangkan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap karbapenem disebut *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Selain memiliki enzim yang membuatnya kebal terhadap antibiotik tertentu, *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemases* juga memiliki endotoksin berupa *lipopolisakarida* (LPS).

LPS adalah komponen utama membran luar bakteri Gram-negatif. LPS adalah komponen penting dari dinding sel untuk menjaga kelangsungan hidup bakteri. LPS tidak toksik jika tetap menjadi bagian dari membran luar bakteri, tetapi menjadi toksik ketika dilepaskan dari dinding sel sebagai lipid A yang dikenali oleh sistem imun dan menyebabkan timbulnya respons inflamasi (Edwin *et al.*, 2003). Produk yang berperan penting terhadap sepsis terutama kandungan lipid A dalam LPS tersebut. LPS atau kompleks glikoprotein endotoksin merupakan komponen utama membran luar bakteri Gram negatif (Guntur, 2006). Bakteri gram negatif (terutama *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, dan *Pseudomonas aeruginosa*) dan kokus Gram positif (terutama *staphylococcus* dan *streptococcus*) paling sering diisolasi dari pasien dengan sepsis dan syok sepsis dari mikroba. Jamur yang paling umum adalah *Candida*, terhitung hanya 5% dari semua kasus sepsis (Bochud dan Calandra, 2003).

LPS yang ada dalam aliran darah akan berikatan dengan protein yang bersirkulasi dan kemudian berinteraksi dengan reseptor makrofag, limfosit dan monosit, serta sel lain dalam sistem retikuloendotelial. Hal ini menyebabkan pelepasan sitokin dan aktivasi komplemen dan jalur koagulasi. Serangkaian kejadian dapat diamati secara klinis, seperti demam,

leukopenia, hipoglikemia, hipotensi, syok, koagulasi intravaskular, dan kematian akibat disfungsi organ (Brooks *et al.*, 2003).

Translokasi bakteri merupakan bagian dari komunitas mikroba melalui lamina propria ke kelenjar getah bening mesenterika lokal dan organ lain seperti hati dan limpa (Alexander *et al.*, 1990). Apoptosis adalah proses penting dalam kematian sel spesifik organ dan kegagalan multi organ. Di hadapan translokasi bakteri, terutama sepsis, memperlambat dan menunda apoptosis neutrofil memperburuk respons imun, mendukung terjadinya *Multiple Organ Dysfunction Syndrome* (MODS).

Salah satu organ yang berperan penting dalam sistem imun adalah limpa, karena fungsinya membantu membersihkan dan menyimpan sel darah merah, serta membantu mengenali dan menyerang bahan pantogen. Untuk menjaga sistem kekebalan tubuh, limpa juga membantu menjaga mikroba berbahaya keluar dari darah. Secara alami, tubuh memiliki sistem kekebalan yang menetralkan dan menonaktifkan molekul asing (molekul yang disediakan oleh virus, bakteri, dan parasit) dan menghancurkan mikroba atau sel asing (sel yang terinfeksi virus, sel dalam transplantasi organ, dan sel kanker). Sel kekebalan beredar dalam darah, limpa, sel epitel, dan jaringan ikat. Sel yang terlibat dalam respons imun adalah limfosit, sel plasma, sel mast, neutrofil, eosinofil dan sel yang berperan dalam fagositosis (Luiz dan Jose, 2005). Limfosit yang merupakan 20% dari semua leukosit dalam sirkulasi darah orang dewasa terdiri limfosit T dan limfosit B yang merupakan pengendali sistem kekebalan tubuh (Guntur, 2008). Proses patologis utama dari sepsis adalah apoptosis sel efektor imun, termasuk limfosit (Chang *et al.*, 2007). Limpa terlibat dalam produksi limfosit, sehingga limpa merupakan bagian integral dari sistem kekebalan tubuh karena limfosit bertanggung jawab untuk memproduksi antibodi terhadap molekul asing.

Jika limpa rusak dan tidak dapat menjalankan fungsinya dengan baik, fungsi tersebut diambil alih oleh hati. Hati diduga mempengaruhi metabolisme dan mekanisme pertahanan inang selama sepsis. Organ ini secara aktif mengatur proses inflamasi dengan menyaring, menonaktifkan dan menghilangkan bakteri, produk bakteri (endotoksin), zat vasoaktif dan mediator inflamasi. Hati juga dirangsang untuk memproduksi dan

melepaskan berbagai sitokin, lipid bioaktif, dan protein fase akut dalam jumlah besar. Disfungsi hepatic dini terjadi dalam beberapa jam pertama sepsis dan berhubungan dengan hipoperfusi jeroan hati. Penyakit ini dapat menyebabkan peningkatan dramatis pada biomarker kerusakan hati (transaminase, laktat dehidrogenase, dan bilirubin). Disfungsi hati lanjut adalah proses yang lambat dan sulit. Proses ini ditandai dengan kerusakan struktural dan fungsional dan dapat menyebabkan limpahan bakteri, endotoksin, dan molekul inflamasi yang dapat memicu atau mempertahankan kerusakan multi-organ (Sumantri, 2012).

Apoptosis sering terlibat dalam infeksi bakteri dan patogenesis. Selama infeksi bakteri, patogen menghasilkan dan mengeluarkan faktor virulensi (terutama endotoksin) dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum, sel mengalami apoptosis melalui dua jalur utama, yaitu jalur ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (jalur mitokondria). Penghambatan pensinyalan apoptosis dianggap memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri yang disebabkan oleh sepsis.

Jalur ekstrinsik biasanya diprakarsai oleh aktivasi reseptor kematian melalui interaksi antara ligan alami atau dengan induksi pengelompokan reseptor kematian. Reseptor kematian adalah reseptor permukaan milik keluarga *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian (Lin *et al.*, 2010). Reseptor kematian memainkan peran penting dalam apoptosis, mengaktifkan *cascade caspase* dalam beberapa detik setelah pengikatan ligan. Oleh karena itu, induksi apoptosis melalui mekanisme ini sangat cepat (Ghatage *et al.*, 2013).

Mekanisme lain dari apoptosis yang bergantung pada *caspase* adalah jalur intrinsik. Apoptosis melalui jalur ini diinduksi oleh sinyal intraseluler seperti hipoksia, radiasi, infeksi virus, dan terutama kerusakan DNA. Keluarga protein Bcl-2 adalah mediator utama dari proses ini. Setelah penghilangan protein spesifik pro-apoptosis seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi diakhiri dengan aktivasi *caspase 3* (Ghatage *et al.*, 2013).

Semua *caspase* disintesis di dalam sel sebagai zimogen, yang secara katalitik tidak aktif dan harus menjalani proses aktivasi. Aktivasi *caspase* efektor (seperti *caspase 3* atau *caspase 7*) dilakukan oleh *caspase* inisiator

(seperti caspase 9). Memulai *caspases* secara otomatis diaktifkan di bawah kondisi apoptosis, sebuah proses yang sering membutuhkan dan difasilitasi oleh kompleks multikomponen, seperti apoptosome yang bertanggung jawab untuk aktivasi *caspase* 9. Peninjauan tentang *caspase* 3 dianggap penting karena *caspase* 3 adalah *caspase* efektor terpenting yang bertanggung jawab atas perubahan morfologis dan biologis yang diamati pada sel apoptosis (Ghatage *et al.*, 2013), meskipun *caspase* 6 dan 7 adalah *caspase* efektor, posisi jalur *caspase* berada pada posisi awal, sehingga masih ada kemungkinan bahwa meskipun *caspase* diaktifkan, apoptosis gagal terjadi karena pelepasan protein Bcl-2 anti-apoptosis, sehingga menghambat apoptosis.

Berdasarkan fenomena ini, diperlukan penindaklanjutan untuk menentukan peningkatan ekspresi *caspase* 3 di limpa dan hati tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Topik bahasan dalam buku ini adalah perbedaan peningkatan ekspresi *caspase* 3 pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*. Adanya buku ini diharapkan dapat bermanfaat, yakni berbagai kasus sepsis akibat infeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* diharapkan dapat diketahui tingkat keparahannya melalui peningkatan ekspresi *caspase* 3 pada limpa dan hati. Manfaat lain yang dapat diambil dari buku ini adalah dapat memberikan ilmu tentang perbedaan peningkatan ekspresi *caspase* 3 pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya untuk pengobatan sepsis yang disebabkan oleh bakteri dengan resistensi yang lebih baik terhadap beta-laktam dan *karbapenemase*, sehingga mengurangi morbiditas dan mortalitas sepsis.

## BAB 2

# MENGENAL RESISTEN ANTIBIOTIK BETA-LAKTAMASE

---

### 2.1. Bakteri *Enterobacteriaceae* Resisten

Sejumlah besar strain spesies *Enterobacteriaceae* yang kebal antibiotik yang bersifat patogen bagi manusia telah terdeteksi di seluruh dunia. Resistensi antibiotik yang paling umum di *Enterobacteriaceae* adalah resistensi terhadap beta-laktam, fluoroquinolones, aminoglikosida dan, baru-baru ini, resistensi terhadap polimiksin. Resistensi beta-laktam disebabkan karena bakteri memiliki beta-laktamase, sehingga mampu menghidrolisis antibiotik beta-laktam. Beta-laktamase yang paling penting adalah sefalosporin seperti *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (ESBL) dan *Carbapenemase* Seperti *Metallo-Beta-Lactamase* (MBL), *Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase* (KPC), dan *oxacillinase Oxa-48* (Kocsis dan Szabo, 2013).

Mekanisme resistensi terhadap beta-laktam diubah permeabilitas membran luar dan pompa penghabisan. Enzim yang mengaktifkan antibiotik dapat dimodifikasi dengan asetilasi, adenilasi, atau fosforilasi. Latar belakang genetik mekanisme resistensi beragam karena dapat terjadi pada kromosom, plasmid, integron, dan transposon (Kocsis dan Szabo, 2013).

*Enterobacteriaceae* adalah Gram-negatif, berbentuk batang, berukuran 1-3  $\mu\text{m}$ , bakteri anaerob fakultatif, mendiami saluran usus manusia dan hewan, di mana hospes memiliki hubungan komensalisme dengan flora mikroba, seperti: *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella spp.*, *Providentia spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* (Murray *et al.*, 2005; Paterson, 2006; Falagas and Bliziotis, 2007). Memiliki aktivitas antibakteri yang cukup besar terhadap bakteri enterik. *Enterobacteriaceae* dapat mengembangkan berbagai mekanisme untuk menghindari efek

penghambatan antibiotik dan dengan demikian mengembangkan resistensi (Murray *et al.*, 2005; Gilbert *et al.*, 2007).

Resistensi *Enterobacteriaceae* terhadap beta-laktam terutama disebabkan oleh adanya beta-laktamase. Enzim ini menonaktifkan antibiotik beta-laktam melalui hidrolisis. Ada dua klasifikasi beta-laktamase yang diketahui, Ambler dan Bush-Jacoby-Medeiros (Tabel 1). Kelas Ambler didasarkan pada homologi asam amino, di mana mereka dibagi menjadi empat kelas molekul, A, B, C, dan D. Kelas A, C, dan D termasuk beta-laktamase dengan serin di situs aktifnya, sedangkan molekul kelas B mewakili *Metallo-Beta-Laktamase* (MBLs), dan klasifikasi Bush-Jacoby-Medeiros mengklasifikasikan beta-laktam Enzim dibagi menjadi tiga kelompok utama dan 16 subkelompok. Klasifikasi didasarkan pada substrat dan penghambat (inhibitor) enzim (Bush dan Fisher, 2011; Ambler, 1980).

**Tabel 1. Klasifikasi Beta-Laktamase pada *Enterobacteriaceae***

Bush-Jacoby-Medeiros Classification	Ambler Classification	Distinctive Substrate	Inhibitor	Representative Enzyme
1	C	Cefalosporins	None	AmpC
2b	A	Penicillins, early cefalosporins	Beta-lactamase inhibitors	TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1
2be	A	Extended-spectrum cefalosporins and aztreonam	Beta-lactamase inhibitors	TEM-3, SHV-2, PER, VEB, CTX-M-15
2d	D	Cloxacillin	Beta-lactamase inhibitors	OXA-1, OXA-10
2de	D	Extended-spectrum cefalosporins	Beta-lactamase inhibitors	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenems	Beta-lactamase inhibitors	OXA-23, OXA-48
2f	A	Carbapenems	Beta-lactamase inhibitors	KPC, IMI, SME, NMC
3a	B	Carbapenems	EDTA	MBL

### 2.1.1. *Escherichia coli* Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL)

*Escherichia coli* adalah bakteri komensal berpotensi patogen yang merupakan penyebab utama morbiditas dan mortalitas di seluruh dunia

(Tenailon *et al.*, 2010). Menurut Todar (2008), klasifikasi dan taksonomi *Escherichia coli* adalah sebagai berikut

Kingdom : *Bacteria*  
Divisio : *Proteobacteria*  
Kelas : *Gamma Proteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*  
Famili : *Enterobacteriaceae*  
Genus : *Esherichia*  
Spesies : *Esherichia coli*

*Escherichia coli* pertama kali diisolasi dari kotoran bayi pada tahun 1885 oleh Theodore Escherich (Merchant dan Parker, 1961). Pada umumnya bakteri membutuhkan kelembaban yang cukup tinggi sekitar 85% (Madigan dan Martinko, 2005). *Escherichia coli* merupakan bakteri anaerob fakultatif dengan metabolisme fermentasi dan respirasi, namun sebagian besar tumbuh dalam kondisi anaerobik, namun beberapa *Escherichia coli* juga dapat tumbuh dengan baik dalam kondisi aerobik (Meng dan Schroeder, 2007).

Ukuran sel *E. coli* biasanya berukuran panjang 2,0–6,0  $\mu\text{m}$  dan lebar 1,1–1,5  $\mu\text{m}$ , dan bentuk selnya bulat dan sering kali berbentuk batang panjang (Melliawati, 2009). Struktur sel dari bakteri *E. coli* terdiri dari dinding sel, membran plasma, sitoplasma, flagela, nukleus (inti sel), dan kapsul. Membran sel terdiri dari sitoplasma yang mengandung nukleoprotein. Membran sel *E. coli* ditutupi oleh dinding sel yang melapisi kapsul. Flagela dan *E. coli* berfilamen menonjol dari permukaan sel. Tiga struktur antigen permukaan utama yang digunakan untuk membedakan serotipe koliform adalah antigen O (antigen lipopolisakarida somatik pada dinding sel), antigen K (antigen polisakarida kapsular) dan antigen H (antigen flagellin) (Todar, 2008).

*E. coli* memiliki dinding sel yang kaku dan berpori yang berfungsi untuk membentuk sel dan bertindak sebagai pelindung. Dinding sel diklasifikasikan sebagai antigen O. *Escherichia coli* diklasifikasikan sebagai bakteri Gram-negatif berdasarkan komposisi dinding sel dan pewarnaannya. Bakteri gram negatif diketahui resisten terhadap penanganan fisik (bakteri mati pada suhu 60°C selama 30 menit), namun bakteri ini lebih resisten terhadap antibiotik golongan lain seperti penisilin dan streptomisin. Kapsul pada *E. coli* terbentuk akibat media pertumbuhan dan kondisi lingkungan.

Kapsul terdiri dari polisakarida atau polisakarida-protein kompleks yang melindungi membran luar dari fagositosis dan sistem komplemen. Kapsul ini diklasifikasikan sebagai Antigen *K. Flagella* dari *Escherichia coli* bersifat antigenik dan karenanya disebut antigen H, sedangkan membran sel terdiri dari beberapa lipid dan protein dalam persentase yang hampir sama, dengan lipid membentuk fase nonpolar yang berkelanjutan (Todar, 2008).

*Escherichia coli* merupakan salah satu jenis bakteri mesofilik, yaitu bakteri dengan suhu pertumbuhan optimum 15-45°C dan nilai pH 5,5-8. Suhu optimum pertumbuhan *E. coli* adalah 27°C. Menurut Hawa, dkk (2011), suhu maksimum pertumbuhan *E. coli* adalah 40-45°C, di atas suhu tersebut bakteri akan dinonaktifkan. *Escherichia coli* biasanya menjajah saluran pencernaan dan membangun hubungan mutualistik dalam beberapa jam setelah memasuki tubuh manusia, tetapi strain *Escherichia coli* non-patogen dapat menyebabkan penyakit ketika terjadi gangguan pencernaan dan immunosupresi inang.

Menurut Jawetz *et al* (1996), *Escherichia coli* dibagi menjadi lima kelompok menurut sifat dan sifat virulensinya, yaitu

1. *Enteroinvasive E. coli* (EIEC), ini menyerang sel epitel mukosa usus dan menyebabkan penyakit yang menyerupai shigellosis.
2. *Enteroadgregative E. coli* (EAEC), menempel pada mukosa intestinal, menghasilkan enterotoksin dan sitotoksin, menyebabkan kerusakan mukosa, mengeluarkan banyak lendir, menyebabkan diare akut dan kronis (lebih dari 14 hari).
3. *Enteropathogenic E. coli* (EPEC), adalah penyebab penting diare pada bayi, terutama di negara berkembang. Bakteri ini menempel pada usus kecil. Infeksi EPEC dapat menyebabkan diare cair yang kronis dan sulit disembuhkan.
4. *Enterotoxigenic E. coli* (ETEC), MENGHASILKAN eksotoksin yang labil terhadap panas (LT) dan eksotoksin yang stabil terhadap panas (ST). Infeksi ETEC dapat menyebabkan gejala sakit perut, terkadang disertai demam, muntah, dan darah pada tinja.
5. *Enterohemorrhagic E. coli* (EHEC), serotipenya menghasilkan verotoksin yaitu EHEC O157:H7. Toksin yang dihasilkan oleh EHEC secara kualitatif mirip dengan toksin Shiga yang dihasilkan

oleh strain *Shigella dysenteriae*. Verotoksin yang diproduksi merusak dinding mukosa, menyebabkan pendarahan.

*Escherichia coli* sering digambarkan sebagai agen penyebab utama infeksi ekstraintestinal seperti meningitis neonatal, bakteremia, pielonefritis, sistitis, prostatitis, dan sepsis (Mokady *et al.*, 2005). Adhesi bakteri patogen ke sel inang adalah langkah pertama dalam membangun infeksi. Peristiwa selanjutnya termasuk kolonisasi jaringan. Proses adhesi dimulai ketika struktur permukaan yang disebut adhesin berikatan dengan ligan spesifiknya, reseptor sel inang, atau protein matriks ekstraselular (Mokady *et al.*, 2005; Bian *et al.*, 2000)

Resistensi antibiotik merupakan masalah penting pada kesehatan hewan dan manusia. Bakteri yang secara alami memiliki gen resistensi antibiotik dapat mentransfer gen tersebut ke bakteri lain. Selain itu, bakteri mampu menghasilkan enzim yang menghambat kinerja antibiotik (Aidara-Kane *et al.*, 2013). Umadevi *et al.*, (2011) mencatat bahwa perkembangan resistensi antibiotik telah menyebar secara global. Resistensi terhadap antibiotik beta-laktam umumnya terjadi pada bakteri Gram-negatif. Bakteri penghasil ESBL seperti *E. coli* dapat diisolasi dari berbagai hewan pakan yang diketahui menjadi reservoir bagi *E. coli* penghasil ESBL (Schmid *et al.*, 2013).

ESBL adalah beta-laktamase yang memberikan resistensi terhadap penisilin, sefalosporin, dan aztreonam (tetapi bukan sefamisin atau karbapenem), yang merupakan penghambatan hidrolisis antibiotik oleh beta-laktamase seperti asam klavulanat, sulbaktam, dan tazobaktam (Bush dan Fisher, 2011). Enterobacteriaceae, seperti *Escherichia coli* dan *Klebsiella spp.* membawa gen beta-laktamase pada plasmidnya. Enzim ini dinamai untuk aktivitas hidrolitik cefotaxime. Secara kolektif, enzim CTX-M diidentifikasi dan semua ESBL (Paterson dan Bonomo, 2005).

Gen untuk enzim ESBL ditemukan setelah penemuan sefalosporin spektrum luas dan pertama kali diperkenalkan ke Eropa pada 1980-an. Gen pembentuk ESBL dapat ditemukan pada isolat *E. coli* dari berbagai negara. Selain itu, ESBL adalah bentuk mutan dari TEM-1, TEM-2, dan SHV-1. Biasanya, gen pembentuk ESBL berubah dari bentuk aslinya dengan mengubah hanya 1 atau beberapa sekuens asam amino (Parasakthi *et al.*,

2001). Enzim ESBL ini telah tersebar di berbagai organisme. Enzim ini tidak hanya dapat menghidrolisis penisilin, tetapi juga antibiotik terbaru, sefalosporin kelompok 3 dan monolaktam. *E. coli* penghasil ESBL dapat ditemukan pada manusia, ternak dan hewan liar, pada jaringan saluran pencernaan, dan pada jaringan urin yang terinfeksi (Schauffler *et al.*, 2015).

Studi dengan bakteri ESBL menunjukkan bahwa penundaan kemoterapi antimikroba yang memadai dapat menjadi faktor penting dalam kematian (Rottier *et al.*, 2012; Schwaber dan Carmeli, 2007; Tumbarello *et al.*, 2007). Efek ini tampaknya paling menonjol pada kondisi syok sepsis atau kegagalan organ (Kumar *et al.*, 2009).

### **2.1.2. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase**

Bakteriolog Jerman Edwin Klebs (1834-1913) pertama kali mempelajari dan menamai *Klebsiella*. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini antara lain bronkopneumoniae dan pneumonia. Hampir semua pneumonia disebabkan oleh bakteri ini. *Klebsiella pneumoniae* hadir di saluran pernapasan dan feses sekitar 5% individu normal dan dapat menyebabkan pneumonia bakterial (Patrick, 2005; Elmer, 2006).

*Klebsiella sp* merupakan bakteri Gram negatif dari famili *Enterobacteriaceae* yang dapat ditemukan pada traktus gastrointestinal dan traktus respiratori. Beberapa spesies *Klebsiella* antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, dan *Klebsiella rhinoscleromatis*. Pada manusia, *Klebsiella pneumoniae* hadir dalam sistem pernapasan dalam bentuk saprofit, membentuk 5% kotoran manusia normal, di mana 1% di antaranya dapat menyebabkan pneumonia. *Klebsiella* adalah bakteri anaerob fakultatif berdasarkan kebutuhannya akan oksigen.

*Klebsiella sp* adalah bakteri berbentuk batang pendek tanpa spora dan tanpa flagela. Bakteri *Klebsiella* memecah laktosa in vivo atau in vitro dan membentuk kapsul, dan koloninya berlendir. Kapsul *Klebsiella sp* terdiri dari antigen O, liposakarida yang terdiri dari unit polisakarida berulang. Polisakarida O-spesifik mengandung gula unik. Antigen O tahan terhadap panas dan alkohol, dan dapat dideteksi dengan aglutinasi bakteri. Antibodi terhadap antigen O sebagian besar adalah IgM. Antigen kedua adalah antigen K, yang terletak di luar antigen O dan merupakan polisakarida kapsular.

Antigen K dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O dan berhubungan dengan virulensi. Kedua antigen meningkatkan patogenisitas *Klebsiella sp.* Klasifikasi dan taksonomi *K. pneumoniae* sebagai berikut.

Kingdom : *Bacteria*  
Divisio : *Proteobacteria*  
Kelas : *Gamma Proteobacteria*  
Ordo : *Enterobacteriales*  
Famili : *Enterobacteriaceae*  
Genus : *Klebsiella*  
Spesies : *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae* adalah bakteri Gram-negatif, berukuran 2,0-3,0x0,6 µm, flora normal usus dan saluran pernapasan, anaerob fakultatif. *K. pneumoniae* memiliki kapsul yang besar, sehingga biakan koloni tampak berlendir (mukoid). *K. pneumoniae* menyebabkan infeksi paru-paru seperti pneumonia, infeksi saluran kemih, dan sepsis pada pasien dengan sistem kekebalan yang lemah (Brooks *et al.*, 2005).

Faktor yang terkait dengan virulensi *Klebsiella pneumoniae* termasuk serotipe kapsuler, lipopolisakarida, sistem ironscavenging, adhesin fimbrial dan non-fimbrial. Kapsul polisakarida yang mengelilingi *K. pneumoniae*, yang melindungi dirinya dari fagositosis dan aksi bakterisidal oleh serum, dapat dianggap sebagai penentu virulensi *K. pneumoniae* yang paling penting (Brisse *et al.*, 2009).

Isolat rumah sakit seringkali menunjukkan fenotipe yang resisten terhadap antibiotik, sedangkan isolat yang resisten dan unsur-unsur genetik juga dapat menyebar ke masyarakat, salah satunya adalah *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap antibiotik carbapenem. Infeksi nosokomial disebabkan oleh beragam jenis *Klebsiella pneumoniae*, yang lebih bersifat oportunistik daripada patogen sebenarnya karena terutama menyerang pasien dengan sistem kekebalan tubuh yang lemah. Sebaliknya, infeksi komunitas serius yang disebabkan oleh *K. pneumoniae* menyerang orang sehat. *Klebsiella pneumoniae* secara historis digambarkan sebagai agen penyebab pneumonia Friedlanders, pneumonia lobar yang parah dengan tingkat kematian yang tinggi. *Klebsiella pneumoniae* tetap menjadi

salah satu penyebab utama pneumonia yang didapat masyarakat di beberapa negara (Brisse *et al.*, 2009).

*Carbapenemase* adalah beta-laktamase dengan spektrum hidrolitik yang luas. Enzim ini menonaktifkan hampir semua beta-laktam terhidrolisis, termasuk karbapenem sebagai substrat tambahan yang unik (Queenan dan Bush, 2007). Karbapenema termasuk dalam kelas Ambler A, B dan D dari beta-laktamase (Ambler, 1980). Di kelas A, *karbapenemase* utama adalah KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*), terdeteksi terutama pada plasmid dari *Klebsiella pneumoniae* (Yigit *et al.*, 2001; Nordman *et al.*, tahun 2011). Sampai saat ini, enzim KPC memiliki 15 varian asam amino yang berbeda dan memiliki aktivitas hidrolitik terhadap sefalosporin spektrum luas, karbapenem, dan aztreonam (Bush dan Fisher, 2011).

## BAB 3

# SEPSIS DAN APOPTOSIS

---

### 3.1. Sepsis

#### 3.1.1. LPS-Induced Signaling Pathway

Aktivasi sistem kekebalan dan inflamasi merupakan respons terhadap rangsangan infeksi dan non infeksi. Bakteri gram negatif dan positif adalah agen-agen kausatif. Infeksi merangsang respons imun pada innate, biasanya di mediasi oleh sirkulasi dan sel inflamatori jaringan seperti monosit/makrofag dan neutrofil. Sel-sel ini biasanya ditemukan dalam sistem peredaran darah dan jaringan dan dapat diaktifkan dengan cepat sebagai respons terhadap bakteri. Sel-sel ini menghasilkan mediator inflamasi, yang dapat sangat aktif dalam fagositosis, dan juga dapat meningkatkan kerusakan jaringan yang disebabkan oleh mediator inflamasi yang diproduksi oleh sitokin dan kerusakan yang disebabkan oleh *Reactive Oxygen Species* (ROS).

Mekanisme molekuler yang terjadi karena pelepasan mediator inflamasi dan ekspresi gen yang dapat diinduksi oleh LPS baru-baru ini menjadi objek penelitian yang sering dilakukan (Victor *et al.*, 2005). Selama fase plasma akut, LPS berikatan dengan protein dalam bentuk LPS-binding protein (LBP). LBP sangat penting untuk munculnya respons inflamasi yang di induksi LPS. Saat ini, banyak reseptor endotoksin telah diidentifikasi, seperti  $\beta$ 2-integrin CD11/CD18, macrophage scavenger receptor for acetylated LDL, L-selectin, dan CD14. Dari ke semua reseptor tersebut, CD14 dianggap sebagai yang paling penting. Di mana reseptor ini ditemukan dalam dua bentuk, yaitu membrane bound CD14 (mCD14) dan soluble CD14 (sCD14). LPS juga dapat berinteraksi dengan transmembrane signal transduction receptor Toll-like Receptor 4 (TLR4), di mana reseptor ini berada pada kompleks accessory protein MD-2. Walaupun TLR2 dianggap

ikut berperan pada proses signaling LPS, diduga TLR4 memiliki peran kunci dalam respons imun terhadap bakteri Gram negatif pada innate. LPS yang terikat pada reseptor ini akan mengaktifkan beberapa jalur signaling intraseluler, termasuk jalur I $\kappa$ B kinase (IKK)-Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan berbagai jalur Nitrogen Activated Protein Kinase (NAPK). Jalur-jalur ini akan memfosforilasi dan mengaktifkan berbagai faktor transkripsi, termasuk NF $\kappa$ B/Rel protein, Activator Protein 1 (AP-1) dan Nuclear Factor-interleukin 6 (NF-IL6), yang akan menyebabkan induksi gen serta ekspresi mediator inflamasi dengan cepat, termasuk cytokines, lipid mediators, inducible nitric oxide synthase (iNOS), dan molekul adhesi. Sitokin memiliki berbagai sel target, dan tindakan spesifik sitokin ini bergantung pada stimulus, tipe sel, dan mediator dan reseptor inflamasi lainnya yang ada.

Meskipun beberapa faktor transkripsi telah diidentifikasi yang mungkin terkait dengan perubahan aktivasi gen pada sepsis, termasuk AP-1 dan NF-IL-6, NF $\kappa$ B adalah faktor yang paling baik dijelaskan. Baik studi in vitro dan in vivo telah menunjukkan peran penting NF $\kappa$ B dalam sepsis dan syok endotoksik.

### **3.1.2. Nuclear Factor $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) dan Sepsis**

NF $\kappa$ B adalah faktor transkripsi yang penting untuk fungsi normal sel imun dan mengatur aktivasi gen yang diperlukan untuk respons cepat, tetapi meningkatkan dan/atau memperpanjang durasi aktivasi NF $\kappa$ B akan menyebabkan ekspresi berlebih dari protein mediator dan akan menghasilkan efek yang merusak selama periode sepsis.

Jalur NF $\kappa$ B dapat bervariasi dengan efek yang berbeda pada regulasi gen, tergantung pada kombinasi spesifik yang terjadi (Abraham, 2005). NF $\kappa$ B tidak aktif dalam sitoplasma dan disertai dengan protein inhibitor yang berasal dari family I $\kappa$ B, termasuk I $\kappa$ B $\alpha$ , I $\kappa$ B $\beta$ , dan I $\kappa$ B $\epsilon$ . LPS akan merangsang aktivasi NF $\kappa$ B melalui mediator inflamasi, termasuk sitokin (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), ROS (terutama hidrogen peroksida), aktivator protein kinase C, virus, sinar ultraviolet, dan radiasi pengion (Barnes, 1997).

Aktivasi NF $\kappa$ B dicapai melalui fosforilasi dan degradasi protein penghambat I $\kappa$ B melalui aksi kinase spesifik, kinase penginduksi NF $\kappa$ B (NIK), IKK1, dan IKK-2 (Abraham, 2003). IKK $\alpha$  dan IKK $\beta$  dapat

memfosforilasi I $\kappa$ B in vitro, tetapi studi genetik menunjukkan bahwa IKK $\beta$  memainkan peran utama dalam aktivasi NF $\kappa$ B yang diinduksi oleh sitokin. Degradasi I $\kappa$ B terjadi melalui penambahan residu ubiquitin, diikuti oleh proses proteolitik. Setelah NF $\kappa$ B memasuki nukleus, ia dapat berikatan dengan gen target untuk memulai transkripsi, translasi, dan sintesis protein. Kompleks IKK adalah pengatur utama aktivasi NF $\kappa$ B oleh rangsangan mediator inflamasi. Ada banyak gen yang mengandung urutan spesifik untuk mengikat NF $\kappa$ B ke wilayah promoter.

Mekanisme umpan balik telah diidentifikasi yang dapat menjelaskan modulasi yang terjadi sebagai respons terhadap rangsangan awal (umpan balik positif) atau dalam aktivasi NF $\kappa$ B (umpan balik negatif) (Blackwell dan Christman, 1997). LPS dapat menginduksi sintesis mediator sitokin antiinflamasi, seperti IL-10 (serta IL-4 dan IL-13), yang akan menghambat aktivasi NF $\kappa$ B dan menekan produksi sitokin (Wang *et al.*, 2003), yang membutuhkan mekanisme penghambatan umpan balik.

NF $\kappa$ B memainkan peran sentral dalam mengatur ekspresi mediator imunomodulator yang terlibat dalam stres oksidatif dan sepsis. Beberapa penelitian pada hewan telah menunjukkan hubungan antara sepsis dan aktivasi NF $\kappa$ B dan stres oksidatif. Pada tikus, pemberian LPS ditemukan menyebabkan aktivasi NF $\kappa$ B di banyak organ, yang dikaitkan dengan peningkatan mRNA dan ekspresi protein dari berbagai sitokin yang diatur NF $\kappa$ B, termasuk di antaranya Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) dan IL-6 (Victor *et al.*, 2005)

### 3.2. Apoptosis

Mekanisme molekuler apoptosis sangat dilestarikan melalui evolusi organisme yang lebih tinggi termasuk manusia dan mamalia lainnya. Banyak rangsangan fisiologis dan patologis termasuk kekurangan nutrisi, aktivasi reseptor kematian permukaan sel, bahan kimia, radiasi pengion dan aktivitas fisik dapat mengaktifkan program apoptosis. Stimulasi ini mengaktifkan jalur berbeda yang mengarah ke apoptosis (Nikitakis *et al.*, 2004).

Setelah sel menerima sinyal instruksi khusus, mereka akan mengalami apoptosis, dan sel mengalami perubahan yang khas. Keluarga protein yang disebut *caspases* biasanya diaktifkan pada tahap awal apoptosis. *Caspases*

juga mengaktifkan enzim, seperti DNases, yang mulai memotong DNA di dalam nukleus. Sel-sel apoptosis menunjukkan morfologi khas selama apoptosis. Biasanya, sel mulai menyusut setelah mitosis laminin dan aktin di sitoskeleton. Untuk memfasilitasi fagositosis oleh makrofag, sel-sel apoptosis sering mengalami perubahan membran plasma dan memicu respons makrofag. Salah satu perubahan yang terjadi adalah perpindahan fosfatidilserin dari dalam sel ke luar sel (Ghatage *et al.*, 2013).

### 3.2.1. Apoptosis Dependent Caspase

*Caspases* adalah keluarga enzim yang dilestarikan yang sangat penting untuk inisiasi dan pelaksanaan apoptosis. Istilah *caspases* berasal dari ketergantungan pada *caspases* tertentu. Semua *caspase* disintesis di dalam sel sebagai zimogen, yang secara katalitik tidak aktif dan harus menjalani proses aktivasi. Aktivasi *caspase* efektor (seperti *caspase 3* atau *caspase 7*) dilakukan oleh *caspase* inisiator (seperti *caspase 9*). Initiator *caspases* secara otomatis diaktifkan di bawah kondisi apoptosis, misalnya apoptosome bertanggung jawab atas aktivasi *caspase 9*. *Caspases* efektor, yang paling penting *caspase 3*, bertanggung jawab atas perubahan morfologis dan biologis sel apoptosis. Mereka menargetkan komponen struktural (aktin dan laminin), protein pengatur dan *Caspase Activated Deoxyribonuclease* (CAD) yang diaktifkan *caspase*. CAD bertanggung jawab atas degradasi kromosom, kromatin, kondensasi, dan pembentukan DNA dengan fragmen unik. Penyelesaian jalur eksekutif menyebabkan fagositosis di akhir apoptosis (Ghatage *et al.*, 2013).

*Caspases* adalah protease sistein. Ini adalah mediator kunci dari apoptosis. *Caspases* sangat penting untuk inisiasi dan eksekusi apoptosis. *Caspases* biasanya tidak aktif tetapi dapat diaktifkan oleh berbagai rangsangan apoptosis. Kunci pemecahan protein ini juga mengaktifkan enzim lain. Apoptosis yang bergantung pada *caspase* dibagi menjadi jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik (Nikitakis *et al.*, 2004).

#### 1. Jalur Ekstrinsik

Jalur ekstrinsik di mediasi oleh reseptor kematian. Mereka memainkan peran penting dalam apoptosis dan dapat mengaktifkan *caspase*

*cascade* dalam beberapa detik setelah pengikatan ligan. Oleh karena itu, induksi apoptosis melalui mekanisme ini sangat cepat. Reseptor TNF adalah reseptor membran sel spesifik milik keluarga TNF. Reseptor kematian diduga termasuk reseptor TNF 1, Fas, DR3, DR4, DR5, dan DR6, yang mengikat ligan spesifik seperti TNF $\alpha$ , limfotoksin, ligan Fas, dan TRAIL. Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraselular khusus (Nikitakis *et al.*, 2004).

Perubahan konformasi dalam domain intraselular reseptor menunjukkan adanya domain kematian, seperti TNFR-Associated Death Domain (TRADD), yang memungkinkan perekrutan berbagai protein apoptosis ke reseptor. Kompleks protein ini biasanya disebut sebagai *Death Inducing Signaling Complex* (DISC). Langkah terakhir dalam proses ini adalah perekrutan salah satu *caspase*, biasanya *caspase* 8. Ini mengarah pada aktivasi *caspase* 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga dapat dikaitkan dengan FAS-Associated Death Domain (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui perekrutan dan pembelahan procaspase 8 (Ghatage *et al.*, 2013).

## 2. Jalur Intrinsik

Mekanisme lain dari apoptosis yang bergantung pada *caspase* adalah jalur intrinsik, juga dikenal sebagai apoptosis yang di mediasi mitokondria. Jalur ini di induksi oleh sinyal intraselular seperti hipoksia, radiasi, infeksi virus, dan terutama kerusakan DNA. Keluarga protein Bcl-2 adalah mediator utama dari proses ini. Mengikuti pelepasan protein spesifik pro-apoptosis seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekutif dimulai dengan aktivasi *caspase* 3. Jalur intrinsik didominasi oleh keluarga protein Bcl-2. Keluarga Bcl-2 memiliki sebanyak 4 domain yang di konservasi yang dikenal sebagai Bcl-2 Homology (BH). Keluarga Bcl-2 termasuk anggota proapoptosis dan antiapoptosis. Anggota pro-apoptosis dapat dibagi lagi menjadi protein multidomain (juga dikenal sebagai keluarga Bax), termasuk Bax, Bok, dan Bak, dan protein khusus BH-3, seperti Bid, Bad, dan Bim. Dalam sel normal, Bax hadir dalam sitosol. Kedua protein mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka menjadi aktif setelah stimulasi apoptosis. Anggota keluarga Bcl-2 antiapoptosis mengandung 4

domain yang di konservasi, seperti Bcl-2 dan Bcl-xl. Bcl-2 hanya ada di membran intraselular dan sitosol. Protein ini bertindak dengan mencegah apoptosis melalui heterodimerisasi dan ekspresi protein pro-apoptosis.

Tujuan akhir dari keluarga Bcl-2 adalah untuk melepaskan faktor pensinyalan apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dengan membuka pori transisi membran permeabel. Hal ini dicapai melalui oligomerisasi anggota pro-apoptosis Bcl-2 di membran luar mitokondria, interaksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Ini melepaskan dua kelompok protein pro-apoptosis dari ruang antarmembran ke dalam sitosol. Kelompok pertama dari protein yang dilepaskan adalah sitokrom c, Smac/DIABLO, dan HtrA2/Omi, yang bergantung pada *caspase*, artinya mereka bertindak di hilir *cascade caspase* yang mengarah ke apoptosis. Peran utamanya adalah mengikat dan mengaktifkan Apaf-1 dan procaspase 9, yang mengarah pada pembentukan badan apoptosis. Ini menghasilkan aktivasi *caspase* 9, diikuti oleh aktivasi efektor *caspase* 3 dan *caspase* 7, sehingga menyelesaikan jalur apoptosis (Abud, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004).

## BAB 4

# KORELASI LIMPA DAN HATI PADA SEPSIS DAN SYOK SEPSIS

---

### 4.1. Fungsi Limpa pada Sepsis dan Syok Sepsis

Limpa adalah kumpulan jaringan limfoid terbesar dalam suatu organisme, dan karena mengandung banyak fagosit, limpa merupakan alat pertahanan penting terhadap mikroba yang memasuki sirkulasi. Selain itu, limpa merupakan satu-satunya organ yang memiliki kemampuan menyaring darah, sehingga limpa memiliki fungsi sistem imun dan sistem hematopoietik (Junqueira, 1995).

Fungsi sistem imun meliputi produksi limfosit, produksi antibodi dan perpindahan antigen dari darah, sedangkan fungsi sistem hematopoetik adalah pembentukan sel darah fetus, destruksi eritrosit dan platelet yang sudah tua, rusak, dan abnormal dalam sinus venosus pulpa merah, serta sebagai tempat penyimpanan eritrosit (reservoir) yang elastis dan terkendali yang mampu mengeluarkan sel darah ke dalam sirkulasi serta menyesuaikan volume sirkulasi (Junqueira, 1995).

Limpa berwarna merah keunguan karena banyaknya darah yang disimpan, dan lunak serta mudah ruptur. Limpa ditutupi oleh simpai padat jaringan ikat, dan trabekula membagi parenkim atau limpa menjadi kompartemen (Leeson, *et al.*, 1996). Limpa juga mengandung sejumlah besar limfosit dan sejumlah besar makrofag yang memantau darah. Strukturnya terdiri dari serat, sel *reticular meshwork*, kapsul fibrosa, dan trabekula yang mengandung miofibroblas kontraktile (Junqueira, 1995).

Parenkim limpa terdiri dari pulp merah, yang terdiri dari struktur memanjang, korda Bilroth yang terletak di antara sinusoid. Pulp merah mengandung sel plasma, makrofag, trombosit, granulosit, dan limfosit. Trombosit dan eritrosit tua, rusak, atau abnormal dihancurkan

(hemocatheresis). Sel darah merah (eritrosit) dihancurkan oleh fagosit, dan besi yang diturunkan dari hemoglobin disimpan di dalam sel. Besi dilepaskan saat hemoglobin baru perlu dibentuk (Leeson *et al.*, 1996).

Pulpa putih terdiri dari jaringan limfoid yang menutupi arteri sentral, yang disebut periarteriolar lymphoid sheath (PALS), dan nodulus limfatikus yang ditambahkan pada selubung. (Junqueira, 1995; Leeson, *et al.*, 1996). Limfosit T terdapat di sekitar arteri sentral, sedangkan limfosit B terdapat pada nodulus limfatikus (Leeson, *et al.*, 1996). Jika ada benda asing di dalam darah maka akan merangsang limfosit T dan limfosit B untuk menghasilkan antibodi (Junqueira, 1995). Daerah perbatasan pulpa merah dan pulpa putih disebut Zona Marginalis yang terdiri atas banyak sinus dan jaringan ikat longgar (Leeson, *et al.*, 1996).

Fungsi limpa berpusat pada sirkulasi sistemik. Limpa memiliki dua kompartemen yang berbeda secara fungsional dan morfologis, pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah adalah penyaring darah yang menghilangkan benda asing dan sel darah merah yang rusak dan merupakan tempat penyimpanan zat besi, sel darah merah dan trombosit. Limpa adalah tempat hematopoiesis pada tikus, terutama pada janin dan hewan yang baru lahir. Limpa juga merupakan organ limfoid terbesar, mengandung sekitar seperempat dari semua limfosit dan memulai respons imun terhadap antigen yang dibawa darah (Nolte *et al.*, 2002; Balogh *et al.*, 2004).

#### **4.2. Fungsi Hati pada Sepsis dan Syok Sepsis**

Hati diperkirakan mempengaruhi mekanisme metabolisme dan pertahanan tuan rumah selama sepsis. Organ ini secara aktif mengatur proses inflamasi dengan menyaring, menonaktifkan, dan menghilangkan bakteri, produk bakteri (misalnya endotoksin), zat vasoaktif, dan mediator inflamasi. Selain itu, hati yang terstimulasi sendiri memproduksi dan melepaskan berbagai sitokin, lipid bioaktif, dan protein fase akut dalam jumlah besar.

Disfungsi hepatic dini terjadi dalam beberapa jam pertama sepsis dan berhubungan dengan hipoperfusi hepatosplanknik. Penyakit ini dapat menyebabkan peningkatan akut penanda-penanda biologis kerusakan hati (transaminase, dehidrogenase laktat, bilirubin). Namun, mereka biasanya pulih dengan cepat dengan perawatan suportif yang memadai. Sebaliknya,

disfungsi hati lanjut adalah proses yang lebih lambat dan lebih parah. Proses ini ditandai dengan kerusakan struktural dan fungsional dan dapat menyebabkan pelepasan bakteri, endotoksin, dan molekul inflamasi yang dapat memulai atau mempertahankan kerusakan multiorgan.

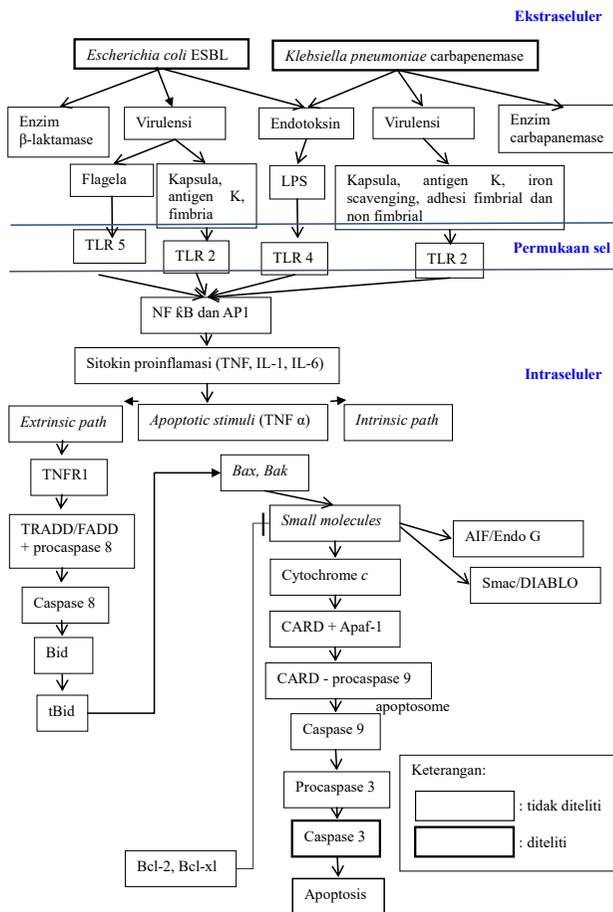
Disfungsi hepatic awal dan akhir dikaitkan dengan perubahan global dalam perfusi hati dan mikrosirkulasi. Sepsis dapat menyebabkan perubahan besar pada mikrosirkulasi semua organ dalam yang tidak dapat diprediksi dari perubahan aliran darah regional atau sistemik. Redistribusi sirkulasi intrahepatik mengalirkan darah dari pembuluh darah yang berkontraksi ke pembuluh darah yang terdilatasi, menyebabkan terjadinya penurunan daerah total sinusoidal yang terperfusi. Sel endotel sinusoidal hati (SES) dan sel Kupffer (SK) merupakan jalur utama kontak untuk bakteri, produk bakteri, dan debris mikrobial, yang diangkut oleh darah portal dan arteri hepatica. Respons mikrovaskular hati terhadap zat-zat ini berkorelasi dengan status aktivasi, jumlah, dan distribusi SK di lobulus hepar. Setelah terstimulasi, SK melepaskan berbagai mediator inflamasi, toksik, dan vasoaktif, yang semuanya menyebabkan kerusakan jaringan secara langsung atau tidak langsung.

Sel endotel sinusoid hati menghasilkan zat vasoaktif, seperti prostasiklin dan oksida nitrat, yang mengatur tonus pembuluh darah dalam makrosirkulasi hati dan mikrosirkulasi. Di sisi lain, SES telah mengalami perubahan struktural dan fungsional yang signifikan. Pembengkakan, distensi, dan penghancuran SES menyebabkan kebocoran albumin, plasma, dan sel inflamasi ke dalam interstitium, mengakibatkan kerusakan jaringan secara langsung. Sel endotel sinusoid kehilangan sifat antikoagulannya dan mengekspresikan molekul adhesi permukaan, yang menarik sejumlah besar trombosit dan leukosit. Akhirnya, sinus tersumbat oleh gumpalan fibrin dan kumpulan sel darah merah. Pengurangan aliran darah yang dihasilkan akan memperburuk keadaan hipoperfusi sinusoidal. Dalam keadaan inflamasi yang tidak terkontrol dan koagulopati persisten, proses di atas menyebabkan iskemia dan disfungsi mikrovaskular, yang pada akhirnya menyebabkan kerusakan dan kegagalan hepatoselular (Ardie dan Pinsky, 2000; Ramalho, et al., 2006; Spapen, 2008).

# BAB 5

## SKETSA PAHAM DAN KONTEMPLASI PEMIKIRAN

### 5.1. Sketsa Paham



Tujuan penindaklanjutan untuk menghitung jumlah apoptosis dan menghitung ekspresi caspase 3 pada limpa dan hati tikus yang diinjeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, keduanya merupakan bakteri yang mengandung lipopolisakarida (LPS) yang dikenali oleh sistem kekebalan sebagai *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMPs). *Escherichia coli* ESBL memiliki flagela, fimbria, kapsula, dan antigen K selain LPS, sedangkan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* memiliki adhesi fimbrial dan non-fimbrial, iron scavenging, kapsula, dan antigen K yang bersifat virulen. ESBL *Escherichia coli* yang digunakan dalam penelitian ini resisten terhadap beta-laktam dan *K. pneumoniae carbapenemase* resisten terhadap karbapenem. Bakteri yang disuntikkan ke tikus akan dikenali oleh Pattern Recognition Receptors (PRR), yaitu TLR2 yang terletak di permukaan sel mengenali mikroorganisme melalui polipeptida, sehingga mengenali komponen bakteri, seperti fimbria, kapsula, antigen K, adhesi fimbrial dan non-fimbrial, dan iron scavenging. Selanjutnya, TLR4 adalah reseptor untuk LPS, sedangkan TLR5 dikhususkan untuk pengenalan flagellar. Selama pengenalan struktur mikroba, pensinyalan oleh TLR mengarah pada perlekatan ligan ke permukaan sel, yang memunculkan respons dari molekul pensinyalan sitoplasma. Respons pertama adalah faktor diferensiasi myeloid protein adaptor 88 (MyD88) dan aktivasi molekul pensinyalan seperti kinase terkait IL-1 *Receptor Associated Kinase* (IRAK) dan *TNF Receptor Associated Factor* (TRAF 6). IRAK menyebabkan autofosforilasi untuk mengaktifkan molekul pensinyalan lain seperti reseptor TNF- $\alpha$  (TNF-R). Gen yang diekspresikan oleh TLRs penting untuk menghasilkan berbagai komponen respons imun bawaan, yaitu sitokin inflamasi (TNF, IL-1, IL-8 dan IL-12), *endothelial adhesion molecules* (E-selection), dan protein yang berperan dalam mekanisme pembunuhan mikroba (termasuk iNOS). Gen spesifik yang diekspresikan tergantung pada jenis sel. Faktor transkripsi, seperti *activating protein-1* (AP-1) melalui jun kinase dan nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), yang diaktifkan dan ditranslokasikan di dalam nukleus, akan merangsang produksi sitokin dan aktivitas fagositik (Abbas, *et al.*, 2000; Shizuo, 2000). Sitokin dominan yang diproduksi adalah sitokin pro-inflamasi, termasuk TNF, IL-1, dan IL-6. Sitokin yang berperan sebagai stimulator apoptosis adalah TNF $\alpha$ .

Selama infeksi bakteri, patogen menghasilkan dan mengeluarkan faktor virulensi (terutama endotoksin) dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum, sel mengalami apoptosis dalam dua cara utama, ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (mitokondria) (Jin dan El-Deiry, 2005; Ayala *et al.*, 2007). Penghambatan sinyal apoptosis ini dianggap memberikan perlindungan terhadap infeksi bakteri yang diinduksi sepsis (Wesche-Soldato *et al.*, 2007; Ayala *et al.*, 2007).

Reseptor TNF adalah reseptor membran sel spesifik, yang termasuk dalam family *Tumor Necrosis Factor* (TNF), secara kolektif dikenal sebagai reseptor kematian, termasuk reseptor TNF 1, yang berikatan dengan ligan spesifik, seperti TNF- $\alpha$ . Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraselular spesifik di belakang ligannya (Nikitakis *et al.*, 2004). Perubahan konformasi dalam domain intraselular reseptor menunjukkan adanya “*death domain*”, seperti TNFR-Associated Death Domain (TRADD), yang memungkinkan perekrutan berbagai protein apoptosis ke reseptor. Langkah terakhir dalam proses ini adalah perekrutan *caspase*, biasanya *caspase* 8, ke DISC. Ini mengarah pada aktivasi *caspase* 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga dapat dikaitkan dengan FAS-Associated Death Domain (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui perekrutan dan pembelahan procaspase 8.

Jalur ekstrinsik biasanya di mediasi melalui interaksi antara ligan alami reseptor kematian atau melalui induksi gugus reseptor kematian untuk mengaktifkan reseptor kematian. Reseptor kematian adalah reseptor permukaan sel yang merupakan anggota keluarga TNF dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian, seperti reseptor TNF 1(p55)/TNF dan limfotoksin. Setelah aktivasi ekstrinsik, intraselular *Death Domain* (DD) dari *death receptor* berhubungan dengan protein adaptor yang disebut Fas-Associated Death Domain (FADD) secara langsung atau tidak langsung melalui reseptor TNF-Associated Death Domain (Ashkenazi and Dixit, 1998).

FADD intraselular terkait reseptor kematian berinteraksi dengan procaspase 8 untuk membentuk kompleks pensinyalan pemicu kematian yang diperlukan untuk aktivasi *caspase* 8 (Ashkenazi dan Dixit, 1998). Family protein Bid menjadi *truncated* Bid (tBid), yang translokasinya di

luar membran mitokondria mengakibatkan hilangnya potensi transmembran mitokondria dan merangsang pelepasan sitokrom c. tBid akan menginduksi protein domain BH3 proapoptosis (Bid, Bad, Noxa, dan p53-up-regulated modulator apoptosis) untuk memberi sinyal ke mitokondria. Protein domain BH3 hanya mempromosikan perakitan protein pro-apoptosis seperti Bax dan Bak ke dalam pori-pori di luar membran mitokondria dan mengubah permeabilitas mitokondria untuk melepaskan berbagai faktor pemicu apoptosis, termasuk sitokrom c melalui transisi permeabilitas mitokondria. Secara umum, penurunan potensi transmembran mitokondria melepaskan sitokrom c, yang mengikat Apaf-1 dan mendorong aktivasi *caspase* 9 dan 3 (Green dan Reed, 1998). Peran sentral mitokondria dalam apoptosis adalah melalui jalur intrinsik.

Jalur intrinsik juga dikenal sebagai apoptosis yang di mediasi mitokondria. Jalur ini di induksi oleh sinyal intraselular, terutama kerusakan DNA. Keluarga protein Bcl-2 adalah mediator utama dari proses ini. Mengikuti pelepasan protein pro-apoptosis spesifik seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi dimulai dengan aktivasi *caspase* 3. Jalur intrinsik didominasi oleh family protein Bcl-2. Target utama family Bcl-2 adalah melepaskan sinyal apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dengan membuka pori transisi membran permeabilitas. Hal ini dapat dicapai melalui oligomerisasi anggota Bcl-2 pro-apoptosis di membran luar mitokondria yang berinteraksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Kelompok pertama dari protein yang dilepaskan adalah sitokrom c dan Smac/DIABLO, yang bergantung pada *caspase*, artinya mereka bertindak di hilir *cascade caspase*, yang mengarah ke apoptosis. Tujuan utamanya adalah untuk mengikat dan mengaktifkan *Caspase Recruitment Domain* (CARD), Apaf-1 dan procaspase 9, yang mengarah pada pembentukan apoptosom. Hal ini pada gilirannya menyebabkan aktivasi *caspase* 9 dan aktivasi efektor *caspase* 3 lebih lanjut, sehingga menyelesaikan jalur apoptosis. Pembentukan apoptosom dan aktivasi kaspase efektorlah yang menyebabkan peristiwa apoptosis seperti kondensasi kromatin, asimetri membran plasma, dan blebbing sel (Abud, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004).

## 5.2. Kontemplasi Pemikiran

Hipotesis penindaklanjutan ini terdapat dua perbedaan peningkatan, yakni jumlah apoptosis pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase, serta ekspresi caspase 3 pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase.

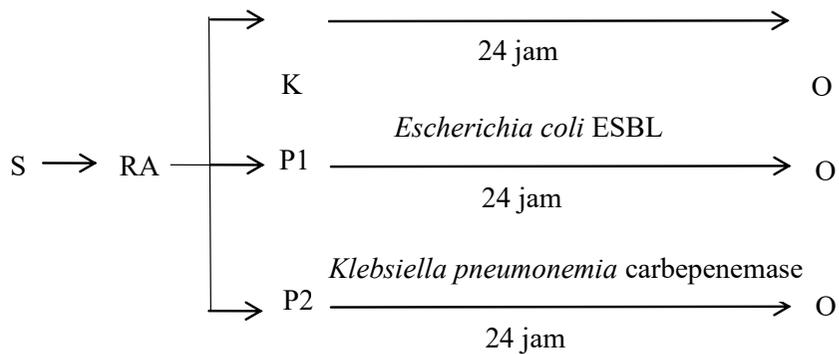
# BAB 6

## DAYA TARIK

---

### 6.1. Strategi Pendalaman

Jenis penindaklanjutan buku ini adalah murni laboratorium (*true experimental*) dengan menggunakan rancangan tatanan *post test only control group design* (pengumpulan data dilakukan setelah diberikan perlakuan) dan dibandingkan dengan kelompok kontrol. Skema rancangan dapat digambarkan sebagai berikut.



**Gambar 1.** Skema rancangan

Keterangan:

S : Sampel

RA : Random alokasi

K : Kelompok 1, kontrol normal diinjeksi aqua pro *injection* bebas pirogen

P1 : Kelompok 2, perlakuan 1 diinjeksi *E. coli* ESBL

P2 : Kelompok 3, perlakuan 2 diinjeksi *K. pneumoniae* carbapenemase

O : Observasi

## **6.2. Lapangan Pelaksanaan**

Lokasi penindaklanjutan ini dilakukan di beberapa tempat, yang pertama yaitu Unit Hewan Coba Laboratorium Ilmu Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya sebagai tempat pemeliharaan, perlakuan, pembedahan, pengambilan limpa, hati, dan darah, serta pembuatan hapusan darah tikus. Kedua, Laboratorium Mikrobiologi RSUD dr. Soetomo sebagai tempat mengkultur isolat klinis (*wild type*) *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Ketiga, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya sebagai tempat pemrosesan jaringan dan pengecekan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus. Penindaklanjutan ini dilakukan kurang lebih selama 3 bulan.

## **6.3. Elemen, Jumlah, dan Proses Penindaklanjutan**

### **6.3.1. Elemen Penindaklanjutan**

Objek penindaklanjutan yang digunakan dalam buku ini adalah tikus (*Rattus norvegicus*) jantan strain wistar berumur sekitar delapan sampai dua belas minggu dengan berat badan 150-200 gram yang berasal dari unit hewan coba laboratorium ilmu biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya.

### **6.3.2. Jumlah Elemen Penindaklanjutan**

Jumlah tikus dalam penindaklanjutan ini adalah 12 ekor dan terdapat 3 perlakuan. Perlakuan pada penindaklanjutan ini adalah: 1) Kelompok 1 sebagai kontrol normal, tikus disuntik aqua pro injeksi bebas pirogen, 2) Kelompok 2 sebagai perlakuan 1, tikus disuntik *E. coli* ESBL, dan 3) Kelompok 3 Kelompok sebagai perlakuan 2, tikus disuntik dengan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

### **6.3.3. Proses Pengambilan Elemen Penindaklanjutan**

Teknik pemilihan objek penindaklanjutan yang digunakan dalam penelitian ini adalah pengalokasian acak. Pengacakan dilakukan dengan menomori semua tikus, yaitu 1-12, kemudian mengacak jumlahnya. Empat angka pertama yang muncul digunakan sebagai grup 1, empat

angka berikutnya digunakan sebagai grup 2, dan empat angka berikutnya digunakan sebagai grup 3.

Pemilihan objek penindaklanjutan ditentukan sesuai dengan kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi meliputi tikus yang digunakan dalam penelitian ini adalah tikus strain wistar, tikus jantan, tikus berumur 8-12 minggu dengan berat antara 150-200 gram, dan tikus yang digunakan dalam penindaklanjutan ini harus sehat yang ditandai dengan bulu yang mengilat, gerakannya aktif, dan tidak terdapat luka.

Sedangkan penentuan sampel yang dikecualikan, yaitu jika ada tikus dalam penindaklanjutan ini yang mati tanpa sepengetahuan penulis, menyebabkan penundaan pembedahan dan pengangkatan hati dan limpa (dengan asumsi terjadi autolisis). Jika ada tikus dalam penindaklanjutan ini yang terinfeksi sebelum menerima pengobatan. Jika tikus memiliki kelainan anatomi (cacat). Setelah diperoleh sampel yang homogen, kelompok sampel secara acak dibagi menjadi beberapa kelompok, dan setiap subjek penindaklanjutan mempunyai kesempatan yang sama untuk menduduki setiap kelompok.

#### **6.4. Gambaran Unsur Pemengaruh**

Variabel yang digunakan dalam penindaklanjutan ini terbagi menjadi 3 variabel, yakni variabel bebas, terikat, dan kendali. Variabel bebas berupa *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae* carbapenemase, variabel terikat berupa ekspresi caspase 3, dan variabel kendali berupa umur tikus, frekuensi suntikan yang diberikan, kondisi kandang, jenis kelamin, pakan yang diberikan, serta minum yang diberikan.

#### **6.5. Jabaran Dasar Eksplikasi**

ESBL *E. coli* yang dimaksud dalam penelitian ini adalah isolat klinis (wild-type) *E. coli* ESBL yang disuntikkan secara intraperitoneal ke tikus dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase yang dimaksud dalam penelitian ini adalah *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase isolat klinis (wild type) yang disuntikkan secara intraperitoneal ke tikus dengan dosis

1x10<sup>5</sup> CFU/ml, dari diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.

Ekspresi *caspase 3* pada penelitian ini mengacu pada ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL dan terinfeksi *K. pneumoniae carbapenem* menggunakan subunit antibodi *caspase 3* p12 yang diproduksi oleh Bioss Antibodies (bs-0087R) untuk deteksi imunohistokimia, kemudian gunakan perhitungan persentase.

## 6.6. Pendukung Pelaksanaan

### 6.6.1. Alat

1. *Disposable syringe* 1 ml One Med Health Care produksi PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia, digunakan sebagai penginjeksian *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenem* pada peritonium tikus.
2. *Disposable syringe* 5 ml One Med Health Care produksi PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia, digunakan sebagai pengambilan darah jantung tikus.
3. *Urine container* 60 ml One Med Health Care produksi PT. Jayamas Medica Industri, Sidoarjo, Indonesia, digunakan sebagai tempat organ hati dan limpa tikus.
4. Vaculab EDTA K3 3 ml One Med produksi PT. Jayamas Medica Industri Indonesia, digunakan sebagai penyimpanan darah jantung tikus.
5. *Rotary microtome* atau *sliding microtome*, kuas, *waterbath*, *object glass*, oven digunakan sebagai pemrosesan organ limpa dan hati tikus.
6. Mikroskop cahaya binokuler Olympus dan kamera mikroskop OptiLab sebagai pengamatan dan pendokumentasian ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus.
7. Kamera Samsung Galaxy J7 12 megapixel digunakan sebagai pendokumentasian kegiatan selama penindaklanjutan.

### 6.6.2. Bahan

1. Tikus jantan strain Wistar berusia kira-kira 8-12 minggu dengan berat badan 150-200 gram yang berasal dari laboratorium ilmu biokimia

Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya.

2. Isolat klinis (*wild type*) *E. coli* ESBL dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.
3. Isolat klinis (*wild type*) *K. pneumoniae* carbapenemase dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml yang diperoleh dari laboratorium mikrobiologi RSUD dr. Soetomo.
4. Physiologic Zur (PZ) yang digunakan dalam penindaklanjutan ini yakni aqua pro *injection* bebas pirogen produksi PT. Ikapharmindo Putramas Pharmaceutical Laboratories Jakarta, Indonesia.
5. Pakan ternak merk Hi-Pro-Vite medicated 593 produksi PT. Charoen Pokphan Indonesia, Tbk., Surabaya, Indonesia, digunakan dalam pemeliharaan tikus.
6. Metanol, giemsa, dan aquades digunakan dalam fiksasi dan pewarnaan hapusan darah tikus.
7. Larutan H<sub>2</sub>CO (formaldehyde) 37% produksi PT. Katalis Datesa Prima digunakan dalam larutan fiksasi organ limpa dan hati tikus.
8. *Buffer formalin*, sodium hidrogen fosfat dibasik (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 6,5 gram, aquadestilata 900 ml, dan *formaldehyde* 37-40%), etanol 80%, etanol 95%, etanol absolut, xylol, larutan *clearing*, paraffin, poly L-Lysin, perekat jaringan digunakan dalam pemrosesan organ limpa dan hati tikus.
9. *Primary antibody* caspase 3 p12 subunit *antibody* (*host: rabbit*, target protein: caspase 3 p12 subunit, *clonality: polyclonal*, *isotype: IgG*, *entrez gene: 836*, *source: KLH conjugated synthetic peptide derived from human caspase 3 p12 subunit*, *purification: purified by protein A*) produksi Bioass Antibodies digunakan dalam pengecekan *caspase 3* oleh organ limpa dan hati tikus.

#### 6.7. Perlakuan pada Hewan Coba

Sesuai dengan tikus dengan perlakuan berikut dengan injeksi intraperitoneal: 1) Kelompok 1 digunakan sebagai kontrol normal, yaitu tikus disuntik dengan injeksi aqua pro bebas pirogen, 2) Kelompok 2 digunakan sebagai perlakuan 1, yaitu tikus disuntik *Escherichia coli* ESBL

dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml, dan 3) Kelompok 3 sebagai perlakuan 2 yaitu tikus disuntik *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/ml.

Hewan percobaan menunjukkan kejadian apoptosis pada limpa dan hati 24 jam setelah terpapar berbagai mikroorganisme pada sepsis, sehingga tikus dapat dibunuh setelah 24 jam untuk melihat jumlah sel apoptosis pada hati dan limpa. Jika tikus mati dalam waktu 24 jam, operasi harus segera dilakukan untuk mengangkat limpa dan hati untuk mencegah autolisis. Irisan organ diambil pada bagian tengah, kiri, dan kanan.

### 6.7.1. Pemrosesan Jaringan

Limpa tikus dan organoid hati difiksasi dalam buffer formalin dengan tujuan mempertahankan morfologi sel normal untuk mencegah autolisis dan mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur. Tahap selanjutnya adalah pembuatan blok parafin. Setelah blok parafin dibuat, sayat jaringan dengan mikrotom putar atau mikrotom geser dengan ketebalan 4-6 mikron. Sayatan yang diperoleh kemudian dihilangkan dengan kuas yang dibasahi air dan diletakkan di permukaan *waterbath*. Jaringan yang bengkak kemudian diangkat dengan *object glass* yang telah dilapisi dengan perekat jaringan, kemudian dikeringkan pada suhu kamar dan ditempatkan dalam oven semalaman.

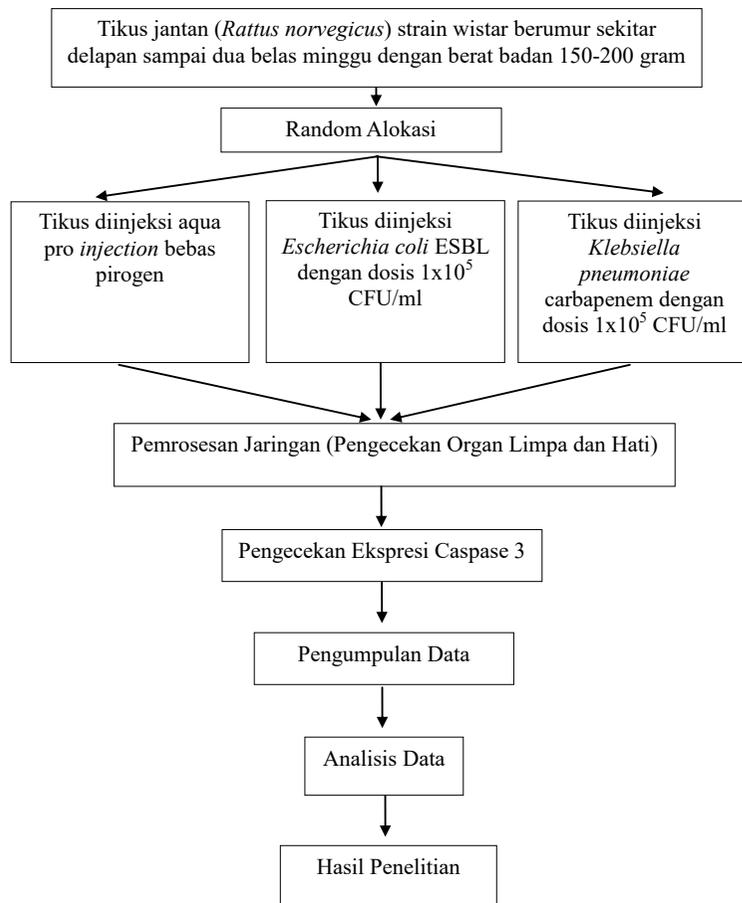
### 6.7.2. Pengamatan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus

Pengamatan ekspresi *caspase 3* pada hati dan limpa tikus dilakukan dengan pengecatan menggunakan *primary antibody caspase 3 p12 subunit antibody (host: rabbit, target protein: caspase 3 p12 subunit, clonality: polyclonal, isotype: IgG, entrez gene: 836, source: KLH conjugated synthetic peptide derived from human caspase 3 p12 subunit, purification: purified by protein A)* produksi *Bioss Antibodies*. Ekspresi *Caspase 3* diamati dengan metode imunohistokimia. *Caspase 3* diekspresikan ketika sitoplasma berwarna coklat, tetapi jika sitoplasma transparan, dapat dikatakan bahwa *caspase 3* tidak diekspresikan. Ekspresi *caspase 3* dihitung dengan membagi sel pengekspresian *caspase 3* dengan semua sel yang diawetkan dan dikalikan dengan 100% untuk menyatakan data sebagai persentase.

## 6.8. Skenario Tindakan

Hasil yang diperoleh ditinjau lebih lanjut dengan menghitung besarnya pemusatan (*mean*, *median*, dan *modus*) dan titik sebar (standar deviasi dan koefisien variasi), kemudian dibandingkan antara 3 kelompok, yang pertama adalah tikus kontrol dengan tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL. Kedua, tikus kontrol dengan tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase. Ketiga, tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase. Data ditinjau lebih lanjut dengan tabel dan grafik menggunakan aplikasi Graphad Prism.

## 6.9. Paradigma Konsep



# BAB 7

## KUPAS TUNTAS

---

### 7.1. Kematian Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Menurut penelitian yang telah selesai, ditunjukkan bahwa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* memiliki tingkat kematian yang lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi ESBL *E. coli*. Di bawah ini adalah data kematian tikus pada jam ke 2-8 dan jam ke 8-24 setelah injeksi bakteri *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* (Tabel 2).

**Tabel 2. Data Kematian Tikus pada Jam ke 2-8 dan Jam ke 8-24 Setelah Diinfeksi Bakteri *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Kelompok	Tikus Hidup	Tikus Mati Jam ke 2-8	Tikus Mati Jam ke 8-24
Kontrol (n=4)	4 (100%)	0	0
<i>E.coli</i> ESBL (n=4)	4 (100%)	0	0
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (n=4)	1 (25%)	0	3 (75%)

Berdasarkan Tabel 2, semua tikus yang terinfeksi *E.coli* ESBL bertahan hidup, sedangkan hanya satu mencit yang terinfeksi *K.pneumoniae carbapenemase* yang bertahan hidup lebih dari 24 jam.

### 7.2. Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

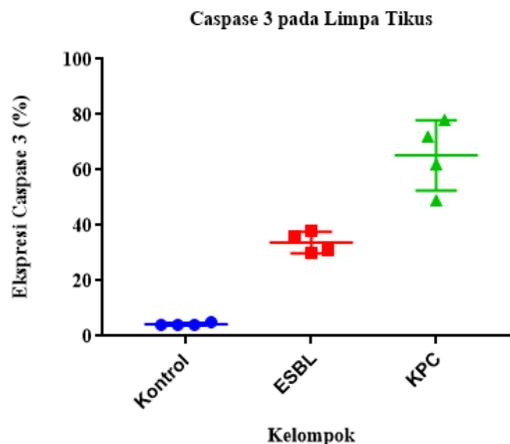
Berdasarkan penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL. Di bawah ini adalah data rata-rata dan standar deviasi (simpangan

baku) ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus kontrol, tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* (Tabel 3).

**Tabel 3. Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Infeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (%)**

Kelompok	$\bar{x} \pm SD$	Median	Max-Min
Kontrol (n=4)	4,25±0,5	4	5-4
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	33,75±3,862	33,5	38-30
<i>K. pneumoniae carbapenemase</i> (n=4)	65,25±12,69	67	78-49

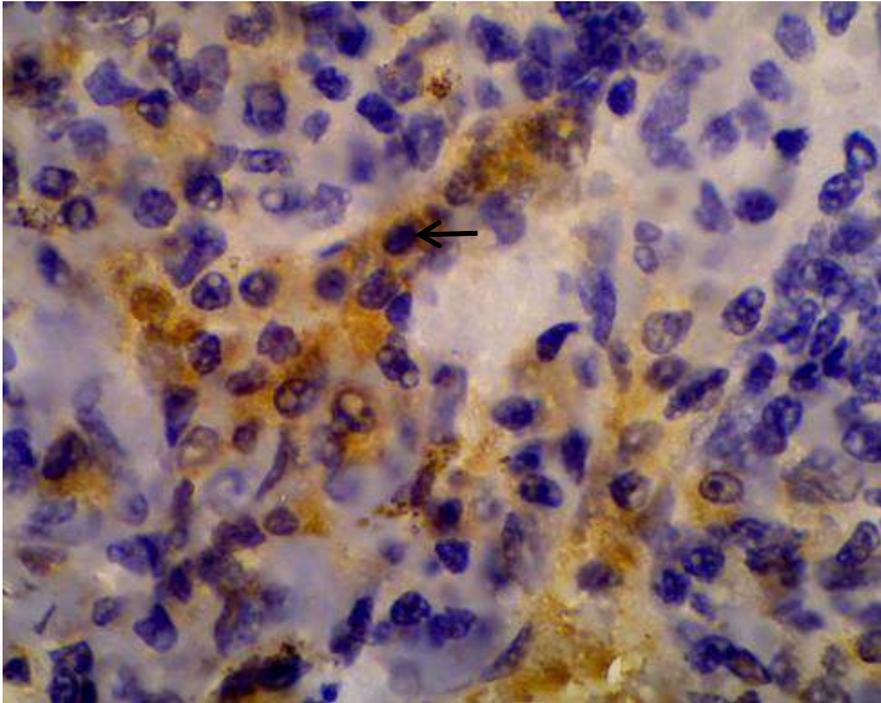
Berdasarkan data pada Tabel 3 terlihat bahwa tingkat ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* paling tinggi yaitu 65,25±12,69%, sedangkan tingkat ekspresi *caspase 3* lebih rendah dari tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL pada limpa tikus sebesar 33,75 ± 3,862%. Perbedaan antara kelompok perlakuan dan kontrol berdasarkan ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus ditunjukkan pada Gambar 2. Ekspresi *caspase 3* pada limpa tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* ditunjukkan pada Gambar 3-8.



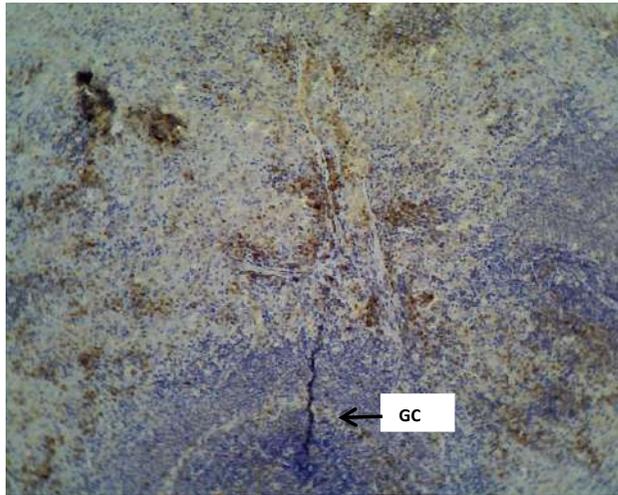
**Gambar 2. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus**

Keterangan:

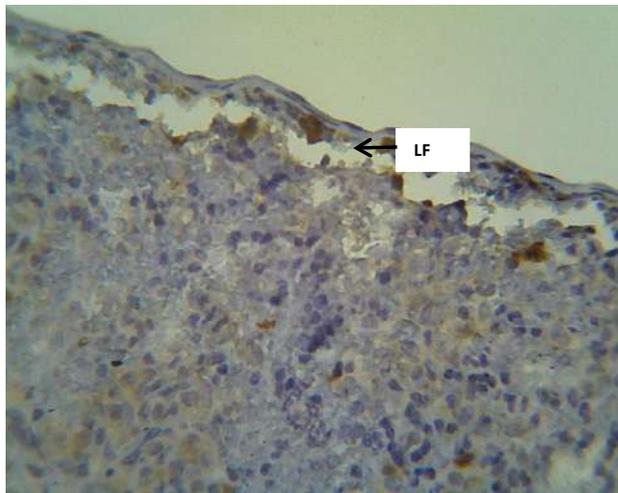
- = Ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus kontrol
- = Ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Ekspresi caspase 3 pada limpa kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL



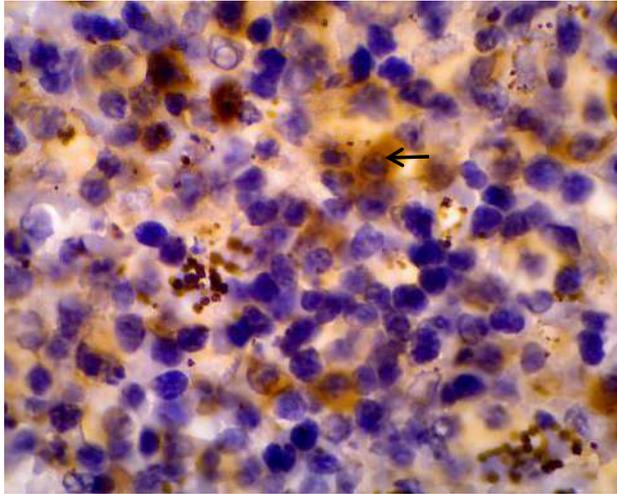
**Gambar 3.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



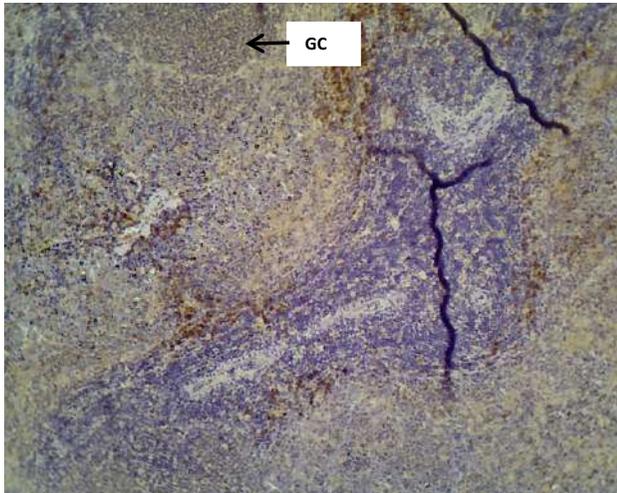
**Gambar 4.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 100x (GC = *germinal center*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



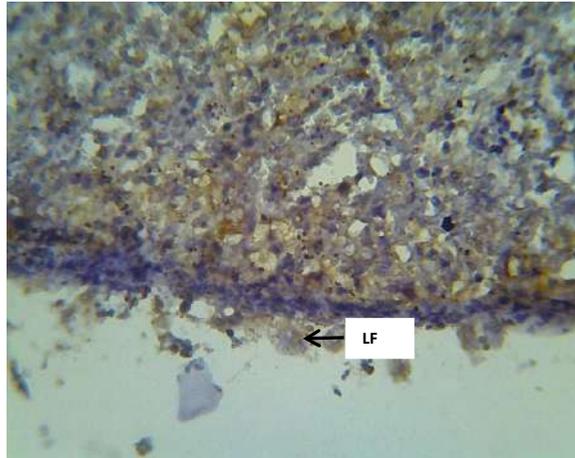
**Gambar 5.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 400x (LF= *lymphoid follicel*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 6.** Ekspresi Caspase 3 Sel Limfosit pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 7.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 100x (GC = *germinal center*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 8.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* dengan Perbesaran 400x (LF = *lymphoid follicel*) (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

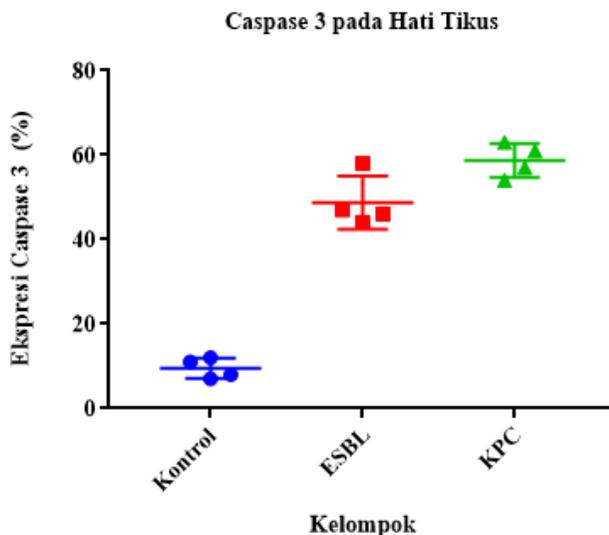
### 7.3. Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

Berdasarkan penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL. Rata-rata dan standar deviasi (simpangan baku) ekspresi *caspase 3* pada hati tikus kontrol, tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* ditunjukkan di bawah ini (Tabel 4).

**Tabel 4.** Data Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus dengan Perlakuan Kontrol, Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Infeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (%)

Kelompok	$\bar{x} \pm SD$	Median	Max-Min
Kontrol (n=4)	9,5±2,38	9,5	12-7
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	48,75±6,292	46,5	58-44
<i>K. pneumoniae carbapenemase</i> (n=4)	58,75±4,031	59	63-54

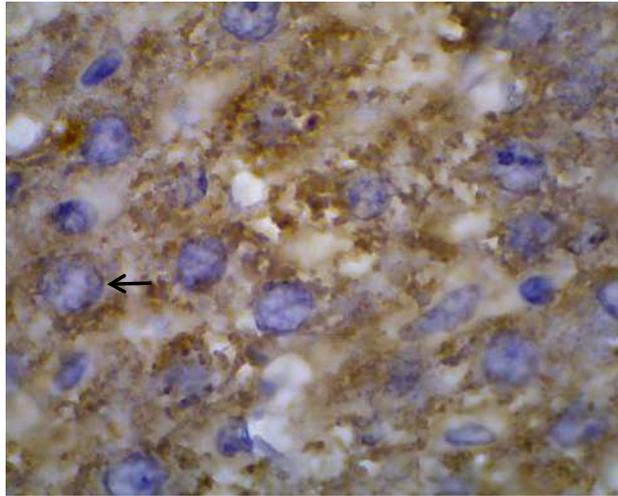
Berdasarkan data pada Tabel 4, tingkat ekspresi *caspase 3* pada kelompok *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* paling tinggi yaitu  $58,75 \pm 4,031\%$ , dan tingkat ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* paling tinggi. *Escherichia coli* ESBL adalah  $48,75 \pm 6,292\%$ . Perbedaan perlakuan dan kontrol berdasarkan ekspresi *caspase 3* pada hati tikus dapat dilihat pada Gambar 9. Ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* dapat dilihat pada Gambar 10-12.



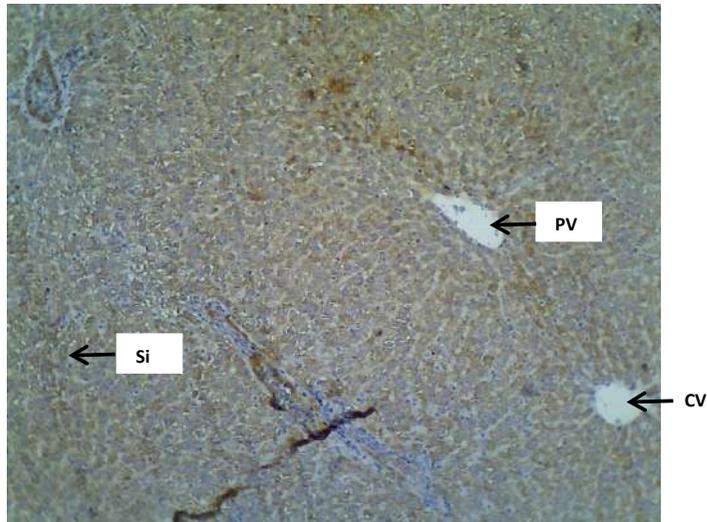
**Gambar 9.** Grafik Rerata dan Simpangan Baku Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus

Keterangan:

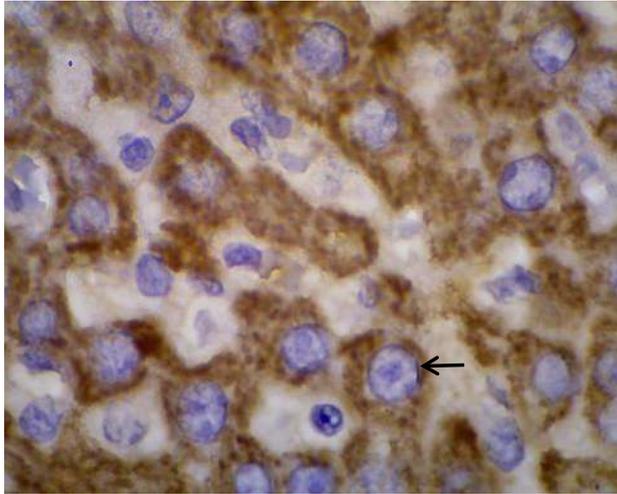
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus kontrol
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL



**Gambar 10.** Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



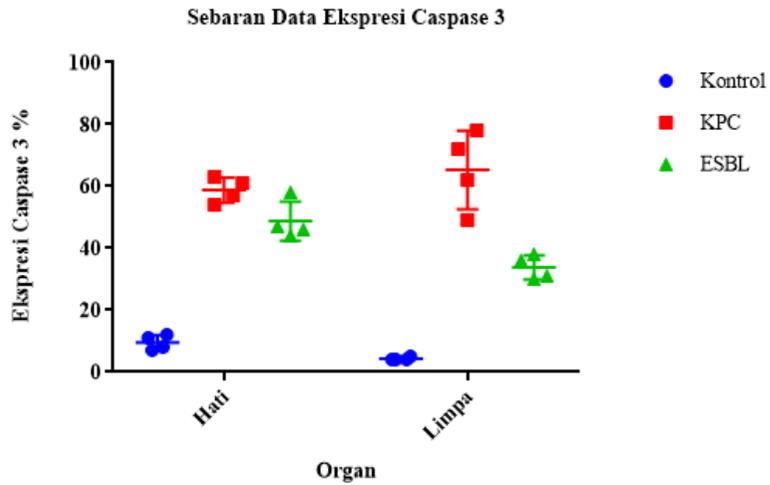
**Gambar 11.** Distribusi Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dengan Perbesaran 100x (PV = *portal vein*, CV = *central vein*, Si = *sinusoid*) (seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)



**Gambar 12.** Ekspresi Caspase 3 Sel Hepatosit pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase dengan Perbesaran 1000x (sitoplasma sel berwarna coklat seperti yang ditunjukkan dengan tanda panah)

#### **7.4. Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Menurut penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase 3* lebih tinggi pada limpa tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* dibandingkan pada hati tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL. Gambar di bawah ini menunjukkan distribusi data ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati kelompok kontrol, mencit yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (Gambar 13).



Gambar 13. Grafik Sebaran Data Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus

Keterangan:

- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus kontrol
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Ekspresi caspase 3 pada hati kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL

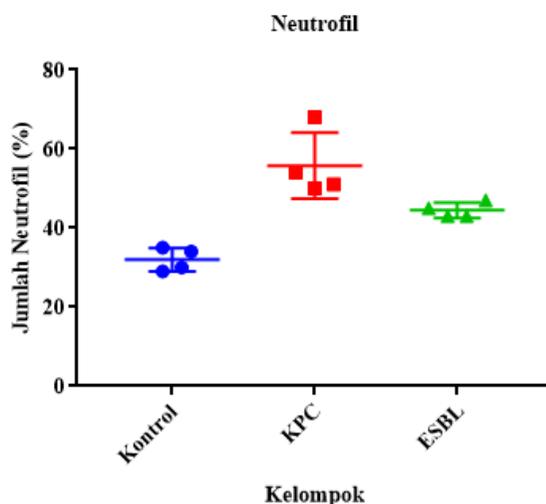
### 7.5. *Differential Count* pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Menurut penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa nilai neutrofil dan limfosit tikus yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase lebih tinggi daripada tikus yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL yang diekstraksi dari darah tepi pada saat tikus mati (baik tikus yang mati kurang dari 24 jam ataupun tikus yang mati pada saat 24 jam). Di bawah ini adalah rata-rata dan standar deviasi diffcount untuk tikus kontrol, tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, dan tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase (Tabel 5).

**Tabel 5. Data Rerata dan Simpangan Baku *Diffcount* pada Kelompok Kontrol, Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL, dan Tikus dengan Infeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (%)**

Kelompok	Neutrofil	Limfosit
Kontrol (n=4)	32,0±2,944	67,0±2,449
<i>E. coli</i> ESBL (n=4)	44,5±1,915	77,5±3,109
<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase (n=4)	55,75±8,342	91,25±7,588

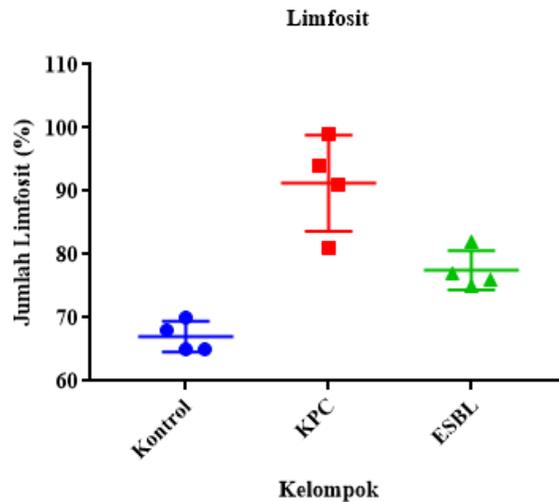
Terlihat dari data rata-rata pada Tabel 5 bahwa jumlah neutrofil pada kelompok ESBL *Escherichia coli* masih dalam nilai rata-rata normal, yaitu lebih rendah dari jumlah neutrofil pada kelompok *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* 44,5 ± 1,915%, sedangkan jumlah neutrofil pada *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* adalah 55,75 ± 8,342%. Jumlah limfosit pada kelompok *E. coli* ESBL juga memiliki rerata nilai normal yang lebih rendah dibandingkan pada kelompok *K. pneumoniae carbapenemase* yaitu sebesar 77,5 ± 3,109%, sedangkan limfosit pada *K. pneumoniae carbapenemase* sebesar 91,25 ± 7,588%. Perbedaan antara perlakuan dan kontrol berdasarkan jumlah neutrofil dapat dilihat pada Gambar 14, dan perbedaan antara perlakuan dan kontrol berdasarkan jumlah limfosit dapat dilihat pada Gambar 15.



**Gambar 14. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Neutrofil**

Keterangan:

- = Jumlah neutrofil pada kelompok tikus kontrol
- = Jumlah neutrofil pada kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Jumlah neutrofil pada kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL



Gambar 15. Grafik Rerata dan Simpangan Baku Jumlah Limfosit

Keterangan:

- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus kontrol
- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae* carbapenemase
- = Jumlah limfosit pada kelompok tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL

# BAB 8

## SEGMENT DISCUSSION

---

### 8.1. Death of Mice that are Co-infected with *Escherichia coli* ESBL and that are Co-infected with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Based on research data, it was found that control mice and mice in the ESBL *Escherichia coli* infection group survived for 24 hours, while mice in the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase infection group survived for more than 24 hours. In addition to endotoxins and ESBL genes owned by *E. coli* ESBL and *K. pneumoniae carbapenemase*, other contributors to death in the animal experiment are cardiovascular instability and septic shock, which cause death in bacterial infection.

*E. coli* ESBL and *K. pneumoniae carbapenemase* are gram-negative bacteria with a molecular composition of lipopolysaccharide (LPS) that binds to proteins in the form of LPS-Binding Protein (LBP). LBP is very important for the inflammatory response induced by LPS. At this time, many endotoxin receptors have been identified, such as  $\beta$ 2-integrin CD11/CD18, macrophage scavenger receptor for acetylated LDL, L-selectin, and CD14. CD14 is considered the most important. Receptors are found in two forms, namely membrane-bound CD14 (mCD14) and soluble CD14 (sCD14). LPS can also interact with transmembrane signal transduction receptor Toll-like Receptor 4 (TLR4), which is located in the MD-2 accessory protein complex. Although TLR2 is considered to play a role in LPS signaling, it is believed that TLR4 has a key role in the immune response to Gram-negative bacteria in innate immunity. LPS binds to this receptor and activates several intracellular signaling pathways, including the I $\kappa$ B kinase (IKK Nuclear Factor  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)) and various Nitrogen Activated Protein Kinase (NAPK) pathways. These pathways will phosphorylate and

mengaktifkan berbagai faktor transkripsi, termasuk NF $\kappa$ B/Rel protein, *Activator Protein 1* (AP-1) dan *Nuclear Factor-interleukin 6* (NF-IL6), yang akan menyebabkan induksi gen serta ekspresi mediator inflamasi dengan cepat, termasuk *cytokines*, *lipid mediators*, *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS), dan molekul adhesi. Sitokin memiliki berbagai sel target, dan tindakan spesifik sitokin ini bergantung pada stimulus, tipe sel, dan mediator dan reseptor inflamasi lainnya yang ada. Meskipun beberapa faktor transkripsi telah diidentifikasi yang mungkin terkait dengan perubahan aktivasi gen pada sepsis, termasuk AP-1 dan NF-IL-6, NF $\kappa$ B adalah faktor yang paling baik dijelaskan.

Menurut perkiraan global resistensi antibiotik yang diterbitkan oleh Organisasi Kesehatan Dunia pada tahun 2014, *Klebsiella pneumoniae* dan *Escherichia coli* terdaftar sebagai dua dari tiga patogen yang paling memprihatinkan, terkait dengan infeksi yang didapat di rumah sakit dan masyarakat (WHO, 2014). *Escherichia coli* menghasilkan vitamin B dan K, yang menghambat pertumbuhan patogen di usus dan berubah menjadi berbagai patogen genetik dan oportunistik dengan menggabungkan gen patogenisitas dan virulensi yang berbeda, misalnya *Escherichia coli enterotoksigenik* (ETEC) dengan gen untuk toksin yang tahan panas dan panas labil toksin, *enterohemorrhagic Escherichia coli* (EHEC) dengan gen Shiga toxin I dan II dan *E. coli enteropatogenik* (EPEC) dengan gen untuk pilus berbentuk bundar. Munculnya bakteri *multidrug-resistant* (MDR), salah satunya *Escherichia coli* ESBL, yaitu bakteri yang mampu menghidrolisis cincin  $\beta$ -laktam *cephalosporins* spektrum luas (kecuali *cephamisin* dan *carbapenems*) dan *monobactams*, kemudian menginaktivasi senyawa ini (Su, *et al.*, 2016).

Beberapa keluarga gen ESBL (blaCTX-M, blaSHV, blaTEM, dan blaOXA) dikodekan pada plasmid. Peninjauan sebelumnya telah menunjukkan bahwa beberapa plasmid pembawa ESBL mempengaruhi faktor selain resistensi, seperti kemampuan strain *Klebsiella* untuk menyerang sel epitel. Plasmid ESBL ini memiliki kemampuan untuk mencegah sel dari “post-segregational killing”, sehingga bakteri selalu menjalani pemeliharaan plasmid selama replikasi. Sistem antitoksin tipe I adalah molekul RNA antisense kecil yang terutama menghambat penerjemahan mRNA toksin

atau menurunkan mRNA toksin, sedangkan protein sistem antitoksin tipe II berinteraksi dengan protein toksin pasca-translasi.

Replikasi dalam plasmid-free sel puter tipe I molekul antitoksin RNA tidak stabil (mis. sok) menurun dengan cepat, sedangkan toksin yang stabil seperti hok menginduksi pembentukan membran, yang mengganggu sintesis ATP dan selanjutnya menyebabkan kematian sel bakteri. Di antara plasmid ESBL, sistem yang paling sering muncul tidak hanya mencakup hok/sok, tetapi juga pemK/I dan ccdA/B, yang tampaknya terkait dengan CTX-M-15 dan CTX-M-9 encoding plasmid dari jenis replika IncF (Schauffler *et al.*, 2013).

*K. pneumoniae carbapenemase* memberikan perlawanan terhadap hampir semua  $\beta$ -laktam, termasuk karbapenem. Gen blaKPC tertanam dalam transposon Tn3 yang sangat mobile, Tn4401, dan telah di-genotipe terhadap sejumlah plasmid dari kelompok yang berbeda (Chavda *et al.*, 2015; Mathers *et al.*, 2015). Di antara banyak bakteri Gram-negatif yang penting secara medis, *Enterobacteriaceae* adalah anggota yang paling umum dan penting. Resistensi terhadap karbapenem pada *Enterobacteriaceae* dapat terjadi melalui sejumlah mekanisme yang berbeda, termasuk hilangnya porins, mempengaruhi permeabilitas membran luar, peningkatan regulasi sistem penghabisan dalam hubungannya dengan *hyperproduction* dari *AmpC- $\beta$ -lactamases* atau *extended spectrum- $\beta$ -lactamase* (ESBLs), dan produksi karbapenemase seperti KPC dan New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) (Chen *et al.*, 2014; Pitout *et al.*, 2015).

Penyebab utama kematian pada tikus adalah kegagalan multi-organ. Ada hubungan yang kuat antara tingkat resistensi disfungsi organ terhadap perawatan intensif dan kemungkinan bertahan hidup, dan antara jumlah organ yang gagal dan risiko kematian. Mekanismenya melibatkan deposisi fibrin yang ekstensif yang menyebabkan oklusi mikrovaskular, produksi eksudat jaringan yang selanjutnya mengganggu oksigenasi adekuat dan gangguan hemostasis mikrovaskular yang timbul dari elaborasi zat-zat vasoaktif seperti PAF, histamin dan prostanoi. Infiltrasi seluler, terutama neutrofil, secara langsung merusak jaringan dengan melepaskan enzim lisosom dan radikal bebas turunan superoksida. TNF- $\alpha$  dan sitokin lainnya meningkatkan ekspresi nitrit oksida sintase yang diinduksi, dan peningkatan

produksi nitrit oksida selanjutnya berkontribusi terhadap ketidakstabilan vaskular dan juga depresi miokard yang terjadi pada sepsis (Aird, 2003; Elbers & Ince, 2006)

Tingkat kematian hewan percobaan tidak hanya bergantung pada jumlah endotoksin dan keberadaan gen ESBL pada bakteri, tetapi juga pada kemampuan respons tubuh hewan percobaan terhadap infeksi bakteri Gram-negatif.

## **8.2. Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase***

Menurut hasil penindaklanjutan yang telah selesai, ditemukan bahwa ekspresi *caspase* 3 meningkat secara signifikan pada kelompok tikus yang terinfeksi ESBL E. Fungsi limpa berpusat pada sirkulasi sistemik. Limpa memiliki dua kompartemen yang berbeda secara fungsional dan morfologis, pulpa merah dan pulpa putih. Pulpa merah adalah penyaring darah yang menghilangkan bahan asing dan sel darah merah yang rusak dan merupakan tempat penyimpanan zat besi, sel darah merah dan trombosit. Limpa adalah tempat hematopoiesis pada tikus, terutama pada janin dan hewan yang baru lahir. Limpa juga merupakan organ limfoid terbesar, mengandung sekitar seperempat dari semua limfosit dan memulai respons imun terhadap antigen yang dibawa darah (Nolte *et al.*, 2002; Balogh *et al.*, 2004).

Tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* memiliki ekspresi *caspase* 3 hati yang lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, yang mungkin dipengaruhi oleh adanya perbedaan antigen yang dimiliki oleh *K. pneumoniae carbapenemase* dengan *E. coli* ESBL. Kapsul *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* terdiri dari antigen O, yang merupakan liposakarida yang terdiri dari unit polisakarida berulang. Polisakarida O-spesifik mengandung gula unik. Antigen O tahan panas dan alkohol. Antigen kedua adalah antigen K, yang terletak di luar antigen O dan merupakan polisakarida kapsular. Antigen K dapat mengganggu aglutinasi oleh antiserum O dan berhubungan dengan virulensi. Kedua antigen meningkatkan patogenisitas *K. pneumoniae carbapenemase*.

Selama infeksi bakteri, patogen menghasilkan dan mengeluarkan faktor virulensi dan memicu sinyal apoptosis. Secara umum, sel mengalami apoptosis dalam dua cara utama, ekstrinsik (jalur reseptor kematian) dan jalur intrinsik (mitokondria) (Jin dan El-Deiry, 2005; Ayala *et al.*, 2007). Reseptor TNF adalah reseptor membran sel spesifik yang termasuk dalam family *Tumor Necrosis Factor* (TNF), secara kolektif dikenal sebagai reseptor kematian, termasuk reseptor TNF 1, yang berikatan dengan ligan spesifik, seperti TNF- $\alpha$ . Reseptor ini mengalami perubahan konformasi yang memungkinkan mereka berinteraksi dengan protein adaptor intraseluler spesifik di belakang ligannya (Nikitakis *et al.*, 2004). Perubahan konformasi dalam domain intraseluler reseptor menunjukkan adanya “*death domain*”, seperti domain kematian terkait TNFR (TRADD), yang memungkinkan perekrutan berbagai protein apoptosis ke reseptor. Langkah terakhir dalam proses ini adalah perekrutan *caspase*, biasanya *caspase* 8, ke DISC. Ini mengarah pada aktivasi *caspase* 8 dan inisiasi apoptosis. TRADD juga dapat dikaitkan dengan *FAS-Associated Death Domain* (FADD), yang mengarah pada induksi apoptosis melalui perekrutan dan pembelahan procaspase 8.

Jalur ekstrinsik biasanya di mediasi melalui interaksi antara ligan alami reseptor kematian atau melalui induksi gugus reseptor kematian untuk mengaktifkan reseptor kematian. Reseptor kematian adalah reseptor permukaan sel yang merupakan anggota keluarga TNF dan berinteraksi dengan ligannya untuk membentuk kompleks reseptor kematian, seperti reseptor TNF 1(p55)/TNF dan limfotoksin. Mengikuti aktivasi ekstrinsik, intraseluler *Death Domain* (DD) dari *death receptor* berhubungan dengan protein adaptor yang disebut *FAS-Associated Death Domain* (FADD) secara langsung atau tidak langsung melalui reseptor *TNF-Associated Death Domain* (Ashkenazi and Dixit, 1998).

*Death receptor associated FADD* intraseluler berinteraksi dengan *procaspase* 8 untuk membentuk kompleks pensinyalan pemicu kematian yang diperlukan untuk aktivasi *caspase* 8 (Ashkenazi dan Dixit, 1998). Keluarga protein Bid menjadi *truncated* Bid (tBid), yang translokasinya di luar membran mitokondria mengakibatkan hilangnya potensi transmembran mitokondria dan merangsang pelepasan sitokrom c. tBid akan menginduksi protein domain BH3 pro-apoptosis (Bid, Bad, Noxa, dan p53-up-regulated

modulator apoptosis) untuk memberi sinyal ke mitokondria. Protein domain BH3 hanya mempromosikan perakitan protein pro-apoptosis seperti Bax dan Bak ke dalam pori-pori di luar membran mitokondria dan mengubah permeabilitas mitokondria untuk melepaskan berbagai faktor pemicu apoptosis, termasuk sitokrom c melalui transisi permeabilitas mitokondria. Secara umum, penurunan potensi transmembran mitokondria melepaskan sitokrom c, yang mengikat Apaf-1 dan mendorong aktivasi *caspase* 9 dan 3 (Green dan Reed, 1998). Peran sentral mitokondria dalam apoptosis adalah melalui jalur intrinsik.

Mengikuti pelepasan protein pro-apoptosis spesifik seperti sitokrom c, smac/DIABLO, AIF, dan Endo G, jalur eksekusi dimulai dengan aktivasi *caspase* 3. Jalur intrinsik didominasi oleh family protein Bcl-2. Target utama family Bcl-2 adalah melepaskan sinyal apoptosis dari mitokondria melalui *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP) dengan membuka pori transisi membran permeabel. Hal ini dapat dicapai melalui oligomerisasi anggota Bcl-2 pro-apoptosis di membran luar mitokondria yang berinteraksi dengan saluran pori membran dan/atau hilangnya potensi membran mitokondria. Kelompok pertama dari protein yang dilepaskan adalah sitokrom c dan Smac/DIABLO, yang bergantung pada *caspase*, artinya mereka bertindak di hilir *cascade caspase*, yang mengarah ke apoptosis. Tujuan utamanya adalah untuk mengikat dan mengaktifkan *Caspase Recruitment Domain* (CARD), Apaf-1 dan *procaspase* 9, yang mengarah pada pembentukan apoptosom. Hal ini pada gilirannya menyebabkan aktivasi *caspase* 9 dan aktivasi efektor *caspase* 3 lebih lanjut, sehingga menyelesaikan jalur apoptosis. Pembentukan apoptosom dan aktivasi *caspase* efektorlah yang menyebabkan peristiwa apoptosis seperti kondensasi kromatin, asimetri membran plasma, dan blebbing sel (Abud, 2004; Nikitakis *et al.*, 2004).

### **8.3. Ekspresi Caspase 3 pada Hati Tikus yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**

Menurut penindaklanjutan yang telah dilakukan, ditemukan bahwa ekspresi *caspase* 3 meningkat pada hati kelompok mencit yang terinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

Tikus disuntik dengan bakteri melalui rute intraperitoneal. Bakteri yang disuntikkan ke dalam rongga peritoneal diserap ke dalam sirkulasi portal dan diangkut ke hati. Sebagai organ penerima vena portal dan darah arteri, hati merupakan bagian penting dari pertahanan terhadap infeksi yang ditularkan melalui darah.

Hati diduga mempengaruhi metabolisme dan mekanisme pertahanan inang selama sepsis. Organ ini secara aktif mengatur proses inflamasi dengan menyaring, menonaktifkan dan menghilangkan bakteri, produk bakteri (endotoksin), zat vasoaktif dan mediator inflamasi. Hati juga diuji untuk produksi dan pelepasan berbagai sitokin, lipid bioaktif, dan protein fase akut dalam jumlah besar. Disfungsi hepatic dini terjadi dalam beberapa jam pertama sepsis dan berhubungan dengan hipoperfusi hepatosplanknik. Gangguan ini dapat menyebabkan peningkatan akut penanda-penanda biologis kerusakan hati (transaminase, dehidrogenase laktat, dan bilirubin). Disfungsi hati lanjut adalah proses yang berjalan secara perlahan dan berat. Proses ini ditandai dengan kerusakan struktural dan fungsional dan dapat menyebabkan limpahan bakteri, endotoksin, dan molekul inflamasi yang dapat memicu atau mempertahankan kerusakan multi-organ (Sumantri, 2012).

Peningkatan ekspresi *caspase 3* pada hati mencit yang terinfeksi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* lebih tinggi dibandingkan dengan tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL, yang kemungkinan dipengaruhi oleh perbedaan faktor larut bakteri yang dapat diinduksi oleh sel inang. Faktor-faktor yang mempengaruhi virulensi strain *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* meliputi serotipe kapsuler, lipopolisakarida, sistem ironscavenging, adhesin fimbrial dan non-fimbrial. Kapsul polisakarida yang mengelilingi *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* melindungi dirinya dari fagositosis dan aksi bakterisidal oleh serum dan dapat dianggap sebagai penentu virulensi terpenting dari *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*.

Kerusakan hati dikaitkan dengan terjadinya apoptosis hepatosit (Mordue *et al.*, 2001). Apoptosis hepatosit dapat terjadi melalui jalur intrinsik dan ekstrinsik. Apoptosis melalui jalur intrinsik pada hepatosit diinduksi oleh faktor terlarut pada bakteri yang dapat menginduksi sel inang dan menjadikannya toksik bagi sel lain. Faktor-faktor terlarut ini menyebabkan

pelepasan ROS dari mitokondria. Infeksi bakteri menyebabkan mitokondria memproduksi ROS dan memicu pelepasan sitokrom c (Nomura *et al.*, 2000). Sitokrom c memicu pengikatan *caspase 9* ke efektor *caspase caspase 3*, yang mengarah ke apoptosis (Yoon, *et al.*, 2002).

Apoptosis hepatosit terjadi karena kelebihan produksi sitokin pro-inflamasi (Mordue *et al.*, 2001). Aktivasi sitokin ini, IL-18 dan IL-2, menghasilkan interferon gamma (IFN- $\gamma$ ). IFN- $\gamma$  memicu makrofag untuk memproduksi TNF- $\alpha$ . Denkers dan Gazzinalli (1998) menunjukkan bahwa makrofag yang diaktivasi oleh IFN- $\gamma$  menghasilkan TNF- $\alpha$ . Seperti yang dinyatakan oleh Gucciardi *et al.*, (2005), bagian dari efek sitotoksik langsung pada hepatosit adalah TNF- $\alpha$  atau TNFR-1. Interaksi antara TNF dan TNFR-1 dapat memicu terjadinya apoptosis di hati (Yoon *et al.*, 2002). Selain TNF dan TNFR-1, pengikatan antara FAS-L yang diproduksi oleh sel T sitolitik dan sel NK serta FAS milik hepatosit juga memicu pengikatan apoptosis (Mordue *et al.*, 2001). TNF- $\alpha$  adalah mediator apoptosis yang juga dapat memicu sel untuk mengekspresikan FAS, yang mengarah ke apoptosis (Gucciardi *et al.*, 2005).

Hepatosit, jenis sel utama hati, memiliki kemampuan regenerasi yang kuat saat rusak oleh berbagai faktor, salah satunya adalah infeksi bakteri. Berbagai mode kematian sel dapat terjadi pada hepatosit, termasuk apoptosis, nekroptosis, nekrosis, dan *autophagic-dependent cell death*. Apoptosis hepatosit memainkan peran protektif penting dalam menghilangkan mikroorganisme eksternal melalui penghancuran diri. Apoptosis hepatosit melibatkan dua jalur fundamental: jalur ekstrinsik yang mentransmisikan sinyal kematian melalui *death receptor* (DR) dan jalur intrinsik yang diprakarsai oleh rangsangan intraseluler. Jalur apoptosis ekstrinsik diaktifkan oleh ligan kematian yang mengikat DR pada membran plasma. Ligan kematian termasuk dalam superfamili tumor necrosis factor (TNF) dan termasuk FasL, TNF- $\alpha$ , dan ligan penginduksi apoptosis terkait TNF (TRAIL). Demikian, DR termasuk Fas, TNF-receptor 1 dan TRAIL-R.

Pengikatan kematian ligan ke DR menginduksi trimerisasi dan konformasi perubahan DR. Perubahan ini merekrut protein adaptor sitoplasma (seperti protein *FAS-Associated Protein With Death Domain* [FADD]), yang merekrut molekul pensinyalan apoptosis (seperti *caspase*

8). DR, protein adaptor, dan molekul pensinyalan apoptosis yang terkait menginduksi *Death-Inducing Signaling Complex* (DISC), menghasilkan aktivasi *cascade caspase* efektor, biasanya melibatkan *caspase 3, 6, dan 7* (Hillebrandt *et al.*, 2005); Pritchard *et al.*, 2007; Gustot *et al.*, 2006). Selain apoptosis, mode kematian sel lainnya juga terlibat dalam crosstalk dan tumpang tindih kematian hepatosit dan cedera hati, menghasilkan proses kematian yang sangat beragam.

Aktivasi *caspase* secara signifikan berkorelasi dengan aktivitas inflamasi. Aktivasi *caspase* terdeteksi di sebagian besar hepatosit. Pembelahan *Caspase 3* menandai peristiwa awal dalam proses apoptosis. Sedikit imunoreaktivitas ditunjukkan pada jaringan hati yang sehat menggunakan antibodi spesifik untuk *caspase 3 dan 7* yang diaktifkan. Menariknya, *caspases 3 dan 7* yang diaktifkan tampaknya memiliki lokalisasi subseluler yang sedikit berbeda. Mengaktifkan *caspase 3* terutama ditemukan di nukleus, sedangkan antibodi pengaktif *caspase 7* biasanya memberi label pada daerah perinuklear. *Caspase 7* yang teraktivasi sebelumnya telah diamati pada hati tikus dan sel Jurkat T untuk mengikat sebagian mikrosomal atau mentranslokasi ke retikulum endoplasma setelah induksi apoptosis (Chandler *et al.*, 1998; Zhivotovsky *et al.*, 1999).

Penghambatan aktivasi *caspase 3* mencegah cedera hepatosit, kematian sel, dan pensinyalan pro-inflamasi, terutama perekrutan monosit inflamasi pro-fibrotik. Efek ini ditemukan tidak bergantung pada akumulasi trigliserida hati. Aktivasi *caspase 3* dalam hepatosit memainkan peran sentral dalam steatohepatitis dan fibrosis (Thapaliya *et al.*, 2014).

Studi sebelumnya telah menunjukkan bahwa dua jalur utama apoptosis, yang disebut jalur ekstrinsik (di mediasi reseptor kematian) dan jalur intrinsik (diprakarsai oleh organel), berkontribusi. Kedua jalur ini cenderung menyatu pada tingkat mitokondria, yang mengarah ke permeabilisasi membran luar mitokondria dan pelepasan beberapa protein dari ruang mitokondria antar membran ke dalam sitoplasma (Li *et al.*, 2008; Feldstein *et al.*, 2004).

Konsekuensi utama dari proses ini adalah aktivasi *caspase* efektor (terutama *caspase 3*), yang kemudian membelah banyak substrat berbeda dalam sel, yang mengarah ke karakteristik perubahan morfologis dari

apoptosis (Green, 2005; Chowdhury *et al.*, 2008). Apoptosis dianggap non-inflamasi, dan jelas bahwa peningkatan patologis dalam apoptosis dalam konteks penyakit kronis dapat secara langsung atau tidak langsung meningkatkan peradangan (Alkhoury *et al.*, 2010; Syn *et al.*, 2009).

Peradangan persisten pada cedera hati kronis diketahui terutama menginduksi perkembangan fibrosis hati, dan penelitian terbaru menunjukkan bahwa makrofag hati melakukan ini hanya sebagian, tetapi sangat bergantung pada perekrutan monosit ke hati (Imamura *et al.*, 2005; Tacke *et al.*, 2012). Aktivasi *caspase* 3 di hepatosit secara signifikan mempengaruhi produksi sitokin pro-inflamasi seperti TNF dan IL 6.

Apoptosis sel efektor bakteri dan pengukuran *caspase* 3 tidak mengherankan, karena kemampuan untuk mengoordinasikan kelangsungan hidup atau kematian sel dalam kondisi terkendali memberikan manfaat yang jelas bagi mikroorganisme yang menyerang. Tampaknya aktivasi *caspase* 3 selama infeksi bakteri adalah produk sampingan dari invasi bakteri, kemungkinan dipicu oleh tekanan sel inang berikutnya yang terkait dengan replikasi intraseluler. Contohnya adalah toksin bakteri dengan berat molekul besar yang dapat menargetkan siklus sel atau integritas sel dengan efek di luar target yang menyebabkan stres seluler dan kematian sel selanjutnya melalui *caspase* apoptosis (Cheung *et al.*, 2009).

Aktivasi *caspase* 3 oleh bakteri patogen semakin dikenal sebagai strategi infeksi bakteri, tetapi mekanisme interaksi langsung bakteri dengan *caspase* 3 kurang dipahami. Karena gangguan jalur multiseluler, *caspase* promotor hulu (seperti *caspase* 8 dan 9) sering diaktifkan selama infeksi, seringkali secara bersamaan, yang mengarah ke induksi tidak langsung aktivitas *caspase* 3 dan luapan sel. Sementara aktivasi ini dapat dilacak dari waktu ke waktu, memberikan indikasi jalur dan bagaimana *caspase* diaktifkan, aktivasi *caspase* 3 langsung atau alternatif, seperti yang dijelaskan selama infeksi bakteri, lebih sulit dipahami secara mekanis (Zhu *et al.*, 2013).

Jalur apoptosis intrinsik dan ekstrinsik dianggap sebagai cara kebanyakan apoptosis terjadi, tetapi aktivasi *caspase* 3 independen dari jalur ini menunjukkan jalur alternatif yang menginduksi aktivasi *caspase* 3 selama infeksi bakteri. Dengan demikian, jalurnya tidak dapat diidentifikasi; tidak dapat diabaikan bahwa efektor langsung dari interaksi enzim juga

dapat menyebabkan aktivasi *caspase 3* (Kobayashi *et al.*, 2013). Kehadiran motif asam efektor asam amino pendek yang dikenal untuk merangsang aktivasi caspase-3 juga dapat berkontribusi pada aktivasinya, dan memang, konservasi evolusi aktivitas prokariotik *caspase 3* juga telah dijelaskan, yang mungkin berperan (Bidle *et al.*, 2010).

#### **8.4. Diffcount pada Hapusan Darah Tikus dengan Infeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae carbapenemase***

Hasil penindaklanjutan didapatkan bahwa jumlah neutrofil pada kelompok ESBL *Escherichia coli* masih berada pada rata-rata normal yaitu lebih rendah dari pada kelompok *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, dan jumlah limfosit pada kelompok ESBL *Escherichia coli* juga memiliki nilai yang masih rata-rata dan lebih rendah dari jumlah limfosit pada kelompok *K. pneumoniae carbapenemase*.

Sel yang terlibat dalam respons imun adalah limfosit, sel plasma, sel mast, neutrofil, eosinofil dan sel yang berperan dalam fagositosis (Luiz dan Jose, 2005). Limfosit menyusun 20% dari seluruh sel darah putih yang bersirkulasi pada orang dewasa dan terdiri dari limfosit T dan B yang merupakan pengendali sistem kekebalan tubuh (Guntur, 2008). Proses patologis utama dari sepsis adalah apoptosis sel efektor imun, termasuk limfosit (Chang, *et al.*, 2007).

Neutropenia dan limfopenia diakui sebagai tanda infeksi bakteri yang parah. Zahorec *et al* (2001) mendokumentasikan rasio jumlah neutrofil-ke-limfosit (NLCR) sebagai parameter yang mudah diukur yang menunjukkan tingkat keparahan peradangan sistemik dan sepsis pada 90 pasien onkologi. Bahkan, NLCR adalah parameter yang berguna untuk memprediksi bakteremia dalam keadaan darurat (Jager *et al.*, 2010). Namun, sedikit informasi yang tersedia tentang potensi penggunaan NLCR untuk membedakan infeksi bakteri parah dari virus.

Neutrofil adalah garis pertahanan pertama melawan infeksi bakteri dan dapat dengan cepat direkrut ke tempat infeksi. Menanggapi infeksi lokal, neutrofil dan fagosit lainnya direkrut dari jaringan lokal untuk memediasi pertahanan inang. Selanjutnya, dalam situasi “darurat” tertentu, infeksi lokal dapat menginduksi rekrutmen kronis neutrofil ke jaringan hematopoietik (Furze, *et al.*, 2008).

# BAB 9

## INTIHA

---

### 9.1. Inferensi

Ekspresi caspase 3 meningkat pada limpa tikus yang terinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*, dibandingkan dengan tikus yang terinfeksi *E. coli* ESBL, hal tersebut diduga dapat dipengaruhi karena adanya perbedaan antigen yang dimiliki oleh kedua bakteri tersebut, sehingga kemungkinan apoptosis yang terjadi pada sel limfosit yang disebabkan oleh *K. pneumoniae carbapenemase* akan lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL.

Terjadi peningkatan ekspresi *caspase 3* pada hati tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan yang diinfeksi *E. coli* ESBL, hal tersebut dapat dipengaruhi karena perbedaan faktor soluble dari kedua bakteri tersebut, jadi, dibandingkan dengan hepatosit yang terinfeksi *E. coli* ESBL, *Klebsiella pneumoniae carbapenemases* lebih cenderung menginduksi apoptosis pada hepatosit.

### 9.2. Gagasan Usul

Penindaklanjutan lebih lanjut diperlukan untuk menentukan perbedaan ekspresi *caspase 3* di limpa dan hati tikus yang terinfeksi ESBL *E. coli* dan tikus yang terinfeksi *E. coli*. Penindaklanjutan lebih lanjut diperlukan untuk menentukan perbedaan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* dan dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae*. Indikator apoptosis pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase* memerlukan penindaklanjutan lebih lanjut untuk mengetahui korelasinya dengan ekspresi *caspase 3*.

## DAFTAR PUSTAKA

---

- Abbas AK, Lichtman AH, and Pober JS. 2000. *Cellular and Molecular Immunology*, 4th Ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia. Pp: 91,110, 111, 150, 203, 236, 262-263, 276, 277, 303, 332
- Abraham E. 2003. Nuclear factor-kB and its role in sepsis-associated organ failure. *J Infect Dis*, 187: S364-9.
- Abraham P. 2000. Nitro-Arginine Methyl Ester, A Non-Selective Inhibitor of Nitric Oxide Synthase Reduce Ibuprofen-Induced Gastric Mucosal Injury In the Rat. *Digestive Diseases and Sciences*. 50(9): 1632-1640.
- Abud HE. 2004. Shaping Developing Tissues by Apoptosis. *Cell Death Differ*, 11: 3155-62.
- Adrie C, Pinsky MR. 2000. The inflammatory balance in human sepsis. *Intensive Care Med.*, 26:364-75.
- Aidara-Kane A, Andreumont A, Collignon P. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain and the AGISAR initiative. *J Infect Pub Hea*. 6. 162-165.
- Aird WC. 2003. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*, 101:3765-77.
- Akira Shizuo. 2000. A Toll-Like Receptor Recognized Bacteri. Research Institute for Microbial Disease, Osaka University; Erato of Japan. *Nature*, 408:740-745.
- Alexander JW, Boyce ST, Babcock GF, Gianotti L, Peck MD, Dunn DL, Pyles T, Childress CP, Ash SK. 1990. The process of microbial translocation. *Ann Surg.*, 212: 496-510.
- Alkhoury N, Gornicka A, Berk MP. 2010. Adipocyte apoptosis, a link between obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *The Journal of biological chemistry.*, 285:3428–3438.

- Ambler RP. 1980. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*, 289: 321–331
- Ashkenazi A. and Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation *Science*, 281, 1305-1308.
- Ayala A, Wesche-Soldato DE, Perl M, Lomas-Neira JL, Swan R, Chung C. 2007.
- Blockade of apoptosis as a rational therapeutic strategy for the treatment of sepsis NovartisFound Symp USA
- Balogh P, Horváth G, Szakal AK. 2004. Immunoarchitecture of distinct reticular fibroblastic domains in the white pulp of mouse spleen. *J Histochem Cytochem.*, 52:1287-1298.
- Barnes PJ. 1997. Nuclear factor  $\kappa$ B. *Int J Biochem Cell*, 29: 867-70.
- Bian Z, Brauner A, Li Y, Normark S. 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis*, 181: 602-612.
- Bidle KA., Haramaty L, Baggett N, Nannen J, and Bidle KD. 2010. Tantalizing evidence for caspase-like protein expression and activity in the cellular stress response of Archaea. *Environ Microbiol* 12: 1161–1172.
- Blackwell TS, Christman JW. 1997. The role of nuclear factor  $\kappa$ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 3-9.
- Bochud PY., Calandra T. 2003. Science, medicine, and the future, Pathogenesis of sepsis: new concepts and implications for future treatment. *BMJ*. 326:262–6.
- Brisse S, Grimont F, and Grimon, PAD. 2009. The Genus *Klebsiella*. *The Prokaryotes*. 6(3): 159–196.
- Brooks G. F., Butel J., Morse A.S. 2003. *Medical Microbiology*. 22th ed. Singapore: Mc Graw Hill Co, p: 217.
- Brooks GF, JS. Butel, dan SA Morse. 2005. *Medical Microbiology* 23rd Edition. The McGraw-Hill Companies, Inc. New York. Pp 661-701.
- Bush K, Fisher JF. 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from Gramnegative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 65: 455-478.

- Chandler JM, Cohen GM, MacFarlane M. 1998. Different subcellular distribution of caspase-3 and caspase-7 following Fas-induced apoptosis in mouse liver. *J Biol Chem*, 273:10815-10818.
- Chang KC., Unsinger J, Davis CG, Schwulst SJ, Muenzer JT, Strasser A, Hotchkiss RS. 2007. Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrialmediated apoptosis. *FASEB J.* 21: 708-19.
- Chavda KD, Chen L, Jacobs MR, Rojtman AD, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2015. Complete sequence of a bla(KPC)-harboring cointegrate plasmid isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 59: 2956–2959.
- Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. 2014. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol*, 22:686–696.
- Cheung, GYC., Kelly, SM, Jess, TJ, Prior S, Price NC, Parton R., and Coote JG. 2009. Functional and structural studies on different forms of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*. *Microb Pathog* 46: 36–42.
- Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. 2008. Caspases-an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, 151:10–27.
- Denkers, E.Y. and R.T. Gazzinelli. 1988. Regulation and Function of T-Cell-mediated Immunity during *Toxoplasma gondii* Infection. *Clinical Microbiology Review*, 11 (4): 569-588.
- Elbers PW, Ince C. 2006. Mechanisms of critical illness--classifying microcirculatory flow abnormalities in distributive shock. *Crit. Care*, 10:221.
- Falagas ME, Bliziotis IA. 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*, 29: 630-636.
- Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, et al. 2004. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF-alpha expression via a lysosomal pathway. *Hepatology*, 40:185–194.
- Furze RC, Rankin SM. 2008. Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* 125, 281–288.

- Ghatage DD, Gosavi SR, Ganvir SM, and Hazarey VK. 2013. Apoptosis: Molecular Mechanism. *Journal of Orofacial Sciences.*, 4: 103-107.
- Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA. 2007. *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy*. 37th Edition, Sperryville, VA, USA
- Green DR and Reed JC. 1998. Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281:1309-12. Green DR. 2005. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell.*, 121:671–674.
- Guacciardi, M., E. Gores, G., J. 2005. Apoptosis: A Mechanism of Acute Chronic Liver Injury. *Recent Advance in Basic Science*, 54:1024–1033.
- Guntur AH. 2006. *Sirs & Sepsis: Immunologi, Diagnosis, Penatalaksanaan*. Surakarta: Sebelas Maret University Press, pp: 1-14.
- Guntur AH. 2007. Immunopatobiologi sepsis dan penatalaksananya. *Simposium Nasional SEPSIS dan Antimikrobal Terkini*. Surakarta: PETRI, pp: 31-6.
- Guntur AH. 2008. *Sepsis*. Dalam: Prasetyo DH, penyunting. SIRS, sepsis, dan syok septik (imunologi, diagnosis, dan penatalaksanaan). Surakarta: Sebelas Maret University Press, hlm. 1-15.
- Gustot T, Lemmers A, Moreno C, Nagy N, Quertinmont E, Nicaise C. 2006. Differential liver sensitization to toll-like receptor pathways in mice with alcoholic fatty liver. *Hepatology*, 43:989-1000.
- Hawa LC, Susilo, Bambang, Jayasari NE. 2011. Studi Komparasi Inaktivasi *Escherichia coli* Dan Perubahan Sifat Fisik Pada Pasteurisasi Susu Sapi Segar menggunakan Metode Pemanasan Dan Tanpa Pemanasan Dengan Kejut Medan Listrik. *Jurnal Keteknik Pertanian, Universitas Brawijaya, Malang*. P. 34.
- Hillebrandt S, Wasmuth HE, Weiskirchen R, Hellerbrand C, Keppeler H, Werth A. 2015. Complement factor 5 is a quantitative trait gene that modifies liver fibrogenesis in mice and humans. *Nat Genet*, 37:835-843.
- Imamura M, Ogawa T, Sasaguri Y, Chayama K, Ueno H. 2005. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology.*, 128:138–146.

- Jawetz, Melnick dan Adelberg. 1996. *Mikrobiologi Kedokteran*, edisi 20, EGC, Jakarta.
- Jin and El-Deiry, W. S. 2005. Stabilization of p53 by CP-31398 inhibits ubiquitination without altering phosphorylation at serine 15 or 20 or MDM2 binding. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2171-2181.
- Junqueira LC, Arneiro j, Kelley RO. 1995. *Basic Histology. 8th Ed.* London: Prentice Hall International inc. pp: 423-446.
- Kobayashi T, Ogawa M, Sanada T, Mimuro H, Kim M, Ashida H. 2013. The Shigella OspC3 effector inhibits caspase-4, antagonizes inflammatory cell death, and promotes epithelial infection. *Cell Host Microbe* 13: 570– 583.
- Kocsis B and Szabo D. 2013. Antibiotic Resistance Mechanisms in Enterobacteriaceae. *Formatex*, 251-257.
- Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, et al. 2009. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136(5):1237–48. Epub 2009/08/22. doi: 10.1378/chest.09-0087 PMID: 19696123.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. 1996. *Buku Ajar Histologi. Edisi 5.* Jakarta: EGC. hlm. 291-303.
- Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. 2008. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology*, 47:1495–1503.
- Lin Chung-Wei C, Taylor Deborah, A Sita M, Zeindra Bierma, Maher Christoper G. 2010. Exercise for Osteoarthritis of the Knee, Physical Therapy June 2010, Volume 90 No. 6 839-842, *journal of the American Physical Therapy*
- Madigan MT dan Martinko JM. 2005. *Brock Biology of Microorganisms 11th ed.*, Prentice Hall, New Jersey.
- Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. 2015. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrugresistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 28:565–591.
- Meng J, Schroeder CM. 2007. *Eschericia coli*. Dalam Simjee S, editor. *Foodborne Diseases*. Totowa: Humana Pr.

- Melliawati, R. 2009. *E. coli* dalam kehidupan manusia. *Bio trends/Vol.4/ No.1/Th.2009*
- Merchant IA dan Parker RA. 1961. *Veterinary Bacteriology and Virology*. The Iowa State University Press: Ames, Iowa.Pp 306-308.
- Mokady D, Gophna U, Ron EZ. 2005. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *Int J Med Microbiol*, 295: 455-462.
- Mordue, D.G., F. Monroy., M.L. Regina., C.A. Dinarello and L.D. Sibley. 2001. Acute Toxoplasmosis Leads to Lethal Overproduction of Th1 Cytokines. *The American Association of Immunologists*, 167: 4574-4584.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2005. *Medical Microbiology* 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania USA.
- Nikitakis NG, Sauk JJ, and Papanicolaou SI. 2004. The Role of Apoptosis in Oral Disease: Mechanisms; Aberrations in Neoplastic, Autoimmune, Infectious, Hematologic, and Developmental Diseases; and Therapeutic Opportunities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 97: 476-490.
- Nolte MA, Hamann A, Kraal G, Mebius RE. 2002. The strict regulation of lymphocyte migration to splenic white pulp does not involve common homing receptors. *Immunology*, 106: 299-307.
- Nomura, K., H. Imai, T. Koumura, T.Koebayashi and Y. Nakagawa. 2000. Mitochondrial Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase inhibits the release of cytochrome c from mitochondria by suppressing the peroxidation of cardiolipin in hypoglycaemia induced apoptosis. *Biochem J.*, 351: 183-193.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*, 17: 1791-1798.
- Pajariu A, Firmanti SC, & Isbandrio B. 2010. *Infeksi oleh Bakteri Penghasil Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (ESBL) di RSUP Dr. Kariadi Semarang: Faktor Risiko Terkait Penggunaan Antibiotik*. Program Pendidikan Sarjana Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro.
- Parasakthi N, Arrifin H, Kamarulzaman A, Ibrahim HSM, Adnan A, Choeng I. 2001 Consensus guidelines for the management of infections by

- ESBL-producing bacteria. Kuala Lumpur (MY): Malaysian Society of Infectious Disease and Chemotherapy.
- Paterson D, Bonomo R. 2005. Extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiology Review*, 18: 657-686.
- Paterson DL. 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med*, 119: 20-28.
- Patrick D. 2005. *Medicine At A Glance*. Alih Bahasa: Rahmalia. A, dkk. Jakarta: Erlangga Elmer G.W., McFarland L.V., McFarland M, 2006. *Meta-analysis of probiotics for the prevention and treatment of acute pediatric diarrhea*.
- Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. 2015. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59:5873–5884.
- Poeze M, Ramsay G, Gerlach H, Rubulotta F, Levy M. 2004. An international sepsis survey: a study of doctors' knowledge and perception about sepsis. *Critical Care*. 8(6): 409-13.
- Pritchard MT, McMullen MR, Stavitsky AB, Cohen JI, Lin F, Medof ME. 2007. Differential contributions of C3, C5, and decay-accelerating factor to ethanol-induced fatty liver in mice. *Gastroenterology*, 132:1117-1126.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20: 440–458.
- Ramalho FS, Fernandez-Monteiro I, Rosello-Catafau J, Peralta C. 2006. Hepatic microcirculatory failure. *Acta Cir Bras*, 1:48-53.
- Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ. 2012. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* and patient outcome: a meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(6):1311–20.
- Savitri, L. 2018. Perbedaan Peningkatan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa dan Hati Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia Coli* ESBL dan dengan yang Diinfeksi *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase. *Disertasi*. Universitas Airlangga.
- Schauffler K, Wieler LH, Semmler T, Ewers C, and Guenther S. 2013. ESBL-

- plasmids carrying toxin-antitoxin systems can be “cured” of wild-type *Escherichia coli* using a heat technique. *Gut Pathogens*, 5:34
- Schaufler K, Bethe A, Lübke-Becker A, Ewers C, Kohn B, Wieler LH, Geunther S. 2015 Putative connection between zoonotic multiresistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs. *Infect Ecol Epidemiol*. 5(4):25334-25339.
- Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld, R. 2013 Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environment Microbiol*. 79(9):3027-3032.
- Schwaber MJ, Carmeli Y. 2007. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 60(5):913–20.
- Spapen H. 2008. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. *Anat Rec (Hoboken)*, 291:714-20.
- Su Y, Yu CY, Tsai Y, Wang SH, Lee C, and Chu C. 2016. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 49, 892e901
- Sumantri, Sunarsih ES, Hakim L, and Sugiyanto. 2012. Protective Effect of Brassica oleracea var. Botrytis L. against theophylline-induced hepatocellular abnormalities in Rats. *Univera Medicina* 31 (1): 12-19.
- Syn WK, Choi SS, Diehl AM. 2009. Apoptosis and cytokines in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis.*, 13:565–580. [PubMed: 19818305]
- Tacke F. 2012. Functional role of intrahepatic monocyte subsets for the progression of liver inflammation and liver fibrosis in vivo. *Fibrogenesis & tissue repair.*, 5(Suppl 1):S27. [PubMed: 23259611]
- Tambajong RN, Lalenoh DC, Kumaat L. 2014. Profil penderita sepsis di ICU RSUP Prof. Dr. R. D. Kandou Manado periode Desember

- 2014-2015. Jurnal e-Clinic (eCl), 4 (1)
- Tenaillon O, D Skurnik B. Picard, and E. Denamur. 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:207-217. [PubMed]
- Thapaliya S, Wree A, Povero D, Inzaugarat M.E, Berk M, Dixon L, Papouchado BG, and Feldstein AE. 2014. Caspase 3 inactivation protects against hepatic cell death and ameliorates fibrogenesis in a diet induced NASH model. *Dig Dis Sci.*, 59(6): 1197–1206. doi:10.1007/s10620-014-3167-6.
- Todar K. 2008. *Staphylococcus aureus* and Staphylococcal disease. Todar's Online textbook of Bacteriology.
- Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, et al. 2007. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrobial agents an chemotherapy*, 51(6):1987–94. Epub 2007/03/28. doi: 10.1128/aac.01509-06 PMID: 17387156; PubMed Central PMCID: PMC PMC1891412.
- Umadevi S, Kandhakumari G, Joseph NM, Kumar S, Easow JM, Stephen S, Singh UK. 2011. Prevalence and antimicrobial susceptibility pattern of ESBL producing Gram negative bacilli. *J Clin Diagnos Res.* 5(2):236-239.
- Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 20: 440–458.
- Victor M. 2005. Role of Free Radicals in Sepsis: Antioxidant Therapy. *Current Pharmaceutical Design.* 11: 3141-3158
- Wang W, Jittikanont S, Falk SA, Li P, Feng L, Gengaro PE, et al. 2003. Interaction among nitric oxide, reactive oxygen species, and antioxidants during endotoxemia-related acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol*; 284: 352-7.
- Wesche-Soldato CE, Lomas-Neira JL, Perl M, Jones L, Chung C, Ayala A. 2007. The role and regulation of apoptosis in sepsis *J of Endotoxin Res USA*
- World Health Organization. 2014. Antimicrobial resistance: global re-port

- on surveillance. Geneva. *WHO Press*: 17-19.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapene-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-1161.
- Yoon, J.H. and G.J. Gores. 2002. Death Receptor-mediated apoptosis and the liver. *J. Hepatology*. 37: 400-410.
- Zahorec R. 2001. Ratio of neutrophil to lymphocyte counts – rapid and simpl parameter of systemic inflammation and stress in critically ill [Article in English and Slovak]. *Bratisl Med J*, 102: 5-14
- Zhivotovsky B, Samali A, Gahm A, Orrenius S. 1999. Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ*, 6:644-651.
- Zhu, W, Hammad LA, Hsu F, Mao Y, and Luo ZQ. 2013. Induction of caspase 3 activation by multiple *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates. *Cell Microbiol* 15: 1783–1795.

# LAMPIRAN

---

## Lampiran 1

### Perlakuan pada Hewan Coba

Tikus yang telah diadaptasikan selama 1 minggu, kemudian siap diberikan perlakuan. Tikus di berikan injeksi pada bagian peritoniumnya dan dimasukkan satu kelompok di infeksi *Escherichia coli* ESBL dan kelompok lain diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Masing-masing dosisnya adalah  $1 \times 10^5$  CFU/ml. Irisan organ yang akan diambil adalah pada bagian tepi kiri dan kanan. Deteksi adanya apoptosis dilakukan dengan menempatkan potongan setebal 4-6  $\mu\text{m}$  dan diletakkan di atas *slide* polylysin kemudian diinkubasi semalam di inkubator pada suhu 45°C. Setelah itu merehidrasi preparat organ dengan aquades steril, kemudian ditambah dengan 50  $\mu\text{l}$  TUNEL *label mix* (campuran 5  $\mu\text{l}$  *enzyme solution* dan 45  $\mu\text{l}$  *labeling solution*) dengan TdT. Preparat ditutup dengan *siliconized cover slip*. Preparat diinkubasi pada suhu 37°C selama 30 menit di dalam *moist chamber*. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan *RNase solution* pada suhu 37°C selama 30 menit. Kemudian preparat dicuci lagi dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat diinkubasi dengan larutan Propidium iodida pada suhu ruang selama 10 menit. Preparat dicuci dengan PBS sebanyak 3 kali. Preparat ditutup dengan *cover slide* diameter 18 mm dan *immumount*. Pengamatan apoptosis dilakukan dengan menggunakan mikroskop fluoresen. Sel yang mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi warna hijau sedangkan sel yang tidak mengalami apoptosis akan mengalami fluoresensi merah.

## Lampiran 2

### Pemrosesan Jaringan

Jaringan organ tikus difiksasi ke dalam *buffer formalin* dengan tujuan untuk mempertahankan morfologi sel seperti semula, untuk mencegah terjadinya *otolisis*, dan untuk mencegah pertumbuhan bakteri atau jamur. *Buffer formalin* yang digunakan terdiri dari sodium hidrogen fosfat mono basik ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) 4 gram, sodium hidrogen fosfat dibasik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 6,5 gram, aquadestilata 900 ml, dan *formaldehyde* 37-40% 100 ml. Tahap selanjutnya adalah *dehidrasi* dengan *etanol* yang konsentrasinya dinaikkan secara bertahap, yaitu 80% selama 1 jam, 95% sebanyak 2 kali masing-masing selama 2 jam dan 1 jam, dan etanol absolut sebanyak 3 kali masing-masing selama 1 jam untuk menarik air dari dalam jaringan secara perlahan agar jaringan tidak mengalami pengerutan. Proses dehidrasi selesai lalu dilanjutkan dengan proses *clearing* yaitu dengan menggunakan bahan xylol untuk memediasi antara bahan dehidrasi dengan bahan *embedding* yang akan digunakan. Larutan *clearing* dapat melarutkan larutan dehidran dan juga dapat larut dengan bahan *embedding*, sehingga diperlukan proses penghilangan larutan dehidran dalam jaringan yang disertai dengan proses infiltrasi larutan *embedding* ke dalam jaringan. Proses ini dikenal dengan impregnasi. Bahan impregnasi yang digunakan adalah paraffin. Jaringan yang sudah dibuat blok paraffin selanjutnya dilakukan penyayatan jaringan dengan menggunakan *rotary microtome* atau *sliding microtome* dengan ketebalan 4-6 mikron. Bahan yang digunakan adalah poly L-Lysin. Bahan ini sangat baik digunakan untuk melekatkan sayatan jaringan untuk pewarnaan yang sering mengalami pencucian, seperti pewarnaan imunohistokimia. Sayatan yang diperoleh kemudian diambil dengan kuas yang telah dibasahi dengan air dan diletakkan pada permukaan *waterbath*. Jaringan yang mengembang kemudian diambil dengan *object glass* yang telah dilapisi dengan perekat jaringan, lalu dikeringkan pada suhu kamar dan dimasukkan ke dalam oven semalam.

### Lampiran 3

#### Pemeriksaan Imunohistokimia Ekspresi Caspase 3

Langkah-langkah pemeriksaan imunohistokimia sebagai berikut:

1. Xylol : 3-5 menit
2. Xylol : 3-5 menit
3. Xylol : 3-5 menit
4. Xylol : 3-5 menit
5. Ethanol absolut : 1-3 menit
6. Ethanol absolut : 1-3 menit
7. Ethanol absolut : 1-3 menit
8. Ethanol 70% : 1-3 menit
9. Ethanol 70% : 1-3 menit
10. Cuci 3x Aquabidest, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue*
11. Teteskan Proteinase K, inkubasi suhu ruangan selama 20 menit
12. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
13. Teteskan 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubasi suhu ruangan selama 5-10 menit
14. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
15. Teteskan Reaction Buffer inkubasi suhu ruangan selama 10-30 menit
16. Tanpa dicuci, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
17. Teteskan Complete Labelling Reaction Mixture inkubasi suhu 37°C selama 1-1,5 jam (masukkan inkubator dengan suhu yang sudah diatur 37°C)
18. Dikeluarkan dari inkubator cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
19. Teteskan Blocking Buffer inkubasi suhu ruangan selama 10 menit
20. Tanpa dicuci, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
21. Teteskan Antibody Solution inkubasi suhu ruangan selama 1-1,5 jam (kondisi gelap, bagian atas chamber ditutup dengan kain supaya tidak ada sinar yang masuk)
22. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
23. Teteskan Blocking Buffer inkubasi suhu ruangan selama 10 menit
24. Tanpa dicuci, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering
25. Teteskan 200X Conjugate inkubasi suhu ruangan selama 30 menit
26. Cuci PBS 3x, bersihkan pinggir *slide* dengan *tissue* kering

27. Teteskan DAB Solution inkubasi suhu ruangan selama 15 menit
28. Cuci Aquabidest 3x, bersihkan pinggir sliide dengan *tissue* kering
29. Teteskan Counterstain Methyl Green inkubasi suhu ruangan selama 3 menit
30. Cuci air mengalir 3x, pencucian terakhir biarkan selama 10 menit
31. Keringkan-Mounting

**Lampiran 4**  
**Foto Kegiatan**



**Tikus yang digunakan untuk penelitian, yaitu tikus strain Wistar**



**Isolat bakteri yang digunakan untuk penelitian, yaitu *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**



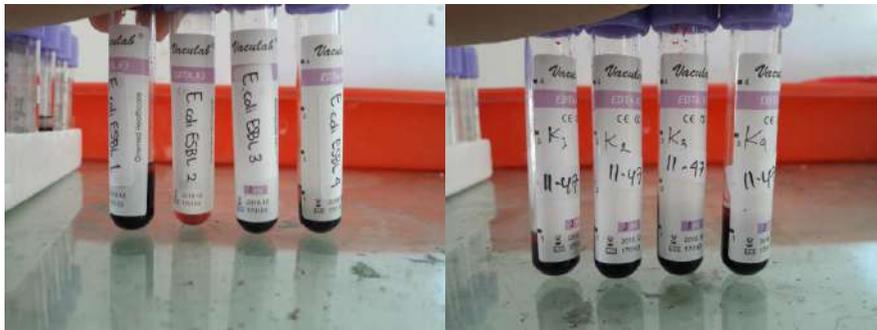
**Proses penyuntikan bakteri dan pembedahan tikus**



**Penyimpanan darah dan pembuatan hapusan darah**



**Hati dan limpa tikus**



**Darah dari tikus yang diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase**



Hati dan limpa dari tikus yang diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

**Sepsis** adalah suatu sindroma klinik yang terjadi karena adanya respons tubuh yang berlebihan terhadap rangsangan produk mikroorganisme. Sepsis dapat diperberat oleh peningkatan kuman yang multiresisten terhadap bermacam antibiotik, seperti *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* (KPC). *Carbapenemases* adalah beta-laktamase dengan spektrum hidrolitik yang luas. *Escherichia coli* yang resisten terhadap beta-laktam disebut *Escherichia coli* ESBL, sedangkan *Klebsiella pneumoniae* yang resisten terhadap karbapenem disebut *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*. Organ yang berperan penting dalam sistem kekebalan tubuh adalah limpa dan hati. Limpa merupakan situs hematopoiesis pada tikus dan merupakan organ limfoid terbesar yang memulai tanggapan kekebalan terhadap antigen yang ditularkan melalui darah. Injeksi bakteri pada tikus dilakukan melalui jalur injeksi intraperitoneal.

Buku ini berisi penguraian akan perbedaan peningkatan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*. Adanya buku ini diharapkan dapat bermanfaat, yakni berbagai kasus sepsis akibat infeksi *E. coli* ESBL dan *K. pneumoniae carbapenemase* diharapkan dapat diketahui tingkat keparahannya melalui peningkatan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati. Manfaat lain yang dapat diambil dari buku ini adalah dapat memberikan ilmu tentang perbedaan peningkatan ekspresi *caspase 3* pada limpa dan hati tikus yang diinfeksi *E. coli* ESBL dengan yang diinfeksi *K. pneumoniae carbapenemase*, sehingga dapat digunakan untuk pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya untuk pengobatan sepsis yang disebabkan oleh bakteri dengan resistensi yang lebih baik terhadap beta-laktam dan *carbapenemase*, sehingga mengurangi morbiditas dan mortalitas sepsis.



**Lisa Savitri** merupakan dosen di salah satu perguruan tinggi ternama di Indonesia. Beliau menyelesaikan pendidikan sarjana pada Program Studi Biologi, Universitas Negeri Malang dan pendidikan magister pada Program Studi Immunologi, Universitas Airlangga. Saat ini, beliau aktif sebagai *board of advisor* di Synbio Indonesia dan menjadi peneliti di Bioinformatics Research Center, Inbio Indonesia. Selain aktif melakukan kegiatan tri dharma perguruan tinggi, beliau juga aktif menjadi pembicara dalam pertemuan ilmiah nasional dan menulis beberapa buku, seperti Panduan Ringkas Desain Vaksin Berbasis Bioinformatika (2021) dan Langkah Mudah Membuat Professional Science Figures Bebas Plagiasi (2022).

**Penerbit Deepublish (CV BUDI UTAMA)**

Jl. Kaliurang Km 9,3 Yogyakarta 55581

Telp/Fax : (0274) 4533427

Anggota IKAPI (076/DIY/2012)

cs@deepublish.co.id

Penerbit Deepublish

@penerbitbuku\_deepublish

www.penerbitdeepublish.com



Kategori : Biologi

ISBN 978-623-02-5818-3



9 786230 258183



## **EFEK PREVENTIF EKSTRAK DAUN KENTUT (*Paederia foetida* L.) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-6 PADA MENCIT MODEL SEPSIS YANG DIINDUKSI *Escherichia coli***

**Lisa Savitri<sup>1a)</sup>, Elfred Rinaldo Kasimo<sup>2b)</sup>**

<sup>1,2</sup>Universitas Kadiri, Jalan Selomangleng No. 1, Kota Kediri, Telp.(0354)771649

e-mail: <sup>a)</sup>[lisasavitri@unik-kediri.ac.id](mailto:lisasavitri@unik-kediri.ac.id), <sup>b)</sup>[elferdreno@unik-kediri.ac.id](mailto:elferdreno@unik-kediri.ac.id)

*Received:*

*Revised:*

*Accepted:*

### **ABSTRAK**

Sepsis adalah keadaan darurat medis yang menggambarkan respons imunologis sistemik tubuh dan perubahan nukleotida pada gen yang mengkodekan interleukin-6 (IL-6) yang menghasilkan polimorfisme sehingga meningkatkan faktor risiko kematian karena sepsis. Terapi berbasis imunoterapi yang ditargetkan sebagian besar belum terbukti efektivitasnya sejauh ini. Sehingga, diperlukan tindakan yang lebih mengarah pada tindakan preventif, salah satunya dengan daun kentut (*Paederia foetida* L.). Mencit yang telah diadaptasikan diberikan perlakuan selama 14 hari dengan variasi sebagai berikut: 1) kelompok mencit yang tidak diberikan sonde lambung (N), 2) kelompok mencit diberikan aquades, 3) kelompok mencit diberikan ciprofloxacin, 4) kelompok diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 100 mg/kgBB, 5) kelompok mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 300 mg/kgBB, 6) kelompok mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 500 mg/kgBB. Mencit yang telah diberikan perlakuan diinjeksi pada bagian peritoniumnya dengan *E. coli* dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Mencit setelah 24 jam pasca pemaparan polimikroba sepsis akan memperlihatkan kejadian apoptosis. Berdasarkan hasil ELISA didapatkan kadar IL-6 N sebesar 1625,83 pg/mL, K- sebesar 2656,17 pg/mL, K+ sebesar 2033,21 pg/mL, P1 sebesar 2272,67 pg/mL, P2 sebesar 2175,83 pg/mL, P3 sebesar 2064,83 pg/mL. Mekanisme antiinflamasi pada sepsis diduga disebabkan adanya kandungan saponin, flavonoid, dan minyak atsiri yang terdapat di dalam ekstrak daun kentut. Mekanisme antiinflamasi yang paling mungkin adalah diduga saponin mampu berinteraksi dengan banyak membran lipid, seperti fosfolipid yang merupakan prekursor prostaglandin dan mediator inflamasi lainnya.

**Kata Kunci:** daun kentut, kadar interleukin-6, sepsis

### **PENDAHULUAN**

Sepsis adalah keadaan darurat medis yang menggambarkan respons imunologis sistemik tubuh terhadap proses infeksi yang dapat menyebabkan disfungsi organ stadium akhir dan kematian (Gyawali, et al., 2019). Pada tahun 2017, penyumbang terbesar kasus sepsis dan kematian terkait sepsis di semua usia adalah penyakit diare (9,2 hingga 15 juta kasus per tahun) dan infeksi saluran pernapasan bawah (1,8-2,8 juta per tahun). Ancaman serius penyebab sepsis salah satunya adalah bakteri

*Escherichia coli* (Lawn, et al., 2017; Stoll, et al., 2011).

Sepsis yang disebabkan oleh bakteri adalah kondisi yang mengancam jiwa yang muncul ketika respons tubuh terhadap infeksi melukai jaringan dan organnya (Singer, et al., 2016). Infeksi bakteri *E. coli* sebagai penyebab gangguan saluran cerna pada manusia telah meningkat prevalensinya (Silaban, 2015). *E. coli* adalah salah satu bakteri yang paling sering diisolasi dalam aliran darah dan merupakan infeksi dari bakteri Gram negatif yang paling sering diisolasi pada

pasien dewasa dengan bakteremia (Mora-Rillo, et al., 2015).

Pada sepsis, respons inflamasi terhadap patogen yang menyerang melibatkan proses inflamasi dan antiinflamasi, reaksi humoral dan seluler, dan kelainan peredaran darah (Kaukonen, et al., 2015). Beberapa penelitian telah mendeteksi perubahan nukleotida pada gen yang mengkodekan interleukin-6 (IL-6) menghasilkan polimorfisme yang akan meningkatkan faktor risiko atau pelindung untuk mengembangkan sepsis, syok sepsis, dan bahkan kematian karena sepsis (Tischendorf, et al., 2007).

Terlepas dari semua upaya penelitian eksperimental dan klinis selama tiga dekade terakhir, kemampuan untuk mempengaruhi perjalanan bakteri masih terbatas. Terapi berbasis imunoterapi yang ditargetkan sebagian besar belum terbukti efektivitasnya sejauh ini (Zhao, et al., 2014). Sehingga, diperlukan tindakan yang lebih mengarah pada tindakan preventif, terutama dengan menggunakan bahan herbal, karena dipercaya memiliki efek samping yang rendah.

Salah satu tanaman tradisional yang dipercaya masyarakat zaman dahulu untuk menyembuhkan gangguan pencernaan seperti diare adalah daun kentut (*Paederia foetida* L.), yang di Jawa Timur dikenal dengan nama 'daun sembukan'. Daun kentut mengandung metabolit sekunder, seperti alkaloid, saponin, tanin, dan flavonoid yang secara farmakologi memiliki manfaat seperti antioksidan, antibiotik, antikanker, antiserangga, agen antitumor, dan agen imunomodulasi (Jarczak, et al., 2021; Kumari, et al., 2017; Saifudin, 2014).

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan daun kentut (*Paederia foetida* L.) yang didapatkan dari Dusun Mlaten, Desa Ngrami, Kecamatan Sukomoro, Kabupaten Nganjuk, Jawa Timur. Objek yang

digunakan dalam penelitian ini adalah 36 ekor mencit jantan strain Balb/c umur 4-8 minggu dengan bobot 20-30 gram.

Mencit jantan ditimbang kemudian diletakkan di dalam kandang *polypropilane* standar dengan alas menggunakan serbuk kayu untuk diaklimatisasi selama dua minggu. Alas kandang diganti setiap tiga hari sekali. Pakan yang diberikan dilunakkan dengan menggunakan air terlebih dahulu, kemudian dikepal, sehingga berbentuk lonjong, dengan berat kurang lebih 5 gram per mencit. Minum diberikan secara *ad libitum*. Pakan dan minum diganti setiap hari. Mencit dibagi dalam enam kelompok perlakuan setelah diaklimatisasi selama dua minggu.

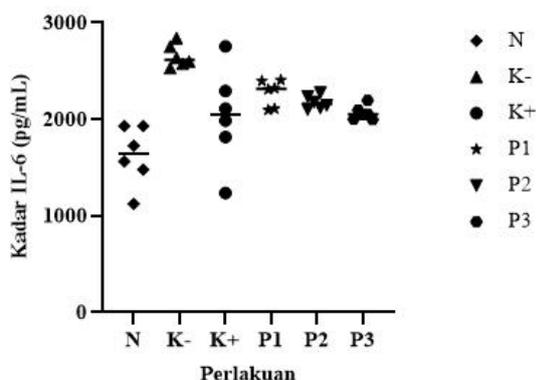
Mencit yang telah diadaptasikan diberikan perlakuan selama 14 hari dengan variasi sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal (N), yaitu mencit yang tidak diberikan sonde lambung, 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif (K-), yaitu mencit diberikan aquades, 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif (K+), yaitu mencit diberikan ciprofloxacin, 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1 (P1), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 100 mg/kgBB, 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2 (P2), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 300 mg/kgBB, 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3 (P3), yaitu mencit diberikan ekstrak daun kentut dengan dosis 500 mg/kgBB.

Mencit yang telah diberikan perlakuan diinjeksi pada bagian peritoniumnya dengan *E. coli* dengan dosis  $1 \times 10^5$  CFU/mL. Mencit setelah 24 jam pasca pemaparan polimikroba sepsis akan memperlihatkan kejadian apoptosis.

Setelah mencit dimatikan kemudian mengambil darah dari jantung, selanjutnya darah dimasukkan ke dalam *ependoff* 2 mL dan mensentrifugasi dengan kecepatan 3.000 rpm menggunakan *mikrosentrifuge*, selama lima belas menit. Serum darah diambil sebanyak 100  $\mu$ L untuk pengujian kadar IL-6.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil ELISA didapatkan kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli*, sebagai berikut: 1) kelompok 1 sebagai kontrol normal (N) sebesar 1625,83 pg/mL, 2) kelompok 2 sebagai kontrol negatif (K-) sebesar 2656,17 pg/mL, 3) kelompok 3 sebagai kontrol positif (K+) sebesar 2033,21 pg/mL, 4) kelompok 4 sebagai perlakuan 1 (P1) sebesar 2272,67 pg/mL, 5) kelompok 5 sebagai perlakuan 2 (P2) sebesar 2175,83 pg/mL, 6) kelompok 6 sebagai perlakuan 3 (P3) sebesar 2064,83 pg/mL.



**Gambar 1. Diagram Pengaruh Ekstrak Daun Kentut terhadap Kadar IL-6 pada Mencit Model Sepsis yang Diinduksi *E. coli***

Dari Gambar 1 dapat diketahui bahwa kadar IL-6 terendah adalah pada kelompok kontrol normal (N), karena pada kelompok tersebut mencit sama sekali tidak diberikan paparan *E. coli*, sehingga mencit tidak mengalami sepsis. Pada mencit model sepsis, efek preventif yang ditunjukkan dengan kadar IL-6 paling rendah adalah kelompok kontrol positif (K+), karena mencit tersebut diberikan obat ciprofloxacin, di mana obat tersebut merupakan bahan kimia yang tentunya memiliki efek samping jika dikonsumsi secara terus-menerus. Sedangkan untuk perlakuan dengan ekstrak daun kentut, didapatkan bahwa yang paling mampu untuk menurunkan IL-6 adalah pada perlakuan 3 (P3), yaitu ekstrak daun kentut dosis 500 mg/kgBB.

Dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap penurunan kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* dapat diketahui dengan melakukan analisis secara statistik dengan metode ANOVA pada tingkat kepercayaan 95%. Dari hasil analisis dengan GraphPad Prism versi 9.3.1 (471) menunjukkan bahwa F hitung dosis 10,35 > 0,6330 (taraf 0,05), sehingga menunjukkan bahwa F hitung lebih besar daripada F tabel. Hal ini berarti terdapat perbedaan bermakna dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* dengan kata lain terdapat pengaruh antar dosis. Kelompok dosis pemberian yang mempunyai pengaruh antar dosis, dapat diketahui dengan uji lanjutan yaitu *Brown-Forsythe test* yang menunjukkan bahwa F (DFn, DFd) 3,477 (5,30) > P value 0,0135 dan *Bartlett's test* yang menghasilkan nilai *Bartlett's statistic (corrected)* 28,74 dengan P value < 0,0001

Mekanisme antiinflamasi pada sepsis diduga disebabkan adanya kandungan saponin, flavonoid, dan minyak atsiri yang terdapat di dalam ekstrak daun kentut. Mekanisme antiinflamasi yang paling mungkin adalah diduga saponin mampu berinteraksi dengan banyak membran lipid, seperti fosfolipid yang merupakan prekursor prostaglandin dan mediator inflamasi lainnya (Savitri dan Ihsan, 2020)

Mekanisme antiinflamasi juga dilakukan oleh flavonoid yang dilakukan melalui jalur penghambatan aktivitas enzim COX dan/atau lipooksigenase, karena penghambatan COX atau lipooksigenase. Penghambatan jalur COX dan lipooksigenase ini secara langsung juga menyebabkan penghambatan biosintesis eikosanoid dan leukotrien, yang merupakan produk akhir dari jalur COX dan lipooksigenase (Savitri, 2022)

Selain itu, flavonoid dapat menurunkan jumlah leukosit immobil dan mengurangi aktivasi komplemen sehingga

menurunkan adhesi leukosit ke endotel dan mengakibatkan penurunan respon inflamasi tubuh. Penghambatan degranulasi netrofil. Flavonoid juga berperan untuk menghambat pelepasan histamin. Efek antiinflamasi flavonoid didukung oleh aksinya sebagai antihistamin (Savitri, et al., 2020). Histamin adalah salah satu mediator inflamasi yang pelepasannya distimulasi oleh pemompaan kalsium ke dalam sel. Flavonoid dapat menghambat enzim c-AMP fosfodiesterase, sehingga kadar c-AMP dalam sel mast meningkat, dengan demikian kalsium dicegah masuk ke dalam sel yang berarti juga mencegah pelepasan histamin dan dapat menstabilkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) dengan bereaksi dengan senyawa reaktif dari radikal sehingga radikal menjadi inaktif (Savitri, et al., 2019).

## SIMPULAN

Dosis ekstrak daun kentut sebagai preventif terhadap kadar IL-6 pada mencit model sepsis yang diinduksi *E. coli* didapatkan bahwa yang paling mampu untuk menurunkan kadar IL-6 adalah pada perlakuan 3 (P3), yaitu ekstrak daun kentut dosis 500 mg/kgBB dengan mekanisme antiinflamasi pada sepsis diduga disebabkan adanya kandungan saponin, flavonoid, dan minyak atsiri yang terdapat di dalam ekstrak daun kentut. Mekanisme antiinflamasi yang paling mungkin adalah diduga saponin mampu berinteraksi dengan banyak membran lipid, seperti fosfolipid yang merupakan prekursor prostaglandin dan mediator inflamasi lainnya

## UCAPAN TERIMAKASIH

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Direktorat Akademik Pendidikan Tinggi Vokasi, Direktorat Jenderal Pendidikan Vokasi, Kementerian Pendidikan, Kebudayaan, Riset, dan Teknologi yang

telah memberikan pendanaan untuk penelitian ini.

## DAFTAR PUSTAKA

- Chu, K. C. Kao, S. H. Huang, D. Y. Chuang, and H. P. Wu. (2016) "Diagnostic value of apoptosis biomarkers in severe sepsis-a pilot study," *Cellular and Molecular Biology*, vol. 62, no. 11, pp. 32–37, 2016.
- Gyawali, B., Ramakrishna, K., & Dhamoon, A. S. (2019). Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE open medicine*, 7, 2050312119835043. <https://doi.org/10.1177/2050312119835043>
- Jarczak Dominik, Kluge Stefan, Nierhaus Axel. (2021) Sepsis Pathophysiology and Therapeutic Concepts. *Frontiers in Medicine*. Vol. 8 (2021). 609. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmed.2021.628302>.
- Kaukonen K-M, Bailey M, Pilcher D, Cooper DJ, Bellomo R. (2015) Systemic inflammatory response syndrome criteria in defining severe sepsis. *N Engl J Med* 2015;372(17):1629–38.
- Kumari, Preeti, Chandrawati Kumari, and Poornima Shekhar Singh. (2017) "Phytochemical screening of selected medicinal plants for secondary metabolites." *Int. J. Life. Sci. Scienti. Res* 2017; 3(4):1151-1157. <https://doi.org/10.21276/ijlssr.2017.3.4.9>
- Lawn JE, Bianchi-Jassir F, Russell NJ, Kohli-Lynch M, Tann CJ, Hall J, et al. (2017) Group B Streptococcal Disease Worldwide for Pregnant Women, Stillbirths, and Children: Why, What, and How to Undertake Estimates? *Clin Infect Dis*. 2017;65(suppl\_2):S89-S99.

- Monneret, F. Venet, B. J. Kullberg, and M. G. Netea. (2011) "ICU-acquired immunosuppression and the risk for secondary fungal infections," *Medical mycology*, vol. 49, no. S1, pp. S17–S23, 2011.
- Monneret and F. Venet (2016) "Sepsis induced immune alterations monitoring by flow cytometry as a promising tool for individualized therapy," *Cytometry. Part B, Clinical Cytometry*, vol. 90, no. 4, pp. 376–386, 2016.
- Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez Sebastián J, Romero-Gómez MP, Fernández FA, et al. (2015) Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence*. 2015; (1):93-100.
- Saifudin, Azis. (2014) *Senyawa alam metabolit sekunder teori, konsep, dan teknik pemurnian*. Deepublish, 2014.
- Savitri, L., Sandhika, W., & Wahyu Widodo, A. D. (2019). Perbedaan Ekspresi Caspase 3 pada Limpa Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan dengan yang Diinfeksi *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. *Prosiding Seminar Nasional Multidisiplin*, 2(1), 300–306. Retrieved from <https://ejournal.unwaha.ac.id/index.php/snami/article/view/705>
- Savitri, L. & Ihsan, K. Aktivitas Triterpenoid Kulit Batang Waru Jawa (*Hibiscus tiliaceus* L.) terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Kesehatan Perintis* (Perintis's Health Journal), 7 (1) 2020: 41-50.
- Savitri, Lisa; Maslikah, Siti & Susilowati,. (2020). Effect of red betel leaf extract (*Piper crocatum*) against interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ) levels and thickness of feet oedema in *Mus musculus* (swiss strain) rheumatoid arthritis model. *AIP Conference Proceedings*. 2231. 040012. 10.1063/5.0002562.
- Savitri, Lisa. (2022). Perbandingan Tingkat Keganasan Bakteri Berdasarkan Lama Waktu Kematian pada Tikus Model Sepsis yang Diinfeksi *Escherichia coli* ESBL dan *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase. *Quagga: Jurnal Pendidikan dan Biologi*. 14. 67-72. 10.25134/quagga.v14i1.5065.
- Silaban H. (2021) The Effect of Various Concentrations of Ethanol Extract of the Leaves of *Paederia foetida* L. on the Growth of *Escherichia Coli* Bacteria. *JDDT* [Internet]. 15Nov.2021 [cited 27Dec.2021];11(6):61-7.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche JD, Coopersmith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent JL, Angus DC. (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*. 2016 Feb 23;315(8):801-10.
- Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. (2011) Early onset neonatal sepsis: the burden of group B Streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics*. 2011;127(5):817-26.
- Tischendorf JJW, Yagmur E, Scholten D, Vidacek D, Koch A, Winograd R, et al. (2007) The interleukin-6 (IL6)- 174 G/C promoter genotype is associated with the presence of septic choque and the ex vivo secretion of IL6. *Int J Immunogenet* 2007 Dec;34(6):413 8.

Zhao, Y. Xu, J. Zhang, and T. Ji (2014)  
“Cardioprotective effect of  
carvedilol: inhibition of apoptosis  
in H9c2 cardiomyocytes via the  
TLR4/NF- $\kappa$ B pathway following  
ischemia/reperfusion injury,”  
Experimental and Therapeutic  
Medicine, vol. 8, no. 4, pp. 1092  
1096, 2014.



Magelang, 5 November 2022

No : 004/IJNSE/X/2022  
Hal : **Penerimaan Artikel**

Yth. Lisa Savitri  
di Universitas Kadiri

Dengan hormat,

Bersama ini kami beritahukan bahwa artikel Saudara yang berjudul “EFEK PREVENTIF EKSTRAK DAUN KENTUT (*Paederia foetida* L.) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-6 PADA MENCIT MODEL SEPSIS YANG DIINDUKSI *Escherichia coli*” sudah diterima dewan redaksi *Indonesian Journal of Natural Science Education* melalui laman [jom.untidar.ac.id/index.php/ijnse](http://jom.untidar.ac.id/index.php/ijnse) dan berdasarkan hasil review artikel tersebut akan kami publikasikan pada *Indonesian Journal of Natural Science Education* Volume 5 Nomor 2 pada bulan November tahun 2022.

Demikian surat ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya. Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih

Editor-in-Chief  
  
Dr. Ahmad Muhlisin, M.Pd



# UNIVERSITAS KADIRI

## TERAKREDITASI "BAIK SEKALI"

Fakultas : Hukum S1 & S2 • Sospol S1 & S2 • Pertanian S1 • Ekonomi S1 & S2 • Teknik S1 • Ilmu Kesehatan S1 & S2  
Alamat : Jl. Selomangleng No. 1 Kediri – Jawa Timur • Telp. (0354) 773032, 771649, 771017 • Fax. (0354) 773032  
Website : <http://unik-kediri.ac.id> • Email : [rektor@unik-kediri.ac.id](mailto:rektor@unik-kediri.ac.id)

### SURAT PERNYATAAN TANGGUNG JAWAB BELANJA

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : LISA SAVITRI S.Si, M.Imun.

Alamat : Jl. Masjid Al Huda 93

berdasarkan Surat Keputusan Nomor 0746/D4/AK.04/2022 dan Perjanjian / Kontrak Nomor 003/SP2H/PPKM/LL7/2022, 07/P.1/LP3M/VI/2022 mendapatkan Anggaran Penelitian EFEK PREVENTIF EKSTRAK DAUN KENTUT (*Paederia foetida L.*) TERHADAP KADAR INTERLEUKIN-6 DAN EKSPRESI CASPASE-3 PADA LIMPA MENCIT MODEL SEPSIS YANG DIINDUKSI *Escherichia coli* Sebesar 12,000,000

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Biaya kegiatan Penelitian di bawah ini meliputi :

No	Uraian	Jumlah
01	<b>Bahan</b> 1. ATK - Rp 209.500,00, 2. Bahan Penelitian (Habis Pakai) - Rp 870.500,00, 3. Bahan Persediaan - Rp 850.540,00	1,930,540
02	<b>Pengumpulan Data</b> 1. Konsumsi - Rp 1.262.597,00, 2. HR Sekertariat/Administrasi Peneliti - Rp 420.000,00, 3. Transport - Rp 550.000,00, 4. Biaya Rapat - Rp 1.040.000,00, 5. FGD - Rp 500.000, 6. HR Pembantu Peneliti - Rp 500.000,00	4,772,597
03	<b>Analisis Data(Termasuk Sewa Peralatan</b> 1. Objek Penelitian - Rp 1.085.000,00, 2. Analisis Sampel - Rp 7.434.268,00, 3. HR Sekertariat/Administrasi Peneliti - Rp 420.000,00, 4. Biaya Rapat - Rp 250.000,00, 5. FGD - Rp 250.000,00	9,439,268
04	<b>Pelaporan, Luaran Wajib dan Luaran Tambahan</b> 1. HR Sekertariat/Administrasi Peneliti - Rp 235.000,00, 2. Publikasi Jurnal - Rp 400.000,00, 3. Layanan Parafrase Buku - Rp 1.900.000,00	2,535,000
05	<b>Lain-lain</b> -	0
	<b>Jumlah</b>	<b>18,677,405</b>

2. Jumlah uang tersebut pada angka 1, benar-benar dikeluarkan untuk pelaksanaan kegiatan Penelitian dimaksud.

Demikian surat pernyataan ini dibuat dengan sebenarnya.

Kediri, 08-12-2022

Ketua,

METHUKAN TEMPEL  
9401AAK091328 SAVITRI, S.Si., M.Imun.  
NIP / NIK 3571024404940002