

**PENGARUH KOMBINASI PROBIOTIK (*Bifidobacterium Infantis* dan  
*Lactobacillus Acidophilus*) TERHADAP KADAR IL-17 PADA  
TIKUS MODEL KOLITIS ULSERATIF  
(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*)  
yang Diinduksi *Dextran Sodium Sulphate* (DSS))**

**Skripsi**

untuk memenuhi sebagian persyaratan  
mencapai gelar Sarjana Kedokteran



Oleh:

**Naufal Adi Pamungkas**

**30101800127**

**FAKULTAS KEDOKTERAN  
UNIVERSITAS ISLAM SULTAN AGUNG  
SEMARANG**

**2022**

## SKRIPSI

**PENGARUH KOMBINASI PROBIOTIK (*Bifidobacterium Infantis* dan  
*Lactobacillus Acidophilus*) TERHADAP KADAR IL-17 PADA TIKUS  
MODEL KOLITIS ULSERATIF  
(Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*)  
yang diinduksi Dextran Sodium Sulphate (DSS))**

Yang dipersiapkan dan disusun oleh :

**Naufal Adi Pamungkas**

**30101800127**

telah dipertahankan di depan Dewan Penguji pada tanggal 10 Februari 2022  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

### Susunan Tim Penguji

Pembimbing I

**dr. Pujiati Abbas Sp.A**  
NIDN.0627086501

Penguji I

**Dr. dr. Chodidjah, M.Kes., PA**  
NIDN. 621075601

Pembimbing II

**dr. Suslorini Sp.PA.M.Si.Med**  
NIDN. 0618057905

Penguji II

**Azizah Hikma Safitri, S.Si, M.Si**  
NIDN.0601059001

Semarang, .....

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung

Dekan,



**Dr.dr.H. Setyo Trisnadi, S.H., Sp.KF**  
NIDN. 613066402

## SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Naufal Adi Pamungkas

NIM : 30101800127

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi yang berjudul :

**“PENGARUH KOMBINASI PROBIOTIK (*Bifidobacterium Infantis* dan *Lactobacillus Acidophillus*) TERHADAP KADAR IL-17 PADA TIKUS MODEL KOLITIS ULSERATIF (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar (*Rattus Norvegicus*) yang diinduksi Dextran Sodium Sulphate (DSS))”**

Adalah benar hasil karya saya dan penuh kesadaran bahwa saya tidak melakukan tindakan plagiasi atau mengambil alih seluruh atau sebagian besar skripsi orang lain tanpa menyebutkan sumbernya. Jika saya terbukti melakukan tindakan plagiasi, saya bersedia menerima sanksi sesuai dengan aturan yang berlaku.

Semarang, 23 Februari 2022  
Yang menyatakan,



**Naufal Adi Pamungkas**

## PRAKATA

*Assalamu'alaikum wr.wb.*

Alhamdulillah, puji syukur senantiasa penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala berkah, rahmat, dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“PENGARUH KOMBINASI PROBIOTIK (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophillus*) TERHADAP KADAR IL-17 PADA TIKUS MODEL KOLITIS ULSERATIF (Studi Eksperimental pada Tikus Jantan Galur Wistar yang Diinduksi *Dextran Sodium Sulphate* (DSS))”**. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat kelulusan tingkat sarjana kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari berbagai hambatan. Namun, berkat bimbingan dan bantuan yang diberikan dari berbagai pihak, akhirnya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Dr. dr. H. Setyo Trisnadi Sp.KF. S.H. selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Sultan Agung.
2. dr. Pujiati Abbas, Sp.A. dan Dr. dr. Susilorini, Sp. PA, Msi.Med., selaku dosen pembimbing I dan II yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran, ilmu, serta kesabarannya dalam memberikan bimbingan, nasihat, dan saran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan.
3. Dr. dr. Chodidjah, M.Kes. dan Ibu Azizah Hikmah Safitri, S.Si, Msi., selaku dosen penguji I dan II yang telah memberikan masukan, ilmu,

arahan, dan saran sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini hingga akhir.

4. Papa (dr. Toni Purwirantono Sp.B), Mama (dr. Rien Endah Widayati), Kakak (dr.Galih Widiyanto), Kakak kedua (dr.Eta Septiani Maulidita) dan segenap keluarga atas kasih sayang, doa, dukungan, dan motivasi tiada henti kepada penulis.
5. Teman-teman semua (Xavier, om Bran, Asep, Dida, dan Arvin) dan saudara saya (Adit dan Zufar) yang telah menemani dan memberikan semangat kepada penulis selama masa perkuliahan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam penulisan skripsi ini, maka penulis mengharapkan kritik dan saran demi kebaikan akan skripsi ini. Akhir kata penulis mohon maaf atas semua kesalahan baik disengaja maupun tidak dan semoga karya ini dapat bermanfaat bagi semua pihak.

*Wassalamu'alaikum wr.wb.*

Semarang, 20 November 2021

**Naufal Adi Pamungkas**

## DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
SURAT PERNYATAAN.....	iii
PRAKATA.....	iv
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR SINGKATAN .....	ix
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
INTISARI.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah .....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.3.1. Tujuan Umum .....	5
1.3.2. Tujuan Khusus .....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	6
1.4.1. Manfaat Teoritis.....	6
1.4.2. Manfaat Praktis .....	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1. Interleukin-17 .....	7
2.1.1. Definisi.....	7
2.1.2. Karakteristik.....	7
2.1.3. Patomekanisme Interleukin-17 pada Kolitis Ulseratif .....	8
2.2. Probiotik .....	12
2.2.1. <i>Bifidobacterium Infantis</i> .....	13
2.2.2. <i>Lactobacillus Acidophilus</i> .....	14
2.2.3. Pengaruh Probiotik terhadap Kolitis Ulseratif .....	16
2.2.4. Penentuan Efektivitas Probiotik.....	16

2.3.	Kolitis Ulseratif .....	18
2.3.1.	Definisi .....	18
2.3.2.	Klasifikasi .....	18
2.3.3.	Etiopatogenesis .....	22
2.3.4.	Diagnosis .....	28
2.3.5.	Tatalaksana.....	31
2.3.6.	Tikus model kolitis ulseratif.....	33
2.4.	Kerangka Teori.....	35
2.5.	Kerangka Konsep .....	36
2.6.	Hipotesis .....	36
2.6.1.	Hipotesis mayor .....	36
2.6.2.	Hipotesis minor .....	36
<b>BAB III METODE PENELITIAN.....</b>		<b>37</b>
3.1.	Jenis Penelitian .....	37
3.2.	Tempat dan waktu penelitian.....	37
3.3.	Subyek Penelitian .....	37
3.3.1.	Kriteria Inklusi .....	38
3.3.2.	Kriteria Eksklusi.....	38
3.4.	Besar Sampel .....	38
3.5.	Teknik <i>Sampling</i> .....	39
3.6.	Rancangan Penelitian .....	39
3.7.	Variabel dan Definisi Operasional .....	40
3.7.1.	Variabel .....	40
3.7.2.	Definisi Operasional.....	41
3.8.	Alat dan Bahan .....	42
3.8.1.	Alat .....	42
3.8.2.	Bahan Penelitian.....	42
3.9.	Cara Kerja.....	43
3.9.1.	Adaptasi tikus.....	43
3.9.2.	Randomisasi .....	43
3.9.3.	Induksi <i>Dextran Sodium Sulphate</i> (DSS).....	44

3.9.4. Penentuan dosis.....	45
3.9.5. Perlakuan.....	46
3.9.6. Pengukuran kadar IL-17.....	47
3.10. Analisa Hasil .....	47
3.11. Alur Penelitian.....	48
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>51</b>
4.1. Hasil Penelitian.....	51
4.1.1. Hasil Pemeriksaan Kadar IL-17 Setelah data di eksklusi .....	53
4.1.2. Hasil Pemeriksaan Selisih Kadar IL-17 <i>Pretest</i> dan <i>Posttest</i> ....	58
4.2. Pembahasan .....	60
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>65</b>
5.1. Kesimpulan.....	65
5.2. Saran.....	65
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>67</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>71</b>



## DAFTAR SINGKATAN

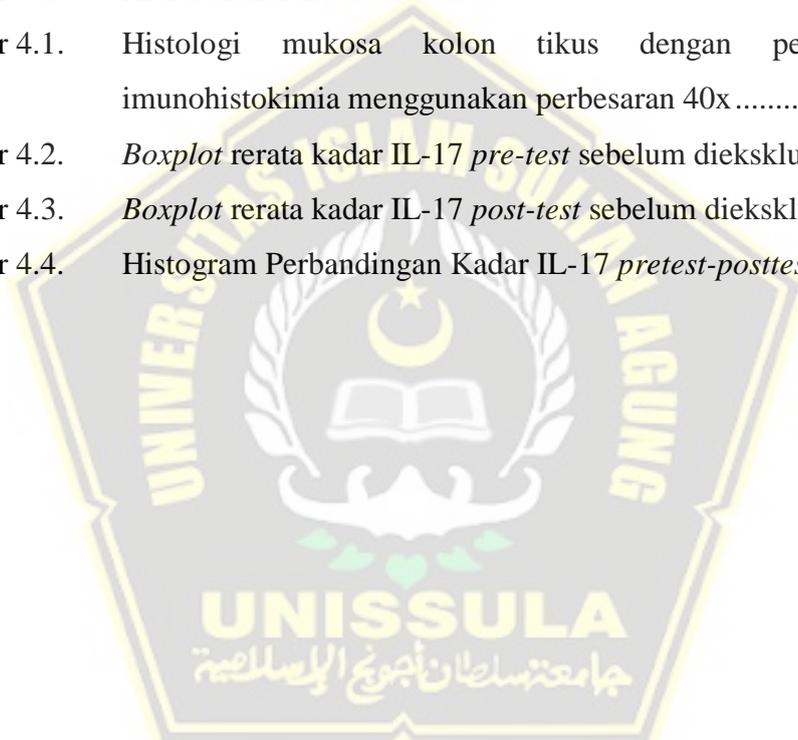
APC	: <i>Antigen Presenting Cell</i>
ASCA	: <i>Anti-Saccharomyces cerevisiae Antibodies</i>
ATG16L1	: <i>Autophagy Related 16 Like 1</i>
CFU	: <i>Colony Forming Unit</i>
CRP	: <i>C-reactive protein</i>
CT-scan	: <i>Computed Tomography scan</i>
CXCL1	: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 1</i>
CXCL2	: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 2</i>
CXCL5	: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 5</i>
CXCL8	: <i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand 8</i>
DSS	: <i>Dextran Sodium Sulphate</i>
FOXP3	: <i>Forkhead Box P3</i>
GALT	: <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
IBD	: <i>Inflammatory Bowel Disease</i>
IFN- $\gamma$	: <i>Interferon gamma</i>
IL-6	: <i>Interleukin-6</i>
IL-8	: <i>Interleukin-8</i>
IL-10	: <i>Interleukin-10</i>
IL-17	: <i>Interleukin-17</i>
IL-23	: <i>Interleukin-23</i>
IPAA	: <i>Ileal-Pouch Anal Anastomosis</i>
KU	: <i>Kolitis Ulseratif</i>
LED	: <i>Laju Endap Darah</i>
MALT	: <i>Mucosa Associated Lymphoid</i>
MCP-1	: <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MDP	: <i>Muramyl Dipeptide</i>
MHC	: <i>Major Hystocompatibility Complex</i>
MRI	: <i>Magnetic Resonance Imaging</i>
MUC-2	: <i>Mucin-2</i>

NF- $\kappa$ B	: <i>Nuclear Factor kappa-B</i>
NOD2	: <i>Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 2</i>
p-ANCA	: <i>Perinuclear Anti-Neutrophil Cytoplasm Antibodies</i>
PARP	: <i>Peri-Appendiceal Red Patch</i>
SCFA	: <i>Short Chain Fatty Acid</i>
Sel NK	: <i>Sel natural killer</i>
STAT3	: <i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i>
TGF- $\beta$	: <i>Transforming Growth Factor-beta</i>
Th1	: <i>T Helper 1</i>
Th2	: <i>T Helper 2</i>
Th17	: <i>T Helper 17</i>
TLR	: <i>Toll-like Receptor</i>
TNBS	: <i>Trinitro Benzene Sulfonic Acid</i>
TNF- $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i>
Treg	: <i>T regulator</i>



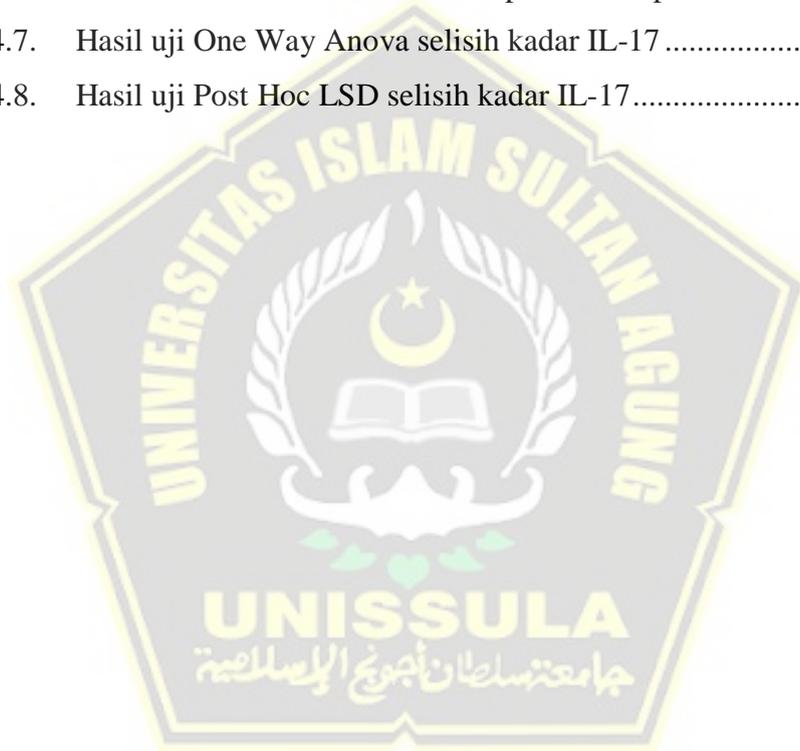
## DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1.	Peran IL-17 dalam Patogenesis IBD .....	10
Gambar 2.2.	Disbiosis dalam kasus IBD .....	11
Gambar 2.3.	Bifidobacterium infantis.....	13
Gambar 2.4.	Lactobacillus acidophilus.....	15
Gambar 2.5.	Klasifikasi kolitis ulseratif menurut Montreal .....	20
Gambar 2.6.	Kerangka Teori.....	35
Gambar 2.7.	Kerangka konsep .....	36
Gambar 3.1.	Alur Penelitian .....	48
Gambar 4.1.	Histologi mukosa kolon tikus dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan perbesaran 40x .....	52
Gambar 4.2.	<i>Boxplot</i> rerata kadar IL-17 <i>pre-test</i> sebelum dieksklusi .....	52
Gambar 4.3.	<i>Boxplot</i> rerata kadar IL-17 <i>post-test</i> sebelum dieksklusi .....	53
Gambar 4.4.	Histogram Perbandingan Kadar IL-17 <i>pretest-posttest</i> .....	57



## DAFTAR TABEL

Tabel 2.1.	Klasifikasi Mayo .....	21
Tabel 2.2.	Skoring tikus model kolitis (Martin et al., 2016) .....	34
Tabel 4.1.	Rerata kadar IL-17 pre-test setelah di eksklusi .....	54
Tabel 4.2.	Hasil One Way Anova kadar IL-17 pre-test .....	54
Tabel 4.3.	Rerata kadar IL-17 post-test setelah di eksklusi .....	55
Tabel 4.4.	Hasil One Way Anova kadar IL-17 post-test.....	55
Tabel 4.5.	Hasil uji Post Hoc LSD kadar IL-17 post-test .....	56
Tabel 4.6.	Rerata selisih kadar IL-17 antara pretest dan posttest.....	58
Tabel 4.7.	Hasil uji One Way Anova selisih kadar IL-17 .....	59
Tabel 4.8.	Hasil uji Post Hoc LSD selisih kadar IL-17 .....	59



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1.	Hasil analisis statistik.....	71
Lampiran 2.	<i>Ethical Clearance</i> .....	78
Lampiran 3.	Surat keterangan penelitian.....	79
Lampiran 4.	Hasil penelitian.....	80
Lampiran 5.	Dokumentasi penelitian.....	82
Lampiran 6.	Surat Undangan Ujian Skripsi.....	83



## INTISARI

Probiotik adalah mikroorganisme hidup yang bermanfaat apabila diberikan dalam dosis dan waktu yang tepat. Probiotik *Lactobacillus spp.* atau *Bifidobacterium spp.* memiliki fungsi sebagai imunoregulator. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophillus*) terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif.

Desain penelitian eksperimental dengan *pre test - post test control group design* menggunakan 24 ekor tikus dan dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok K, kelompok P1 diberi induksi DSS tanpa terapi, kelompok P2 diinduksi DSS dan terapi standar 5-ASA, kelompok P3 diinduksi DSS dan terapi kombinasi probiotik dilakukan selama 8 hari. Sampel darah diambil saat sebelum dan sesudah perlakuan. Kadar IL-17 diukur menggunakan ELISA. Data yang didapatkan diuji dengan *Paired Sample T-test* dan diuji dengan *One Way ANOVA* dilanjutkan *Posthoc LSD*

Rerata kadar IL-17 pada kelompok K ( $238,5 \pm 75,2$ ) dan ( $217,4 \pm 8,5$ ), kelompok P1 ( $242,4 \pm 20,1$ ) dan ( $178,9 \pm 17,1$ ), kelompok P2 ( $174,5 \pm 49,3$ ) dan ( $212,3 \pm 32,1$ ), kelompok P3 ( $240 \pm 44$ ) dan ( $194,8 \pm 6,2$ ). Hasil uji *Paired Sample T-test* menunjukkan tidak ada perbedaan rerata kadar IL-17 *pre* dan *post* pada kelompok K ( $p=0,548$ ), kelompok P2 ( $p=0,062$ ), kelompok P3 ( $p=0,061$ ). Sedangkan kelompok P1 ada perbedaan yang bermakna ( $p=0,001$ ).

Uji *One Way ANOVA* didapatkan hasil  $p=0,009$ . Hasil uji *Post Hoc LSD* menunjukkan data *post test* antara kelompok kontrol dengan perlakuan I menunjukkan ada perbedaan signifikan menunjukkan induksi DSS berhasil sedangkan kelompok kontrol dengan kelompok perlakuan III menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan.

Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi probiotik (*Lactobacillus acidophillus* dan *Bifidobacterium infantis*) berpengaruh terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif.

**Kata kunci:** *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophillus*, Kadar IL-17, *Dextran Sodium Sulphate* (DSS).

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1. Latar Belakang

Kolitis ulseratif (KU) merupakan penyakit radang kronik usus yang predileksinya di colon. (Gajendran *et al.*, 2019). Angka kejadian kolitis ulseratif meningkat tiap tahunnya pada negara-negara industrial. Kolitis ulseratif dapat terjadi karena disbiosis mikroba usus dan peningkatan sitokin proinflamasi seperti IL-17 (Hohenberger *et al.*, 2018). IL-17 mempunyai 6 tipe yaitu IL-17 sampai dengan IL-17f. Pada kasus kolitis ulseratif IL-17 berperan sebagai sitokin proinflamasi akan tetapi IL-17 memiliki sifat protektif terhadap *tight junction* sel epitel usus dan melindungi usus terhadap induksi *Dextran Sodium Sulphate* (DSS). Sedangkan IL-17f mempunyai peran penting dalam tingkat keparahan kolitis ulseratif (Tang *et al.*, 2018). Pengobatan konvensional kasus kolitis saat ini masih memberikan efek samping apabila dikonsumsi dalam dosis tinggi berupa infeksi oportunistik, diabetes mellitus, hipertensi, efek okuler (glaukoma dan katarak), komplikasi psikiatri, supresi aksis hipotalamus-hipofisis-adrenal dan peningkatan risiko osteoporosis (Curkovic *et al.*, 2013). Sedangkan efek samping paska operasi yang dapat terjadi adalah infeksi, ileus, fistula, obstruksi usus kecil, kebocoran anastomosis, abses pelvis dan dapat berujung kematian (Peyrin-Biroulet *et al.*, 2016). Selain itu, terdapat terapi alternatif berupa pemberian probiotik. Pada penelitian sebelumnya membuktikan penggunaan terapi probiotik tunggal yaitu *Bifidobacterium*

*infantis* tidak memberikan hasil yang efektif pada tikus model kolitis (Zuo et al., 2014a). Namun sejauh ini penelitian yang menggunakan dua kombinasi probiotik *Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus* pada tikus model kolitis belum dilakukan.

Angka insidensi KU di Asia masih tergolong lebih rendah dibandingkan negara daerah Barat. Akan tetapi beberapa studi epidemiologi melaporkan terdapat negara di Asia yang memiliki angka insidensi tertinggi seperti China, India, Korea, Jepang, dan Hongkong. Sebuah studi berskala besar dari 8 negara Asia (China, Hongkong, Makau, Singapura, Malaysia, Thailand, Sri Lanka, dan Indonesia), menunjukkan negara China memiliki angka insidensi tertinggi yaitu 3,44 per 100.000 orang. Sedangkan negara di Asia Tenggara memiliki angka insidensi yang lebih rendah seperti Malaysia dengan angka 0,59 per 100.000 orang dan Indonesia dengan angka 0,55 per 100.000 orang (Ng et al., 2016).

Kolitis ulseratif dapat disebabkan oleh beberapa penyebab, yaitu faktor genetika, faktor keseimbangan mikrobiota di usus, faktor lingkungan, faktor abnormalitas sistem imun tubuh (Gajendran et al., 2019). Studi tentang kolitis membuktikan bahwa disbiosis mikrobiota usus menjadi faktor utama dalam patogenesis kolitis ulseratif. Bakteri komensal di usus menghasilkan *Short Chain Fatty Acid* (SCFA) yang berfungsi sebagai sumber energi utama sel epitel mukos usus dan menjaga integritas barrier mukosa. Pada keadaan disbiosis mikrobiota usus bakteri patogen meningkat dan menginvasi koloni bakteri komensal usus sehingga produksi SCFA berkurang berakibat

hilangnya integritas barrier mukosa. Peningkatan bakteri patogen juga menyebabkan pelepasan sitokin proinflamasi dalam jumlah banyak dan berakibat meningkatnya permeabilitas mukosa usus karena inflamasi (Sasaki & Klapproth, 2012).

Stimulasi bakteri patogen melepaskan sitokin proinflamasi seperti IL-8, *Tumour Necrosis Factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ), *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1), IL-6, dan IL-23. Interleukin-23 (IL-23) menstimulasi sekresi Th17 dan menginfiltrasi mukosa usus. Pada beberapa kasus kolitis ulseratif menunjukkan adanya peningkatan sekresi IL-17 dimana IL-17 merupakan hasil sekresi dari Th-17. IL-17f memegang peran penting dalam patogenesis KU karena meningkatkan aktivasi STAT3. Aktivasi STAT3 menyebabkan terjadinya inflamasi yang bersifat kronis dan kuat (Lee *et al.*, 2018). Peningkatan IL-17f dapat mempengaruhi tingkat keparahan kolitis ulseratif. Produksi Th-17 dapat ditekan dengan cara mengurangi sitokin proinflamasi dan meningkatkan sitokin anti inflamasi dengan cara pengobatan salah satunya pemberian probiotik (Bassaganya-Riera *et al.*, 2012).

Probiotik terdiri atas satu atau beberapa strain mikroorganisme hidup apabila diberikan dalam jumlah yang tepat kepada manusia atau hewan dapat memberikan manfaat kesehatan dengan cara meningkatkan kapabilitas flora-flora normal yang ada di tubuh (Abraham & Quigley, 2017). Probiotik memiliki efek anti inflamasi dengan cara meningkatkan sistem imun pada mukosa pencernaan melalui *Toll-like receptor* (TLR) dan meningkatkan diferensiasi T-Helper tipe 1. Akibat dari mekanisme tersebut produksi

antibodi akan bertambah, peningkatan fagositosis, peningkatan aktivitas sel natural killer, dan juga aktivasi sel B. Dengan adanya konsekuensi tersebut terjadi peningkatan regulasi sitokin antiinflamasi seperti IL-10, apoptosis *T cell*, dan penekanan sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8, dan lainnya. (Quigley, 2019). Efektivitas terapi probiotik pada kolitis bergantung pada kombinasi, waktu, dan dosis. Penelitian tentang terapi probiotik tanpa kombinasi pada tikus model kolitis berupa pemberian *Bifidobacterium infantis* dosis  $6 \times 10^7$  CFU/hari menunjukkan perbaikan yang kurang signifikan dan tidak ada perubahan pada sitokin (Zuo et al., 2014a). Sedangkan terapi probiotik yang menggunakan 4 strain berbeda berupa *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium longum*, dan *Clostridium butyricum* pada tikus model kolitis dapat menurunkan sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan IL-1 $\beta$  (Wang et al., 2020).

Tikus model kolitis dapat diinduksi dengan cara menginduksi *dextran sodium sulphate* (DSS), asam asetat, indometasin, atau *trinitro benzene sulfonic acid* (TNBS). *Dextran sodium sulphate* (DSS) merupakan polimer polisakarida sulfat. Pemberian DSS secara terus menerus dengan dosis 1-5% yang dilarutkan dalam air dapat menginduksi cedera usus akut yang ditandai dengan respon inflamasi (Mizoguchi, 2012). Hewan yang digunakan pada percobaan ini adalah tikus jantan galur Wistar. Pada penelitian sebelumnya tikus jantan menunjukkan lebih sensitif terhadap induksi, respon inflamasi, dan cedera histologis yang parah karena pengaruh hormon testosteron (Bábíčková et al., 2015).

Berdasarkan uraian di atas, maka peneliti ingin mengetahui lebih lanjut mengenai pengaruh pemberian kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*) terhadap kadar IL-17 pada tikus jantan galur Wistar yang diinduksi DSS.

## 1.2. Rumusan Masalah

Bagaimana pengaruh kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*) terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif?

## 1.3. Tujuan Penelitian

### 1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*) terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif.

### 1.3.2. Tujuan Khusus

1.3.2.1. Mengetahui kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif yang tidak diberi perlakuan.

1.3.2.2. Mengetahui kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif tanpa diberi terapi.

1.3.2.3. Mengetahui kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif dan diberi terapi standar 5-aminosalicylic acid (5-ASA).

- 1.3.2.4. Mengetahui kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif dan diberi terapi kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*).
- 1.3.2.5. Mengetahui perbedaan kadar IL-17 pada masing-masing kelompok.

#### **1.4. Manfaat Penelitian**

##### **1.4.1. Manfaat Teoritis**

Memberikan manfaat mengenai pengaruh kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*) dalam penatalaksanaan kasus kolitis ulseratif.

##### **1.4.2. Manfaat Praktis**

Memberikan informasi pengaruh kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*) terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif dan diharapkan dapat dimanfaatkan untuk penelitian lebih lanjut.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **2.1. Interleukin-17**

##### **2.1.1. Definisi**

Interleukin-17 (IL-17) merupakan sitokin proinflamasi diproduksi oleh subset CD4<sup>+</sup> dan Th17 akibat stimulasi IL-23. Sel tersebut berperan dalam meregulasi sistem imun adaptif dan non adaptif. Terdapat 6 tipe IL-17 yaitu IL-17 sampai IL-17F. Interleukin-17 (IL-17) yang aktif secara biologis akan berikatan dengan reseptor tipe 1 di permukaan sel yaitu IL-17R, terdapat 3 tipe dari IL-17R yaitu IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC. Setelah berikatan dengan reseptor tersebut IL-17 akan mengaktifasi kaskade sinyal inflamasi, yang kemudian mengarah induksi kemokin. IL-17 bertindak sebagai chemoattractant karena mengundang sel – sel imun seperti monosit dan neutrofil ke tempat terjadinya inflamasi. IL-17 bersamaan dengan TNF dan interleukin-1 dapat menginduksi terjadinya inflamasi (Hohenberger *et al.*, 2018).

##### **2.1.2. Karakteristik**

Interleukin-17 dikenal karena kemampuannya dalam menginisiasi respon inflamasi yang kuat meliputi induksi faktor granulopoiesis dan kemokin neutrofil spesifik (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8). Target interleukin-17 (IL-17) meliputi sel epitel,

endotel, dan sel stroma lainnya seperti fibroblas, osteoblas, kondrosit, dan sel sinovial. Menariknya, IL-17 tidak dapat meningkatkan respon inflamasi yang kuat dengan sendirinya. Dalam proses inflamasi IL-17 bekerjasama atau bersinergi dengan mediator inflamasi lainnya. IL-17 dapat menyebabkan kaskade inflamasi yang kuat dengan meningkatkan regulasi ekspresi gen target dalam jumlah besar misalnya IL-17 bersama dengan TNF menginduksi perekrutan neutrofil yang berkelanjutan selama peradangan. Produksi IL-17 bergantung pada aktivitas sitokin tertentu lainnya, seperti IL-1 $\beta$  dan IL-23. Pada penelitian sebelumnya membuktikan bahwa IL-1 $\beta$  bersinergi dengan IL-23 untuk menginduksi produksi IL-17 (Zenobia & Hajishengallis, 2015).

IL-17 dan IL-17f memiliki letak yang berdekatan baik pada manusia maupun tikus. IL-17 dan IL-17f memiliki struktur yang homolog dengan identitas asam amino 50% membentuk heterodimer dan berikatan di reseptor yang sama (Tang et al., 2018).

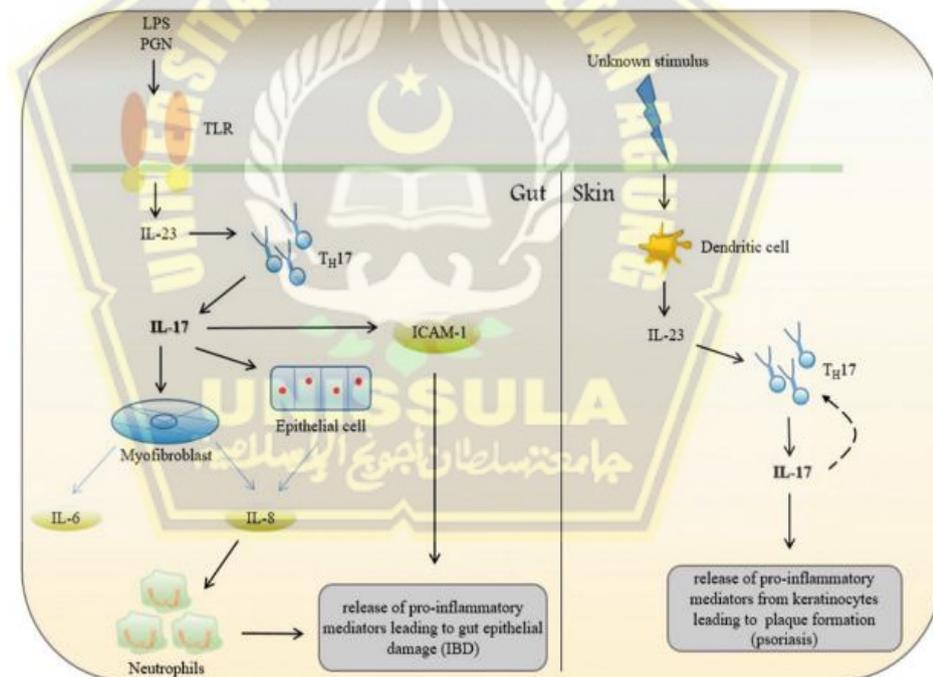
### **2.1.3. Patomekanisme Interleukin-17 pada Kolitis Ulseratif**

Di dalam sistem kekebalan tubuh manusia terdapat 2 jenis yaitu sistem imun non spesifik dan adaptif. Sistem pertahanan imun non spesifik salah satunya adalah mukosa. Mukosa berfungsi sebagai barrier utama yang berhubungan langsung dengan berbagai antigen asing. *Mucosal Associated Lymphoid Tissue* (MALT) merupakan sistem imun mukosa yang bekerja melindungi dari invasi dan

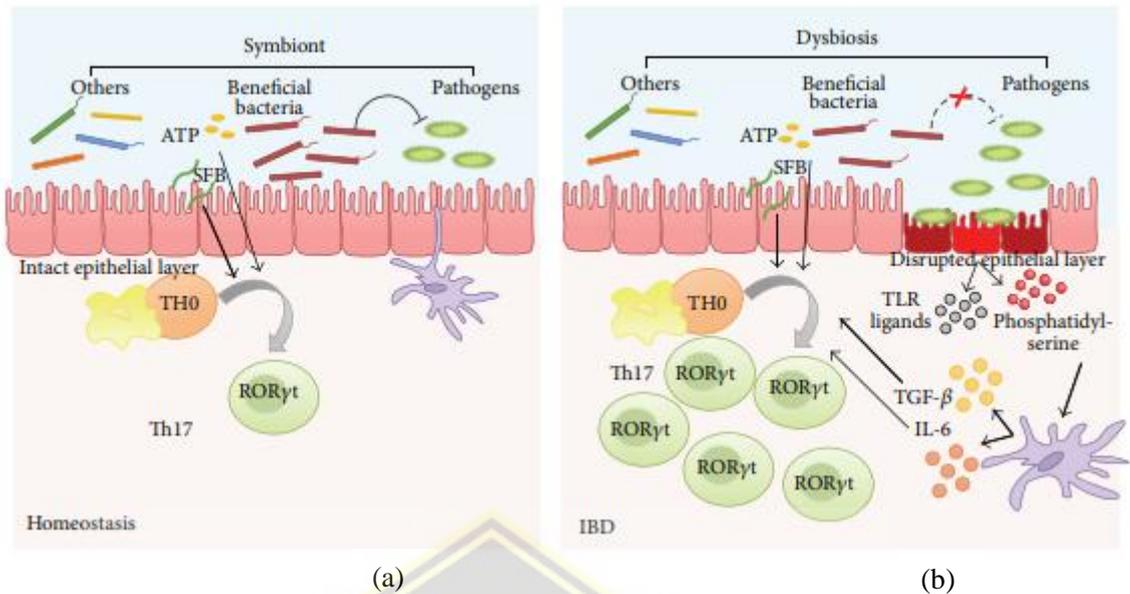
kolonisasi mikroba patogen yang berusaha masuk. Sistem pertahanan mukosa juga terdapat di dalam traktus gastrointestinal yaitu GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*). Di dalam GALT terdapat sel-sel imun yaitu sel dendritik, makrofag, sel B, dan sel T. Mikroba patogen yang masuk akan langsung ditangkap oleh makrofag kemudian antigen mikroba tersebut dibawa oleh MHC II dan diberikan kepada limfosit T *helper* CD4<sup>+</sup>. Selain sistem imun juga terdapat sistem imun adaptif yang sifatnya spesifik terhadap patogen dan biasanya sistem imun adaptif bekerja saat sistem imun non spesifik tidak dapat mengatasi invasi patogen (Abbas *et al.*, 2019).

Pada kasus kolitis ulseratif terdapat respon imun yang berlebihan dan tidak terkontrol terhadap mikrobiota normal, melalui aktivasi sel Th CD4<sup>+</sup>. Selain itu, disbiosis mikrobiota pada organ pencernaan juga memegang peran penting dalam patogenesis kolitis ulseratif. Dalam keadaan disbiosis koloni bakteri patogen lebih banyak dibandingkan koloni bakteri normal dalam usus (Gálvez, 2014). Lipopolisakarida dan peptidoglikan pada bakteri patogen berikatan dengan *Toll-like receptor* pada *Antigen Presenting Cell* (APC) di mukosa usus. Setelah berikatan TLR akan terjadi peningkatan pelepasan IL-23 yang kemudian menginduksi Th-17 untuk mensekresikan IL-17. Pelepasan IL-17 akan menstimulasi sekresi IL-6, IL-8, dan aktivasi *Signal Transducers and Activators of Transcription 3* (STAT3) dari sel epitel, miofibroblas, dan diikuti

dengan peningkatan regulasi regulasi *Intercellular Adhesion Molecul-1* (ICAM-1) di sel endotelial usus. IL-8 merupakan faktor kemotaktif atau sitokin yang bersifat *chemoattractant* dimana akan menarik neutrofil dan sitokin proinflamasi lainnya yang kemudian menyebabkan inflamasi yang bersifat kronis pada usus dan menimbulkan kerusakan epitel usus (Hohenberger *et al.*, 2018). STAT3 berperan penting dalam patogenesis IBD dikarenakan STAT3 berikatan dengan sistem imun non spesifik maupun adaptif dan meningkatkan kelangsungan hidup sel T patogen (Lee *et al.*, 2018).



**Gambar 2.1.** Peran IL-17 dalam Patogenesis IBD (Hohenberger *et al.*, 2018)



**Gambar 2.2.** Disbiosis dalam kasus IBD  
(Gálvez, 2014)

Pada gambar (a) menunjukkan pada usus orang normal terdapat keseimbangan populasi dan keberagaman mikroba. Sistem kekebalan usus sering terpapar berbagai macam antigen yang berasal dari makanan, minuman, dan antigen lainnya. Sistem imun usus dalam tubuh harus dapat membedakan antara antigen yang invasif dengan yang tidak berbahaya. Homeostasis usus bergantung hubungan yang dinamis antara mikrobiota, sel epitel usus, dan sel-sel imun yang terdapat dalam usus. Sedangkan gambar (b) menunjukkan rusaknya homeostasis di dalam usus yang memicu timbulnya penyakit inflamasi kronis. Selama proses peradangan awal antigen asing mengaktifkan sistem imun bawaan yang berada di usus, termasuk sel *Natural Killer* (sel NK), sel dendritik, sel mast, neutrofil, dan

makrofag. Reaksi inflamasi yang berkepanjangan mengaktivasi respon imun adaptif. Sel CD4<sup>+</sup> Th efektor yang diaktifkan secara abnormal mensintesis dan melepaskan mediator inflamasi yang mengakibatkan kerusakan epitel dan jaringan yang bersifat kronis (Gálvez, 2014).

## 2.2. Probiotik

Probiotik adalah produk yang mengandung mikroorganisme hidup dan apabila dikonsumsi dalam jumlah yang cukup akan memberikan efek kesehatan yang menguntungkan bagi host (Cremon *et al.*, 2018). Probiotik bermanfaat untuk melawan bakteri patogen dengan cara berkompetisi dengan koloni. Probiotik memiliki peran penting dalam homeostasis kehidupan mikrobiota usus termasuk bakteri patogen dengan bakteri komensal. Secara umum mekanisme kerja probiotik yaitu memproduksi zat antimikroba, berkompetisi dengan bakteri patogen sehingga mencegah terjadinya adhesi ke epitel, menghambat toxin bakteri patogen, dan menghambat pertumbuhan bakteri asing yang bersifat patogen (Sanders *et al.*, 2018). Selain itu probiotik dapat meningkatkan imunitas mukosa dengan berikatan *Toll-Like receptor* untuk mendorong diferensiasi Th1. Akibatnya produksi antibodi meningkat seperti makrofag, sel NK, dan persinyalan *Nuclear Factor-kappa B* (NF- $\kappa$ B) dihambat. Hal ini mengakibatkan terinduksinya apoptosis sel T, peningkatan regulasi sitokin anti inflamasi seperti IL-10, peningkatan *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), dan

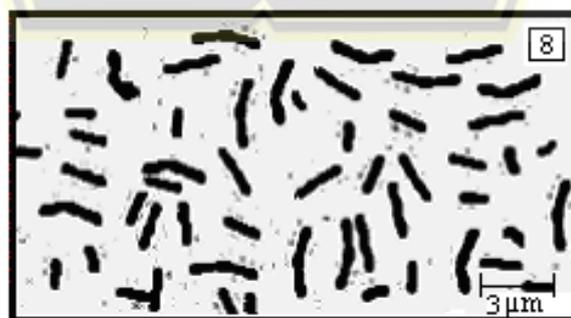
penurunan regulasi sitokin proinflamasi seperti TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , dan IL-8 (Quigley, 2019).

### 2.2.1. *Bifidobacterium Infantis*

*Bifidobacterium infantis* adalah bakteri asam laktat yang bersifat anaerob, non motil, dan bakteri ini merupakan bakteri gram positif. Bakteri ini memiliki bentuk basil atau batang, koloni berwarna putih mengkilat dan berbentuk konveks (Hoover, 2014).

Berikut klasifikasi dari *Bifidobacterium infantis*.

Kingdom : *Bacteria*  
 Filum : *Actinobacteria*  
 Kelas : *Actinobacteria*  
 Subkelas : *Actinobacteridae*  
 Ordo : *Bifidobacteriales*  
 Famili : *Bifidobacteriaceae*  
 Genus : *Bifidobacterium*  
 Spesies : *Bifidobacterium longum*  
 Subspesies : *Bifidobacterium infantis*



**Gambar 2.3.** *Bifidobacterium infantis*  
(Shigwedha, 2013)

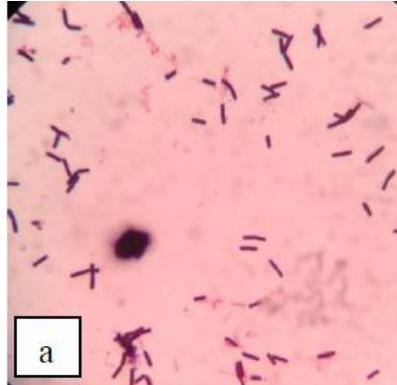
Pada penelitian yang telah dilakukan bakteri *Bifidobacterium Infantis* dapat memberikan efek positif dalam menurunkan derajat keparahan kolitis. Mekanisme bakteri ini bekerja dengan cara meregulasi respon sel T. Bakteri *Bifidobacterium sp.* dapat menekan respon Th1 dan Th17. Bakteri ini juga menstimulasi produksi Foxp3<sup>+</sup> yang berfungsi untuk immunoregulator, menekan respon sel Th dan memproduksi sitokin anti inflamasi seperti IL-10 dan TGF- $\beta$  (Zuo et al., 2014a).

### 2.2.2. *Lactobacillus Acidophilus*

*Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri anaerob fakultatif, non motil, tidak berspora, dan merupakan bakteri gram positif. *Lactobacillus acidophilus* tergolong spesies *homofermentative*, memiliki sifat mikroaerofilik, tumbuh di keadaan pH rendah (pH<5) dan dapat memfermentasikan gula menjadi asam laktat. Bakteri ini memiliki bentuk basil atau batang, koloni berwarna putih susu bercampur krem dan memiliki bentuk bulat (Anjum *et al.*, 2014). Berikut klasifikasi dari *Lactobacillus acidophilus*.

Kingdom : *Bacteria*  
 Filum : *Firmicutes*  
 Kelas : *Bacilli*  
 Ordo : *Lactobacillales*  
 Famili : *Lactobacillaceae*  
 Genus : *Lactobacillus*

Spesies : *Lactobacillus acidophilus*



**Gambar 2.4.** *Lactobacillus acidophilus*  
(Putri *et al.*, 2018)

Menurut penelitian yang pernah dilakukan, bakteri *Lactobacillus Acidophilus* mampu menekan diferensiasi Th17 dan menekan produksi TNF $\alpha$  pada tikus yang diinduksi DSS. Selain penekanan terhadap Th17 bakteri ini juga dapat menurunkan regulasi IL-23 dan ekspresi TGF $\beta$ 1 dimana sitokin proinflamasi ini mempengaruhi stimulasi diferensiasi dari Th17 dalam patogenesis kolitis ulseratif. *Lactobacillus Acidophilus* juga menghambat ekspresi STAT3 dalam patogenesis kolitis. STAT3 merupakan golongan protein STAT yang merespon sitokin dan faktor pertumbuhan. STAT3 memegang peranan penting dalam memediasi pembentukan Th17 sebagai respon terhadap IL-23 dan TGF $\beta$ 1 (Chen *et al.*, 2015).

### 2.2.3. Pengaruh Probiotik terhadap Kolitis Ulseratif

Sifat immunomodulator dari probiotik dapat digunakan sebagai pengobatan alternatif pada kasus kolitis ulseratif. Penelitian (Wang *et al.*, 2020) menggunakan 4 strain bakteri yang berbeda yaitu *Lactobacillus reuteri*, *Bacillus coagulans*, *Bifidobacterium longum*, dan *Clostridium butyricum* menunjukkan hasil adanya perbaikan keseimbangan sistem imun dan mukosa usus pada hewan model kolitis yang diinduksi DSS. Kombinasi probiotik tersebut dapat meningkatkan regulasi IL-10 dimana sitokin tersebut merupakan sitokin antiinflamasi, meningkatkan produksi *mucin-2* (MUC-2), *claudin-1*, *occludin* yang berfungsi sebagai homeostasis pertahanan sistem pencernaan, menurunkan produksi sitokin proinflamasi seperti IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, dan meningkatkan produksi TGF- $\beta$  (Wang *et al.*, 2020).

### 2.2.4. Penentuan Efektivitas Probiotik

Pemberian probiotik dengan kombinasi, dosis, dan waktu yang tepat dapat memiliki manfaat bagi kesehatan tubuh. Berdasarkan hasil penelitian sebelumnya pemberian *Bifidobacterium infantis* memberikan efek yang cukup baik yaitu mengurangi gejala yang ditimbulkan oleh kolitis yang diinduksi 2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS). Tikus model kolitis yang diinduksi TNBS diberikan probiotik dengan dosis  $1 \times 10^9$  CFU dimana terdapat 0.205

g bakteri *Bifidobacterium infantis* dalam sediaan bubuk kemudian dilarutkan dalam 1 mL air. Pada kelompok tikus kolitis yang diberikan probiotik berupa *Bifidobacterium sp.* terdapat hasil yang cukup baik berupa pengurangan gejala, kerusakan yang minimal pada mukosa, dan melindungi sel epitel dan sel goblet. Manfaat probiotik juga dipengaruhi oleh lamanya pemberian. Efektivitas lamanya pemberian probiotik berkisar 7-10 hari (Javed *et al.*, 2016).

Beberapa penelitian juga menunjukkan bahwa pemberian kombinasi probiotik dengan strain yang berbeda dapat memberikan efek yang positif. (Jakubczyk *et al.*, 2020). Pada penelitian (Biagioli *et al.*, 2017) dilakukan percobaan 2 campuran dengan strain yang berbeda untuk mengetahui efektivitas kombinasi probiotik. Kombinasi pertama diberikan *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus debrueckii subsp. Bulgaricus*. Sedangkan kombinasi kedua berisi *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium. breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei*, and *Lactobacillus debrueckii subsp. bulgaricus*. Kombinasi pertama memberikan efek yang menguntungkan sedangkan kombinasi kedua menyebabkan inflamasi menjadi bertambah parah dinilai dari skoring gejala klinis, luas lesi,

dan permeabilitas usus yang memburuk. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa efek probiotik bergantung pada metabolisemenya dan masing-masing probiotik memiliki efek yang berbeda (Jakubczyk *et al.*, 2020).

## **2.3. Kolitis Ulseratif**

### **2.3.1. Definisi**

Kolitis ulseratif adalah penyakit inflamasi pada colon yang bersifat kronis dan idiopatik. Kolitis ulseratif bersifat kontinyu mulai dari rektum sampai ke proksimal dari colon. Pada pemeriksaan histopatologi ditemukan adanya gambaran pengurangan densitas kelenjar lieberkuhn, distorsi kelenjar lieberkuhn, permukaan irreguler pada mukosa colon dan inflamasi transmukosal yang bersifat difus tanpa adanya granuloma. (Moein *et al.*, 2019).

### **2.3.2. Klasifikasi**

Menilai derajat keparahan kolitis ulseratif secara obyektif sangat penting untuk menentukan pengobatan dan memprediksi hasil jangka panjang pasien. Ada 10 sistem penilaian dalam menentukan derajat atau aktivitas penyakit kolitis ini, mulai dari sistem pengembangan pertama yang dilakukan Baron *et al.* Akan tetapi hanya ada beberapa sistem penilaian yang paling umum digunakan yaitu klasifikasi Montreal, sistem skoring Mayo, dan pengklasifikasian Internasional menurut *American College of*

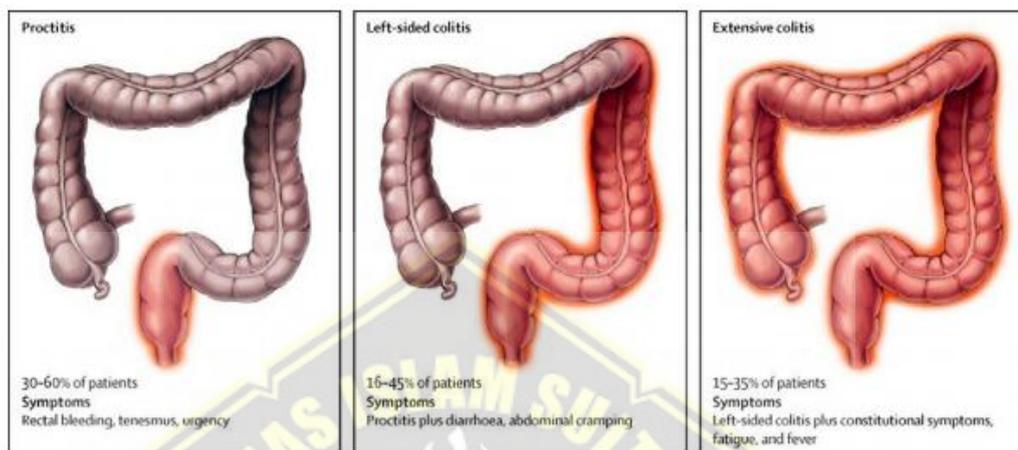
*Gastroenterology* (ACG), *European Crohn's and Colitis Organization* (ECCO) dan *Japanese Society of Gastroenterology* (Gajendran *et al.*, 2019).

#### 2.3.2.1. Klasifikasi Montreal

Montreal mengklasifikasikan tingkat keparahan kolitis berdasarkan luasnya lesi dan membagi menjadi 3 subkelompok. Kelemahan utama klasifikasi Montreal berkaitan dengan perubahan yang bersifat dinamis dalam perjalanan penyakit kolitis dan keparahan penyakit selama periode waktu tertentu. Berikut klasifikasi kolitis ulseratif menurut Montreal berdasarkan penyebaran luas lesi:

1. E1 (*Ulcerative Proctitis*): luas lesi dari inflamasi hanya terbatas di rektum. Terdapat 30 – 60% kasus yang ditemukan pada derajat E1. Gejala yang timbul pada derajat ini adalah diare berdarah, tenesmus, inkontinensia urgensi.
2. E2 (*Left-sided*): Luas penyebaran inflamasi mulai dari distal colo-rectum sampai ke flexura coli sinistra. Terdapat 16 – 45 % kasus yang ditemukan pada derajat E2. Gejala pada derajat ini adalah diare disertai proctitis, dan kram perut.
3. E3 (*Extensive/Pancolitis*): Pada derajat ini inflamasi meluas mulai dari rectum sampai ke proximal flexura

coli dextra atau seluruh colon. Terdapat 15 – 35 % kasus yang ditemukan pada derajat ini. Gejala yang dialami pada derajat ini adalah proctitis disertai diare dan gejala konstitusional, demam, dan juga kelelahan.



**Gambar 2.5.** Klasifikasi kolitis ulseratif menurut Montreal

#### 2.3.2.2. Klasifikasi Mayo

Sistem penilaian Mayo adalah indeks yang umum digunakan untuk menilai derajat keparahan penyakit kolitis dan digunakan untuk memantau pasien selama terapi. Sistem penilaian ini menggunakan manifestasi klinis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan endoskopi. Skoring dimulai dari 0 hingga 12, semakin tinggi skor menunjukkan bahwa pasien memiliki penyakit yang lebih parah. Berikut skoring penilaian Mayo:

**Tabel 2.1. Klasifikasi Mayo**

Mayo Index	0	1	2	3
Frekuensi defekasi	Normal	1 – 2 kali per hari	3 – 4 kali per hari	5 kali per hari atau lebih
Perdarahan Rectum	Tidak ada	Bercak darah	Ditemukan darah pada feses	Hanya darah
Mukosa	Normal	Kerapuhan ringan	Kerapuhan sedang disertai erosi	Ulserasi disertai perdarahan spontan
Interpretasi	Normal	Ringan	Sedang	Berat

### 2.3.2.3. Klasifikasi derajat keparahan Internasional

Menurut *American College of Gastroenterology* (ACG), *European Crohn's and Colitis Organization* (ECCO) dan *Japanese Society of Gastroenterology* membagi tingkat keparahan menjadi ringan, sedang, dan berat berdasarkan kriteria *Truelove-Witts*. Berikut pembagian tingkat keparahan kolitis secara umum:

1. Ringan (*Mild*): Defekasi kurang dari 4 kali sehari, feses dapat disertai darah atau tidak, tidak ada tanda toksisitas sistemik, laju endap darah masih dalam batas normal, nyeri abdomen ringan, tenesmus dan jarang terjadi konstipasi.
2. Sedang (*Moderate*): Defekasi 4 kali atau lebih dalam sehari, feses disertai darah, nyeri abdomen, demam subfebris, anemia ringan, dan tidak ada tanda penurunan berat badan.

3. Berat (*Severe*): Defekasi disertai darah lebih dari 6 kali per hari, nyeri abdomen berat, demam ( $\geq 37,5^{\circ}\text{C}$ ), takikardia, anemia, peningkatan laju endap darah, dan disertai penurunan berat badan yang signifikan.

### 2.3.3. Etiopatogenesis

#### 2.3.3.1. Faktor genetik

Etiologi dari kolitis ulseratif belum dapat diketahui pasti namun beberapa penelitian menunjukkan bahwa ada keterkaitan antara faktor genetik, respon sel imun, dan mikrobiota di dalam usus. Penelitian *Genetic Factors Association Studies* (GWAS) menunjukkan bahwa faktor genetika berperan penting dalam patogenesis dari KU. Faktor genetik dapat mempengaruhi homeostasis usus, seperti fungsi barrier epitel usus, pertahanan pertama pada mukosa usus, regulasi sistem imun, migrasi sel, autofagi, imun adaptif, dan homeostasis sistem metabolisme tubuh. *Nucleotide-binding oligomerization domain 2* (NOD2) merupakan gen yang pertama kali ditemukan dalam kasus penyakit crohn dimana gen ini seringkali ditemukan bermutasi dan berkaitan dengan patogenesis terjadinya IBD. Namun NOD2 juga ditemukan berperan pada kasus kolitis ulseratif. NOD termasuk dalam golongan sitosolik *NOD-like receptor* berdasarkan pemicu dan jalur

persinyalan yang mereka kendalikan sebagai pendeteksi invasi mikroba. NOD2 berperan sebagai intraseluler sensor komponen bakteri dikarenakan NOD2 dapat mengenali fragmen kecil bioaktif di dinding sel bakteri gram positif atau negatif, fragmen bioaktif ini disebut sebagai *muramyl dipeptide* (MDP). NOD2 juga mempengaruhi inisiasi autofagi dimana autofagi merupakan proses daur ulang yang melibatkan degradasi dari sitosol dan organel, serta melindungi atau memberi pertahanan terhadap infeksi. NOD2 berikatan dengan ATG16L1 dan bertindak sebagai rangka molekuler untuk nukleasi oleh sistem autofagi. ATG16L1 sangat penting untuk semua bentuk autofagi. Akan tetapi poliformisme ATG16L1 juga terkait dengan penyakit Crohn seperti NOD2. Pada pasien pengidap penyakit Crohn substitusi T300A yang ada di ATG16L1 yang bersifat homozigot, mereka mempunyai persinyalan TLR dan fungsi sel paneth yang abnormal. Penghapusan selektif ATG16L1 dalam sel T yang dilakukan pada tikus menghasilkan peradangan usus spontan yang ditandai dengan respon Th2 yang abnormal terhadap antigen makanan, mikrobiota dan menurunkan sel TReg Foxp<sup>3+</sup>. Sel T yang terganggu menyebabkan gangguan pertahanan mukosa usus berupa intoleransi

terhadap antigen usus dan mensekresikan IgA, IgG untuk melawan bakteri komensal usus.(Guan, 2019).

#### 2.3.3.2. Faktor mikrobiota usus

Mikrobiota usus juga merupakan faktor utama dalam patogenesis terjadinya kolitis. Inflamasi pada usus dapat muncul dikarenakan respon imun host yang abnormal terhadap mikrobiota usus. Mikrobiota di dalam traktus gastrointestinal manusia sudah berkoloni sejak manusia lahir. Mikrobiota sistem pencernaan manusia memiliki 1000-5000 spesies yang berbeda dan didominasi oleh *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, dan *Actinobacteria*. Homeostasis mikrobiota usus dapat dipengaruhi oleh pola makan, probiotik, prebiotik, antibiotik, enzim eksogen, dan faktor lingkungan luar lainnya. Mikrobiota usus berperan penting dalam keseimbangan atau homeostasis fungsi sistem pencernaan. Keberadaan mikrobiota usus dapat memberikan keuntungan untuk metabolisme host dan perkembangan sistem pencernaan tetapi dapat juga menimbulkan penyakit pencernaan apabila host mempunyai intoleran terhadap mikrobiota usus. Mikroorganisme komensal dapat melindungi infeksi bakteri pencernaan yang bersifat patogen melalui resistensi kolonisasi dengan cara

berkompetisi, dan mensintesis faktor faktor yang mendukung seperti *transforming growth factor* (TGF)  $\beta$ -rich environment oleh spesies *Clostridium* asli yang ada di usus. Bakteri ini meningkatkan jumlah sel T (TReg), fungsi colon dan resistensi terhadap kolitis yang di induksi DSS. Penelitian yang pernah dilakukan pada hewan menunjukkan mikrobiota usus memegang peran sebagai proinflamasi dan antiinflamasi dalam patogenesis inflamasi pada usus. Penelitian pada manusia juga pernah dilakukan menunjukkan mikrobiota usus kemungkinan kecil memicu timbulnya IBD. Akan tetapi, keberadaan *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* dan *Escherichia coli* meningkat pada pasien penyakit Crohn. Peningkatan jumlah bakteri pada mukosa usus dan penurunan bakteri komensal antiinflamasi *Faecalibacterium prausnitzii* juga ditemukan pada pasien penyakit crohn. (Guan, 2019)

#### 2.3.3.3. Faktor Lingkungan

Faktor lingkungan dalam patogenesis IBD didukung oleh studi terbaru tentang epidemiologi IBD. Frekuensi penyakit crohn telah meningkat secara signifikan di negara-negara yang lebih maju selama 50 tahun terakhir, dan semakin dikenalnya penyakit yang berhubungan dengan industrialisasi progresif. Asupan makanan merupakan

faktor lingkungan yang penting dalam perkembangan penyakit IBD. Makanan cepat saji yang mengandung banyak lemak dan banyak mengandung gula dapat memperburuk terjadinya penyakit crohn. Studi lain menunjukkan bahwa asam lemak rantai menengah lebih efektif dalam mempercepat terjadinya inflamasi usus dibandingkan asam lemak berantai panjang. Merokok juga memperburuk terjadinya penyakit crohn, merokok telah terbukti mempengaruhi respon imun seluler atau humoral dan meningkatkan produksi mukus di usus. Kandungan nikotin dalam rokok memiliki efek menghambat fungsi dari sel Th2 tetapi tidak memiliki efek menghambat sel Th1. Bukti ilmiah dari beberapa penelitian juga mengatakan bahwa merokok juga menginisiasi proses autofagi, dimana proses autofagi merupakan bagian patogenesis dari IBD. Ada beberapa faktor lingkungan lain yang menyebabkan resiko terjadinya IBD yaitu stress psikis, post operasi *appendectomy*, diet, dan pengobatan. Salah satu studi menunjukkan bahwa diet tinggi protein hewani dapat meningkatkan respon makrofag proinflamasi dan menimbulkan murine kolitis (Guan, 2019).

#### 2.3.3.4. Faktor Abnormalitas Sistem Imun

Disregulasi sistem imun pada IBD memiliki karakteristik kerusakan epitel usus (abnormalitas produksi mukus, perbaikan yang buruk), perluasan inflamasi yang di perantarai oleh mikrobiota usus dan invasi sel T, sel B, makrofag, sel dendritik, neutrofil dalam jumlah besar di lamina propria dan kegagalan regulasi sistem imun untuk mengontrol respon inflamasi. Sel lamina propria yang terkena menghasilkan sitokin proinflamasi dalam jumlah yang besar di jaringan lokal yaitu TNF, IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , dari jalur sitokin IL-23/Th17. Sistem imun dibagi menjadi 2 yaitu sistem imun bawaan dan adaptif. Sistem imun innate terdiri atas barier mukosa usus, protein antibakteri (komplemen, defensin dan lainnya), kadar pH yang asam, sel imun non spesifik (neutrofil, makrofag, sel dendritik, dan sel NK) dan sitokin non spesifik (IL-1, TNF dan defensin). Sistem imun adaptif bersifat spesifik terhadap patogen dan biasanya dimulai dalam keadaan respon imun innate tidak dapat mengatasi stimulasi patogen. Setelah terpapar patogen itu tubuh membutuhkan beberapa hari untuk menghasilkan sistem imun adaptif yaitu sel T dan sel B. Inisiasi respon imun terhadap flora usus diatur ketat dan regulasi ini menentukan terjadinya toleransi imun atau

respon inflamasi defensif. Gangguan keseimbangan sistem imun ini dapat menyebabkan resiko terjadinya IBD (Guan, 2019)

#### 2.3.4. Diagnosis

Diagnosis kolitis ulseratif dapat ditegakkan dengan menggabungkan antara manifestasi klinis, temuan endoskopi, pemeriksaan penunjang lainnya seperti imaging, pemeriksaan feses, sigmoidoskopi, kolonoskopi, dan biopsi. Selain untuk mengkonfirmasi dan mendiagnosis, penting juga untuk menentukan derajat keparahan dan pemilihan terapi yang tepat dan memprediksi prognosis pasien kolitis ulseratif (Gajendran *et al.*, 2019).

##### 2.3.4.1. Pemeriksaan Laboratorium

Pemeriksaan laboratorium sangat membantu dalam memantau dan menilai aktivitas penyakit seperti pemeriksaan hitung darah lengkap, pemeriksaan laktoferin feses, pemeriksaan *C-reactive protein* (CRP), dan laju endap darah (LED). Pemeriksaan *calprotectin* pada feses juga dapat membantu untuk menentukan tingkat keparahan penyakit dan kekambuhan penyakit. Diagnosis karena infeksi harus disingkirkan pada pemeriksaan feses seperti pemeriksaan toxin dan GDH *Clostridium difficile*, kultur tinja rutin (*Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*, *Yersinia*) dan pemeriksaan khusus *Escherichia coli* O157:H7 untuk

menyingkirkan diagnosis diare akibat infeksi bakteri. Selain itu pemeriksaan kadar serum albumin, zat besi, dan vitamin B12 juga dapat digunakan untuk memantau dan menilai status gizi pada penderita kolitis ulseratif agar tidak terjadi defisiensi nutrisi (Gajendran *et al.*, 2019).

#### 2.3.4.2. Serologi

Terdapat 2 antibodi yang paling sering di ukur yaitu *perinuclear anti-neutrophil cytoplasmic antibodies* (p-ANCA) dan *anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies* (ASCA). Antibodi tersebut digunakan untuk membedakan penyakit crohn atau kolitis ulseratif dengan pola ASCA+/p-ANCA- pada pasien penyakit crohn sedangkan pasien kolitis ulseratif menunjukkan hasil ASCA-/p-ANCA+ (Gajendran *et al.*, 2019).

#### 2.3.4.3. Endoskopi

Illeokolonoskopi dengan biopsi menjadi pilihan utama dalam mendiagnosis kolitis ulseratif. Pemeriksaan ini juga termasuk gold-standard untuk memantau respon penyakit terhadap pengobatan. Temuan patognomonik pada kasus kolitis ulseratif ditandai dengan adanya lesi inflamasi pada mukosa kolon yang bersifat kontinyu disertai eritema, pola pembuluh darah yang abnormal, bergranul, mudah rapuh, erosi, ulserasi, dan perdarahan. Lebih dari 75 % pasien

kolitis ulseratif derajat E2 menunjukkan adanya area peradangan yang terisolasi disekitar orificium appendix, dan dikenal sebagai *peri-appendiceal red patch* (PARP). Untuk memastikan diagnosis dari kolitis ulseratif setidaknya harus ada dua biopsi diambil dari 6 area berbeda (terminal ileum, colon ascendens, colon transversum, colon descendens, colon sigmoid, dan rektum) termasuk mukosa yang tampak normal. Temuan histopatologi yang menonjol pada kolitis ulseratif meliputi distorsi crypt, pemendekan crypt, abses, infiltrat seluler dengan sel plasma (*basal plasmocytosis*), peningkatan limfosit di lamina propria, depleksi musin dan metaplasia sel paneth (Gajendran *et al.*, 2019).

#### 2.3.4.4. Radiologi

Pemeriksaan radiologi memiliki kegunaan yang terbatas dalam mendiagnosis kolitis ulseratif namun pencitraan berfungsi menyingkirkan komplikasi – komplikasi yang dapat terjadi. Pemeriksaan radiologi yang sering digunakan adalah pemeriksaan kontras dengan barium enema. Pada pemeriksaan barium enema akan menunjukkan hasil granulasi mukosa yang menebal kemudian timbul ulserasi seiring dengan berjalannya penyakit. Pencitraan yang lainnya dapat menggunakan foto

polos abdomen digunakan untuk mengetahui kondisi megacolon atau perforasi pada usus. Pemeriksaan radiologi yang lainnya menggunakan CT-scan dan MRI. Pada pemeriksaan CT scan dan MRI kasus kolitis ulseratif menunjukkan adanya penebalan mural atau penebalan dinding kolon rata – rata 8mm (Harbord *et al.*, 2017).

### 2.3.5. Tatalaksana

Pengobatan kolitis ulseratif ditentukan menurut tingkat keparahan, luas lesi (*proctitis*, *left-sided*, *extensive*) dan pola penyakit. Terapi farmakologi lini utama yang digunakan pada kasus kolitis ulseratif adalah *5-aminosalicylic acid* (5-ASA). *Mesalazine* merupakan obat golongan 5-ASA yang sering digunakan sebagai obat pilihan utama dalam kasus *proctitis* dengan bentuk sediaan obat tablet (Williams *et al.*, 2011). Alternatif bentuk sediaan lain dari *mesalazine* adalah enema dan suppositoria namun suppositoria terbukti lebih efektif dalam pengobatan kolitis tipe *proctitis*. *Mesalazine* topikal lebih poten dibandingkan steroid topikal akan tetapi *mesalazine* topikal juga dapat dikombinasikan dengan steroid topikal atau *mesalazine* oral agar lebih efektif dalam pengobatan. Pada kolitis ulseratif tipe *left-sided* diberikan pengobatan berupa *aminosalicylate* enema dengan dosis  $\geq 1$  g/hari dan dikombinasi dengan mesalamine oral dengan dosis  $\geq 2,4$  g/hari. Pada kasus kolitis ulseratif tipe *extensive* dapat menggunakan kombinasi

*aminosalicylate* enema dosis  $\geq 1$  g/hari dengan mesalamine oral dosis  $\geq 2,4$  g/hari. Kortikosteroid sistemik dapat menjadi pilihan dalam terapi kasus kolitis ulseratif derajat berat atau derajat ringan namun resisten terhadap pengobatan mesalamine. Kolitis dengan derajat yang berat berindikasi untuk dirujuk dan dirawat secara intensif di rumah sakit. Alternatif pengobatan kolitis ulseratif derajat berat dapat menggunakan terapi ciclosporin intravena apabila pasien menunjukkan reaksi berat terhadap steroid. Pasien kolitis wajib diberikan cairan elektrolit yang adekuat melalui intravena dan heparin dengan berat molekul rendah sebagai tromboprolifaksis. Anemia dan abnormalitas elektrolit harus diperbaiki dan dipantau selama perawatan. Pasien dengan ketergantungan steroid dapat diberikan kombinasi antara thiopurine dengan anti-TNF. Obat anti-TNF yang sering digunakan adalah infliximab, vedolizumab, atau methotrexate. Apabila pengobatan tersebut gagal dapat menggunakan alternatif pengobatan lini kedua yaitu pemberian vedolizumab atau *colectomy* jika diperlukan (Harbord *et al.*, 2017).

Pengobatan lainnya pada kasus kolitis ulseratif adalah terapi pembedahan. Teknik pembedahan yang umum digunakan pada kasus kolitis ulseratif adalah restorative proctocolectomy dengan ileal pouch-anal anastomosis (IPAA). Beberapa penelitian membuktikan adanya perbaikan kualitas hidup pasien kolitis dengan terapi pembedahan IPAA. Indikasi dalam terapi pembedahan meliputi

terjadinya perforasi, perdarahan hebat, kegagalan terapi farmakologi akibat derajat yang sudah sangat parah, dan toxic megacolon. Kualitas buang air besar harus dinilai sebelum dilakukannya terapi pembedahan IPAA. Pada pasien wanita dengan riwayat persalinan pervaginam yang banyak dan riwayat episiotomi dengan laserasi beresiko mengalami gangguan inkontinensia. Alternatif teknik pembedahan lainnya adalah ileostomi, total abdominal colectomy dengan anastomosis ileorectal (Gajendran *et al.*, 2019)

#### **2.3.6. Tikus model kolitis ulseratif**

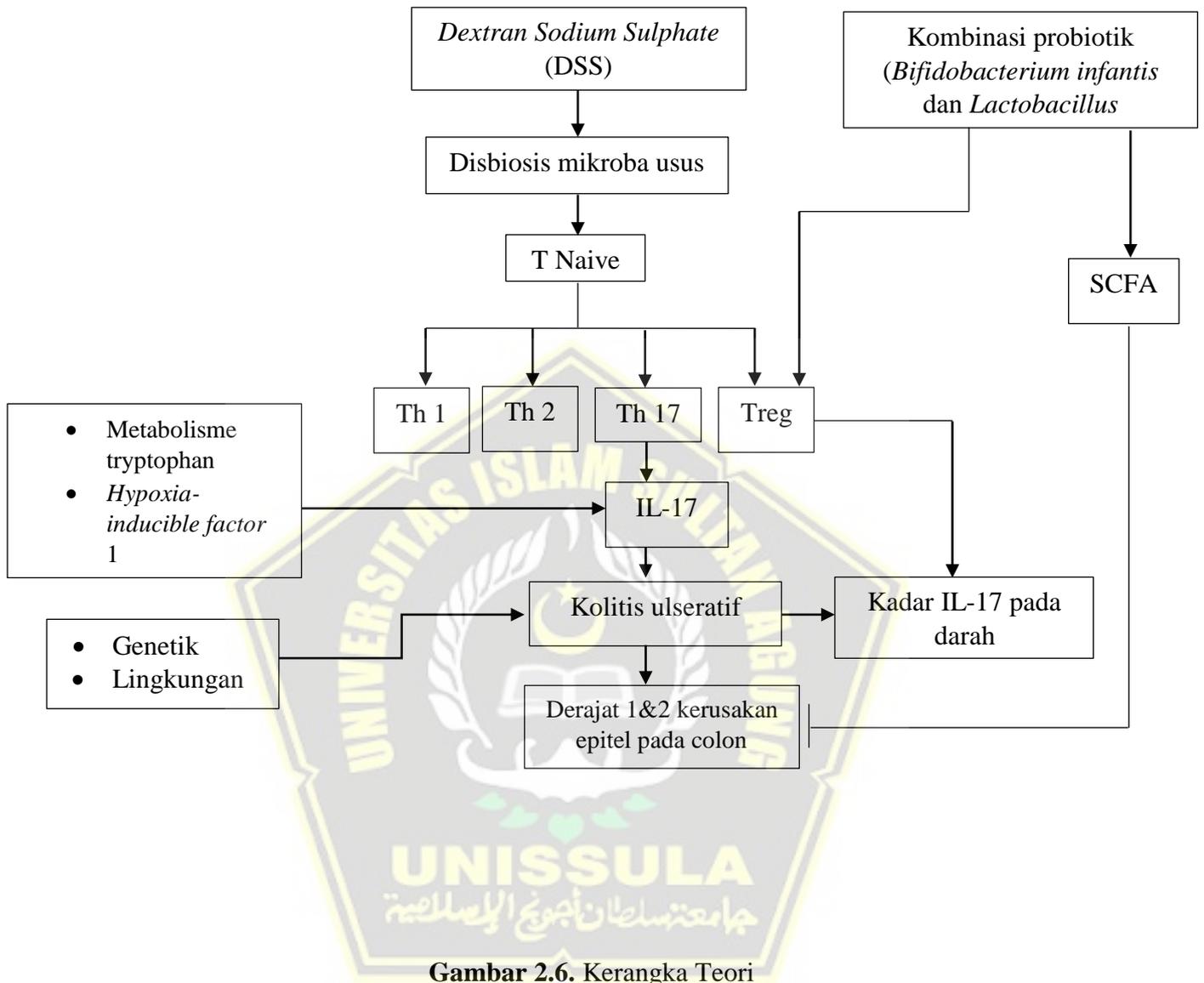
Tikus model kolitis ulseratif dapat dibuat dengan menginduksi *Dextran Sodium Sulphate* (DSS). *Dextran Sodium Sulphate* (DSS) adalah senyawa polisakarida sulfat yang larut dalam air, bermuatan negatif, dan memiliki berat molekul yang bervariasi mulai dari 5 hingga 1400 kDa. Keberhasilan dan tingkat keparahan kolitis bergantung terhadap lamanya pemberian, frekuensi, dan konsentrasi dari DSS yang diberikan. Berat badan hewan uji coba harus selalu dipantau dan darah pada feses. Tikus kolitis yang diinduksi DSS sering digunakan dalam penelitian karena memiliki kelebihan yaitu kecepatan, kemudahan, reproduktifitas, dan kemampuan pengendaliannya. Derajat keparahan dapat diatur dengan memodifikasi konsentrasi DSS dan frekuensi pemberiannya. Dengan memberikan DSS dengan dosis 2 – 5 % terlarut dalam air selama 4-9 hari dapat menginduksi terjadinya penipisan musin pada

mukosa usus, peningkatan permeabilitas epitel, degenerasi epitel, deplesi sel goblet, dan dapat menginduksi erosi atau uleserasi pada kolon.(Chassaing et al., 2014). Tikus yang digunakan adalah tikus *Rattus Norvegicus* (Galur Wistar) jantan karena pada tikus betina memiliki kandungan hormon *17- $\beta$ -estradiol* yang memiliki efek dapat meminimalisir keparahan proses inflamasi (Bábíčková et al., 2015). Tingkat keparahan kolitis pada tikus yang diinduksi DSS dapat dinilai menggunakan skoring berdasarkan gejala yang dialami tikus tersebut. Berikut tabel skoring derajat keparahan tikus kolitis yang diinduksi DSS.

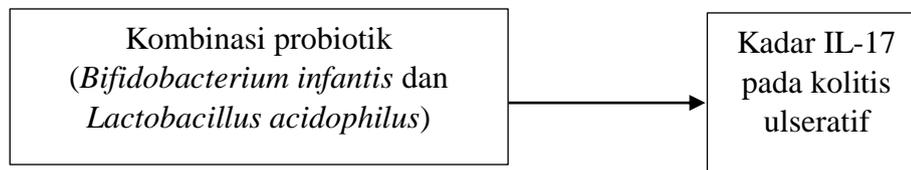
**Tabel 2.2. Skoring tikus model kolitis (Martin et al., 2016)**

Konsistensi feses	Skor	Darah dalam feses
Normal	0	Tidak ada
Cair	1	Sedikit, di dalam feses dan/atau di sekitar anus
Lunak	2	Banyak
Diare berair	3	-

## 2.4. Kerangka Teori



## 2.5. Kerangka Konsep



**Gambar 2.7.** Kerangka konsep

## 2.6. Hipotesis

### 2.6.1. Hipotesis mayor

Terdapat pengaruh kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*) terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif.

### 2.6.2. Hipotesis minor

2.6.2.1. Tidak terdapat pengaruh terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif yang tidak diberi perlakuan.

2.6.2.2. Terdapat pengaruh terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif tanpa diberi terapi.

2.6.2.3. Terdapat pengaruh terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif dan diberi terapi standar *5-aminosalicylic acid* (5-ASA)

2.6.2.4. Terdapat pengaruh terhadap kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif dan diberi terapi kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*).

2.6.2.5. Terdapat perbedaan kadar IL-17 pada masing-masing kelompok.

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Jenis Penelitian**

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan hewan coba berupa tikus *Rattus Norvegicus* (Galur Wistar) jantan. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *pretest posttest control group design*. Desain ini terbagi menjadi dua kelompok yaitu kelompok kontrol dan kelompok perlakuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap kelompok eksperimen.

#### **3.2. Tempat dan waktu penelitian**

Tempat pemeliharaan dan induksi hewan dilakukan di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Tempat untuk pengujian sampe dilakukan di *Integrated Biomedical Laboratory* Universitas Islam Sultan Agung Semarang. Waktu yang diperlukan dalam penelitian ini adalah 1 bulan (Agustus-September 2021).

#### **3.3. Subyek Penelitian**

Subyek penelitian adalah tikus *Rattus norvegicus* (galur Wistar), diperoleh dan dipelihara di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Bahan makanan tikus digunakan adalah pakan diet standar.

### 3.3.1. Kriteria Inklusi

1. Tikus jantan *Rattus norvegicus* (galur Wistar) yang sehat. Tikus sehat adalah tikus dengan kondisi mata bersinar, bulu tidak kusam, aktif dan nafsu makan baik (Kusumawati, 2014).
2. Berumur 6-8 minggu
3. Berat badan 150 – 200 gram

### 3.3.2. Kriteria Eksklusi

1. Tikus dengan kelainan bawaan atau cacat fisik
2. Tikus mati saat penelitian

### 3.4. Besar Sampel

Penelitian ini menggunakan sampel sebanyak 18 ekor tikus *Rattus norvegicus* (galur Wistar) yang dibagi menjadi 4 kelompok tikus yang diambil secara acak. Jumlah sampel hewan coba pada penelitian ini minimal 6 ekor. Rumus sampel yang digunakan adalah Rumus Federer (1977) sebagai berikut:

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

$$(4-1)(n-1) \geq 15$$

$$3(n-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 5$$

$$n \geq 6$$

Keterangan:

t = jumlah kelompok

n = jumlah populasi tikus dalam satu kelompok

### 3.5. Teknik Sampling

Pengambilan sampel diambil dengan teknik *purposive sampling*, yaitu pengambilan sampel dengan cara mengambil anggota populasi yang ada atau tersedia. Pada penelitian ini sampel diperoleh dengan cara memesan atau membeli sejumlah tikus *Rattus norvegicus* (galur Wistar) dari populasi yang kriteria nya sudah ditentukan pada kriteria inklusi.

Sampel penelitian dibagi secara random sebanyak 3 kelompok, dengan masing-masing terdiri dari tikus, yaitu:

1. Kelompok kontrol (K) adalah kelompok yang tidak diberi perlakuan.
2. Kelompok perlakuan I (P1) adalah kelompok tikus jantan galur Wistar yang diinduksi *dextran sodium sulphate* (DSS) tanpa diberi terapi.
3. Kelompok perlakuan II (P2) adalah kelompok tikus jantan galur Wistar yang diinduksi *dextran sodium sulphate* (DSS) dan diberi terapi standar.
4. Kelompok perlakuan III (P3) adalah kelompok tikus jantan galur Wistar yang diinduksi *dextran sodium sulphate* (DSS) dan diberi terapi kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophillus*).

### 3.6. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian berupa *pre test – post test control group design*.

K I:  $O_0 \rightarrow (X_0) \rightarrow O_1$

K II:  $O_2 \rightarrow (X_1) \rightarrow O_3$

K III:  $O_4 \rightarrow (X_2) \rightarrow O_5$

K IV:  $O_6 \rightarrow (X_3) \rightarrow O_7$

Keterangan:

- K I : Kelompok kontrol tanpa diberi perlakuan  
 K II : Kelompok tikus yang diberi perlakuan I  
 K III : Kelompok tikus yang diberi perlakuan II  
 K IV : Kelompok tikus yang diberi perlakuan III  
 X<sub>0</sub> : Tanpa perlakuan  
 X<sub>1</sub> : Perlakuan dengan induksi DSS (tikus jantan galur Wistar model kolitis ulseratif)  
 X<sub>2</sub> : Tikus jantan galur Wistar model kolitis ulseratif + 5-ASA  
 X<sub>3</sub> : Tikus jantan galur Wistar model kolitis ulseratif + *Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*  
 O<sub>0</sub> : Pengamatan hasil kelompok kontrol sebelum perlakuan  
 O<sub>1</sub> : Pengamatan hasil kelompok kontrol sesudah perlakuan  
 O<sub>2</sub> : Pengamatan hasil pada kelompok kolitis ulseratif sebelum perlakuan  
 O<sub>3</sub> : Pengamatan hasil pada kelompok kolitis ulseratif sesudah perlakuan  
 O<sub>4</sub> : Pengamatan hasil pada kelompok kolitis ulseratif + 5-ASA sebelum perlakuan  
 O<sub>5</sub> : Pengamatan hasil pada kelompok kolitis ulseratif + 5-ASA sesudah perlakuan  
 O<sub>6</sub> : Pengamatan hasil pada kelompok kolitis ulseratif + *B.infantis* + *L.acidophilus* sebelum perlakuan  
 O<sub>7</sub> : Pengamatan hasil pada kelompok kolitis ulseratif + *B.infantis* + *L.acidophilus* sesudah perlakuan

### 3.7. Variabel dan Definisi Operasional

#### 3.7.1. Variabel

##### 3.7.1.1. Variabel Bebas

1. *Bifidobacterium infantis*
2. *Lactobacillus acidophilus*

##### 3.7.1.2. Variabel Terikat

1. Kadar IL-17

### 3.7.2. Definisi Operasional

#### 3.7.2.1. *Bifidobacterium infantis*

*Bifidobacterium infantis* adalah bakteri penghasil asam laktat, golongan gram positif, berbentuk basil bercabang, dan bersifat anaerob. Bakteri *Bifidobacterium infantis* dapat diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU) Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta dengan dosis sebesar  $1 \times 10^9$  Colony Forming Unit (CFU)/200g berat badan dilarutkan dalam 1 mL air. Skala data yang digunakan adalah nominal.

#### 3.7.2.2. *Lactobacillus acidophilus*

*Lactobacillus acidophilus* adalah bakteri golongan gram positif, non motil, bersifat anaerob dan berbentuk basil. Bakteri *Lactobacillus acidophilus* diperoleh dari Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PAU) Universitas Gadjah Mada (UGM) Yogyakarta dengan dosis sebesar  $1 \times 10^9$  Colony Forming Unit (CFU)/200g berat badan dilarutkan dalam 1 mL air. Skala data yang digunakan adalah nominal.

#### 3.7.2.3. Kadar IL – 17

Kadar IL – 17 diukur dengan mengambil serum darah tikus melalui arteri *ophthalmica* saat sebelum dan sesudah perlakuan. Kemudian kadar IL-17 sebelum dan

sesudah perlakuan dihitung menggunakan metode ELISA dengan antibodi anti IL-17 pada hari ke-8. Skala data yang digunakan adalah rasio.

### **3.8. Alat dan Bahan**

#### **3.8.1. Alat**

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah:

1. Alat suntik
2. Alat suntik yang digunakan merk Terumo, kemasan steril untuk sekali pakai, ukuran 1 ml dengan panjang jarum  $\frac{1}{2}$  inci dan kaliber 27 G yang digunakan untuk injeksi intraperitoneal dan sonde tikus.
3. Alat bedah hewan ( scalpel, pinset, gunting )
4. Mikropipet
5. Spektrofotometer
6. Horizontal shaker
7. Inkubator
8. Sentrifuge
9. Cawan petri
10. Kapas steril

#### **3.8.2. Bahan Penelitian**

1. *Dextran sodium sulphate* (DSS) 5 %.

2. *Bifidobacterium infantis* dengan dosis  $1 \times 10^9$  CFU/200g berat badan dilarutkan dalam 1 mL air.
3. *Lactobacillus acidophilus* dengan dosis  $1 \times 10^9$  CFU/200g berat badan dilarutkan dalam 1 mL air.
4. *Mesalazine* (5-ASA) dosis 36 mg/200g berat badan
5. IL-17 ELISA kit.
6. Pakan diet standar dan diberi minum air *ad libitum*.

### 3.9. Cara Kerja

#### 3.9.1. Adaptasi tikus

- 3.9.1.1. Tikus jantan galur Wistar yang sehat dan berusia 6-8 minggu diadaptasi selama satu minggu di laboratorium dengan suhu berkisar antara  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ .
- 3.9.1.2. Semua tikus ditempatkan di kandang sesuai kelompok awal.
- 3.9.1.3. Tikus diberi makan berupa makanan standart dan minuman berupa air *ad libitum*.
- 3.9.1.4. Setiap hari dilakukan penimbangan berat badan pada masing-masing tikus jantan galur Wistar. Berat ideal tikus yang digunakan berkisar 150-200 gram.

#### 3.9.2. Randomisasi

- 3.9.2.1. Setiap tikus diberi identitas berupa nomor di bagian punggung menggunakan spidol.

- 3.9.2.2. Dilakukan pengambilan nomor secara acak untuk penentuan kelompok.
- 3.9.2.3. Tikus yang telah dipilih secara acak, dimasukkan ke dalam kelompoknya. Kelompok kontrol (K) yang nantinya tidak mendapat perlakuan; kelompok perlakuan I (P1) yang nantinya diinduksi *dextran sodium sulphate* (DSS) tanpa diberi terapi; kelompok perlakuan II (P2) yang nantinya diinduksi DSS dan diberi terapi standar; dan kelompok perlakuan III (P3) yang nantinya diinduksi DSS dan diberi terapi kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus*).

### **3.9.3. Induksi *Dextran Sodium Sulphate* (DSS)**

- 3.9.3.1. Setelah itu tikus pada kelompok perlakuan akan diinduksi dengan DSS dengan dosis 5 % diberikan secara peroral dan ditunggu selama 5 hari untuk membuat tikus model kolitis. Pada penelitian sebelumnya, pemberian DSS 2-5% dalam waktu 4-9 hari sudah terbukti dapat menyebabkan degenerasi epitel dan disbiosis mikroba pada usus sehingga menimbulkan kolitis ulseratif (Perše & Cerar, 2012). Tikus dikatakan kolitis apabila konsistensi tinja cair maupun lunak dan terdapat darah dalam feses dan/atau di sekitar anus (derajat 1 dan 2).

- 3.9.3.2. Diambil satu sampel tikus untuk dilihat perkembangannya dengan cara pembedahan. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 4 jam sebelum dilakukan tindakan pembedahan.
- 3.9.3.3. Apabila tikus belum mengalami kolitis lanjutkan perlakuan pemberian DSS 5 % selama 2 hari.

#### 3.9.4. Penentuan dosis

- 3.9.4.1. Dosis kombinasi probiotik (*Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium infantis*)

Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa pemberian kombinasi probiotik (*Lactobacillus delbruekii* dan *Lactobacillus fermentum*) dengan dosis  $1 \times 10^9$  CFU/150 g berat badan yang dilarutkan dalam 50 mL air dapat menurunkan aktivitas pengikatan NF- $\kappa$ B dan menurunkan regulasi sitokin proinflamasi seperti IL-6 dan TNF- $\alpha$ . (Hegazy & El-Bedewy, 2010).

- 3.9.4.2. Dosis terapi standar

Terapi standar pada kolitis ulseratif berupa 5-ASA yaitu *Mesalazine* dengan dosis 2,4 g/hari untuk orang dewasa (Williams *et al.*, 2011). Apabila dosis dikonversi ke tikus (200g), maka dosis yang didapatkan adalah 36 mg/200 g BB selama 8 hari.

### 3.9.5. Perlakuan

- 3.9.5.1. Jika tikus sudah mengalami kolitis, dapat dilanjutkan dengan pemberian terapi standar dan terapi probiotik.
- 3.9.5.2. Kelompok P2 diberi terapi standar berupa 5-ASA yaitu *Mesalazine* tablet 500mg dengan dosis 36 mg /200 g BB per oral selama 8 hari.
- 3.9.5.3. Pada kelompok P3, diberi kombinasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dalam sediaan kapsul dengan dosis  $1 \times 10^9$  Colony Forming Unit (CFU)/200 g berat badan dan *Bifidobacterium infantis* dalam sediaan kapsul dengan dosis  $1 \times 10^9$  Colony Forming Unit (CFU)/200 g berat badan. Keduanya dienkapsulasi dan dilarutkan bersamaan dalam aquadest sebanyak 1 mL. Larutan tersebut dihomogenkan dengan batang pengaduk. Terapi probiotik ini diberikan selama 8 hari. Lama pemberian terapi berpengaruh terhadap hasil yang didapat. Pada penelitian yang telah dilakukan membuktikan efektivitas pemberian terapi kombinasi probiotik adalah 7-10 hari (Javed *et al.*, 2016).
- 3.9.5.4. Selama proses percobaan, di semua kelompok tikus tetap diberi makan berupa makanan standart dan minuman berupa air *ad libitum*.

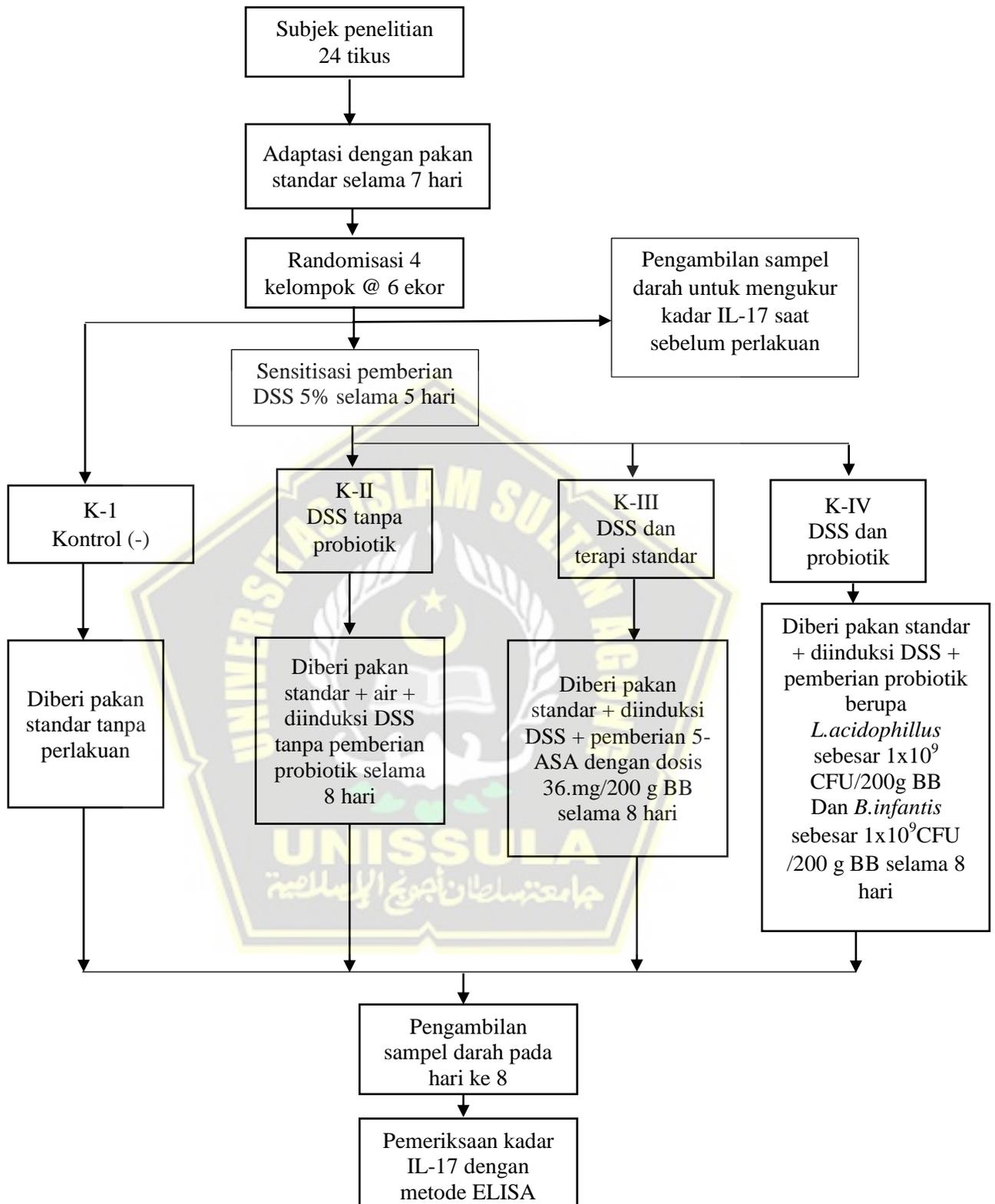
### 3.9.6. Pengukuran kadar IL-17

3.9.6.1. Pada hari ke-8 diambil serum darah tikus di a. *ophthalmica* dan dilakukan pemeriksaan kadar IL-17 pada masing – masing kelompok menggunakan metode ELISA.

### 3.10. Analisa Hasil

Pengolahan analisis data dilakukan menggunakan *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 25.0 for windows*. Hasil penelitian akan diperoleh data berupa kadar IL-17 sebelum dan sesudah perlakuan. Data yang diperoleh akan diinput, ditabulasi, dan diedit. Terdapat *outlier* pada data kelompok I atau K, kelompok III atau P2 dan kelompok IV atau P3. *Outlier* tersebut dieksplicit dikarenakan kadar IL-17 pada kelompok tersebut jauh lebih tinggi dan lebih rendah dibandingkan tikus lainnya. Kemudian data pre dan post yang telah diolah akan dilakukan uji deskriptif untuk mengetahui nilai mean, median dan standar deviasi/standar error. Setelah itu akan dilakukan uji normalitas menggunakan *Saphiro – wilk test* dan uji homogenitas dengan menggunakan *Levenne test*. Setelah uji deskriptif dan uji normalitas data akan dilakukan uji *Pair T Test*. Data antara post yang telah dilakukan uji deskriptif, uji normalitas menggunakan *Saphiro – wilk test* dan uji homogenitas menggunakan *Levenne* dianalisa dengan uji *One Way Anova* dan dilanjutkan uji *Post Hoc test* dengan *LSD*.

### 3.11. Alur Penelitian



Gambar 3.1. Alur Penelitian

Keterangan alur penelitian:

1. Tikus akan diadaptasi selama satu minggu kemudian dibagi menjadi 4 kelompok secara acak yang masing – masing kelompok terdiri atas 6 ekor tikus jantan berdasarkan kriteria inklusi. Tikus diberi pakan standar, diberi minum air dan berat badan ditimbang setiap hari.
2. Sebelum tikus diberi induksi DSS, diambil sampel darah terlebih dahulu di *a.ophthalmica* di setiap kelompok. Setelah itu tikus pada kelompok perlakuan akan diinduksi dengan DSS dengan dosis 5 % diberikan secara peroral dan ditunggu selama 5 hari untuk membuat tikus model kolitis. Pada penelitian sebelumnya, pemberian DSS 2-5% dalam waktu 4-9 hari. Tikus dikatakan kolitis apabila konsistensi tinja cair maupun lunak dan terdapat darah dalam feses dan/atau di sekitar anus (derajat 1 dan 2).
3. Diambil satu sampel tikus untuk dilihat perkembangannya dengan cara pembedahan. Tikus dipuasakan terlebih dahulu selama 4 jam sebelum dilakukan tindakan.
4. Apabila tikus belum mengalami kolitis lanjutkan perlakuan pemberian DSS 5 % selama 2 hari.
5. Jika tikus sudah mengalami kolitis dapat dilanjutkan pemberian terapi standar berupa *5-aminosalicylic* (5-ASA) yaitu Mesalazine tablet 500mg dengan dosis 36 mg/200g BB selama 8 hari.

6. Pada kelompok lain, dilanjutkan pemberian kombinasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dengan dosis  $1 \times 10^9$  Colony Forming Unit (CFU)/200 g berat badan dan *Bifidobacterium infantis* dengan dosis  $1 \times 10^9$  Colony Forming Unit (CFU)/200 g berat badan selama 8 hari.
7. Pada hari ke-8 diambil serum darah tikus dan dilakukan pemeriksaan kadar IL-17 pada masing – masing kelompok menggunakan metode ELISA

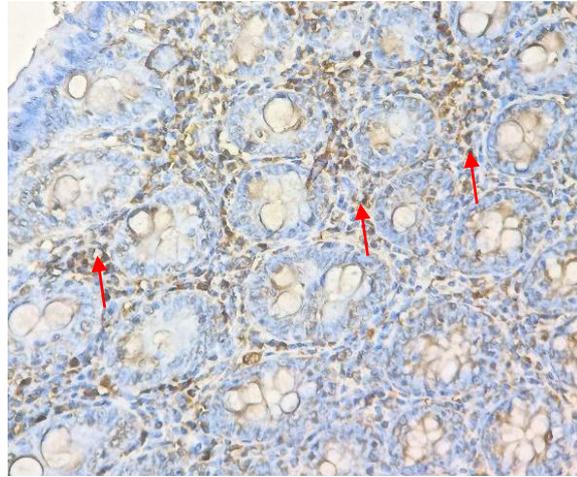


## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Hasil Penelitian

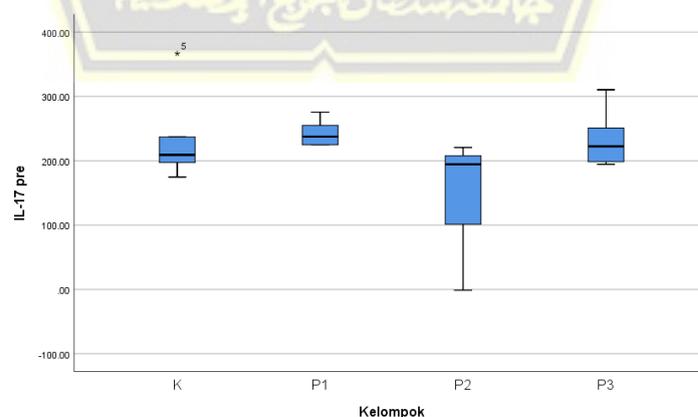
Penelitian mengenai pengaruh kombinasi probiotik *B. infantis* dan *L. acidophilus* terhadap kadar IL-17 pada tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan galur Wistar yang dibuat model kolitis ulseratif. Berdasarkan perhitungan besar sampel minimal, sebanyak 24 ekor tikus yang dibagi dalam 4 kelompok disertakan pada penelitian ini. Semua tikus yang terlibat dalam penelitian tidak ada yang mati atau *drop out*, namun terdapat 4 data yang tereksklusi. Penyebab data dieksklusi adalah nilai data terlalu tinggi atau rendah yang dapat mengakibatkan bias pada hasil analisis. Kelompok K adalah kelompok tikus yang tidak diberi perlakuan, kelompok P1 yaitu kelompok tikus yang diinduksi *dextran sodium sulphate* (DSS) tanpa diberi terapi, kelompok P2 yaitu kelompok tikus yang diinduksi DSS dan diberi terapi standar, sedangkan P3 yaitu kelompok tikus yang diinduksi DSS dan diberi kombinasi probiotik *B. infantis* dan *L. acidophilus*. Pelaksanaan penelitian bertempat di Laboratorium Pusat Studi Pangan dan Gizi (PSPG) Universitas Gadjah Mada Yogyakarta selama 20 hari. Hasil induksi kolitis dapat dilihat dari histopatologi kolon tikus. Hasil histopatologi kolon tikus dapat dilihat pada gambar 4.1



**Gambar 4.1.** Histologi mukosa kolon tikus dengan pengecatan imunohistokimia menggunakan perbesaran 40x

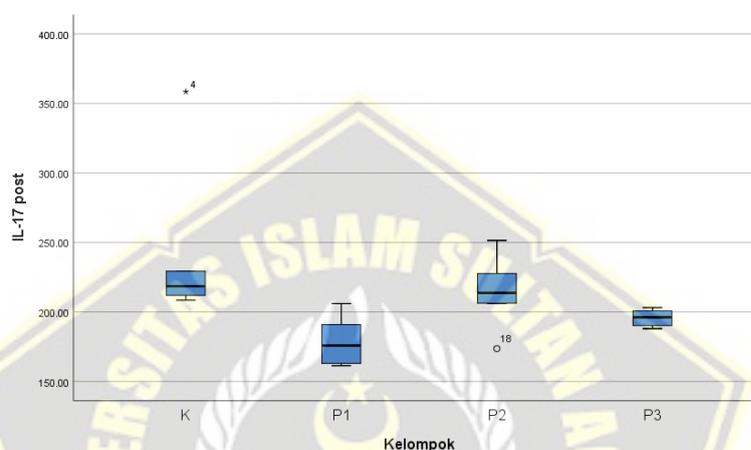
Gambar diatas menunjukkan adanya infiltrat sel radang di lamina propia kolon tikus dan adanya ekspresi TGF- $\beta$  berwarna coklat pada sitoplasma. Ekspresi TGF- $\beta$  menunjukkan induksi kolitis dengan DSS berhasil.

Kadar IL-17 diukur dalam 2 (dua) kali yaitu sebelum perlakuan (*pretest*) dan setelah perlakuan (*posttest*). Kadar IL-17 diukur menggunakan ELISA dengan antibodi IL-17. Hasil rerata kadar IL-17 sebelum eksklusi dapat dilihat pada gambar 4.2 dan gambar 4.3



**Gambar 4.2.** Boxplot rerata kadar IL-17 *pre-test* sebelum dieksklusi

*Boxplot* diatas menunjukkan terdapat *outlier* pada data kelompok K, P2, dan P3. *Outlier* tersebut akan dieksklusi karena nilai pada data tersebut terlalu tinggi atau rendah. *Outlier* yang terlalu tinggi atau rendah dapat disebabkan karena kondisi tikus yang berbeda. Hal tersebut dapat dipengaruhi oleh kondisi genetik tikus yang dapat menyebabkan kadar IL-17 terlalu tinggi atau rendah.



Gambar 4.3. *Boxplot* rerata kadar IL-17 *post-test* sebelum dieksklusi

Gambar 4.3 menunjukkan adanya *outlier* pada data kelompok K, P2, dan P3. *Outlier* tersebut akan dieksklusi agar tidak terjadi bias pada hasil analisis. *Outlier* tersebut dapat dipengaruhi oleh beberapa hal yaitu faktor genetik dari tikus. Faktor genetik tersebut menyebabkan kadar IL-17 tinggi atau rendah dengan tikus lainnya saat sebelum diberi perlakuan.

#### 4.1.1. Hasil Pemeriksaan Kadar IL-17 Setelah data di eksklusi

Deskripsi kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* ditunjukkan pada

Tabel 4.1 dan Tabel 4.4

**Tabel 4.1. Rerata kadar IL-17 pre-test setelah di eksklusi**

Kelompok	Mean $\pm$ Std.deviation	Min-Max	Uji	Uji
			Normalitas ( <i>Shapiro Wilk</i> )	Homogenitas ( <i>Levene's Test</i> )
			Nilai p	Nilai p
K	238,53 $\pm$ 75,19	174,66-366,53	0,141	
P1	242,42 $\pm$ 20,13	224,53-275,53	0,310	0,315
P2	174,46 $\pm$ 49,29	101,38-207,56	0,063	
P3	240,04 $\pm$ 44,08	194,44-310,19	0,553	

Sumber: (Data primer diolah, 2022)

Tabel 4.1 menunjukkan bahwa kelompok P1 memiliki kadar IL-17 *pretest* paling tinggi, sedangkan kelompok P2 memiliki kadar IL-17 terendah. Berdasarkan hasil uji normalitas sebaran data dengan *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai  $p > 0,05$  untuk tiap-tiap kelompok sehingga disimpulkan semua kelompok memiliki sebaran data kadar IL-17 *pretest* normal. Uji homogenitas dengan uji *Levene* juga didapatkan nilai  $p > 0,05$  menunjukkan bahwa keempat kelompok uji memiliki variasi data kadar IL-17 *pretest* yang homogen/seragam. Setelah itu kadar IL-17 *pretest* dapat dilakukan dengan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil analisis *One Way Anova* dapat dilihat pada tabel 4.2

**Tabel 4.2. Hasil *One Way Anova* kadar IL-17 pre-test**

	P
<i>One Way Anova</i>	0,174

Sumber: (Data primer diolah, 2022)

Berdasarkan uji *One Way ANOVA* pada tabel 4.2 menunjukkan tidak adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok. Hal tersebut dapat diartikan bahwa rerata kadar IL-17 pada semua kelompok normal karena tidak ada perbedaan yang signifikan antar kelompok.

**Tabel 4.3. Rerata kadar IL-17 *post-test* setelah di eksklusi**

Kelompok	Mean $\pm$ Std.deviation	Min-Max	Uji	Uji
			Normalitas ( <i>Shapiro Wilk</i> )	Homogenitas ( <i>Levene's Test</i> )
			Nilai p	Nilai p
K	217,38 $\pm$ 8,50	208,53-229,34	0,628	0,083
P1	178,87 $\pm$ 17,13	161,44-206,03	0,580	
P2	212,32 $\pm$ 32,11	173,63-251,41	0,969	
P3	194,76 $\pm$ 6,22	187,97-203,22	0,792	

Sumber: (Data primer diolah, 2022)

Tabel 4.3 menunjukkan bahwa kelompok K memiliki kadar IL-17 *posttest* paling tinggi, sedangkan kelompok P1 memiliki kadar IL-17 terendah. Berdasarkan hasil uji normalitas sebaran data dengan *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai  $p > 0,05$  untuk tiap-tiap kelompok sehingga disimpulkan semua kelompok memiliki sebaran data kadar IL-17 *posttest* normal. Uji homogenitas dengan uji *Levene* juga didapatkan nilai  $p > 0,05$  menunjukkan bahwa keempat kelompok uji memiliki variasi data kadar IL-17 *posttest* yang homogen/seragam. Berdasarkan uji *Shapiro Wilk* didapatkan bahwa kadar IL-17 pada semua kelompok berdistribusi normal ( $p > 0,05$ ) juga memiliki varian data homogen ( $p > 0,05$ ), sehingga kadar IL-17 *posttest* dapat dilakukan dengan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil analisis *One Way Anova* dapat dilihat pada tabel 4.4

**Tabel 4.4. Hasil *One Way Anova* kadar IL-17 *post-test***

	P
<i>One Way Anova</i>	0,009

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai p sebesar 0,009 yang artinya terdapat perbedaan rata-rata kadar IL-17 *posttest* yang

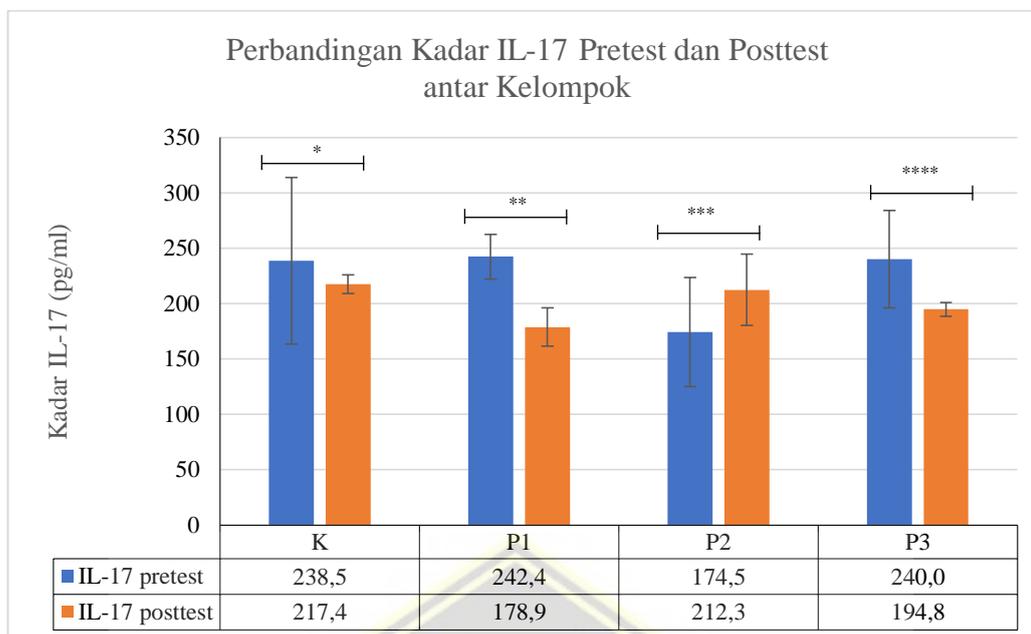
signifikan diantara keempat kelompok. Perbandingan kadar IL-17 *posttest* selanjutnya dilakukan dengan uji *Post Hoc LSD* untuk mengetahui signifikan tidaknya perbandingan kadar IL-17 *posttest* antar kelompok. Hasil *PostHoc LSD* dapat dilihat pada tabel 4.5

**Tabel 4.5. Hasil uji *Post Hoc LSD* kadar IL-17 *post-test***

	Kelompok	p
K1	P1	0,002
	P2	0,724
	P3	0,059
P1	P2	0,008
	P3	0,156
P2	P3	0,140

Berdasarkan uji *PostHoc LSD* didapatkan bahwa hanya perbandingan rata-rata kadar IL-17 *posttest* antara kelompok K dengan P1 dan antara P1 dengan P2 yang signifikan ( $p < 0,05$ ). Dari uji *PostHoc LSD* dapat dinyatakan bahwa pemberian terapi standar pada tikus putih jantan galur Wistar yang diinduksi DSS berpengaruh terhadap kadar IL-17.

Perbandingan hasil kadar IL-17 sebelum dan sesudah perlakuan ditunjukkan pada gambar berikut:



**Gambar 4.4.** Histogram Perbandingan Kadar IL-17 *pretest-posttest*  
Sumber: (Data primer diolah, 2022)

Keterangan:

- \* : tidak terdapat perbedaan kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* pada kelompok K, karena nilai signifikansi yang didapat sebesar 0,548 ( $p > 0,05$ ).
- \*\* : terdapat perbedaan kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* pada kelompok P1, karena nilai signifikansi yang didapat sebesar 0,001 ( $p < 0,05$ ).
- \*\*\* : tidak terdapat perbedaan kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* pada kelompok P2, karena nilai signifikansi yang didapat sebesar 0,062 ( $p > 0,05$ ).
- \*\*\*\* : tidak terdapat perbedaan kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* pada kelompok P3, karena nilai signifikansi yang didapat sebesar 0,061 ( $p > 0,05$ ).

Histogram pada Gambar 4.4 menampilkan perbandingan rata-rata kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* antar tiap kelompok yang diuji menggunakan *paired sample t-test* karena dari hasil uji normalitas dan homogenitas sebelumnya telah didapatkan sebaran data normal dan varian data homogen. Berdasarkan hasil *paired sample t-test*, didapatkan bahwa perbandingan rata-rata kadar IL-17 *pretest* dan *posttest* yang signifikan hanya ditunjukkan pada kelompok P1,

dimana kadar IL-17 posttest lebih rendah dari pada *pretest* ( $p < 0,05$ ), sedangkan pada ketiga kelompok lainnya yaitu kelompok K, P2 dan P3 tidak menunjukkan perbandingan yang signifikan ( $p > 0,05$ ).

#### 4.1.2. Hasil Pemeriksaan Selisih Kadar IL-17 *Pretest* dan *Posttest*

Berdasarkan hasil penelitian dapat diambil data selisih antara kelompok *pretest* dan posttest. Deskripsi selisih kadar IL-17 antara *pretest* dan *posttest* ditunjukkan pada table 4.6.

**Tabel 4.6. Rerata selisih kadar IL-17 antara *pretest* dan *posttest***

Kelompok	Mean $\pm$ Std.deviation	Min-Max	Uji	Uji
			Normalitas ( <i>Shapiro Wilk</i> )	Homogenitas ( <i>Levene's Test</i> )
			Nilai p	Nilai p
K	-21,15 $\pm$ 72,25	-143,75-39,65	0,113	0,232
P1	-63,55 $\pm$ 21,78	-91,78- -33,93	0,797	
P2	37,86 $\pm$ 26,04	16,97-72,25	0,324	
P3	-45,28 $\pm$ 39,17	-106,97- -0,78	0,635	

Tabel 4.6 menunjukkan bahwa kelompok P2 memiliki selisih kadar IL-17 paling tinggi, sedangkan kelompok P1 memiliki selisih kadar IL-17 terendah. Berdasarkan hasil uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk* didapatkan nilai  $p > 0,05$  pada semua kelompok dan dapat disimpulkan bahwa semua kelompok memiliki sebaran data selisih kadar IL-17 normal. Sedangkan pada uji homogenitas dengan menggunakan *Levene test* juga didapatkan nilai  $p > 0,05$  menunjukkan bahwa semua kelompok memiliki variasi data selisih kadar IL-17 yang homogen/seragam. Berdasarkan hasil uji

normalitas dan homogenitas semua data didapatkan normal dan homogen sehingga data selisih kadar IL-17 dilanjutkan dengan uji parametrik *One Way Anova*. Hasil analisis *One Way Anova* dapat dilihat pada tabel 4.7

**Tabel 4.7. Hasil uji *One Way Anova* selisih kadar IL-17**

	P
<i>One Way Anova</i>	0,018

Hasil uji *One Way Anova* didapatkan nilai p sebesar 0,018 yang artinya terdapat perbedaan rerata selisih kadar IL-17 yang bermakna diantara keempat kelompok. Untuk melihat perbandingan antara keempat kelompok dapat diuji menggunakan *PostHoc LSD*. Hasil uji *Post Hoc LSD* dapat dilihat pada tabel 4.8

**Tabel 4.8. Hasil uji *Post Hoc LSD* selisih kadar IL-17**

	Kelompok	p
K1	P1	0,134
	P2	0,065
	P3	0,402
P1	P2	0,003
	P3	0,506
P2	P3	0,013

Hasil uji *PostHoc LSD* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan rata-rata selisih kadar IL-17 yang signifikan antara kelompok P1 dengan P2 dan P2 dengan P3 dengan nilai  $p < 0,05$ . Dari hasil uji tersebut dapat diartikan bahwa pemberian terapi menggunakan 5-ASA dapat mempengaruhi kadar IL-17. Pada kelompok P3 pemberian terapi kombinasi probiotik juga dapat memberikan pengaruh terhadap kadar IL-17. Akan tetapi pemberian 5-ASA lebih

efektif atau memberikan efek yang lebih besar dibandingkan kombinasi probiotik.

#### 4.2. Pembahasan

Penelitian ini menggunakan desain *pre-post test* dengan 4 kelompok tikus yang diberikan perlakuan berbeda pada masing-masing kelompok. Hasil uji histologi pada mukosa kolon tikus dengan pengecatan immunohistokimia perbesaran 40x didapatkan adanya infiltrat polimorfonuklear atau infiltrat sel radang pada lamina propria dan terdapat peningkatan ekspresi TGF- $\beta$  pada sitoplasma (Gálvez, 2014). Hal tersebut menandakan tikus telah mengalami kolitis ulseratif. Hal ini didukung juga berdasarkan uji *paired sample t-test* pada histogram gambar 4.4 yang menunjukkan hasil kelompok P1 mengalami penurunan kadar IL-17 dengan angka *pretest* sebesar  $(238,53 \pm 75,19)$  sedangkan *posttest* sebesar  $(217,38 \pm 8,5)$  dan terdapat perbedaan antara *pretest* dan *posttest* dengan signifikansi 0,001 ( $p < 0,05$ ). Perubahan kadar IL-17 pada kelompok P1 menandakan induksi menggunakan *Dextran Sodium Sulphate* (DSS) 5% berhasil. Menurut penelitian yang telah dilakukan sebelumnya Th-17 memiliki plastisitas atau kemampuan merubah struktur dan fungsinya. Th17 dapat berdiferensiasi menjadi proinflamasi atau menjadi pelindung. Th17 dapat memproduksi IFN- $\gamma$  dan IL-17. Th17 mampu berkembang menjadi Th1 dimana hal ini dapat mencegah terjadinya keparahan imunopatologi. Stimulasi Th17 dengan IL-12 dapat meningkatkan ekspresi Th1-related transcription factor *T-bet*, menurunkan regulasi *RAR-related orphan*

*receptor gamma t* (ROR $\gamma$ t) dan IL-17 (Gálvez, 2014). Selain itu IL-17 mempunyai subtype yang berbeda pada kasus kolitis ulseratif IL-17 dan IL-17f berperan penting dalam proses patogenesis kolitis ulseratif. Akan tetapi IL-17 mempunyai kemampuan untuk melindungi epitel usus dari DSS dan menjaga *tight junction*. Pada fase akut aktif proses induksi IL-17 dan IL-17f meningkat signifikan tetapi pada fase setelah induksi atau fase kronis dari kolitis rasio IL-17 lebih sedikit dibandingkan IL-17f. IL-17f yang mempengaruhi progresivitas tingkat keparahan kolitis ulseratif (Tang et al., 2018). Hasil uji *One Way Anova* pada kelompok *pretest* didapatkan  $p > 0,05$  yang menandakan tidak adanya perbedaan yang bermakna antar kelompok. Tidak adanya perbedaan antar kelompok menunjukkan bahwa kadar IL-17 sebelum diberi induksi atau perlakuan normal.

Pada kelompok P2 tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara *pretest* dan *posttest* dengan nilai signifikansi 0,062 ( $p > 0,05$ ). Hasil uji deskriptif pada kelompok P2 menunjukkan *pretest* ( $174,46 \pm 49,29$ ) dan *posttest* ( $212,32 \pm 32,11$ ). Uji *PostHoc LSD* data *posttest* pada kelompok P2 dengan P1 menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan nilai signifikansi 0,008 ( $p < 0,05$ ). Sedangkan untuk uji *Post Hoc LSD* kelompok P2 dengan P3 tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan derajat signifikansi 0,14 ( $p > 0,05$ ). Hal ini menunjukkan bahwa pemberian 5-ASA mampu menormalkan kadar IL-17. Hasil uji *One Way Anova* dengan *PostHoc LSD* pada data selisih kadar IL-17 antara P2 dengan P1 juga menunjukkan hasil yang signifikan ( $p < 0,05$ ) menunjukkan bahwa

pemberian 5-ASA berpengaruh untuk mengembalikan kadar IL-17 ke kadar normal. Pemberian 5-ASA juga lebih efektif dibuktikan pada uji *PostHoc LSD* dengan kelompok P3 dengan nilai  $p < 0,05$ . Pada penelitian sebelumnya mengatakan bahwa IL-17 dan IL-17f memiliki peran penting dalam patogenesis kolitis ulseratif. Akan tetapi IL-17 dengan IL-17f memiliki peran yang berbeda dalam kolitis. Peningkatan IL-17f menyebabkan progresivitas keparahan kolitis. Sedangkan IL-17 memiliki peran protektif terhadap induksi DSS dan menjaga *tight junction* dari usus. Pada penelitian ini pemberian terapi standar berupa 5-ASA dapat mempengaruhi dari kadar IL-17 tikus model kolitis ulseratif (Tang *et al.*, 2018).

Hasil penelitian kadar IL-17 kelompok P3 digunakan untuk mengetahui pengaruh dari terapi kombinasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium infantis* pada tikus model kolitis ulseratif. Uji deskriptif pada kelompok P3 *pretest* menunjukkan angka ( $240 \pm 44,08$ ) sedangkan *posttest* ( $194,76 \pm 6,22$ ). Hasil uji *Post Hoc LSD* kelompok P3 dengan P1 tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan derajat signifikansi sebesar 0,156 ( $p > 0,05$ ). Sedangkan P3 dengan P2 juga tidak menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dengan derajat signifikansi sebesar 0,140 ( $p > 0,05$ ). Berdasarkan uji *paired sample t-test* tidak didapatkan perbedaan yang signifikan antara sebelum dan sesudah perlakuan, nilai signifikansi pada kelompok P3 adalah 0,061 ( $p > 0,05$ ) Hal ini menunjukkan bahwa pemberian terapi kombinasi probiotik *Lactobacillus*

*acidophilus* dan *Bifidobacterium infantis* mampu mempengaruhi kadar IL-17 dikarenakan tidak adanya perbedaan yang signifikan antara kelompok P3 dengan kelompok kontrol. Dalam hal ini terapi kombinasi probiotik dapat menjaga kadar IL-17 dalam kadar normal. Pada kasus kolitis rasio antara sitokin proinflamasi dan inflamasi haruslah seimbang agar tidak terjadi inflamasi yang berlebihan. Pada kasus kolitis ulseratif IL-17f yang berperan penting dalam proses autoimun. Selain itu IL-17 juga melindungi epitel usus dari induksi DSS dengan cara meningkatkan perbaikan epitel yang dibantu oleh *Fibroblast Growth Factor 2* (FGF2). Pada penelitian sebelumnya mengatakan bahwa penghambatan IL-17f lebih berpengaruh terhadap pengobatan kolitis ulseratif dibandingkan IL-17 (Tang et al., 2018). Dalam hal ini pengobatan kolitis menggunakan kombinasi probiotik *Lactobacillus acidophilus* dan *Bifidobacterium infantis* sejalan dengan penelitian sebelumnya yang membuktikan pemberian probiotik *Bifidobacterium infantis* dapat meningkatkan sel T regulator dan juga menyeimbangkan rasio antara sitokin pro inflamasi dan anti inflamasi (Zuo et al., 2014). Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan sesuai teori bahwa pemberian kombinasi probiotik *Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophilus* dengan dosis masing-masing  $1 \times 10^9$  CFU/ 200 g BB dapat mempengaruhi kadar IL-17 dalam kasus kolitis ulseratif.

Pada penelitian ini ada keterbatasan yang menyebabkan nilai standar deviasi masih tinggi. Hal tersebut dapat disebabkan karena peneliti tidak mengamati kolonisasi atau bioavailabilitas probiotik, pemeriksaan tanda

klinis setelah induksi DSS maupun pemberian terapi, jangka waktu pemberian terapi yang terlalu singkat dan juga faktor genetik yang mempengaruhi hasil. Peneliti juga tidak mengamati rasio antara IL-17 dan IL-17f, peneliti juga tidak memeriksa kadar IL-17 setelah induksi DSS.



## BAB V

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan sebagai berikut:

- 5.1.1. Terapi pemberian kombinasi probiotik (*Bifidobacterium infantis* dan *Lactobacillus acidophillus*) dapat mempengaruhi kadar IL-17 pada tikus model kolitis ulseratif
- 5.1.2. Rata-rata kadar IL-17 pada kelompok K sebelum perlakuan sebesar  $(238,53 \pm 75,19)$  dan setelah perlakuan sebesar  $(217,38 \pm 8,5)$
- 5.1.3. Rata-rata kadar IL-17 pada kelompok P1 sebelum perlakuan sebesar  $(242,42 \pm 20,13)$  dan setelah perlakuan sebesar  $(178,87 \pm 17,13)$
- 5.1.4. Rata-rata kadar IL-17 pada kelompok P2 sebelum perlakuan sebesar  $(174,46 \pm 49,29)$  dan setelah perlakuan sebesar  $(212,32 \pm 32,11)$
- 5.1.5. Rata-rata kadar IL-17 pada kelompok P3 sebelum perlakuan sebesar  $(240,06 \pm 44,08)$  dan setelah perlakuan sebesar  $(194,76 \pm 6,22)$

#### 5.2. Saran

Ada saran untuk penelitian selanjutnya yang perlu dilakukan yaitu:

- 5.2.1. Penggunaan kombinasi probiotik dari bakteri lain agar mendapatkan hasil atau efek yang lebih maksimal dan efektif.
- 5.2.2. Perlunya pemeriksaan tanda-tanda klinis setelah induksi dan setelah pemberian terapi.

- 5.2.3. Perlu pemeriksaan parameter lain untuk membandingkan rasio antara sitokin pro inflamasi dan anti inflamasi
- 5.2.4. Menilai bioavailabilitas dan keberhasilan kolonisasi bakteri.
- 5.2.5. Pemberian terapi dalam waktu yang tidak terlalu singkat.

## DAFTAR PUSTAKA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2019). *Basic Immunology E-Book: Functions and Disorders of the Immune System*. Elsevier Health Sciences.
- Abraham, B. P., & Quigley, E. M. M. (2017). Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Clinics*, *46*(4), 769–782.
- Anjum, N., Maqsood, S., Masud, T., Ahmad, A., Sohail, A., & Momin, A. (2014). Lactobacillus acidophilus: characterization of the species and application in food production. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*(9), 1241–1251. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.621169>
- Bábíčková, J., Tothova, L., Lengyelová, E., Bartoňová, A., Hodosy, J., Gardlík, R., & Celec, P. (2015). Sex Differences in Experimentally Induced Colitis in Mice: a Role for Estrogens. *Inflammation*, *38*. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0180-7>
- Bassaganya-Riera, J., Viladomiu, M., Pedragosa, M., De Simone, C., & Hontecillas, R. (2012). Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PloS One*, *7*(4), e34676.
- Biagioli, M., Laghi, L., Carino, A., Cipriani, S., Distrutti, E., Marchianò, S., Parolin, C., Scarpelli, P., Vitali, B., & Fiorucci, S. (2017). Metabolic Variability of a Multispecies Probiotic Preparation Impacts on the Anti-inflammatory Activity. *Frontiers in Pharmacology*, *8*, 505. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00505>
- Chassaing, B., Aitken, J. D., Malleshappa, M., & Vijay-Kumar, M. (2014). Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Current Protocols in Immunology*, *104*, 15.25.1-15.25.14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1525s104>
- Chen, L., Zou, Y., Peng, J., Lu, F., Yin, Y., Li, F., & Yang, J. (2015). *Lactobacillus acidophilus* Suppresses Colitis-Associated Activation of the IL-23/Th17 Axis. *Journal of Immunology Research*, *2015*, 909514. <https://doi.org/10.1155/2015/909514>
- Cremon, C., Barbaro, M. R., Ventura, M., & Barbara, G. (2018). Pre- and probiotic overview. *Current Opinion in Pharmacology*, *43*, 87–92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2018.08.010>
- Curkovic, I., Egbring, M., & Kullak-Ublick, G. A. (2013). Risks of inflammatory bowel disease treatment with glucocorticosteroids and aminosalicylates.

- Digestive Diseases (Basel, Switzerland)*, 31(3–4), 368–373.  
<https://doi.org/10.1159/000354699>
- Gajendran, M., Loganathan, P., Jimenez, G., Catinella, A. P., Ng, N., Umopathy, C., Ziade, N., & Hashash, J. G. (2019). A comprehensive review and update on ulcerative colitis,. *Disease-a-Month*, 65(12), 100851.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2019.02.004>
- Gálvez, J. (2014). Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD. *ISRN Inflammation*, 2014, 928461. <https://doi.org/10.1155/2014/928461>
- Guan, Q. (2019). A comprehensive review and update on the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of Immunology Research*, 2019.
- Harbord, M., Eliakim, R., Bettenworth, D., Karmiris, K., Katsanos, K., Kopylov, U., Kucharzik, T., Molnár, T., Raine, T., & Sebastian, S. (2017). Third European evidence-based consensus on diagnosis and management of ulcerative colitis. Part 2: current management. *Journal of Crohn's and Colitis*, 11(7), 769–784.
- Hegazy, S. K., & El-Bedewy, M. M. (2010). Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ b activation in ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 16(33), 4145–4151.  
<https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i33.4145>
- Hohenberger, M., Cardwell, L. A., Oussedik, E., & Feldman, S. R. (2018). Interleukin-17 inhibition: role in psoriasis and inflammatory bowel disease. *Journal of Dermatological Treatment*, 29(1), 13–18.
- Hoover, D. G. (2014). *Bifidobacterium* (C. A. Batt & M. L. B. T.-E. of F. M. (Second E. Tortorello (eds.); pp. 216–222). Academic Press.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00033-1>
- Jakubczyk, D., Leszczyńska, K., & Górska, S. (2020). The Effectiveness of Probiotics in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease (IBD)-A Critical Review. *Nutrients*, 12(7), 1973.  
<https://doi.org/10.3390/nu12071973>
- Javed, N. H., Alsahly, M. B., & Khubchandani, J. (2016). Oral Feeding of Probiotic *Bifidobacterium infantis*: Colonic Morphological Changes in Rat Model of TNBS-Induced Colitis. *Scientifica*, 2016, 9572596.  
<https://doi.org/10.1155/2016/9572596>
- Lee, S. H., Kwon, J. E., & Cho, M.-L. (2018). Immunological pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Intestinal Research*, 16(1), 26–42.  
<https://doi.org/10.5217/ir.2018.16.1.26>

- Martin, J., Berioui, G., & Josien, R. (2016). Dextran Sulfate Sodium (DSS)-Induced Acute Colitis in the Rat. *Methods in Molecular Biology*, 1371, 197–203. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3139-2\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3139-2_12)
- Mizoguchi, A. (2012). Animal Models of Inflammatory Bowel Disease. In P. M. B. T.-P. in M. B. and T. S. Conn (Ed.), *Animal Models of Molecular Pathology* (Vol. 105, pp. 263–320). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394596-9.00009-3>
- Moein, S., Vaghari-Tabari, M., Qujeq, D., Majidinia, M., Nabavi, S. M., & Yousefi, B. (2019). MiRNAs and inflammatory bowel disease: An interesting new story. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 3277–3293.
- Ng, W. K., Wong, S. H., & Ng, S. C. (2016). Changing epidemiological trends of inflammatory bowel disease in Asia. *Intestinal Research*, 14(2), 111–119. <https://doi.org/10.5217/ir.2016.14.2.111>
- Perše, M., & Cerar, A. (2012). Dextran sodium sulphate colitis mouse model: Traps and tricks. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012(May 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/718617>
- Peyrin-Biroulet, L., Germain, A., Patel, A. S., & Lindsay, J. O. (2016). Systematic review: outcomes and post-operative complications following colectomy for ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 44(8), 807–816. <https://doi.org/10.1111/apt.13763>
- Putri, A. A., Erina, E., & Fakhrurrazi, F. (2018). Isolasi Bakteri Asam Laktat Genus Lactobacillus dari Feses Rusa Sambar (*Cervus unicolor*). *JURNAL ILMIAH MAHASISWA VETERINER*, 2(2), 170–176.
- Quigley, E. M. M. (2019). Prebiotics and probiotics in digestive health. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 17(2), 333–344.
- Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A., & Hutkins, R. (2018). Probiotics for human use. *Nutrition Bulletin*, 43(3), 212–225.
- Sasaki, M., & Klapproth, J.-M. A. (2012). The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *Journal of Signal Transduction*, 2012.
- Shigwedha, N. (2013). *Bifidobacterium in Human GI Tract: Screening, Isolation, Survival and Growth Kinetics in Simulated Gastrointestinal Conditions* (L. J. E.-M. Kongo (ed.); p. Ch. 12). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/50457>
- Tang, C., Kakuta, S., Shimizu, K., Kadoki, M., Kamiya, T., Shimazu, T., Kubo, S., Saijo, S., Ishigame, H., Nakae, S., & Iwakura, Y. (2018). Suppression of IL-17F, but not of IL-17A, provides protection against colitis by

- inducing Treg cells through modification of the intestinal microbiota. *Nature Immunology*, *19*(7), 755–765. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0134-y>
- Wang, Y., Xie, Q., Zhang, Y., Ma, W., Ning, K., Xiang, J.-Y., Cui, J., & Xiang, H. (2020). Combination of probiotics with different functions alleviate DSS-induced colitis by regulating intestinal microbiota, IL-10, and barrier function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(1), 335–349. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10259-6>
- Williams, C., Panaccione, R., Ghosh, S., & Rioux, K. (2011). Optimizing clinical use of mesalazine (5-aminosalicylic acid) in inflammatory bowel disease. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *4*(4), 237–248. <https://doi.org/10.1177/1756283X11405250>
- Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology 2000*, *69*(1), 142–159. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>
- Zuo, L., Yuan, K.-T., Yu, L., Meng, Q.-H., Chung, P. C.-K., & Yang, D.-H. (2014a). *Bifidobacterium infantis* attenuates colitis by regulating T cell subset responses. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(48), 18316–18329. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18316>
- Zuo, L., Yuan, K. T., Yu, L., Meng, Q. H., Chung, P. C. K., & Yang, D. H. (2014b). *Bifidobacterium infantis* attenuates colitis by regulating T cell subset responses. *World Journal of Gastroenterology*, *20*(48), 18316–18329. <https://doi.org/10.3748/wjg.v20.i48.18316>