

DISERTASI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIANA
(*Coleus scutellarioides [L] Benth*) TERHADAP PROFIL HYPOXIA
INDUCIBLE FACTOR-1 ALPHA Alpha (HIF-1 α) DAN VASCULAR
ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) PADA MENCIT YANG
DIINFEKSI *S.typhi***



THEO AUDI YANTO

NIM : P0200315013

Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran

Fakultas Kedokteran

Universitas Hasanuddin

Makassar

2020

Pengaruh pemberian ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides [L] Benth*) terhadap profil Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1 α) dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada mencit yang diinfeksi *S. typhi*

DISERTASI

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh GElar Doktor Program Studi Kedokteran

Disusun dan Diajukan Oleh

THEO AUDI YANTO

P0200315013

Kepada

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

DISERTASI

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK MIANA (*COLEUS SCUTELLARIOIDES (L)BENTH*) TERHADAP PROFIL HYPOXIA-INDUCCIBLE FAKTOR-1 ALPHA (HIF-1A) DAN VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) PADA MENCIT YANG DIINFEKSI *SALMONELLA TYPHI*.

Disusun dan diajukan oleh

Theo Audi Yanto
P0200315013

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 5 Januari 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,

dr. Agussalim Bukhari, M.Med. Ph.D. Sp.GK(K)
Promotor

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D. Sp.MK(K)
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

dr. Agussalim Bukhari, M. Med. Ph.D. Sp.GK (K)

Prof. dr. Rosdjana Natzir, Ph.D. Sp.Biok
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin

Prof. dr. Budig Ph.D. Sp.M(K), M.Med.Ed

ABSTRACT

THEC AUDI YANTO. *The Effect of Miana Leaf Extract (Coleus scutellarioides (L) Benth) on Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1a) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Profiles on S.typhi-infected Mice, (Supervised by Agussalim Bukhari, Mochammad Hatta, and Rosdiana Natzir).*

The study aims to study the effect of Miana leaf extract on the mRNA expression of the HIF-1a gene, HIF-1a levels, mRNA expression of the VEGF gene, and VEGF levels, as well as its association with the amount of bacteria (bacterial load) in the blood in mice infected with S.typhi

The study was conducted using animal experimental methods with pre and post intervention test, 16 male BALB/c mice aged 12 induced 10 S.typhi peritoneally. Post-induction was intervened against 4 groups as following the negative control group obtained placebo, the positive control group obtained levofloxacin 98/KgBW, the miana leaf extract group got a dose of 714 mg/kgBW, and the miana leaf extract group and levofloxacin obtained 714 mg/KgBW of miana, and 98 mg/KgBW of levofloxacin. Examination of bacterial growth, mRNA expression of HIF-1a gene, mRNA expression of VEGF gene, HIF-1a levels is carried out on days 0, 1, 8, 15 after induction.

The results of the administration of miana leaf extract provided a suppression of bacterial load, reduced expression of the mRNA of the HIF-1a gene, levels of HIF- 1a, mRNA expression of the VEGF gene, and VEGF ($p < 0.001$) levels compared to the negative control group. The antimicrobial effect of miana leaf extract is weaker than the levofloxacin ($p < 0.001$), but the decline in mRNA expression of the HIF-1a and VEGF genes, as well as HIF-1a and VEGF levels are similar to the effects of levofloxacin administration. The result of the administration of miana leaf extract along with levofloxacin does not make a difference in effect with the levofloxacin group. There is a correlation between the growth of S.typhi bacteria with the mRNA expression of the HIF-1a gene, and VEGF, as well as HIF-1a levels, and VEGF ($R = 0.687-0.881$, $p < 0.001$). There is a correlation between the mRNA expression of the HIF-1a gene and VEGF ($R = 0.792$, $p < 0.001$) and the correlation between HIF-1a and VEGF levels ($R = 0.746$, $p < 0.001$). There is a potential antimicrobial effect of miana leaf extract in vivo in animal model, BALB/c against peritoneal S.typhi infection, and the regulatory effect of inflammatory responses in the HIF-1a - VEGF pathway.

Keywords: Salmonella typhi, Miana Leaf Extract, HIF-1a MRNA Expression, HIF-1a Levels, VEGF MRNA Expression, VEGF Levels, Bacterial Load



ABSTRAK

THEO AUDI YANTO. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Miana (*Coleus Scutellarioides* [L] Benth) terhadap Profil Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1 α) dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada Mencit yang Diinfeksi *S. Typhi* (dibimbing oleh Agussalim Bukhari, Mochammad Hatta, dan Rosdiana Natzir).

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh efek ekstrak daun miana terhadap ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, dan kadar VEGF, serta hubungannya dengan jumlah bakteri (*bacterial load*) di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *S. typhi*. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan hewan coba, 16 ekor mencit BALB/c jantan usia 12 diinduksi 10^3 *S. typhi* secara peritoneal. Pascainduksi dilakukan intervensi terhadap 4 kelompok, yaitu kelompok kontrol negatif mendapatkan *placebo*, kelompok kontrol positif mendapatkan *levofloxacin* 98/KGBB, kelompok ekstrak daun miana mendapatkan dosis 714 mg/kgBB, dan kelompok ekstrak daun miana dan *levofloxacin* mendapatkan 714 mg/kgBB miana, dan 98 mg/kgBB *levofloxacin*. Pemeriksaan pertumbuhan bakteri, ekspresi mRNA gen HIF-1, ekspresi mRNA gen VEGF, kadar HIF-1 α dilakukan pada hari 0, 1, 8, 15 setelah dilakukan induksi.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun miana memberikan penurunan pertumbuhan bakteri, penurunan ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, dan kadar VEGF ($p < 0,001$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Efek antimikroba ekstrak daun miana lebih lemah dibandingkan dengan pemberian *levofloxacin* ($p < 0,001$). Namun, penurunan ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan VEGF, serta kadar HIF-1 α dan VEGF sama dengan efek pemberian *levofloxacin*. Hasil pemberian ekstrak daun miana bersama dengan *levofloxacin* tidak memberikan perbedaan efek dengan pemberian *levofloxacin* saja. Terdapat korelasi antara pertumbuhan bakteri *S. typhi* dengan ekspresi mRNA gen HIF-1 α , dan VEGF, serta kadar HIF-1 α , dan VEGF ($R = 0,687 - 0,861$, $p < 0,001$). Terdapat korelasi antara ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan VEGF ($R = 0,792$, $p < 0,001$) dan korelasi antara kadar HIF-1 α dan VEGF ($R = 0,946$, $p < 0,001$). Didapatkan potensi efek antimikroba dari ekstrak daun miana secara *in vivo* pada hewan coba mencit BALB/c terhadap infeksi *S. typhi* secara peritoneal, dan pengaruh regulasi respon inflamasi di dalam jalur HIF-1 α -VEGF.

Kata kunci: salmonella typhi, ekstrak daun miana, ekspresi mRNA Gen HIF-1 α , Kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, kadar VEGF, *bacterial load*





KEMENTERIAN PENDIDIKAN DAN KEBUDAYAAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN

Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Theo Audi Yanto
NIM : P02003150113
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Pengaruh Pemberian Ekstrak Miana (Coleus Scutellarioides) (L) Benth terhadap Profil Hypoxia-Inducible Faktor-1 Alpha (HIF-1 α) dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada Mencit yang Diinfeksi Salmonella Typhi.

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri.

Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 25 Januari 2021

Yang menyatakan,



Theo Audi Yanto

Abstrak

THEO AUDI YANTO. Pengaruh pemberian ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) terhadap profil *Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha* (HIF-1 α) dan *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) pada mencit yang diinfeksi *S.typhi*.

Penelitian ini bertujuan mempelajari pengaruh efek ekstrak daun Miana terhadap ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, dan kadar VEGF, serta hubungannya dengan jumlah bakteri (*bacterial load*) di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental menggunakan hewan coba, 16 ekor mencit BALB/c jantan usia 12 diinduksi 10³ *S.typhi* secara peritoneal. Pasca induksi dilakukan intervensi terhadap 4 kelompok sebagai berikut kelompok kontrol negatif mendapatkan placebo, kelompok kontrol positif mendapatkan levofloxacin 98/kgBB, kelompok ekstrak daun miana mendapatkan dosis 714 mg/kgBB, dan kelompok ekstrak daun miana dan levofloxacin mendapatkan 714 mg/kgBB miana, dan 98 mg/kgBB levofloxacin. Pemeriksaan pertumbuhan bakteri, ekspresi mRNA gen HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, kadar HIF-1 α dilakukan pada hari 0, 1, 8, 15 setelah dilakukan induksi.

Hasil pemberian ekstrak daun miana memberikan penurunan pertumbuhan bakteri, penurunan ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, dan kadar VEGF ($p < 0,001$) dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Efek antimikroba ekstrak daun miana lebih lemah dibandingkan pemberian levofloxacin ($p < 0,001$), namun penurunan ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan VEGF, serta kadar HIF-1 α dan VEGF sama dengan efek pemberian levofloxacin. Hasil pemberian ekstrak daun miana bersama dengan levofloxacin tidak memberikan perbedaan efek dengan pemberian levofloxacin saja. Terdapat korelasi antara pertumbuhan bakteri *S.typhi* dengan ekspresi mRNA gen HIF-1 α , dan VEGF, serta kadar HIF-1 α , dan VEGF ($R=0,687-0,861$, $p < 0,001$). Terdapat korelasi antara ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan VEGF ($R=0,792$, $p < 0,001$) dan korelasi antara kadar HIF-1 α dan VEGF ($R=0,946$, $p < 0,001$)

Didapatkan potensi efek antimikroba dari ekstrak daun miana secara in vivo pada hewan coba mencit BALB/c terhadap infeksi *S.typhi* secara peritoneal, dan pengaruh regulasi respon inflamasi di dalam jalur HIF-1 α - VEGF.

Kata kunci: *Salmonella typhi*, Ekstrak Daun Miana, Ekspresi mRNA Gen HIF-1 α , Kadar HIF-1 α , Ekspresi mRNA Gen VEGF, Kadar VEGF, *Bacterial Load*

ABSTRACT

THEO AUDI YANTO. Effect of Miana leaf extract (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) on Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1 α) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) profiles on *S.typhi*-infected mice.

The study aims to study the effect of Miana leaf extract on the mRNA expression of the HIF-1 α gene, HIF-1 α levels, mRNA expression of the VEGF gene, and VEGF levels, as well as its association with the amount of bacteria (bacterial load) in the blood in mice infected with *S.typhi*

The study was conducted using experimental animal methods with pre-and post-intervention tests, 16 male BALB/c mice aged 12 induced 10³ *S.typhi* peritoneally. Post-induction was intervened against 4 groups as following the negative control group obtained placebo, the positive control group received levofloxacin 98/kgBB, the miana leaf extract group got a dose of 714 mg/kgBB, and the miana leaf extract group and levofloxacin obtained 714 mg/kgBB of miana, and 98 mg/kgBB of levofloxacin. Examination of bacterial growth, mRNA expression of HIF-1 α gene, mRNA expression of VEGF gene, HIF-1 α levels is carried out on days 0, 1, 8, 15 after induction.

The results of the administration of miana leaf extract provided a suppression of bacterial load, reduced expression of the MRNA of the HIF-1 α gene, levels of HIF-1 α , mRNA expression of the VEGF gene, and VEGF (p<0.001) levels compared to the negative control group. The antimicrobial effect of miana leaf extract is weaker than the levofloxacin (p<0.001), but the decline in mRNA expression of the HIF-1 α and VEGF genes, as well as HIF-1 α and VEGF levels are similar to the effects of levofloxacin administration. The result of the administration of miana leaf extract along with levofloxacin does not make a difference in effect with the levofloxacin group. There is a correlation between the growth of *S.typhi* bacteria with the mRNA expression of the HIF-1 α gene, VEGF, HIF-1 α levels, and VEGF (R=0.687-0.861, p<0.001). There is a correlation between the mRNA expression of the HIF-1 α gene and VEGF (R=0.792, p<0.001) and the correlation between HIF-1 α and VEGF levels (R=0.946, p<0.001)

There is a potential antimicrobial effect of miana leaf extract in vivo in animal model, BALB/c against peritoneal *S.typhi* infection, and the regulatory effect of inflammatory responses in the HIF-1 α - VEGF pathway.

Keywords: *Salmonella typhi*, Miana Leaf Extract, HIF-1 α mRNA Expression, HIF-1 α Levels, VEGF mRNA Expression, VEGF Levels, Bacterial Load

DISERTASI

Pengaruh pemberian ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides [L.] Benth*) terhadap profil Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-1 α) dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada mencit yang diinfeksi *S.typhi*

Disusun oleh

Theo Audi Yanto

NIM : P0200315013

Diusulkan di depan Tim Pembimbing dan Penguji pada tanggal, 19 Juni 2020

Menyetujui

Tim Promotor,

dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)

Promotor

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)

Ko-promotor

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok

Ko-promotor

Ketua Program Studi Doktor/S3 Ilmu Kedokteran, Sekolah Pasca Sarjana UNHAS

dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK (K)

Daftar Isi

Abstrak	2
DISERTASI	8
Daftar Isi	9
Daftar Ilustrasi	14
Daftar Tabel	16
Daftar Istilah	18
Pendahuluan	21
1.1. Latar Belakang	23
Rumusan Masalah	27
1.2. Tujuan Penelitian	27
Tujuan Umum	27
Tujuan Khusus	27
1.3. Manfaat Penelitian	29
Manfaat dari Segi Keilmuan	29
Manfaat dari Segi Klinis	29
2. Tinjauan Pustaka	30
2.1. Definisi DT	30
2.2. Sejarah DT	30
2.3. Epidemiologi DT	30
2.4. Taksonomi DT	31
2.5. Karakteristik <i>S.typhi</i>	32
2.6. Patogenisitas <i>S.typhi</i>	32
2.7. Sistem Imunitas terhadap infeksi	38
2.8. Patogenesis <i>S.typhi</i>	42
2.9. Sistem imun terhadap infeksi <i>S. typhi</i>	45
2.10. Manifestasi Klinis DT	48
2.11. Diagnosis DT	50

2.12.	Komplikasi DT	58
2.13.	Penatalaksanaan DT.....	59
2.14.	Resistensi Antibiotika Pengobatan DT	60
2.15.	Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α)	61
2.16.	Peranan HIF-1 α dalam infeksi bakteri	67
2.17.	Potensi HIF sebagai biomarker dan terapi.....	69
2.18.	Vascular endothelial growth factor (VEGF)	71
2.19.	Fungsi VEGF.....	75
2.20.	Peranan VEGF dalam Infeksi	75
2.21.	Daun Miana (<i>Coleus scutellaroides</i> [L] Benth).....	78
2.22.	Efek terapeutik Ekstrak Daun Miana (EDM) dalam penyakit infeksi	81
2.23.	Efek terapeutik ekstrak Daun Miana dalam infeksi <i>S.typhi</i>	83
2.24.	Efek Flavonoid Terhadap HIF-1 α dan VEGF	84
2.25.	Mencit BALB/c	86
2.26.	Model infeksi <i>S.typhi</i>	86
2.27.	Pemeriksaan ekspresi gen.....	86
2.28.	Metode ELISA.....	90
3.	Kerangka Teori	93
3.1.	Kerangka Konsep	94
3.2.	Variabel penelitian.....	94
a.	Definisi operasional.....	95
b.	Hipotesis Penelitian	96
4.	Metode Penelitian	98
4.1.	Desain penelitian	98
a.	Waktu dan lokasi penelitian.....	98
b.	Subjek penelitian.....	98
4.4	Bahan Penelitian.....	99
	Ekstraksi Daun Miana.....	100
	Induksi <i>S.typhi</i>	101
	Pemberian Levofloksasin	102
	Perlakuan Subjek Penelitian.....	102

Pembagian Kelompok Penelitian	102
Pengambilan sampel darah	103
4.5. Protokol studi	103
Pengukuran ekspresi mRNA gen HIF-1 α	104
Cara Pemeriksaan <i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i> (ELISA) untuk Protein HIF-1 dan VEGF	108
Pengukuran <i>Bacterial load</i>	109
4.6 Analisa Statistik	111
Alur Penelitian	114
5. Hasil Penelitian	115
Induksi Model Mencit Diinfeksi S. typhi	115
Hasil Pemeriksaan Variabel <i>Bacterial load</i> , Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, Ekspresi gen VEGF dan Kadar VEGF Sebelum Dilakukan Induksi <i>S.Typhi</i> (Hari 0)	116
Hasil Variabel <i>Bacterial load</i> , Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, Ekspresi gen VEGF dan Kadar VEGF setelah induksi <i>S. typhi</i> (Hari 1)	117
Hasil Variabel <i>Bacterial load</i> , Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, Ekspresi mRNA gen VEGF dan Kadar VEGF Setelah Masa Perlakuan (Hari 8)	119
Hasil variabel <i>Bacterial load</i> , Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, Ekspresi mRNA gen VEGF dan Kadar VEGF pada pasca perlakuan (H 15)	120
Hasil Variabel <i>Bacterial Load S. typhi</i>	121
Hasil <i>Bacterial Load</i> Sebelum Induksi (H 0) dan Setelah Induksi <i>S.typhi</i> (H 1)	121
<i>Bacterial load</i> setelah masa perlakuan penelitian (H 8)	123
<i>Bacterial load</i> masa pasca perlakuan penelitian (H 15)	124
Analisa Variabel ekspresi mRNA Gen HIF-1α	126
Ekspresi mRNA gen HIF-1a Sebelum (H0) dan Setelah Induksi <i>S.Typhi</i> (H1)	126
Ekspresi mRNA gen HIF-1a sebelum perlakuan dan setelah perlakuan	128
Ekspresi mRNA gen HIF-1a masa perlakuan (Hari 8) dan pasca perlakuan (Hari 15)	130
Profil Ekspresi mRNA Gen HIF-1a Selama Masa Penelitian Mulai Dari Induksi Hingga Masa Pasca Perlakuan	131
Ekspresi mRNA HIF-1a pada Sebelum Induksi (H 0) dan Pasca Perlakuan (H15)	134
Laju Penurunan Ekspresi HIF-1a Selama Masa Perlakuan dan Pasca Perlakuan	135
Hasil Variabel Kadar HIF-1a Dalam Darah	136
Kadar HIF-1a sebelum (H0) dan setelah induksi <i>S.typhi</i> (H1)	136
Kadar HIF-1a sebelum (H1) dan setelah masa perlakuan (H8)	137
Kadar HIF-1a pada masa perlakuan dan pasca perlakuan	139

Profil kadar HIF-1a selama masa penelitian mulai dari induksi hingga masa pasca perlakuan	140
Analisa <i>Post-Hoc</i>	141
Kadar HIF-1a Sebelum Infeksi (H 0) dan Pasca Perlakuan (H 15)	141
Laju Penurunan kadar HIF-1a EDM dan Kontrol Positif Selama Masa Perlakuan dan Pasca Perlakuan ...	143
Hasil Variabel Ekspresi mRNA Gen VEGF	144
Ekspresi mRNA gen VEGF sebelum induksi (H 0) dan setelah induksi (H -1)	144
Ekspresi mRNA gen VEGF sebelum (H 1) dan setelah perlakuan (H 8)	145
Ekspresi Ekspresi mRNA Gen VEGF Pada Masa Perlakuan (H8) dan Pasca Perlakuan (H 15)	147
Profil ekspresi mRNA gen VEGF Selama Masa Penelitian Mulai Dari Induksi Hingga Masa Pasca Perlakuan selama masa penelitian mulai dari induksi hingga masa pasca perlakuan	148
Ekspresi mRNA gen VEGF sebelum Infeksi (H 0) dan Pasca Perlakuan (H 15)	149
Laju Penurunan Ekspresi mRNA gen VEGF Setelah Perlakuan (H8) Sampai pada Pasca Perlakuan (H15)	150
Variabel antara : kadar solubel VEGF dalam darah	152
Kadar VEGF sebelum Induksi (H0) dan Setelah Induksi <i>S.typhi</i> (H1)	152
Kadar VEGF setelah induksi (H1) dan setelah perlakuan (H8).....	152
Hasil kadar VEGF Masa Perlakuan (H 8) dan Pasca Perlakuan (H 15)	154
Profil kadar VEGF Selama Masa Penelitian Mulai selama masa penelitian mulai dari Induksi Hingga Masa Pasca Perlakuan Induksi Hingga Masa Pasca Perlakuan	155
Kadar VEGF Pada Masa Sebelum Infeksi (H0) dan Pasca Perlakuan (H15)	157
Laju Penurunan Kadar VEGF Setelah Perlakuan (H8) Sampai Pada Pasca Perlakuan (H15).....	158
Korelasi antara pertumbuhan bakteri dan ekspresi mRNA gen HIF-a	159
6. Pembahasan	161
Pertumbuhan Bakteri <i>S.typhi</i> Setelah Dilakukan Induksi Intraperitoneal	162
Pertumbuhan Bakteri <i>S.typhi</i> Setelah Masa Perlakuan dan Pasca perlakuan	164
Efek antimikroba Miana pasca pemberian	165
Infeksi <i>S.Typhi</i> Model Induksi Peritoneal dan HIF-1a	167
Infeksi <i>S.typhi</i> Model Induksi Peritoneal dan VEGF	170
Respon HIF-1a Terhadap Pengobatan Antibiotika Levofloxacin	171
Respon VEGF Terhadap Pengobatan Levofloxacin	171
Pengaruh Ekstrak Daun Miana Terhadap HIF-1a dan Pertumbuhan Bakteri.....	172
Pengaruh Ekstrak Daun Miana Terhadap VEGF dan Pertumbuhan Bakteri	174
Pengaruh HIF-1a dan VEGF pada infeksi <i>S.typhi</i> dan Pengaruh EDM	175
7. Kesimpulan dan Saran	176

Kesimpulan..... 176
Saran 178
Referensi..... 178

|

Daftar Ilustrasi

- Gambar 2.6.1 Invasi *Salmonella* dimediasi oleh SPI-1 menuju sel non-fagositik
- Gambar 2.6.2 Eksploitasi sistem ubiquitin oleh efektor yang disekresi oleh *Salmonella*
- Gambar 2.6.3 SPI-2 berfungsi untuk kelangsungan hidup intraseluler
- Gambar 2.6.4 Kematian sel inang yang diinduksi oleh *Salmonella*
- Gambar 2.6.5 Respons nuklear yang terinduksi oleh efektor *Salmonella*
- Gambar 2.7.1 Respons imun non spesifik dan spesifik
- Gambar 2.7.2 Peranan sitokin pada imunitas non spesifik terhadap mikroba yang memproduksi LPS
- Gambar 2.8.1 Infeksi *Salmonella* di epitel usus
- Gambar 2.8.2 Proses *S.typhi* menginvasi dan berdiseminasi
- Gambar 2.9.1 *Salmonella enterica* dan induksi respons imun
- Gambar 2.15.1 Regulasi protein HIF-1 α oleh hidrosilasi prolyl dan degradasi proteosomal
- Gambar 2.15.2 Aksis PHD-VHL-HIF
- Gambar 2.15.3 HIF- α pada kanker
- Gambar 2.16.1 Kategorisasi fungsional dari aktivasi HIF-1 pada infeksi
- Gambar 2.16.2 Interaksi antara patogen dan sel inang terhadap aktivasi HIF-1
- Gambar 2.16.3 Model regulasi transkripsi HIF-1 α di dalam fagosit
- Gambar 2.18.1 Isoform VEGF dan interaksinya dengan reseptor VEGF

- Gambar 2.18.2 Peranan reseptor VEGF dalam beberapa tipe sel.
- Gambar 2.20.1. Respons Penghambatan jalur VEGF pada infeksi tuberculosis
- Gambar 2.21.1 Tanaman Miana (*Coleus scutellaroides* (L) Benth)
- Gambar 3.1 Kerangka teori
- Gambar 3.2 Kerangka konsep
- Gambar 5.1 Pertumbuhan *S.typhi* dari cairan peritoneum pada berbagai kelompok perlakuan selama masa eksperimen
- Gambar 5.2. Ekspresi mRNA gen HIF-1a selama masa penelitian

Daftar Tabel

- Tabel 5.1. Hasil Pemeriksaan Variabel Bacterial load, Ekspresi mRNA gen HIF-1a, kadar HIF-1a, Ekspresi Gen VEGF dan Kadar VEGF Sebelum Dilakukan Induksi ~~sebelum induksi~~ S. Typhi (Hari typhi antar kelompok perlakuan pada hari 0)
- Tabel 5.2. Pemeriksaan Variabel Bacterial load, Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, ekspresi mRNA gen VEGF dan Kadar VEGF Setelah Dilakukan Induksi ~~variabel terikat setelah dilakukan induksi~~ S.typhi Antar Kelompok Perlakuan (Hari antar kelompok perlakuan pada hari 1)
- Tabel 5.3. Pemeriksaan Variabel Bacterial load, Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, Ekspresi mRNA gen VEGF dan Kadar VEGF Setelah Dilakukan Perlakuan Antar Kelompok Perlakuan (Hari 8)
- Tabel 5.4. Pemeriksaan Variabel Bacterial load, Ekspresi mRNA gen HIF-1a, Kadar HIF-1a, Ekspresi mRNA gen VEGF dan Kadar VEGF setelah 1 minggu setelah dilakukan perlakuan (Hari 15)
- Tabel 5.5. Bacterial load S. Typhi pada Berbagai Kelompok Perlakuan Selama Masa Eksperimen
- Tabel 5.6. Analisa Crosstab pertumbuhan bakteri setelah masa perlakuan
- Tabel 5.7 Ekspresi mRNA gen HIF-1a Sebelum (H0) dan Setelah induksi S.Typhi (H1)
- Tabel 5.8. Ekspresi mRNA gen HIF-1a sebelum perlakuan (H1) dan setelah perlakuan (H8)
- Tabel 5.9. Analisa Post Hoc Perbedaan Ekspresi mRNA gen HIF-1a Sebelum Perlakuan (H1) dan Setelah Perlakuan (H8) antara Kelompok
- Tabel 5.10. Ekspresi mRNA gen HIF-1a Pada Masa Perlakuan pada masa perlakuan (H8) dan Pasca Perlakuan (H15)
- Tabel 5.11. Analisa Post Hoc GLM-RM Ekspresi mRNA gen HIF-1a Selama Rentang Waktu Penelitian Antara Kelompok Perlakuan
- Tabel 5.12. Ekspresi mRNA HIF-1a pada Sebelum Induksi (H 0) dan Pasca Perlakuan (H15)
- Tabel 5.12.1. Laju Penurunan antara Ekspresi HIF-1a Kelompok EDM dan Kontrol Positif Selama Masa Perlakuan dan Pasca Perlakuan
- Tabel 5.12.2. Laju Penurunan antara Ekspresi HIF-1a Kelompok EDM+Levofloxacin dan Kontrol Positif Selama Masa Perlakuan dan Pasca Perlakuan
- Tabel 5.12.3 Kadar HIF-1a sebelum (H0) dan setelah (H1) dilakukan induksi S.typhi
- Tabel 5.13. Kadar HIF-1a Sebelum (H1) dan Setelah Masa Perlakuan (H8)
- Tabel 5.14. Analisa post hoc selisih rerata kadar HIF-1a sebelum (H1) dan setelah (H8) diberikan perlakuan
- Tabel 5.15. kadar HIF 1a pada masa perlakuan (H 8) dan pasca perlakuan (H 15)

Commented [a1]: Bacterial Load, Ekspresi mRNA, kadar.....sebelum induksi.....

Tabel 5.16. Analisa post hoc GLM RM HIF 1a selama masa penelitian

Tabel 5.17. Kadar HIF 1a sebelum infeksi (H 0) dan pasca perlakuan (H 15)

Tabel 5.17.1. Laju Penurunan kadar HIF-1a Antara EDM dan Kontrol Positif Selama Masa Perlakuan dan Pasca Perlakuan

Tabel 5.17.2. Laju Penurunan kadar HIF-1a Antara EDM+Levofloxacin dan Kontrol Positif Selama Masa Perlakuan dan Pasca Perlakuan

Tabel 5.18. Ekspresi mRNA Gen Pada Sebelum Induksi S.typhi (H0) dan Setelah Induksi S. typhi (H 1)

Tabel 5.19. Ekspresi mRNA Gen VEGF Sebelum (H 1) dan Setelah Perlakuan (H 8)

Tabel 5.20. Analisa post hoc ekspresi mRNA gen VEGF sebelum (H1) dan sesudah perlakuan (H8)

Tabel 5.21. Ekspresi mRNA gen VEGF pada Masa Perlakuan (H8) dan Pasca Perlakuan (H15)

Tabel 5.23. Ekspresi mRNA Gen VEGF Sebelum Infeksi (H0) dan Pasca Perlakuan (H 15)

Tabel 23.1 Laju Penurunan Ekspresi mRNA gen VEGF antara EDM dan Kontrol Positif

Tabel 5.23.2. Laju Penurunan Ekspresi mRNA gen VEGF antara EDM + Levofloxacin dan Kontrol Positif

Tabel 5.25. Kadar VEGF sebelum perlakuan (H1) dan setelah perlakuan (H8)

Tabel 5.26. Analisa post hoc Kadar VEGF Sebelum sebelum (H1) dan Setelah Masa Perlakuan (H8)

Tabel 5.27. Kadar VEGF pada masa perlakuan (H8) dan pasca perlakuan H15

Tabel 5.28. Analisa post hoc trend kadar VEGF

Tabel 5.29. Kadar VEGF pada sebelum infeksi S.typhi (H0) dan pasca perlakuan (H15)

Tabel 5.29.1. Laju Penurunan Kadar VEGF antara Kelompok EDM dan Kontrol Positif

Tabel 5.29.2. Laju Penurunan Kadar VEGF antara Kelompok EDM+Levofloxacin dan Kelompok Kontrol Positif

Tabel 5.30. Uji korelasi antara variabel Bacterial Load, Ekspresi HIF-1a, kadar HIF-1a, Ekspresi VEGF, dan Kadar VEGF

Daftar Istilah

Abl	: <i>Abelson tyrosine kinase</i>
Ang2	: <i>Angiopoietin-2</i>
bFGF	: <i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
ATR	: <i>Acid tolerance response</i>
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
CFR	: <i>Case Fatality Rate</i>
COX	: <i>Cyclo-oxygenase</i>
DAMP	: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DT	: <i>Demam Tifoid</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EDM	: <i>Ekstrak daun miana</i>
FAK	: <i>Focal adhesion kinase</i>
MOB	: <i>Homoisoflavone-type methyl ophiopogonanone B</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMAPII	: <i>Endothelial monocyte activating peptide II</i>
EPO	: <i>Erythropoietin</i>
FGF	: <i>Fibroblasts growth factor</i>
FH	: <i>Fumarate hydratase</i>
Flt	: <i>fms-like-tyrosine kinase</i>
H58	: <i>Halotype 58</i>
HIF-1 α	: <i>Hypoxia inducible factor-1alpha</i>
hMDM	: <i>Human monocyte derived macrophages</i>
HMGB 1	: <i>High mobility group box 1</i>

HRE	: <i>Hypoxia-responsive enhancer elements</i>
IFN	: Interferon
IGF-1	: <i>Insulin-like growth factor 1</i>
IKK	: <i>IkappaB kinases</i>
IL	: Interleukin
iNOS	: <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
kD	: kilodalton
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
M cells	: <i>Microfold cells</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDR	: <i>Multidrug resistance</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
MODS	: <i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>
mRNA	: <i>Messenger ribonucleic acid</i>
NFkB	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
NOS	: <i>Nitric oxide synthase</i>
NPV	: <i>Negative predictive value</i>
PAS	: <i>Family of PER, AHR, ARNT and SIM</i>
PCO2	: <i>Partial pressure of carbon dioxide</i>
ODDD	: <i>O₂-dependent degradation domain</i>
PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PGE2	: <i>Prostaglandin E2</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>

PHD	: <i>Prolyl hydroxylase-domain</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear</i>
PO2	: <i>Partial pressure of oxygen</i>
PPV	: <i>Positive predictive value</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
pVHL	: <i>von-Hippel Lindau tumor suppressor gene</i>
RAGE:	: <i>Receptor for advanced glycation end</i>
RES	: <i>Reticuloendothelial system</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
RPM	: <i>Revolutions per minute</i>
RTK	: <i>Receptor tyrosine kinase</i>
CXCL	: <i>Chemokine ligand</i>
<i>S. typhi</i>	: <i>Salmonella typhi</i>
SCV	: <i>Salmonella containing vacuole</i>
SPI	: <i>Salmonella Pathogenicity Island</i>
TCA	: <i>Tricarboxylic</i>
TLR	: <i>Toll-like receptor</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
TTSS	: <i>Type Three Secretion System</i>
USDA	: <i>United States Department of Agriculture</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa bahwa atas restu dan karunia-Nya sehingga penyusunan disertasi dengan judul “Pengaruh pemberian ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) terhadap profil *Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha* (HIF-1a) dan Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) pada mencit yang diinfeksi *S.typhi*” dapat terselesaikan dengan baik dan lancar. Penulis menyadari sepenuhnya disertasi ini dapat diselesaikan berkat bantuan, bimbingan, arahan, saran, koreksi dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin menghanturkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K), selaku promotor yang dengan penuh perhatian dan kearifan senantiasa memotivasi, membuka wawasan, membimbing, mendorong dan meluangkan waktu di tengah kesibukan bagi penulis sejak awal penelitian ini hingga pada akhir penulisan disertasi ini.
2. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K), selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.
3. Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok, selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.
4. Prof. Dr. dr. F. X. Budhianto Suhadi, MS selaku penguji yang sangat berkompeten dibidangnya yang telah memberikan ide-ide sejak awal penelitian dan menyediakan sarana dan prasarana untuk terlaksananya penelitian ini.
5. Dr. dr. Risna Halim, Sp.PD-KTPI, dr. Marhaen Hardjo, M.Biomed, Ph.D, dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S, dr. Firdaus Hamid, Ph.D dan Dr. dr. Burhanuddin Bahas, MS, selaku penguji yang berkompeten dibidangnya yang tidak lelah memberikan masukan, saran-saran dan nasehat yang sangat berguna bagi penyempurnaan disertasi ini.
6. Prof. Dr. Dr. dr. Eka Julianta Wahjoepramono, SpBS, PhD sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Pelita Harapan dan selaku pendukung utama yang selalu mendorong semangat untuk maju dan berprestasi baik di tingkat Nasional maupun Internasional.
7. dr. Grace Frelita, MM selaku pimpinan Siloam Hospital yang telah memberikan dukungan kepada penulis dalam masa pendidikan ini.
8. Rekan kerja sejawat dokter Penyakit Dalam di Rumah Sakit Siloam Hospital Lippo Village, terutama teruntuk dr. Andree Kurniawan, Sp.PD, dr. Nata Pratama, Sp.PD, dr. Margaret Merlyn Tjang, Sp.PD, dr. Euphemia Seto, Sp.PD, dr. Ignatius Bima Prasetya, Sp.PD, dr. Jeremia Immanuel Siregar, Sp.PD, selaku motivator dan pendukung utama terselesaikannya proses pendidikan ini.
9. Rekan sejawat program S3 teruntuk dr. Erwin Mulyawan, Sp.An-FIPM, Dr. dr. Stevent Sumantri, Sp.PD-KAI, dr. Jacobus Jeno, Sp.OG, drg. Andi Budianto, Sp.BM, dr. Pulo Raja Soaloon Banjarnahor, Sp.THT-KL dan dr. Rahmad Mulyadi, Sp.Rad(K).

10. Khusus untuk istri tercinta dr. Christina Handokom Sp. OG dan anakku tersayang Ruth Michella Lemuel yang selalu memberikan dukungan, semangat, dan doa serta pengorbanan yang sangat besar dengan penuh kesabaran dan pengertiannya mendampingi penulis menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

10. Mama dan papa tercinta, Januar Lemuel dan drg. Lydiana terus memberikan dukungan moril, doa dan semangat untuk penulis untuk menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

11. Mama dan papa mertua tersayang, dr. Handoko, SpAN dan Dr. dr. Johana Titus, SpGK yang terus memberikan dukungan moril, doa dan semangat untuk penulis untuk menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

12. Murid-murid saya tercinta, dr. Gilbert Sterling, Tanya Koleta, Sked, Claudya Susanto, Sked, Erica Widodo, Sked, Katarina Beatrice, Sked, Lovely Poppy Arief, Sked.

13. Ucapan terimakasih dan penghargaan juga disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sampaikan satu demi satu yang telah dengan tulus serta segenap hati membantu saya sejak awal hingga akhir terselesaikannya proses pendidikan dan penelitian ini. Saya juga menghaturkan maaf sebesar-besarnya apabila terdapat kesalahan dalam penyusunan disertasi ini. Semoga Disertasi ini dapat dijadikan panduan dan bermafaat bagi banyak orang.

Tangerang, 5 Januari 2020,



Theo Audi Yanto

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Demam Tifoid (DT) merupakan infeksi enterik yang disebabkan oleh bakteri *Salmonella enterica* serovar *Typhi* (*S.typhi*). Manusia dapat terinfeksi oleh *S.typhi* melalui rute fekal-oral (Radhakrishnan et al., 2018). Di tahun 2017, terdapat hampir 10,924,264 kasus *S.typhi* di seluruh dunia dengan kematian sebanyak 116,841 kasus (Global Burden of Disease, 2018) melalui rute fekal-oral (Radhakrishnan et al., 2018). Di tahun 2017, terdapat hampir 10,924,264 kasus *S.typhi* di seluruh dunia dengan kematian sebanyak 116,841 kasus (Global Burden of Disease, 2018). Tahun 2018, WHO menyatakan infeksi DT berkisar 10 hingga 12 juta kasus per tahun, dan tingkat kematian berkisar 128-161.000 per tahunnya (World Health Organisation, 2018).

Sedangkan di Indonesia, insidensi DT mencapai 900,000 kasus per-tahunnya dengan morbiditas sebanyak 20,000 kasus per tahun. Kasus yang terkonfirmasi sebanyak 1000 setiap 100,000 populasi Indonesia per tahunnya (Ochiai et al., 2008). Menurut data Riset Kesehatan Dasar (RISKESDAS) pada tahun 2017, prevalensi nasional untuk DT mencapai 1.6% (0.3%-3%) (RISKESDAS, 2017).

Manifestasi klinis DT adalah demam progresif dengan tipe anak tangga, *malaise*, penurunan nafsu makan, mual, serta gangguan pencernaan seperti diare yang diikuti dengan konstipasi. Komplikasi penyakit DT dapat mengakibatkan perforasi usus halus, bakteremia, sepsis dan infeksi endovaskular, tifoid toksik disertai dengan penurunan kesadaran. DT diterapi dengan pemberian antibiotika. Terapi pilihan saat ini adalah kloramfenicol, alternatifnya adalah ampisilin, ceftriaxone~~seftriakson~~, ciprofloxacin dan levofloxacin. (Paul, et al.2017)

Permasalahan penanganan DT adalah resistensi antibiotika terhadap bakteri *S.typhi*. Sebuah studi di Indonesia menemukan peningkatan tren resistensi bakteri terhadap ampisillin, kloramfenikol, kotrimoksazol dan juga ciprofloxacin (Hatta et al., 2008). Resistensi juga terjadi pada golongan

Commented [TAYL2]: Semua demam typhoid menjadi DT

Commented [TAYL3]: Ganti salmonella → s.typhi

Commented [TAYL4]: Referensi belum dimasukkan

Commented [TAYL5]: Ref belum ada di mendelley

Commented [TAYL6]: Penelitian Prof. Hatta di Sulawesi, Indonesia

Commented [TAYL7]: Kata kunci permasalahan yang ingin dipecahkan

sefalosporin generasi ketiga. Hal tersebut membuat pemberian antibiotika tidak lagi efektif karena kumannya menjadi resisten. Oleh karena itu diperlukan cara lain untuk mengatasi infeksi bakteri patogen. Antibiotika memiliki keterbatasan dalam aktivitas membunuh bakteri, maka diperlukan cara untuk memperkuat respons imunitas sebagai mekanisme pertahanan tubuh. Dalam hal ini diperlukan terapi tambahan dengan tujuan meningkatkan respons imunitas terhadap virulensi bakteri *S.typhi*, sehingga terjadi sinergi efek antibiotika dan *immunoregulator*.

S.typhi termasuk serotipe grup D sesuai dengan tipe O-antigen, tipe O9-12, fase 1 flagelin tipe H:d, dan positif untuk kapsul Vi yang membuat bakteri ini biasanya monofasik (Dougan et al., 2014). *S.typhi* dapat menempel pada sel epitel usus halus dengan bantuan 12 operon fimbriae (House et al., 2001). Patogenisitas *S.typhi* dikendalikan oleh gen *Salmonella Pathogenicity Island* (SPI-1) yang merupakan bagian dari kromosom yang mengkode protein regulator, seperti sistem sekresi tipe III (TTSS) yang mengantarkan protein efektor bakteri dari sitosol *Salmonella* menuju sel inang (Sukhan, 2000). Ketika bakteri menginvasi sel inang, maka akan terjadi proses inflamasi dan merangsang respon imunitas penjamu. Inflamasi dan infeksi akan menciptakan kondisi hipoksia lokal akibat peningkatan aktivitas metabolik dan pertumbuhan kuman, sehingga jaringan terinflamasi mengalami peningkatan suhu yang mempengaruhi kadar dan tekanan O₂ lokal yang berakibat hipoksia selular pada jaringan tersebut. (Ramakrishnan et al., 2014). Kondisi ini mengakibatkan sel mengalami stres hipoksia. Sel yang mengalami hipoksia akan merespons terhadap kondisi ekstrem ini untuk menghindari kerusakan selular lebih lanjut yang mengakibatkan kematian sel. Respons adaptif ini dikendalikan oleh sebuah faktor transkripsi yang dinamakan *hypoxia inducible factor-1a* (HIF-1 α). HIF-1 α memegang kunci penting dalam respons imun dan menjadi target terapi untuk memperkuat daya tahan sel. HIF-1 α berperan dan respons inflamasi dalam hal membantu mempertahankan homeostasis energi, peningkatan produksi eritropoietin (EPO), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang berperan dalam *angiogenesis*, serta *nitric oxide synthase* (NOS) yang menghasilkan *nitric oxide* (NO) untuk vasodilatasi sehingga terjadi peningkatan laju darah ke jaringan yang iskemik yang memperbaiki

hipoksia. (Rius et al., 2008) (Bhandari, 2014). Strategi pengobatan alternatif yang menargetkan HIF-1 α menjadi peluang untuk dapat memecahkan permasalahan ini.

Penggunaan obat herbal menjadi alternatif dan komplementer pengobatan standar. Saat ini, memang telah banyak dirasakan manfaatnya dalam pengobatan berbagai macam penyakit, termasuk penyakit infeksi. Perilaku berobat masyarakat Indonesia yang menggunakan pengobatan tradisional masih cukup banyak. Penggunaan obat-obatan antibiotika mempunyai kelemahan yaitu munculnya efek samping obat, dan resistensi. Hal ini menjadi salah satu alasan masyarakat menggunakan obat-obatan tradisional atau herbal (Ismail, 2015). Namun, bukti ilmiahnya masih kurang, terutama yang berkaitan mengenai khasiat, patofarmakologi, serta efek terapeutik pengobatan tradisional yang dibandingkan dengan penggunaan obat antibiotika.

Tanaman Miana (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) dikenal sebagai tumbuhan hias yang berasal dari Asia Tenggara. Miana memiliki daun yang beraneka ragam warna dan bentuknya, di antaranya ada varian yang berdaun merah kecoklatan ternyata memiliki khasiat dalam pengobatan. Secara empiris, masyarakat Indonesia telah menggunakan daun Miana untuk mengobati penyakit mata, wasir, bisul, demam nifas, radang telinga, abses, luka bernanah, keputihan, dan cacangan. Daun Miana mengandung flavonoid, fenolic, tanin, saponin, alkaloid, minyak astiri, dan steroid. Kandungan ini memiliki efek antibakteri, dan mempercepat penyembuhan luka yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada model hewan kelinci (Marpaung, et al, 2014). Pada penelitian *in vitro*, ekstrak Miana dapat menekan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. (Mpila et al., 2012). Selain itu, Miana juga memiliki efek anti-inflamasi dan antioksidan. Dalam penelitian *in vivo*, efek anti inflamasi terlihat dari pengaruhnya terhadap ekspresi IL-37 pada model mencit yang terinfeksi *Candida albicans*. Ekstrak daun Miana ungu mempunyai peranan dalam hal meningkatkan ekspresi IL-10, yang berperan sebagai anti-inflamasi (Amsyah et al., 2019). Dalam infeksi *S.typhi* di model mencit BALB/C, ekstrak daun Miana dapat menekan ekspresi gen m-RNA *toll-like receptor-4* (TLR-4) seperti efek yang dihasilkan oleh penggunaan antibiotika (Syamsuri et al., 2018). Tanaman Miana (*Coleus*

scutellariodes [L] Benth dikenal sebagai tumbuhan hias yang berasal dari Asia Tenggara. Miana memiliki daun yang beraneka ragam, di antaranya ada varian yang berdaun merah kecoklatan ternyata memiliki khasiat dalam pengobatan. Secara empiris, masyarakat Indonesia menggunakan daun Miana untuk mengobati penyakit mata, wasir, bisul, demam nifas, radang telinga, abses, luka bernanah, keputihan, dan cacingan. Daun Miana mengandung flavonoid, fenolic, minyak astiri dan steroid. Kandungan ini memiliki efek antibakteri, dan mempercepat penyembuhan luka yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada model hewan kelinci (Marpaung, et al, 2014). Pada penelitian *in vitro*, ekstrak Miana dapat menekan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. (Mpila et al., 2012). Selain itu, Miana juga memiliki efek anti inflamasi dan antioksidan. Pada penelitian *in vivo*, ekstrak daun Miana memiliki efek anti inflamasi dengan cara menekan ekspresi IL37 pada model mencit yang terinfeksi *Candida albicans*. Ekstrak daun Miana ungu mempunyai peranan dalam meningkatkan ekspresi IL 10, yang berperan sebagai anti inflamasi (Amsyah et al., 2019). Dalam infeksi *S.typhi* di model mencit BALB/C, ekstrak daun Miana dapat menekan ekspresi gen m-RNA *toll like receptor 4* (TLR 4) seperti efek yang dihasilkan oleh penggunaan antibiotika (Syamsuri et al., 2018).

Setelah diketahuinya kemampuan supresi beberapa regulator dan faktor respons inflamasi selular yang dipicu oleh infeksi *S.typhi* seperti IL 37, HMGB1, TLR 4 oleh ekstrak daun Miana, maka membuka peluang untuk melakukan eksplorasi lebih lanjut terhadap interaksi respons imun ditingkat molekular. Dalam hal ini kemampuan adaptasi sel menghadapi infeksi lewat aktivasi HIF-1 α yang mampu meningkatkan daya tahan selular dan meningkatkan respons imun. Selanjutnya, aktivasi VEGF akan memfasilitasi respons angiogenesis dan permeabilitas vaskular yang berguna dalam memperbaiki respons jaringan terhadap infeksi, hingga eradikasi bakteri patogen. Sampai saat ini, efek antimikroba ekstrak daun Miana belum diketahui secara menyeluruh cara kerjanya secara ditingkat molekular. Dalam hal ini, cara kerja dari ekstrak daun miana dalam ini ke jalur aktivasi HIF-1 α dan VEGF belum pernah dipelajari sebelumnya. Oleh karena itu, penelitian ini berupaya untuk mempelajari meneliti

Commented [TAYL8]: Masih bisa ditambahkan beberapa penelitian

mekanisme ~~respon molekular~~ ~~respons inflamasi~~ terhadap infeksi *S.typhi* melalui jalur aktivasi faktor transkripsi HIF-1 α dan VEGF. ~~dan efek daun Miana sebagai potensi.~~

Rumusan Masalah

1. Apakah ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides [L] Benth*) mempengaruhi ekspresi mRNA gen HIF-1 α dan kadar HIF-1 α di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi* ?
2. Apakah ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides [L] Benth*) mempengaruhi ekspresi mRNA gen ~~VEGF~~HIF-1 α dan kadar VEGF di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi* ?
3. Apakah ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , dan ekspresi mRNA gen VEGF dan VEGF di dalam darah berhubungan dengan jumlah bakteri (*bacterial load*) pada mencit yang diinfeksi *S.typhi*?

1.2. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α , ekspresi mRNA gen VEGF, dan kadar VEGF, serta hubungannya dengan jumlah bakteri (*bacterial load*) di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*

Tujuan Khusus

1. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap *bacterial load* pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*
2. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap ekspresi mRNA gen HIF-1 α pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*
3. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap kadar solubel HIF-1 α pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*

4. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap ekspresi mRNA gen VEGF pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*
5. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap kadar solubel VEGF pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*
6. Mengetahui hubungan ekspresi mRNA HIF-1 α , kadar solubel HIF-1 α , ekspresi mRNA HIF-1 α , kadar solubel VEGF dengan *bacterial load* pada mencit yang diinfeksi dengan *S.typhi*

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat dari Segi Keilmuan

1. Penelitian ini akan menambah pengetahuan mengenai efek ekstrak daun Miana terhadap infeksi *S.typhi* memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan DT untuk memberikan luaran yang lebih baik.
2. Penelitian ini juga akan mengeksplorasi mekanisme ekstrak daun Miana dalam respons infeksi melalui jalur HIF-1 α dan VEGF dalam bentuk ekspresi gen dan kadarnya dalam darah hewan model mencit.
3. Penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lainnya untuk membuka potensi ekstrak daun Miana menangani ragam penyakit infeksi lainnya dan membuka wacana potensi zat aktif yang berperan dalam memodulasi ekspresi HIF-1 α .
4. Data dalam penelitian ini dapat dipergunakan sebagai acuan keilmuan yang dapat menyokong bukti ilmiah untuk menjadikan pengobatan daun Miana sebagai obat herbal terstandar.

Manfaat dari Segi Klinis

1. Penelitian ini dapat memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan DT untuk memberikan luaran yang lebih baik.
2. Penelitian ini memberikan informasi khasiat pengobatan tradisional yang menggunakan ekstrak daun miana dan interaksinya obat antibiotika

2. Tinjauan Pustaka

2.1. Definisi DT

Demam Tifoid (DT) adalah infeksi sistemik yang disebabkan oleh *Salmonella enterica* serotipe *typhi* (*S.typhi*) (Ochiai et al., 2008). Penyakit ini ditransmisikan secara fekal-oral dan sering kali mengancam jiwa melalui beragam komplikasinya apabila tidak ditangani segera. Manusia dapat terinfeksi apabila mengonsumsi air atau makanan yang terkontaminasi atau berkontak dengan pasien yang sedang mengalami atau sudah sembuh dari DT. Selain itu, seseorang yang sudah sembuh dari DT dapat menjadi pembawa bibit (carier) untuk ~~waktu~~ jangka panjang, sehingga masih dapat menularkan orang-orang di sekitarnya (Alba S., 2016).

2.2. Sejarah DT

Salmonella pertama kali ditemukan pada tahun 1879 oleh Karl Joseph Eberth saat menemukan basilus di kelenjar getah bening abdomen dan limpa pada penyakit demam pada masa tersebut dan mengakibatkan banyak kematian. Penemuan Karl dikonfirmasi oleh Robert Koch dan asal mula nama genus *Salmonella* berasal dari nama Daniel Elmer Salmon, seorang dokter hewan dari program penelitian *United States Department of Agriculture* (USDA). Beliau memiliki asisten yang bernama Theobald smith yang pertama kali melakukan identifikasi kuman *Salmonella* ini untuk menghargai jasa mentornya, maka nama Salmon diabadikan sebagai nama genus baru ini (Marineli et al., 2013).

2.3. Epidemiologi DT

Sulit untuk memprediksikan secara pasti beban keseluruhan dari penyakit DT karena kurangnya data yang valid. Hal ini disebabkan karena keterbatasan ketersediaan data dari kultur darah, dan sulitnya

mengimplementasikan teknik pengawasan DT dalam skala besar untuk menghitung insidensinya (Crump et al., 2010).

DT merupakan penyakit yang masih menjadi sebuah masalah kesehatan terutama di negara-negara berkembang. Pada tahun 2000, diperkirakan terdapat 2,16 juta kasus DT yang terjadi di seluruh dunia yang mengakibatkan 216,000 kematian dan lebih dari 90% morbiditas dan mortalitas terjadi di Asia (Crump et al., 2004). Jumlah ini meningkat hingga menjadi 13.5 juta kasus di seluruh dunia pada tahun 2000 dengan tingkat kejadian tertinggi di Afrika dan Asia (Alba S et al., 2016). Pada tahun 2018, WHO menyatakan DT mencapai 10-12 juta kasus per tahun di dunia, dan angka kematian berkisar 128-161.000 per tahun (World Health Organisation, 2018).

Pada tahun 1981 hingga 1986, diperkirakan terdapat rata-rata 22,790 kasus pertahunnya dari rumah sakit di Indonesia dengan tingkat kematian rerata sebanyak 13.9 kasus per 100,000 populasi dengan *case fatality rate* (CFR) sebesar 2.6% (Simanjuntak, 1990). Pada tahun 1991, tingkat deteksi kasus meningkat dari 257 per 100,000 populasi menjadi 386 kasus per 100,000 populasi di tahun 2007. Data tahun 2007 menunjukkan bahwa prevalensi DT sebesar 358-810 per 100,000 populasi dengan 64% kasus terjadi pada rentang usia 3 tahun hingga 19 tahun (Hatta et al., 2008).

Commented [TAYL9]: Penelitian Prof. Hatta di Sulawesi, Indonesia

2.4. Taksonomi DT

Domain : Bakteri

Filum : Proteobakteri

Kelas : Gammaproteobakteri

Ordo : Enterobakteriales

Famili : Enterobacteriaceae

Genus : *Salmonella*

Spesies : *Salmonella enterica*

Subspesies : *Salmonella enterica enterica*

Serovar : *Salmonella enterica serovar Typhi*

Basillus gram-negatif ini termasuk dalam famili Enterobacteriaceae di mana semua Enterobacteriaceae memfermentasi glukosa, mereduksi nitrat dan negatif secara oksidasi (Ugboko et al., 2014).

2.5. Karakteristik *S.typhi*

Salmonella merupakan bakteri gram-negatif berbentuk batang, bersifat fakultatif anaerob yang termasuk dalam keluarga Enterobacteriaceae. Berdasarkan klasifikasinya, genus *Salmonella* memiliki 2 spesies yaitu *Salmonella bongori* dan *Salmonella enterica* di mana *S. enterica* memiliki lebih dari 2,500 serovars (Eng et al., 2015). [Salmonella. Enterica serovar typhi selanjutnya dikenal dengan S.typhi ini yang menjadi kuman penyebab DT.](#)

S.typhi secara serologis memiliki antigen lipopolisakarida (LPS) O9 dan O12, antigen protein flagela Hd, dan antigen kapsul polisakarida Vi yang memiliki efek protektif terhadap serum inang yang memiliki efek bakterisidal. Antigen LPS menentukan serogrup dan faktor H menentukan serotipenya (Paul et al., 2017).

2.6. Patogenisitas *S.typhi*

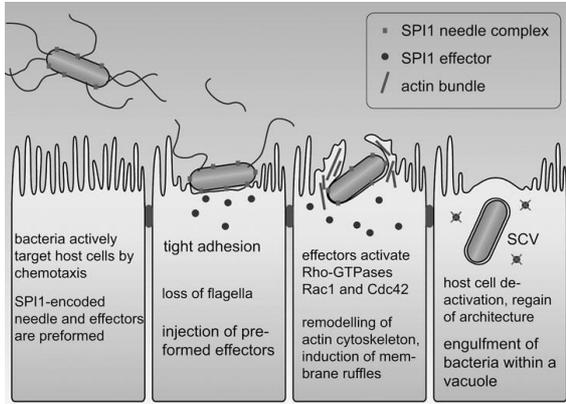
Sebagian besar dari faktor patogenisitas *S.typhi* dikode dalam *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI), fimbriae, flagela, yang salah satunya merupakan antigen vi. Gen yang mengkode faktor ini dapat

ditemukan pada plasmid virulensi (pSLT) yang lebih tepatnya berada pada operon *spv* (dos Santos et al, 2018).

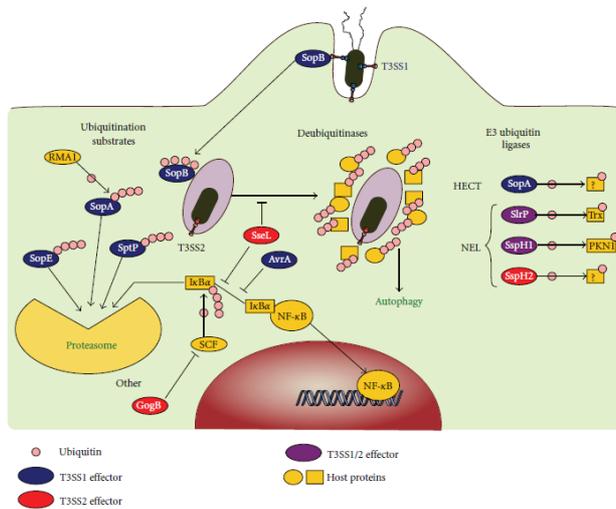
Substrat T3SS yang berperan sebagai efektor ditransport melalui injektisom seperti *flagellum* dari sitoplasma sel bakteri melalui membran dalam dan luar ke sitoplasma sel inang eukariotik (Ramos-Morales, 2012).

Terdapat lebih dari 17 SPI yang sudah ditemukan diantaranya SPI 1 dan SPI 2 memiliki peranan yang penting dalam infeksi DT. Sistem sekresi tipe 3 (T3SS) merupakan sebuah kompleks supramolekular yang tersusun di dalam membran bagian, ruang periplasmik, membran luar dari bakteri, ruang ekstraseluler dan membran sel inang eukariotik. T3SS ini merupakan molekul yang dipunyai oleh *S.typhi* untuk memasukan protein efektor ke sel inang. Protein efektor ini akan memanipulasi jalur sinyal peradangan sehingga dapat terhindar dari eliminasi sistem imun inangnya. T3SS1 yang dikode oleh SPI 1, menginvasi sel non-fagositik sehingga terjadi reorganisasi temporal dari sel sitoskeletal aktin inang dan menginduksi bakteri untuk masuk ke sel melalui makropinositosis. Efektor protein seperti *SopE*, *SopE2*, *SipA*, *SipC*, *SptP* dan *SopB* bekerja pada GTPases dari keluarga Rho sehingga memanipulasi jalur sinyal inflamasi sehingga memungkinkan *S.typhi* untuk menghindari sistem imun adaptif berkat SPI 1 (**Gambar 2.6.1**) (**Gambar 2.6.2**) (Gerlach et al., 2007).

Commented [TAYL10]: Tuliskan lebih detil dari yang literatur yang terbaru



Gambar 2.6.1. Invasi *Salmonella* dimediasi oleh SPI-1 menuju sel non-fagositik

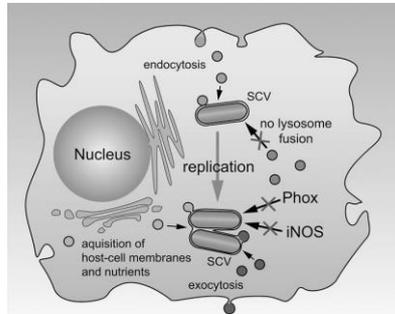


Gambar 2.6.2 Eksploitasi sistem ubiquitin oleh efektor yang disekresi oleh *Salmonella*

Efektor dari T3SS1 juga mengaktivasi jalur MAPK, memproduksi sitokin proinflamasi, rekrutmen dari sel PMN dan induksi dari inflamasi usus halus akut. Invasi *S.typhi* yang bergantung dengan T3SS1 melalui beberapa mekanisme seperti (i) pergerakan dalam lumen usus halus dengan difusi pasif dan motilitas aktif dan kemotaksis; (ii) interaksi transien dengan permukaan mukosa; (iii) ikatan reversibel ke sel target melalui adhesin; (iv) *docking* ireversibel yang dimediasi oleh T3SS1; (v) translokasi efektor bakteri melalui T3SS1; (vi) manipulasi sel inang melalui efektor sehingga munculnya *ruffles* pada membran; (vii) invasi sel inang dengan formasi dari beberapa vakol (Ramos-Morales, 2012).

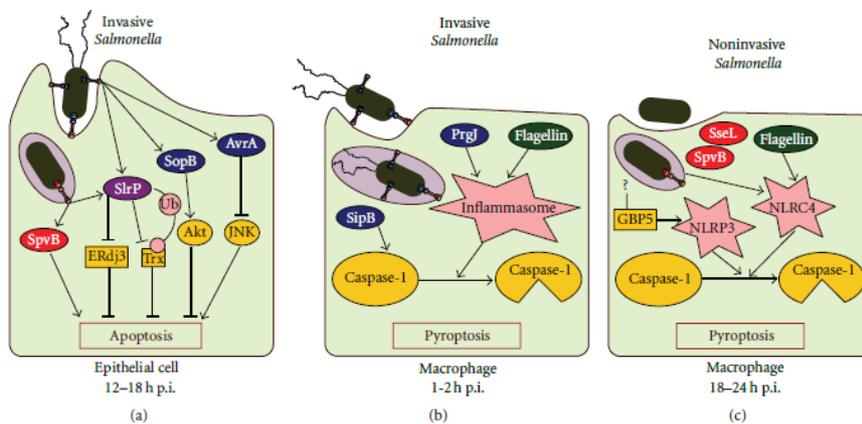
Salah satu faktor penting yang berkontribusi terhadap reorganisasi sitokeletal aktin dan masuknya *Salmonella* melalui T3SS1 adalah fosforilasi tirosin. Dua nonreseptor tirosin kinase berupa Abl (*Abelson tyrosine kinase*) dan FAK (*focal adhesion kinase*) telah ditemukan di mana fosforilasi yang dimediasi oleh Abl pada substrat CrkII yang merupakan sebuah protein adaptor dan Abi1 yang merupakan komponen dari kompleks WAVE2 meningkat pada saat invasi sel oleh inang dan inhibisi fosforilasi CrkII mengganggu masuknya bakteri (Ly et al., 2009).

T3SS2 yang kedua dikode oleh SPI-2 yang diekspresikan *S.typhi* selama berada di dalam intraselular di mana SPI-2 diutuhkan untuk mempertahankan *salmonella containing vacuole* (SCV) sehingga *S.typhi* dapat bertahan dan bereplikasi. Fenotipe dari SPI-2 kebanyakan dikarakterisasi dengan manipulasi vesikel dan sel inang sehingga *S.typhi* tetap mendapatkan nutrisi dan menghindari efek bakterisidal dari sel inang. Studi membuktikan bahwa *Salmonella* dapat mencegah fusi antara SCV dengan vesikel yang mengandung fagosit oksidase (Vazquez-Torres et al., 2000) dan NOS (Chakravorty et al., 2002). Seperti SPI-1, SPI-2 juga memiliki gen yang mengkode protein yang terlibat dalam metabolisme yang berfungsi sebagai faktor virulensi yaitu sistem tetrathionate reduktase yang bermanfaat bagi *Salmonella* untuk mengkolonisasi habitat anaerobik tertentu (**Gambar 2.6.3**) (Gerlach et al., 2007).



Gambar 2.6.3 SPI-2 berfungsi untuk kelangsungan hidup intraselular.

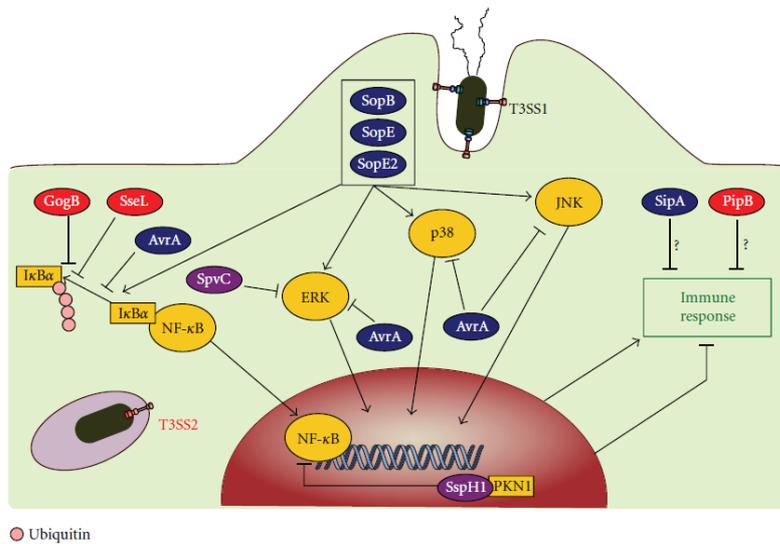
Kematian sel yang diakibatkan oleh *Salmonella* pada sel inang menggunakan T3SS melalui mekanisme dependen dan independen berupa apoptosis sel epitel, piroptosis makrofag yang bergantung terhadap T3SS1 (*rapid response*) dan piroptosis makrofag yang bergantung terhadap T3SS2 (*delayed response*) (Gambar 2.6.4) (Ramos-Morales, 2012).



Gambar 2.6.4 Kematian sel inang yang diinduksi oleh *Salmonella*. (a) Apoptosis yang diinduksi oleh *Salmonella* pada sel epitel 12-18 jam pasca infeksi. (b) *Salmonella* yang mengekspresikan

T3SS1 menginduksi piroptosis cepat pada makrofag. (c) *Salmonella* non-invasif menginduksi piroptosis terlambat pada makforag yang terinfeksi

Salmonella memiliki efektor T3SS1, AvrA, dan efektor T3SS2 berupa SseL dengan aktivitas deubikuitinase. Kedua efektor tersebut mengganggu jalur sinyal NF- κ B melalui substrat seperti NF- κ B, I κ B α , dan β -catenin untuk AvrA dan I κ B α untuk SseL di mana SseL terlibat dalam regulasi autofagi. Beberapa contoh autofagi yang di mana *Salmonella* T3SS dapat berperan adalah (i) membran SCV yang terusak oleh bakteri yang masuk ke sitosol menarik galektin-8 dan *polyubiquitinated protein* berakumulasi pada permukaan bakteri dan (ii) *Salmonella* di dalam vakuol dapat menginduksi respons seluler yang menuju kepada formasi T3SS2- *dependent ubiquitinated aggregates* yang memanggil marker autofagi (**Gambar 2.6.5**) (Ramos-Morales, 2012).



Gambar 2.6.5 Respons nuklear yang terinduksi oleh efektor *Salmonella*

Sebuah studi melaporkan bahwa beberapa spesimen *Salmonella* di Indonesia mengekspresikan flagelin fase 1 yang secara serologis dikategorikan sebagai H:j (Baker et al., 2008). Selain itu, beberapa spesimen Indonesia juga dapat mengekspresikan flagelin alternatif fase 2 dari plasmid linear pBSSB1 yang biasanya tidak ditemukan pada *S.typhi* (Baker et al., 2007).

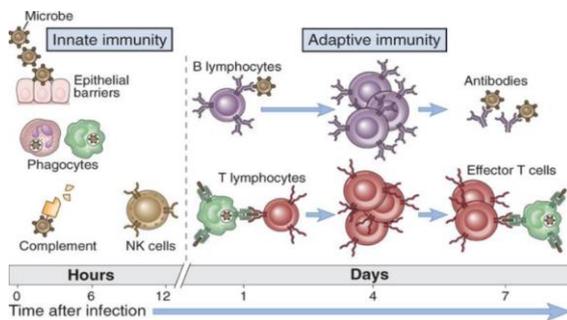
Resistensi obat multipel (MDR) pada *S.typhi* secara eksklusif diasosiasikan dengan adanya plasmid InCH1 yang di mana tampilan fenotipe ini hanya muncul di beberapa lokasi geografis tertentu dan tidak dapat bertahan lama. Namun, terdapat satu keturunannya berupa halotipe 58 (H58) yang menjadi dominan, sehingga dapat menjelaskan epidemik yang sekarang terjadi di seluruh Asia dan Afrika (Emary et al., 2012). Selain itu, resistensi terhadap florokuinolon terjadi melalui mediasi mutasi gen *gyrA* yang mengkode subunit DNA *girase* yang merupakan target utama dari florokuinolon (Parry et al., 2010).

Sebuah studi di Indonesia menemukan bahwa 58% sampel minuman terkontaminasi oleh *Salmonella spp.* yang positif terhadap amplifikasi gen *fliB* dan tanpa amplifikasi dari gen *rfbJ* dan *fliC* di mana gen *fliC* mengkodekan antigen flagela H1 (fase 1) dan gen *fliB* mengkodekan antigen flagela H2 (fase 2). Sedangkan 2% dari sampel es batu ditemukan positif untuk *Salmonella spp.* dengan amplifikasi gen *rfbJ*, 62% gen *fliB* dan tanpa amplifikasi dari gen *fliC* (Waturangi et al., 2019). Gen *rfb* merupakan sebuah kluster gen pada kromosom yang bertanggung jawab terhadap sintesa dari antigen O (Alvarez et al., 2004).

2.7. Sistem Imunitas terhadap infeksi

Sistem imun merupakan gabungan sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi. Reaksi yang dikoordinasi sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya terhadap mikroba disebut

respons imun. Respons imun merupakan kerjasama dari sel imun, jaringan, dan mediator imun (sitokin) terhadap mikroba atau virus (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015). Umumnya sistem imun terbagi dua yaitu non spesifik/*innate* dan spesifik/adaptif. Imunitas *innate* sebagai pertahanan pertama terhadap mikroba sedangkan imunitas adaptif akan timbul apabila pertahanan pertama tidak mampu mengeliminasi patogen yang masuk ke dalam tubuh (Gambar 2.7.1) (Baratawidjaja and Rengganis, 2014).



Gambar 2.7.1. Sistem imun non spesifik dan spesifik

Sel-sel imun berasal dari sel prekursor (induk) dalam sumsum tulang yang kemudian berdiferensiasi menjadi sel premyeloid, sel limfosit (T dan B) dan sel premonosit yang berdiferensiasi menjadi sel monosit makrofag (Baratawidjaja and Rengganis, 2014). Sistem Fagosit mononuklear mengandung sel (monosit dan makrofag) yang mempunyai fungsi utama fagositosis dan sebagai pusat yang menghubungkan imunitas *innate* dan imunitas adaptif (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015).

1. Sistem Imun Nonspesifik/*Innate Immunity*

Mikroorganisme masuk ke dalam tubuh dengan berbagai cara, dapat menimbulkan penyakit dan akan berhadapan dengan imunitas nonspesifik merupakan pertahanan pertama dalam melawan infeksi/benda asing. Imunitas ini memberikan respons awal terhadap mikroba pada pencegahan, mengontrol dan mengeliminasi infeksi di dalam tubuh (Abbas, Lichtman and

Pillai, 2015). Imunitas nonspesifik secara fisiologik berupa komponen normal tubuh, jumlahnya dapat ditingkatkan oleh infeksi, misalnya sel darah putih meningkat selama fase akut pada banyak penderita. Disebut nonspesifik karena tidak ditujukan terhadap mikroba tertentu, telah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Mekanismenya tidak menunjukkan spesifisitas terhadap bahan asing dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial. Sistem tersebut merupakan pertahanan terdepan menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respons langsung. (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

2. Sistem Imun Spesifik/Adaptif

Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan untuk mengenal benda yang dianggap asing bagi dirinya. Benda asing yang pertama kali terpajan dengan tubuh segera dikenal oleh sistem imun spesifik. Paparan tersebut menimbulkan sensitisasi, sehingga antigen yang sama dan masuk tubuh untuk kedua kali akan dikenal lebih cepat kemudian dihancurkan. Sehingga disebut spesifik. Sistem imun spesifik terdiri atas sistem imun humoral dan imunitas seluler. Pada imunitas humoral, sel B melepas antibodi untuk menyingkirkan mikroba ekstraseluler. Aktivasi sel B diawali dengan pengenalan antigen spesifik oleh reseptor permukaan. Antigen dan perangsang lain termasuk Th yang merangsang sel B spesifik berproliferasi, berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi antibodi. Antibodi yang dilepas akan ditemukan di dalam serum. Dalam perkembangannya sel B mula-mula memproduksi IgM atau isotipe Ig lain (seperti IgG), menjadi matang atau menetap sebagai sel memori. Fungsi utama antibodi ialah pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler, virus, dan bakteri serta menetralkan toksin. Masing-masing sel berproliferasi terutama atas pengaruh sitokin IL-12 yang meningkatkan jumlah sel imatur. Sedangkan pada imunitas seluler sel T mengaktifkan makrofag menghancurkan mikroba dan memusnahkan sel yang terinfeksi di intraseluler. Berbeda dengan sel B, sel T terdiri atas beberapa subset sel dengan fungsi yang berlainan yaitu sel CD4+ (Th1, Th2) dan CD8+ (CTL atau Tc dan Ts atau sel Tr atau T3). Fungsi utama

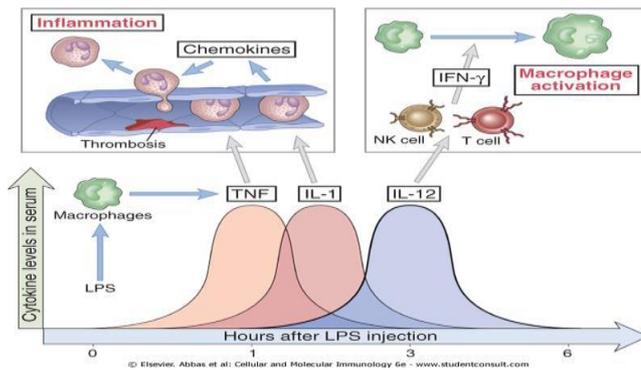
sistem imun spesifik seluler ialah pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, virus, jamur, parasit dan keganasan. Sel CD4 mengaktifkan sel Th1 yang selanjutnya mengaktifkan makrofag untuk menghancurkan mikroba. Sel CD8 memusnahkan sel terinfeksi. (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015) (Baratawidjaja dan Rengganis, 2014).

3. Sitokin

Sitokin merupakan protein sistem imun yang mengatur interaksi antar sel dan memicu respons imun, baik pada imunitas nonspesifik maupun imunitas spesifik. Sitokin adalah polipeptida yang diproduksi sebagai respons terhadap rangsangan mikroba dan antigen lainnya dan berperan sebagai mediator pada reaksi imun dan inflamasi. Sitokin merupakan protein pembawa pesan kimiawi, atau perantara dalam komunikasi antarsel. Sitokin berperan dalam aktivasi sel T, sel B, monosit, makrofag, inflamasi dan induksi sitotoksitas. Pada fase efektor dari imunitas *innate* dan adaptif, sitokin mengaktifkan sel-sel efektor yang berbeda untuk memusnahkan mikroba dan antigen lainnya. Sitokin juga menstimulasi pertumbuhan sel-sel hematopoietik. Dalam pengobatan, sitokin penting sebagai agen terapeutik dan sebagai target bagi antagonis spesifik penyakit-penyakit imun dan inflamasi (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015).

Inflamasi merupakan reaksi kompleks jaringan terhadap infeksi, paparan toksin atau adanya kerusakan sel. Awal inflamasi terjadi peningkatan aliran darah karena adanya vasodilatasi pada tempat terjadinya infeksi atau kerusakan jaringan, sehingga leukosit dapat keluar dari pembuluh darah dan masuk jaringan. Leukosit terutama neutrofil dan monosit, bergerak menuju sasaran akibat kemotaksis. Selain itu juga, terjadi pelepasan protease dan radikal bebas. Pada respons yang sehat, respons inflamasi teraktivasi menyingkirkan patogen (kalau peristiwa itu adalah infeksi) dan memulai proses perbaikan lalu mereda (sembuh), namun inflamasi dapat merusak sel yang sehat akibat diproduksinya reaktif oksigen spesies dan enzim

lisosom oleh neutrofil dan makrofag dapat merangsang inflamasi lebih lanjut (**Gambar 2.7.2**) (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015).



Gambar 2.7.2. Peranan sitokin pada imunitas non spesifik terhadap mikroba yang memproduksi LPS

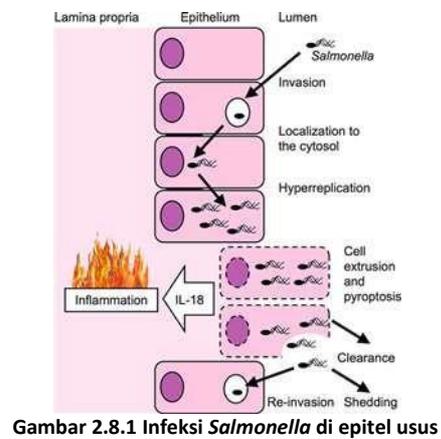
2.8. Patogenesis *S.typhi*

Infeksi yang terjadi pada manusia terjadi saat mengonsumsi makanan atau minuman yang terkontaminasi dengan bakteri *S.typhi* melalui jalur oral-fekal. Diperlukan sekitar 1000 sampai 1 juta *S.typhi* untuk mengakibatkan seseorang mengalami DT (Paul, et al. 2017). Tubuh inang akan melakukan mekanisme pertahanan melalui beberapa proses respons imun baik secara lokal maupun sistemik, spesifik dan non-spesifik serta humoral dan seluler (Wain et al., 2015).

S.typhi yang masuk ke dalam saluran cerna tidak selalu akan menyebabkan infeksi, karena *S.typhi* harus dapat mencapai usus halus. Keasaman lambung ($\text{pH} \leq 3,5$) menjadi salah satu faktor utama tubuh untuk melindungi diri dari *S.typhi*. Namun sebagian besar kuman *S.typhi* dapat bertahan karena memiliki gen ATR (*acid tolerance response*). Perjalanan penyakit *S.typhi* melalui beberapa proses,

diawali dengan masuknya kuman melalui makanan dan minuman yang tercemar melalui jalur oral-fekal.

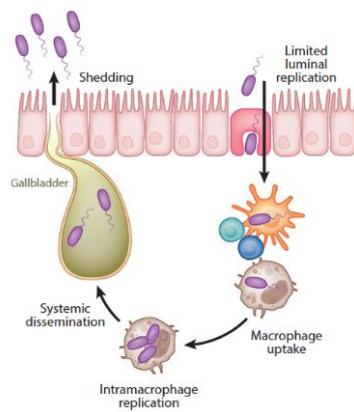
Kondisi *Achlorhydria* akibat penuaan, gastrektomi, penggunaan pompa proton *inhibitor*, pengobatan histamin antagonis reseptor H2, atau pemberian antasida dapat menurunkan dosis infeksi yang mempermudah kuman untuk lolos menuju usus halus (**Gambar 2.8.1**) (Saito et al., 2018).



Gambar 2.8.1 Infeksi *Salmonella* di epitel usus

S.typhi akan menemui dua mekanisme pertahanan tubuh non- spesifik setelah sampai di usus yaitu motilitas berupa peristalsis dan flora normal usus berupa bakteri-bakteri anaerob (Saito et al., 2018). Di usus halus kuman akan menembus mukosa usus diperantarai *microbial binding* terhadap epitel

menghancurkan *Microfold cells* (*M cells*) sehingga sel-sel epitel mengalami deskuamasi, menembus epitel mukosa usus, masuk dalam lamina propria, menetap dan berkembang biak. Kuman akan berkembang biak dalam sel mononuklear sebelum menyebar ke dalam aliran darah (**Gambar 2.8.2**) (Paul et al., 2017).



Gambar 2.8.2. Proses *S.typhi* menginvasi dan berdiseminasi.

Di dalam sel fagosit mononuklear, kuman masuk menginfeksi plak peyeri, yaitu jaringan limfoid yang terdapat di ileum terminal dan bermultiplikasi. Setelah itu, kuman menembus kelenjar limfoid intestinal dan duktus torasikus masuk ke dalam aliran darah sistemik. Setelah 24-72 jam terjadi bakteremia primer namun jumlah kuman belum terlalu banyak maka gejala klinis belum tampak (Dougan et al., 2014). Bakteremia primer berakhir setelah kuman masuk ke dalam organ sistem retikuloendotelial (RES) di hati, limpa, kelenjar getah bening mesenterium dan kelenjar limfoid intestinal untuk berkembang biak. Kuman menjalani masa inkubasi selama 10-14 hari dan di dalam organ RES kuman berkembang pesat dan kembali masuk ke peredaran darah dan menimbulkan bakteremia sekunder. Pada saat terjadi bakteremia sekunder dapat ditemukan gejala-gejala klinis dari DT (Saito et al., 2018).

Pada dinding sel *S.typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan peptidoglikan minimal. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat poten untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Sebagai reseptor, komponen CD14 akan berikatan dengan LPS. Ikatan tersebut kemudian berikatan pula dengan kelompok molekul *Toll-like receptors* (TLR). Aktivasi yang terjadi akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivasi reseptor sitokin dan reseptornya. Sitokin-sitokin tipe I (untuk IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL- 15) ; reseptor sitokin tipe II (untuk 1FN- γ , IFN- α , IL-10); reseptor TNF (untuk TNF, CD4OL, Fas); reseptor superfamili immunoglobulin (IL-1, M- CSF) (Dougan et al., 2014). Berbagai sitokin tersebut mengikuti sirkulasi sistemik, menginduksi produksi prostaglandin, memengaruhi stabilitas pusat termoregulasi berefek terhadap pengaturan suhu tubuh dan menyebabkan demam (Lo et al., 2018).

Sitokin tersebut pula yang menimbulkan dampak pada pusat nafsu makan menyebabkan nafsu makan menurun, mempengaruhi ambang nyeri, sehingga timbul nyeri pada kepala, sendi, otot-otot, dan nyeri pada daerah saluran cerna. Sitokin memengaruhi perubahan pada plak peyeri, inflamasi pada mukosa saluran cerna, menyebabkan motilitas saluran cerna terganggu, sehingga muncul keluhan mual, muntah, diare, nyeri abdomen, perdarahan, perforasi, sedangkan konstipasi terjadi pada tahap lanjut. Kondisi patologis akibat infeksi merangsang hiperaktivitas RES dan menimbulkan pembengkakan hati dan limpa (Upadhyay et al., 2015).

2.9. Sistem imun terhadap infeksi *S. typhi*

Pentingnya imunitas dalam penegakan diagnosis ditunjukkan dari kenaikan titer antibodi terhadap antigen *S.typhi*. Peran imunitas seluler yaitu dalam penyembuhan penyakit (Antillón et al., 2017). Pada infeksi primer, respons humoral melalui sel limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan merangsang terbentuknya imunoglobulin (Ig). Pada infeksi akut, yang pertama terbentuk antibodi O (IgM) yang muncul pada hari ke 3-4 demam, kemudian disusul antibodi pada infeksi kronik yaitu antibodi flagela H (IgG) (Antillón et al., 2017).

Toll-like receptor 4 (TLR4) berperan penting dalam imunitas tubuh karena TLR4 merupakan reseptor utama untuk mengenali endotoksin dan lipopolisakarida (LPS) bakteri *S.typhi*. Reseptor ini merupakan salah satu reseptor dari 11 TLR yang menstimulasi faktor transkripsi NFk-B dan kaskade sinyal yang meningkatkan ekspresi gen imun dan pro-inflamasi. Sehingga, TLR memiliki peranan penting dalam imunitas adaptif dan alami dengan TLR4 memiliki peran dalam deteksi dini dan respons imun terhadap infeksi *S.typhi* (Nguyen et al., 2009). ~~Toll like-receptor 4 (TLR4) berperan penting dalam imunitas tubuh karena TLR4 merupakan reseptor utama untuk mengenali endotoksin dan lipopolisakarida (LPS) bakteri *S.typhi*. Reseptor ini merupakan salah satu reseptor dari 11 TLR yang menstimulasi faktor transkripsi NFk B dan kaskade sinyal yang meningkatkan ekspresi gen imun dan pro inflamasi. Sehingga, TLR memiliki peranan penting dalam imunitas adaptif dan alami dengan TLR4 memiliki peran dalam deteksi dini dan respons imun terhadap infeksi *S.typhi* (Nguyen et al., 2009).~~

Sistem imun alami memiliki peranan dalam mengontrol pertumbuhan dan perkembangan *S.typhi* di dalam RES dengan memproduksi sitokin, faktor solubel, makrofag, serta granuloma. Makrofag dan granulosit neutrofilik memiliki peran penting dalam mengontrol jumlah bakteri (*bacterial load*) serta memiliki aktivitas bakterisidal dalam beberapa jam setelah infeksi dimulai yang nantinya akan digantikan dengan fungsi bakteristatik (Grant et al., 2008).

Komponen dari dinding sel bakteri seperti LPS, DNA, flagela, dan beberapa lipoprotein mengaktifkan TLR pada sel inang yang kemudian akan mengaktifkan respons inflamasi yang dihasilkan oleh sitokin Th-1 seperti IFN- γ , TNF- α , dan IL-1, IL-6, IL-12, dan IL-18 serta faktor inhibisi migrasi makrofag dan iNOS (Khan et al, 2001). Interferon γ memiliki peran penting dalam menahan infeksi dengan patogen intraselular termasuk *Salmonella* karena IFN- γ menstimulasi aktivitas antibakteri pada makrofag. Interleukin-12 dan interleukin-18 disekresi oleh makrofag yang teraktivasi dan bekerja secara independen dan secara sinergis pada sel *natural killer* dan sel T *helper* untuk meningkatkan produksi IFN- γ lebih lanjut yang akhirnya mengaktifasi makrofag melalui *positive feedback loop*. Selain itu, IL-12 juga penting untuk polarisasi sel T *helper* terhadap respons Th1 (Dougan et al., 2011).

Selain itu, sel imun alami juga dapat memproduksi *high mobility group box 1* (HMGB1) yang merupakan protein pengikat DNA intraseluler nuklear. Sel ini berpartisipasi dalam transkripsi, replikasi, formasi nukleosom, dan memperbaiki jaringan. Protein ini dikategorikan ke dalam *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) bernama alarmins di mana alarmin merupakan faktor intraseluler endogen yang biasanya tersembunyi dari rekognisi imun namun dalam kondisi trauma atau stres selular, dilepaskan dan dapat membantu memperbaiki jaringan yang rusak atau memprovokasi inflamasi yang tidak terkontrol (Splichal et al., 2019).

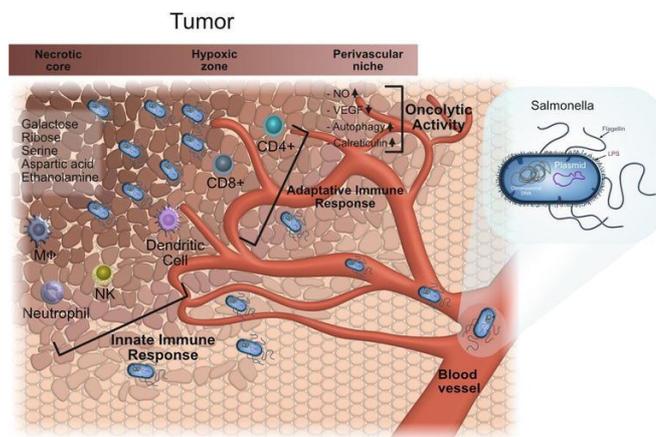
HMGB1 menunjukkan aktivitas sitokin namun memiliki peran pada fase yang lebih lanjut dibanding TNF- α dan IL-1 β . Sekresi aktif dan pasif dari HMGB1 dapat mengamplifikasi perubahan respons imun terhadap *multiple organ dysfunction syndrome* (MODS) dan kematian. Struktur TLR2, TLR4 dan TLR9 mengenali stuktur bakteri dan HMGB1 termasuk reseptor untuk *advanced glycation end* (RAGE) sehingga saat *S.typhi* mengaktifkan sistem imun adaptif, TLR4 dan HMGB1 dapat saling berinteraksi sehingga mengaktifkan NF κ B dan kemudian sistem imun adaptif beserta HIF-1 α (Splichal et al., 2019).

Namun, sistem imun alami saja tidak cukup untuk memberikan efek protektif imunitas yang menyeluruh. Eradikasi bakteri dicapai pada fase akhir dari infeksi primer dan imunitas ditandai dengan terbentuknya limfosit T yang spesifik terhadap *Salmonella* dan rekrutmen sel T tersebut ke lokasi infeksi (Hess et al., 1996).

Pada infeksi primer, sel T CD4⁺ α BT α CR⁺ dengan fenotipe Th1 memediasi klirens dari bakteri dari jaringan tanpa atau sedikit bantuan dari sel T CD8⁺ (Hess et al., 1996). Sel B dan antibodi juga sangat penting pada fase akhir dari infeksi primer salmonellosis di mana sel T memediasi regulasi dari aktivasi dan maturasi sel B spesifik *Salmonella* sehingga memproduksi isotop antibodi dengan efek terhadap polisakarida dan antigen dari bakteri tersebut (Sinha et al., 1997).

Respons sel T memberikan proteksi melalui aktivasi sel mononuklear di jaringan yang terinfeksi *Salmonella* sedangkan antibodi menargetkan bakteri yang menginfeksi sel lainnya yang jauh melalui ruang ekstraseluler. Dalam konteks ini, sel CD4⁺ memediasi proteksi melalui produksi sitokin terutama IFN- γ dan memproduksi sitokin lainnya yang mengaktifkan makrofag (Gambar 2.9.1) (Dougen et al., 2011).

Commented [TAYL11]: Lanjutkan dengan peranan NF Kappa beta



Gambar 2.9.1. *Salmonella enterica* dan induksi respons imun (Hernández-Luna et al., 2018)

2.10. Manifestasi Klinis DT

Gejala klinis DT seringkali tidak khas dan sangat bervariasi. Spektrum klinis DT tidak khas dan sangat lebar, dari asimtomatik atau yang ringan berupa panas disertai diare yang mudah disembuhkan sampai dengan bentuk klinis yang berat baik berupa gejala sistemik panas tinggi, gejala septik yang lain, ensefalopati atau timbul komplikasi gastrointestinal berupa perforasi usus atau perdarahan (Mogasale et al., 2015).

Hal ini mempersulit penegakan diagnosis berdasarkan gambaran klinisnya saja. Gejala klinis DT pada anak biasanya lebih ringan jika dibanding dengan penderita dewasa. Masa inkubasi rata-rata 10 – 20 hari (Gauld et al., 2018) dan setelah masa inkubasi maka ditemukan gejala prodromal, yaitu perasaan

lesu, nyeri kepala, pusing dan tidak bersemangat. Gejala-gejala klinis yang timbul sangat bervariasi dari ringan sampai dengan berat, dari asimtomatik hingga gambaran penyakit yang khas disertai komplikasi hingga kematian (Gauld et al., 2018).

Demam merupakan keluhan dan gejala klinis terpenting yang timbul pada semua penderita DT. Demam dapat muncul secara tiba-tiba, dalam 1-2 hari menjadi parah dengan gejala yang menyerupai septikemia oleh karena *Streptococcus* atau *Pneumococcus* daripada *S.typhi* (Choudhary et al., 2013). Gejala menggigil tidak biasa didapatkan pada DT tetapi pada penderita yang hidup di daerah endemis malaria, menggigil lebih mungkin disebabkan oleh malaria. DT dan malaria dapat timbul secara bersamaan pada satu penderita. Sakit kepala hebat yang menyertai demam tinggi dapat menyerupai gejala meningitis, di sisi lain *S.typhi* juga dapat menembus sawar darah otak dan menyebabkan meningitis (Wain et al., 2015).

Manifestasi gejala mental kadang mendominasi gambaran klinis, yaitu konfusi, stupor, psikotik atau koma. Nyeri perut kadang tak dapat dibedakan dengan apendisitis. Penderita pada tahap lanjut dapat muncul gambaran peritonitis akibat perforasi usus. Gejala klinis yang biasa ditemukan, yaitu (Wain et al., 2015):

1. Demam

Pada kasus-kasus yang khas, demam berlangsung 3 minggu. Bersifat febris remiten dan suhu tidak berapa tinggi. Selama minggu pertama, suhu tubuh berangsur-angsur meningkat setiap hari, biasanya menurun pada pagi hari dan meningkat lagi pada sore dan malam hari. Dalam minggu kedua, penderita terus berada dalam keadaan demam. Dalam minggu ketiga suhu tubuh berangsur-angsur turun dan normal kembali pada akhir minggu ketiga.

2. Gangguan pada saluran pencernaan

Pada mulut terdapat nafas berbau tidak sedap. Bibir kering dan pecah- pecah (ragaden). Lidah ditutupi selaput putih kotor (*coated tongue*), ujung dan tepinya kemerahan, jarang disertai tremor. Pada abdomen mungkin ditemukan keadaan perut kembung (meteorismus). Hati dan limpa membesar disertai nyeri pada perabaan. Biasanya didapatkan konstipasi, akan tetapi mungkin pula normal bahkan dapat terjadi diare.

3. Gangguan kesadaran

Umumnya kesadaran penderita menurun walaupun tidak berapa dalam, yaitu apatis sampai somnolen. Jarang terjadi sopor, koma atau gelisah.

2.11. Diagnosis DT

Penegakan diagnosis DT didasarkan pada manifestasi klinis yang diperkuat oleh pemeriksaan laboratorium penunjang. Penelitian yang menggunakan berbagai metode diagnostik untuk mendapatkan metode terbaik dalam usaha penatalaksanaan penderita DT secara menyeluruh masih terus dilakukan hingga saat ini (Upadhyay et al., 2015).

Diagnosis definitif DT tergantung pada isolasi *S.typhi* dari darah, sumsum tulang atau lesi anatomi tertentu. Adanya gejala klinis dari karakteristik DT atau deteksi dari respons antibodi spesifik adalah sugestif DT tetapi tidak definitif (Crump et al., 2015). Kultur darah adalah *gold standard* dari penyakit ini. Dalam pemeriksaan laboratorium diagnostik, di mana patogen lainnya dicurigai, kultur darah dapat digunakan. Lebih dari 80% pasien dengan DT terdapat *S. typhi* di dalam darahnya. Kegagalan untuk mengisolasi organisme dapat disebabkan oleh beberapa faktor (Upadhyay et al., 2015):

1. Keterbatasan media laboratorium
2. Penggunaan antibiotik
3. Volume spesimen, atau
4. Waktu pengumpulan, pasien dengan riwayat demam selama 7 sampai 10 hari menjadi lebih mungkin dibandingkan dengan pasien yang memiliki kultur darah positif .

Aspirasi sum-sum tulang adalah standar emas untuk diagnosis DT dan sangat berguna bagi pasien yang sebelumnya telah diobati, yang memiliki sejarah panjang penyakit dan pemeriksaan kultur darah yang negatif (Wijedoru et al., 2017). Aspirasi duodenum juga telah terbukti sangat memuaskan sebagai tes diagnostik namun belum diterima secara luas karena toleransi yang kurang baik pada aspirasi duodenum, terutama pada anak-anak. Pemeriksaan laboratorium untuk membantu menegakkan diagnosis DT dibagi dalam empat kelompok, yaitu:

a. Pemeriksaan Darah Tepi

Penderita DT bisa didapatkan anemia, jumlah leukosit normal, bisa menurun atau meningkat, mungkin didapatkan trombositopenia dan hitung jenis biasanya normal atau sedikit bergeser ke kiri, mungkin didapatkan aneosinofilia dan limfositosis relatif, terutama pada fase lanjut (Choudhary et al., 2013).

Penelitian oleh beberapa ilmuwan mendapatkan bahwa hitung jumlah dan jenis leukosit serta laju endap darah tidak mempunyai nilai sensitivitas, spesifisitas dan nilai ramal yang cukup tinggi untuk dipakai dalam membedakan antara penderita DT atau bukan, akan tetapi adanya leukopenia dan limfositosis relatif menjadi dugaan kuat diagnosis DT (Choudhary et al., 2013).

b. Pemeriksaan bakteriologis dengan isolasi dan biakan kuman

Diagnosis pasti DT dapat ditegakkan bila ditemukan bakteri *S.typhi* dalam biakan dari darah, urine, feses, sumsum tulang, cairan duodenum. Berkaitan dengan patogenesis penyakit, maka bakteri akan lebih mudah ditemukan dalam darah dan sumsum tulang pada awal penyakit, sedangkan pada stadium berikutnya di dalam urin dan feses (Choudhary et al., 2013).

Kultur organisme penyebab merupakan prosedur yang paling efektif dalam menduga demam enterik, di mana kultur untuk DT dapat menjelaskan dua pertiga dari kasus septikemia yang diperoleh dari komunitas yang dirawat di rumah sakit (Paul et al., 2017). Kultur darah adalah prosedur untuk mendeteksi infeksi sistemik yang disebabkan oleh bakteri atau jamur. Tujuannya adalah mencari

etiologi bakteremi dan fungemi dengan cara kultur secara aerob dan anerob, identifikasi bakteri dan tes sensitivitas antibiotik yang diisolasi. Hal ini dimaksudkan untuk membantu klinisi dalam pemberian terapi antibiotik yang terarah dan rasional (Keddy et al., 2018).

Media pembiakan yang direkomendasikan untuk *S.typhi* adalah media empedu dari sapi di mana dikatakan media Ggll ini dapat meningkatkan positivitas hasil karena hanya *S.typhi* dan *Salmonella paratyphi* yang dapat tumbuh pada media tersebut. Masing- masing koloni terpilih diamati morfologinya, meliputi: warna koloni, bentuk, diameter 1-2 mm, tepi, elevasi, sifat yaitu berdasarkan kemampuannya untuk memfermentasikan laktosa, atau kemampuannya untuk menghemolisa sel darah merah. Hasil yang menunjukkan ditemukannya bakteri dalam darah dengan cara kultur disebut bakteremia, dan merupakan penyakit yang mengancam jiwa, maka pendeteksiannya dengan segera sangat penting (Antillón et al., 2017).

Indikasi kultur darah adalah jika dicurigai terjadi bakteremia atau septikemia dilihat dari gejala klinik, mungkin akan timbul gejala seperti : demam, mual, muntah, menggigil, denyut jantung cepat (takikardia), pusing, hipotensi, syok, leukositosis, serta perubahan lain dalam sistem organ dan atau laboratoris (Wain et al., 2015). Biakan darah terhadap *Salmonella* juga tergantung dari saat pengambilan pada perjalanan penyakit. Beberapa peneliti melaporkan biakan darah positif 40-80% atau 70-90% dari penderita pada minggu pertama sakit dan positif 10-50% pada akhir minggu ketiga (Keddy et al., 2018). Sensitivitasnya akan menurun pada sampel penderita yang telah mendapatkan antibiotika dan meningkat sesuai dengan volume darah dan rasio darah dengan media kultur yang dipakai. Pada keadaan tertentu dapat dilakukan kultur pada spesimen empedu yang diambil dari duodenum dan memberikan hasil yang cukup baik, akan tetapi tidak digunakan secara luas karena adanya risiko aspirasi terutama pada anak (Keddy et al., 2018). Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil biakan meliputi jumlah darah yang diambil, perbandingan volume darah dari media empedu dan waktu pengambilan darah (Thanh et al., 2016).

Bakteri dalam feses ditemukan meningkat dari minggu pertama (10-15%) hingga minggu ketiga (75%) dan turun secara perlahan. Biakan urin positif setelah minggu pertama. Biakan sumsum tulang merupakan metode baku emas karena mempunyai sensitivitas paling tinggi dengan hasil positif didapat pada 80-95% kasus dan sering tetap positif selama perjalanan penyakit dan menghilang pada fase penyembuhan. Metode ini terutama bermanfaat untuk penderita yang sudah pernah mendapatkan terapi atau dengan kultur darah negatif sebelumnya. Prosedur terakhir ini sangat invasif sehingga tidak dipakai dalam praktek sehari-hari (Wain et al., 2014).

Pemeriksaan pada keadaan tertentu dapat dilakukan kultur pada spesimen empedu yang diambil dari duodenum dan memberikan hasil yang cukup baik akan tetapi tidak digunakan secara luas karena adanya risiko aspirasi pada anak (Mogasale et al., 2015). Salah satu penelitian pada anak menunjukkan bahwa sensitivitas kombinasi kultur darah dan duodenum hampir sama dengan kultur sumsum tulang. Volume 5-10 ml dianjurkan untuk orang dewasa, sedangkan pada anak-anak dibutuhkan 2-4 ml, sedangkan volume sumsum tulang yang dibutuhkan untuk kultur hanya sekitar 0.5-1 ml. Bakteri dalam sumsum tulang juga lebih sedikit dipengaruhi oleh antibiotika daripada bakteri dalam darah (Paul et al., 2017).

Hal ini dapat menjelaskan teori bahwa kultur sumsum tulang lebih tinggi hasil positifnya bila dibandingkan dengan darah walaupun dengan volume sampel yang lebih sedikit dan sudah mendapatkan terapi antibiotika sebelumnya (Choudhary et al., 2013). Spesifisitasnya walaupun tinggi, pemeriksaan kultur mempunyai sensitivitas yang rendah dan adanya kendala berupa lamanya waktu yang dibutuhkan (5-7 hari) serta peralatan yang lebih canggih untuk identifikasi bakteri sehingga tidak praktis dan tidak tepat untuk dipakai sebagai metode diagnosis baku dalam pelayanan penderita (Nuruzzaman et al., 2016).

c. Uji Serologis

1) Uji Widal

Uji Widal merupakan suatu metode serologi baku dan rutin digunakan sejak tahun 1896. Prinsip uji Widal adalah memeriksa reaksi antara antibodi aglutinin dalam serum penderita yang telah mengalami pengenceran berbeda-beda terhadap antigen somatik (O) dan flagela (H) yang ditambahkan dalam jumlah yang sama sehingga terjadi aglutinasi (Crump et al., 2015). Pengenceran tertinggi yang masih menimbulkan aglutinasi menunjukkan titer antibodi dalam serum. Semakin tinggi titernya, semakin besar kemungkinan infeksi ini. Uji Widal ini dilakukan untuk deteksi antibodi terhadap kuman *S.typhi*. Pada uji ini terjadi suatu reaksi aglutinasi antara antigen kuman *S.typhi* dengan antibodi yang disebut aglutinin. Antigen yang digunakan pada uji Widal adalah suspensi *Salmonella* yang sudah dimatikan dan diolah di laboratorium. Tujuan uji Widal adalah menentukan adanya aglutinin dalam serum penderita tersangka DT (Wain et al., 2015).

Tes aglutinasi Widal dapat dilakukan dengan menggunakan uji hapusan (*slide test*) dan uji tabung (*tube test*). Uji hapusan dapat dilakukan dengan cepat dan digunakan dalam prosedur penapisan. Uji hapusan dilakukan dengan menggunakan antigen *S.typhi* komersial yang tersedia, setetes suspensi antigen ditambahkan pada sejumlah serum pasien yang diduga terinfeksi *S.typhi*. Hasil penapisan positif membutuhkan determinasi kekuatan dari antibodi (Thanh et al., 2016).

Di Indonesia pengambilan titer O aglutinin $\geq 1/40$ dengan memakai *slide test* (prosedur pemeriksaan membutuhkan waktu 15 menit) menunjukkan nilai ramal positif 96%. Campuran suspensi antigen dan antibodi diinkubasi selama 20 jam pada suhu 37°C di dalam air. Tes ini dapat digunakan untuk konfirmasi hasil dari uji hapusan. Penelitian pada anak oleh Choo et al (1990) mendapatkan sensitivitas dan spesifisitas masing-masing sebesar 89% pada titer O atau H diatas 1/40 dengan nilai prediksi positif sebesar 34.2% dan nilai prediksi negatif sebesar 99.2% (Nuruzzaman et al., 2016).

Beberapa penelitian pada kasus DT anak dengan hasil biakan positif, ternyata hanya didapatkan sensitivitas uji Widal sebesar 64- 74% dan spesifisitas sebesar 76-83%. Interpretasi dari uji Widal ini harus memperhatikan beberapa faktor antara lain sensitivitas, spesifisitas, stadium penyakit; faktor penderita seperti status imunitas dan status gizi yang dapat mempengaruhi pembentukan antibodi; gambaran imunologis dari masyarakat setempat (daerah endemis atau non-endemis); faktor antigen; teknik serta reagen yang digunakan (Choudhary et al., 2013).

Kelemahan uji Widal yaitu rendahnya sensitivitas dan spesifisitas serta sulitnya melakukan interpretasi hasil membatasi penggunaannya dalam penatalaksanaan penderita DT akan tetapi hasil uji Widal yang positif akan memperkuat dugaan pada tersangka penderita DT (penanda infeksi) (Wijedoru et al., 2017). Uji Widal saat ini walaupun telah digunakan secara luas di seluruh dunia, namun manfaatnya masih diperdebatkan dan sulit dijadikan pegangan karena belum ada kesepakatan akan nilai standar aglutinasi (*cut-off point*). Upaya untuk mencari standar titer uji Widal seharusnya ditentukan titer dasar pada orang sehat di populasi di mana pada daerah endemis seperti Indonesia akan didapatkan peningkatan titer antibodi O dan H pada orang-orang sehat. Kelemahan lain adalah banyak terjadi hasil negatif palsu dan positif palsu pada tes ini. Hasil negatif palsu tes Widal terjadi jika darah diambil terlalu dini dari fase tifoid (Thanh et al., 2016).

Pemberian antibiotik merupakan salah satu penyebab penting terjadinya negatif palsu. Penyebab hasil negatif lainnya adalah tidak adanya infeksi *S.typhi*, status karier, inokulum antigen bakteri pejamu yang tidak cukup untuk melawan antibodi, kesalahan atau kesulitan dalam melakukan tes dan variabilitas antigen. Hasil positif palsu dapat terjadi apabila sudah pernah melakukan tes DT sebelumnya, sudah pernah imunisasi antigen *Salmonella sp.*, ada reaksi silang sebelumnya dengan antigen selain *Salmonella sp.*, variabilitas dan kurangnya

standar pemeriksaan antigen, infeksi malaria atau bakteri *enterobacteriaceae* lainnya, serta penyakit lain seperti *dengue* (Thanh et al., 2016).

2) Uji Tubex

Uji Tubex merupakan uji semi-kuantitatif kolometrik yang cepat (beberapa menit) dan mudah untuk dikerjakan. Uji ini mendeteksi antibodi *anti-S.typhi* O9 pada serum pasien, dengan cara menghambat ikatan antara IgM anti-O9 yang terkonjugasi pada partikel latex yang berwarna dengan lipopolisakarida *S.typhi* yang terkonjugasi pada partikel magnetik latex. Hasil positif uji Tubex ini menunjukkan terdapat infeksi *Salmonellae serogroup D* walau tidak secara spesifik menunjuk pada *S.typhi*. Infeksi oleh *Salmonella paratyphi* akan memberikan hasil negatif (Garai et al., 2012).

Secara imunologi, antigen O9 bersifat imunodominan sehingga dapat merangsang respons imun secara independen terhadap timus dan merangsang mitosis sel B tanpa bantuan dari sel T. Karena sifat-sifat tersebut, respons terhadap antigen O9 berlangsung cepat sehingga deteksi terhadap anti-O9 dapat dilakukan lebih dini, yaitu pada hari ke 4-5 untuk infeksi primer dan hari ke 2-3 untuk infeksi sekunder. Perlu diketahui bahwa uji Tubex hanya dapat mendeteksi IgM dan tidak dapat mendeteksi IgG sehingga tidak dapat dipergunakan sebagai modalitas untuk mendeteksi infeksi lampau (Wain et al., 2014).

Pemeriksaan ini dilakukan dengan menggunakan 3 macam komponen, meliputi: 1) tabung berbentuk V, yang juga berfungsi untuk meningkatkan sensitivitas, 2) Reagen A, yang mengandung partikel magnetik yang diselubungi dengan antigen *S.typhi* O9, 3) Reagen B, yang mengandung partikel lateks berwarna biru yang diselubungi dengan antibodi monoklonal spesifik untuk antigen O9. Untuk melakukan prosedur pemeriksaan ini, satu tetes serum (25 µL) dicampurkan ke dalam tabung dengan satu tetes (25 µL) reagen A. Setelah itu dua tetes reagen B (50 µL) ditambahkan ke dalam tabung. Hal tersebut dilakukan pada kelima tabung

lainnya. Tabung-tabung tersebut kemudian diletakkan pada rak tabung yang mengandung magnet dan diputar selama 2 menit dengan kecepatan 250 rpm (Kintz et al., 2017).

Sampel darah pasien dengan diagnosis klinis DT untuk membandingkan spesifisitas, sensitivitas, *positive predictive value* (PPV) dan *negative predictive value* (NPV) uji Tubex dengan uji Widal. Pada penelitian tersebut, didapatkan sensitivitas uji Tubex sebesar 100% (Widal: 53,1%), spesifisitas 90% (Widal: 65%), PPV 94,11% (Widal: 70,8%), NPV 100% (Widal: 46,4%) (Sabbagh et al., 2019).

3) Uji Typhidot

Uji typhidot dapat mendeteksi antibodi IgM dan IgG yang terdapat pada protein membran luar *S.typhi*. Hasil positif pada uji typhidot didapatkan 2-3 hari setelah infeksi dan dapat mengidentifikasi secara spesifik antibodi IgM dan IgG terhadap antigen *S.typhi* seberat 50 kD, yang terdapat pada strip nitroselulosa. Pada penelitian Gopalakhrisnan dkk 2002, didapatkan sensitivitas uji ini sebesar 98%, spesifisitas sebesar 76,6% dan efisiensi uji sebesar 84%. Pada penelitian lain yang dilakukan oleh Olsen dkk, didapatkan sensitifitas dan spesifisitas uji ini hampir sama dengan uji Tubex yaitu 79% dan 89% dengan 78% dan 89% (Wain et al., 2014).

Pada kasus reinfeksi, respons imun sekunder (IgG) teraktivasi secara berlebihan sehingga IgM sulit terdeteksi. IgG dapat bertahan sampai 2 tahun sehingga pendeteksian IgG saja tidak dapat digunakan untuk membedakan antara infeksi akut dengan kasus reinfeksi atau konvalesen pada kasus uji primer. Untuk mengatasi masalah tersebut, uji ini kemudian dimodifikasi dengan menginaktivasi total IgG pada sampel serum. Uji ini, yang dikenal dengan nama uji Typhidot-M, memungkinkan ikatan antara antigen dengan IgM spesifik yang ada pada serum pasien. Studi evaluasi yang dilakukan oleh Khoo KE dkk pada tahun 1997 lebih sensitif (sensitivitas mencapai 100%) dan lebih cepat (3 jam) dilakukan bila dibandingkan dengan kultur (Kaur et al., 2018).

4) Pemeriksaan kuman secara molekuler

Metode lain untuk identifikasi bakteri *S.typhi* yang akurat adalah mendeteksi DNA (asam nukleat) gen *flagellin* bakteri *S.typhi* dalam darah dengan teknik hibridisasi asam nukleat atau amplifikasi DNA dengan cara *polymerase chain reaction* (PCR) melalui identifikasi antigen Vi yang spesifik untuk *S.typhi* (Kim et al., 2019).

Spesifisitas PCR sebesar 100% dengan sensitivitas yang 10 kali lebih baik daripada penelitian sebelumnya di mana mampu mendeteksi 1-5 bakteri/ml darah. Kendala yang sering dihadapi pada penggunaan metode PCR ini meliputi risiko kontaminasi yang menyebabkan hasil positif palsu yang terjadi bila prosedur teknis tidak dilakukan secara cermat, adanya bahan-bahan dalam spesimen yang bisa menghambat proses PCR (hemoglobin dan heparin dalam spesimen darah serta bilirubin dan garam empedu dalam spesimen feses), biaya yang cukup tinggi dan teknis yang relatif rumit. Usaha untuk melacak DNA dari spesimen klinis masih belum memberikan hasil yang memuaskan sehingga saat ini penggunaannya masih terbatas dalam laboratorium penelitian (Wain et al., 2014).

2.12. Komplikasi DT

Komplikasi DT dapat dibagi atas dua bagian, yaitu (Huang et al, 2005):

1. Komplikasi Intestinal

a) Perdarahan Usus

Sekitar 25% penderita DT dapat mengalami perdarahan minor yang tidak membutuhkan transfusi darah. Perdarahan hebat dapat terjadi hingga penderita mengalami syok. Secara klinis perdarahan akut darurat bedah ditegakkan bila terdapat perdarahan sebanyak 5 ml/kgBB/jam.

b) Perforasi

Usus

Terjadi pada sekitar 3% dari penderita yang dirawat. Biasanya timbul pada minggu ketiga

namun dapat pula terjadi pada minggu pertama. Penderita DT dengan perforasi mengeluh nyeri perut yang hebat terutama di daerah kuadran kanan bawah yang kemudian menyebar ke seluruh perut. Tanda perforasi lainnya adalah nadi cepat, tekanan darah turun dan bahkan sampai syok.

2. Komplikasi Ekstraintestinal

- a) Komplikasi kardiovaskuler: kegagalan sirkulasi perifer (syok, sepsis), miokarditis, trombosis dan tromboflebitis.
- b) Komplikasi darah: anemia hemolitik, trombositopenia, koagulasi intravaskuler diseminata, dan sindrom uremia hemolitik.
- c) Komplikasi paru: pneumoni, empiema, dan pleuritis.
- d) Komplikasi hepar dan kandung kemih: hepatitis dan kolelitiasis.
- e) Komplikasi ginjal: glomerulonefritis, pielonefritis, dan perinefritis.
- f) Komplikasi tulang: osteomyelitis, periostitis, spondilitis, dan artritis.
- g) Komplikasi neuropsikiatrik: delirium, meningismus, meningitis, polineuritis perifer, psikosis, dan sindrom katatonia.

2.13. Penatalaksanaan DT

Terapi untuk DT dapat dibagi menjadi dua yaitu suportif dan kuratif. Untuk terapi suportif dapat diberikan hidrasi oral atau intravena, penggunaan antipiretik, asupan nutrisi yang sesuai dan transfusi darah apabila diperlukan. Hampir 90% pasien dapat ditangani di rumah dengan antibiotik oral dan kunjungan kembali ke rumah sakit apabila terdapat komplikasi atau tidak kunjung membaik. Namun, pasien dengan muntah persisten, diare berat dan distensi abdomen memerlukan perawatan inap dan terapi antibiotik parenteral (World Health Organisation, 2003).

Di Indonesia, kloramfenikol masih merupakan obat lini pertama untuk DT karena lebih murah dan lebih dapat ditemukan di Indonesia. Namun kloramfenikol memiliki angka relaps yang cukup tinggi (sekitar 15%), anemia aplastik ireversibel, dan tidak mencegah pembawa kronis (2-5%). Masalah lainnya adalah angka resistensi yang cukup tinggi di Semarang dan Jakarta (1.8-16.7%) (Soewandojo et al., 1998).

Sedangkan WHO merekomendasikan penggunaan florokuinolon (terutama ciprofloxacin, levofloxacin dan ofloxacin) dan sefalosporin (terutama generasi ke-3 dan ke-4) sebagai lini pertama (World Health Organisation, 2003). Namun, *S.typhi* juga resisten terhadap florokuinolon sehingga penggunaan azitromisin dan sefalosporin generasi ke-3 semakin meningkat. Selain itu, terdapat banyak studi yang melaporkan resistensi tinggi terhadap sefalosporin spektrum luas seperti seftriakson (Upadhyay et al., 2016).

Commented [TAYL12]: Tambahkan levofloxacin

2.14. Resistensi Antibiotika Pengobatan DT

Multidrug resistance (MDR) diasosiasikan dengan plasmid yang dapat ditransfer sedangkan menurunnya suseptibilitas terhadap florokuinolon pada serovar Typhi diasosiasikan dengan mutasi titik di gen target bakteri yang mengkode DNA gyrase dan atau DNA topoisomerase IV (Chau et al., 2007).

Awal mula resistensi antimikrobia ditemukan pertama kali pada tahun 1950, 2 tahun setelah kloramfenikol ditemukan sebagai obat yang sangat efektif dalam penanganan DT. Namun, penggunaannya yang sangat luas mengakibatkan munculnya sampel *S.typhi* resisten terhadap antibiotik tersebut. Pada tahun 1972, resistensi kloramfenikol menjadi sebuah masalah dengan ditemukannya kasus di Mexico (1972), India (1972), Vitenam (1973), dan Korea (1977). Biakan

tersebut juga resisten terhadap ampisilin sehingga pada saat itu kotrimoksazol merupakan obat pilihan hingga 1975 ketika ditemukan juga *S.typhi* yang resisten terhadap kotrimoksazol (Ugboko et al., 2014).

Di akhir tahun 1980, ketiga lini obat pertama sudah tidak dapat mengobati DT secara efektif sehingga siprofloksacin menjadi obat pilihan pertama dalam mengatasi DT MDR. Namun, di tahun 1992, kasus pertama resistensi terhadap florokuinolon dilaporkan di Britania Raya dan setelah itu di India sehingga sefalosporin generasi ketiga mulai digunakan namun tidak lama kemudian kasus resistensi juga dilaporkan (Ugboko et al., 2014).

Mekanisme resistensi oleh *S.typhi* diperantai oleh 2 cara yaitu akuisisi gen asing lewat plasmid dan mutasi kromosom (Holt et al., 1994). Resistensi dapat diraih melalui akuisisi horizontal dari gen resisten, dimobilisasi melalui sekuens insersi, transposons dan plasmid konjugasi dengan cara rekombinasi dari DNA asing ke dalam kromosom atau dengan mutasi pada lokus kromosom yang berbeda (Ugboko et al., 2014).

S.typhi melawan efek dari antimikrobal dengan cara menginaktivasi obat tersebut, modifikasi dari target antimikrobal, dan mengurangi permeabilitas dari agen antimikrobal (Ugboko et al., 2014). Kebanyakan resistensi obat terjadi akibat perubahan genetik di dalam organisme tersebut baik akibat mutasi kromosom atau akuisisi dari plasmid atau transposon (Denyer et al., 2011).

2.15. Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α)

Hypoxia-inducible factor (HIF) merupakan sebuah kompleks heterodimer yang berikatan dengan DNA yang terdiri dari dua protein *helix-loop-helix* dasar dari keluarga PAS (Keluarga PER, AHR, ARNT dan

SIM) (Weidemann A., 2008). HIF adalah faktor transkripsi yang dihasilkan ketika terjadi penurunan kadar oksigen di dalam sel atau kondisi hipoksia (Smith et al., 2008). *Hypoxia-inducible factor (HIF)* merupakan sebuah kompleks heterodimer yang berikatan dengan DNA yang terdiri dari dua protein *helix-loop-helix* dasar dari keluarga PAS (Keluarga PER, AHR, ARNT dan SIM) (Weidemann A., 2008). HIF adalah faktor transkripsi yang dihasilkan ketika terjadi penurunan kadar oksigen di dalam sel atau kondisi hipoksia (Smith et al., 2008).

Gen HIF-1 α terdapat di kromosom 14 lokus q 23.1, dengan koordinat genomik pada 61,695,512-61748,259 pasang basa. Faktor transkripsi HIF-1 α pertama kali ditemukan pada tahun 1995 oleh Gregg L. Semenza dan Guang Wang (Wang et al., 1995), dan semenjak itu HIF-1 α mulai dipostulasikan untuk memiliki peranan dalam beberapa penyakit dari kanker hingga infeksi. Respons seluler utama terhadap level oksigen yang rendah adalah dengan meningkatkan produksi HIF-1 α sehingga meningkatkan ekspresi genetik yang dapat mengkodekan protein untuk meningkatkan suplai oksigen (seperti eritropoietin atau VEGF) atau memperbaiki produksi anaerobik (enzim glikolitik) (Kaluz et al, 2006).

Pentingnya HIF-1 α terbukti saat hilangnya komponen ini pada embriogenesis dapat membunuh mudigah karena vaskularisasi yang defektif. Selain itu, HIF-1 α dapat membantu revaskularisasi setelah iskemia jantung dan otak. Kompleks HIF juga menyokong ekspresi gen lainnya seperti eritropoietin (EPO) dengan cara mengikat pada *hypoxia-responsive enhancer elements* (HREs) (Halterman et al, 1999).

Proses aklimatisasi merupakan sebuah proses di mana saat mencapai ketinggian, akan terjadi hipoksia dalam konteks lingkungan sekitar akibat perubahan fisiologis yang besar sehingga akan mengaktifkan transkripsi HIF dan memengaruhi proses hematologi, respirasi, dan kardiovaskular. Hipoksia akan meningkatkan serum eritropoietin dalam 90 menit dan semakin tinggi ketinggiannya, serum Epo akan memuncak dalam 2 hari dan setelah itu akan menurun dalam waktu 1-2 minggu (Richalet et al., 1994).

Ventilasi pulmoner akan berkaitan dengan metabolisme energi di dalam tubuh yang berfungsi untuk memerlukan substrat esensial (oksigen) dan membuang sisa metabolisme (karbon dioksida) dan ventilasi terpengaruh dari perubahan tekanan parsial arteri dari oksigen (PO_2) dan karbon dioksida (PCO_2). Hipoksia akut menstimulasi peningkatan *minute ventilation* secara langsung yang memuncak dalam hitungan menit dan kemudian menurun ke kadar pre-hipoksia dalam waktu hitungan menit hingga jam (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).

Ketika hipoksia dipertahankan, ventilasi kemudian akan meningkat kembali dalam beberapa jam dan melewati kadar hipoksia akut dan ventilasi akan terus meningkat dalam beberapa hari. Proses ini disebut juga dengan aklimatisasi ventilasi terhadap hipoksia yang ditandai dengan turunnya kadar PCO_2 dan meningkatnya sensitivitas ventilasi hipoksia terhadap stimulus hipoksia akut (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).

Hipoksia akut juga meningkatkan curah jantung yang diasosiasikan dengan peningkatan laju jantung. Curah jantung kemudian akan kembali normal setelah aklimatisasi walaupun laju jantung dapat tetap tinggi yang dikompensasikan dengan menurunnya volume sekuncup (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).

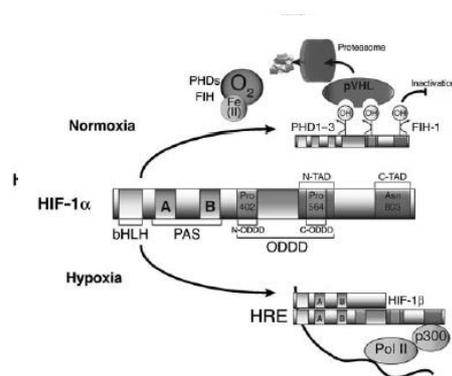
Pada manusia, terdapat 3 subunit dari HIF yaitu HIF-1 α , HIF-2 α , dan HIF-3 α . Secara struktur, subunit yang saling berhubungan memiliki *O₂-dependent degradation domain* (ODDD). Residu prolin (dua untuk HIF-1 α dan HIF-2 α serta satu untuk HIF-3 α) memiliki peran penting terhadap fungsi ODDD (Kaluz et al., 2008). Keseluruhan dari isoform HIF- α dikode oleh lokus genetik yang unik dan keragaman dari isoform ini terjadi melalui promoter alternatif dan pola *splicing*. HIF-1 α dan HIF-2 α memiliki arsitektur domain yang mirip serta melalui regulasi proteolitik yang serupa namun ekspresi jaringan HIF-2 α lebih terbatas (Wiessner et al., 2003).

Studi *in vivo* pada binatang serta *in vitro* membuktikan bahwa isoform HIF-1 α , HIF-2 α memiliki fungsi penting dalam regulasi ekspresi gen namun terdapat fungsi yang tumpang tindih di antara keduanya

yang sangat bervariasi dari satu sel ke sel lainnya. Isoform HIF-3 α belum diketahui secara pasti fungsinya namun *splicing* alternatif dari HIF-3 α menghasilkan protein domain inhibitor PAS yang berfungsi menghambat respons HIF dengan membentuk heterodimer inaktif secara transkripsi dengan HIF-1 α (Makino et al., 2001).

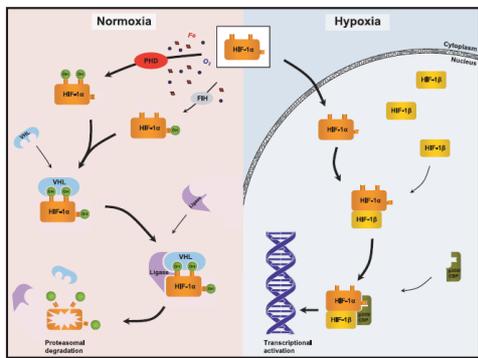
Dalam kondisi normoksia, subunit HIF-1 α memiliki waktu paruh yang sangat singkat (Jewell et al., 2001) dan sel secara terus-menerus mensintesa dan mendegradasi protein HIF- α . Namun, dalam situasi hipoksia, degradasi dari HIF- α menjadi terhambat (Jiang et al., 1996). Reaksi enzimatik hidroksilasi dua residu prolyl (Pro402 dan Pro564) membantu interaksi antara oksigen dan subunit HIF- α di mana reaksi ini terjadi pada ODDD (Ivan et al, 2001). Hidroksilasi yang membutuhkan oksigen ini mengatur interaksi dengan protein supresi tumor von Hippel-Lindau (pVHL) di mana pVHL merupakan komponen rekognisi dari kompleks ligase ubiquitin E3 yang menargetkan HIF- α untuk proteolisis melalui jalur ubiquitin-proteasom (Maxwell et al., 1999).

Dalam kondisi hipoksia, *prolyl hydroxylase-domain* (PHD) tersupresi sehingga protein HIF- α tidak dihancurkan dan berakumulasi. Selanjutnya, HIF- α bertranslokasi ke nukleus dan dimerisasi dengan HIF-1 β . *Heterodimeric transactivating complex* HIF kemudian menempel kepada HRE pada sekuens *promoter* atau *enhancer* dari target gen (**Gambar 2.15.1**) (Weidemann A., 2008).



Gambar 2.15.1 Regulasi protein HIF-1 α oleh hidroksilasi prolyl dan degradasi proteasomal.

Terdapat 3 jenis isoform PHD yaitu PHD1, PHD2, dan PHD3 yang merupakan anggota dari 2-oxoglutarat dan famili dioksigenase yang bergantung dengan zat besi. Aktivitas mereka tergantung dengan oksigen sebagai ko-substrat bersama dengan zat besi, askorbat, dan 2-oxoglutarat sebagai kofaktor obligat. Bersama dengan VHL dan HIF, terbentuklah aksis PHD-VHL-HIF sebagai regulator sentral dari homeostasis oksigen seluler (**Gambar 2.15.2**) (Smith, Robbins and Ratcliffe, 2008).



Gambar 2.15.2 Aksis

PHD-VHL-HIF

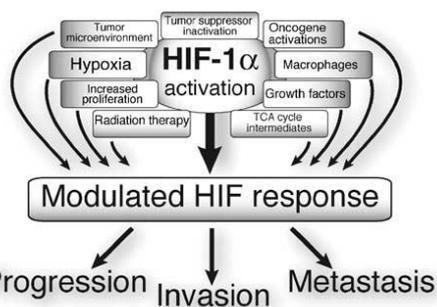
Banyak gen yang diinduksi oleh HIF-1 α diekspresikan pada kadar yang lebih tinggi pada kanker terutama faktor pertumbuhan angiogenik seperti VEGF dan enzim dari metabolisme glukosa. Metabolisme kanker sangat bergantung oleh HIF-1 α seperti peningkatan asupan glukosa ke dalam sel, produksi laktat, dan penurunan respirasi. Aktivasi HIF merupakan sifat umum dari tumor yang lebih prominen pada tumor agresif dan merupakan prediktor independen terhadap prognosis buruk pada kanker tipe tertentu (Weidemann et al., 2008).

Namun, mekanisme aktivasi HIF pada tumor kompleks karena terpengaruh oleh lingkungan mikro yang hipoksia akibat tumor dan juga akibat inaktivasi dari gen supresi tumor seperti hilangnya fungsi pVHL. Pada sebuah studi *hereditary renal cell carcinoma* ditemukan adanya hubungan dengan inaktivasi *fumarat hydratase* (FH) siklus *tricarboxylic* (TCA) di mana pada siklus Krebs fumarat intermediat menghambat *2-oxoglutarate-dependent dioxygenases* seperti HIF *hydroxylases*. Setelah

itu, studi menemukan defisiensi FH memang dapat meningkatkan regulasi HIF- α namun fumarat juga memiliki fungsi dalam pembentukan matriks sehingga mekanisme lebih lanjut perlu diteliti (Pollard et al., 2007).

Gen supresi tumor yang dapat memengaruhi kadar HIF-1 α termasuk p53 dan PTEN yang mensupresi induksi HIF-1 α saat hipoksia dan aktivasi gen target yang diduga melalui modulasi AKT. Lingkungan mikro tumor juga telah diimplikasikan untuk memengaruhi stabilitas HIF-1 α di mana radiasi dapat menginduksi HIF-1 α melalui translasi mRNA HIF-1 α yang dilepaskan dari granula stres setelah oksigenasi kembali. Efek ini tergantung dengan terbentuknya radikal bebas in vivo (Weidemann et al., 2008).

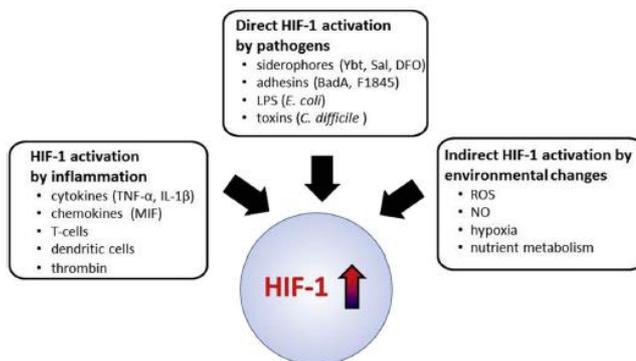
Aktivasi HIF-1 α juga memengaruhi derajat invasif dan metasasis dari tumor. Proses kompleks ini dimulai dari sel tumor yang memisahkan diri dari inti tumor, melewati membran basal, migrasi melalui ECM, invasi pembuluh darah, ekstrasvasi, dan proliferasi pada tempat yang sesuai. Pada tumor renal, hilangnya molekul adhesi antar sel E-cadherin ditemukan meningkatkan agresivitas dan derajat invasi kanker di mana HIF-1 memiliki peran penting dalam memediasi *downregulation* dari E-cadherin pada kondisi defisien VHL (**Gambar 2.15.3**) (Krishnamachary B, 2006).



Gambar 2.15.3 HIF- α Progression Invasion Metastasis pada kanker

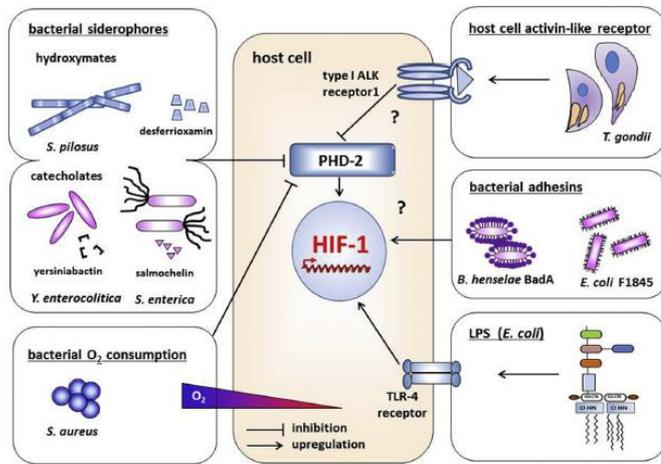
2.16. Peranan HIF-1 α dalam infeksi bakteri

Eksplorasi fungsi HIF-1 α dalam mengaktivasi neutrofil dan makrofag saat infeksi bakteri terbukti ketika ditemukan peningkatan kadar faktor HIF-1 α ketika beberapa spesies bakteri menginfeksi jaringan tubuh seperti *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (Zinkernagel et al., 2007), Enterobacteriaceae sp, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bartonella henselae*, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium tuberculosis*, dan *Helicobacter pylori* (Gambar 2.16.1) (Santos et al., 2017).



Gambar 2.16.1 Kategorisasi fungsional dari aktivasi HIF-1 pada infeksi

Sebuah studi pada mencit yang tidak memiliki HIF-1 α lebih rentan mengalami infeksi *S. pyogenes* yang invasif dan menurunkan kemampuan fagosit membunuh kuman gram-negatif dan gram-positif in vitro sehingga HIF-1 α memiliki peran penting dalam imunitas adaptif (Gambar 2.16.2) (Peyssonnaud et al., 2005).

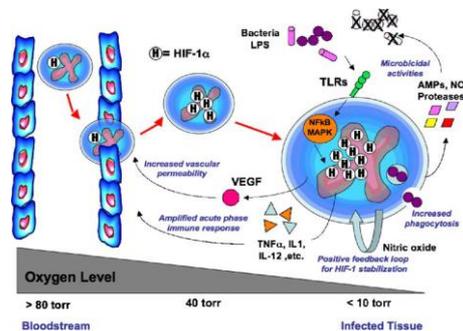


Gambar 2.16.2 Interaksi antara patogen dan sel inang terhadap aktivasi HIF-1

Sekuesterisasi bakteri terhadap zat besi dapat memiliki efek terhadap stabilisasi HIF-1 α sejak mekanisme perputaran HIF-1 α tergantung terhadap aktivitas hidroksil prolyl yang tergantung terhadap zat besi. Fenomena ini dapat terjadi di plak Peyeri di usus halus dan bakteri seperti *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* atau *Enterobacter aerogenes* dapat menginduksi ekspresi HIF-1 α di plak Peyeri (Werth et al., 2006). Ketika mencit yang tidak memiliki ekspresi HIF-1 α terinfeksi oleh *Y. Enterocolitica*, mencit tersebut mengalami reaksi yang lebih berat sehingga jalur aktivasi HIF-1 α dipostulasikan berkontribusi terhadap sistem imun alami (Werth et al., 2006).

Sel-sel fagositik seperti neutrofil dan makrofag memiliki kadar HIF-1 α yang rendah ketika berada di lingkungan yang kaya akan oksigen. Ketika sel-sel tersebut direkrut ke jaringan yang terinflamasi, lingkungan di jaringan tersebut relatif hipoksia sehingga meningkatkan kadar seluler dari HIF-1 α dan menginisiasi aktivasi dari gen efektor proinflamasi dan bakterisidal. Stimulasi dari HIF-1 α akan maksimum ketika distimulasi oleh pola reseptor rekognisi seperti TLR-4 dan jalur sinyal sel seperti NF κ B dan MAPK. Fagositosis yang dimediasi oleh HIF-1 α kemudian meningkat dan dibantu oleh peptida antimikrobal seperti *cathelicins* serta protease granula dengan aktivitas antibakteri langsung. Peningkatan kadar VEGF dan sitokin proinflamasi membantu rekrutmen dan aktivasi dari

sel efektor imunitas lainnya. Aktivasi dari NOS menghasilkan NO yang memiliki properti antimikrobia dan juga menstabilisasi HIF-1 α sehingga menguatkan sistem imunitas alami di dalam fagosit (Gambar 2.16.3) (Vink et al., 2007).



Gambar 2.16.3 Model HIF-1 α di dalam fagosit

regulasi transkripsi

Interleukin-1 β dapat mengaktivasi HIF-1 α melalui NF-kB. Aktivasi dari NF-kB dikontrol secara mayoritas melalui *IkappaB* kinases (IKK) terutama IKK-beta yang berfungsi sebagai degradasi yang diinduksi oleh fosforilasi dari inhibitor IkappaB dalam responsnya terhadap infeksi dan inflamasi. Sebuah studi menunjukkan bahwa makrofag yang diderivasi oleh sum-sum tulang yang terinfeksi bakteri *group A streptococci* dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat menginduksi aktivasi HIF-1 melalui jalur yang dependen terhadap IKK- β (Devraj et al., 2016).

2.17. Potensi HIF sebagai biomarker dan terapi

Peranan sentral dari HIF-1 α membuat aktivator dari HIF-1 α menjadi sebuah potensi pengobatan infeksi. Beberapa senyawa farmakologis telah diteliti untuk mengaktivasi HIF dan yang paling banyak diteliti adalah inhibitor dari prolyl hidrosilasi (Kim et al., 2006). Studi terbaru menunjukkan bahwa peranan HIF-1 mieloid pada patofisiologi sepsis sangat terpengaruh oleh waktu. Studi menemukan bahwa mencit dengan delesi HIF-1 mieloid spesifik memiliki proteksi terhadap takikardia, hipotensi, dan hipotermia akibat sepsis di fase awal namun pada fase akhir HIF-1 mieloid tidak memiliki efek pada gejala klinis (Fitzpatrick et al., 2018).

Pada *in vitro*, setelah stimulasi LPS akut, protein HIF-1 α berakumulasi dan gen target HIF-1 diekspresikan akibat peningkatan mRNA HIF-1 α . Sebaliknya, stimulasi LPS yang repetitif mengakibatkan toleransi endotoksin sehingga kadar HIF-1 α menurun pada monosit. Pada pasien dengan sepsis, monosit yang bersirkulasi pertama-tama terekspos dengan konsentrasi toksin rendah (sepsis insipien) dan kemudian kadar toksin meningkat di dalam darah atau ketika bermigrasi menuju fokus patogen dengan kadar toksin yang lebih tinggi (Schäfer et al., 2013).

Menariknya lagi regulasi HIF-1 α pada manusia dengan sepsis belum diteliti sehingga masih tidak jelas apakah kadar mRNA HIF-1 α meningkat, menurun atau tidak berubah pada pasien dengan sepsis. Selain itu, masih tidak jelas apakah kadar konsentrasi protein HIF-1 α *in vitro* yang menurun berasosiasi dengan eksposur LPS yang repetitif atau karena peningkatan degradasi dan penurunan ekspresi mRNA (Schäfer et al., 2013).

Perubahan dinamis dalam ekspresi HIF pada sepsis membuat studi-studi meneliti potensi HIF sebagai biomarka sepsis walau masih sangat kontroversial. HIF-1 mRNA yang diekstraksi dari sampel darah lengkap meningkat secara signifikan pada pasien dengan syok sepsis namun tidak terdapat korelasi dengan luaran akhir pasien (Textoris et al., 2012). Namun, kadar protein dan HIF-1 mRNA leukosit menurun pada pasien sepsis dan memiliki korelasi terbalik dengan derajat penyakit (Schäfer et al., 2013).

Terdapat uji coba klinis yang menginvestigasi potensi HIF-1 sebagai biomarka novel pada syok sepsis yang masih menunggu publikasi (NCT02163473). Penggunaan HIF sebagai biomarka dapat menjadi sebuah masalah kompleks karena peranannya yang sangat luas tergantung dari tipe sel. HIF juga telah

dipostulasikan dapat menjadi target terapeutik potensial untuk sepsis dan studi memfokuskan dalam menargetkan HIF secara tidak langsung. Edaravone yang merupakan *radical scavenger* yang kuat yang dapat menginduksi HIF-1 α yang kemudian akan menekan stres dan memproteksi jantung dari cedera miokardial sepsis dan disfungsi (He et al., 2018).

Selain itu, ditemukan juga bahwa *7-dihydroxy-8-methoxyflavone* memproteksi melawan cedera paru akut akibat sepsis melalui inhibisi akumulasi HIF-1 α . Ko-stimulasi LPS dan simvastatin menurunkan kadar HIF-1 α dan membantu memproteksi disfungsi hepar pada tahapan awal sepsis pada mencit. Studi lebih lanjut dibutuhkan menggunakan inhibitor HIF spesifik untuk memaparkan potensi jalur target terapeutik dari HIF tersebut (Fitzpatrick, 2019).

2.18. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan mitogen endotel yang sel spesifik in vitro dan sebuah pemicu angiogenik pada beberapa model mitogen in vitro (Ferrara, 2004).

Protein VEGF pertama kali mulai dipikirkan ketika pada tahun 1939 Ide et al. mempostulasikan bahwa terdapat faktor yang menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah akibat tumor dengan basis respons neovaskularisasi yang kuat (Ide et al., 1939).

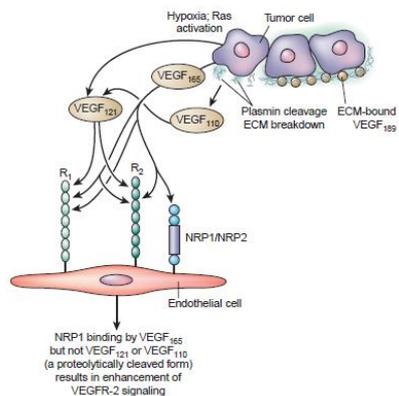
Eksresi mRNA VEGF diinduksi oleh kadar oksigen yang rendah dan HIF-1 merupakan mediator utama dalam kondisi hipoksia (Dor et al., 2001). Mirip seperti HIF-1 α , gen supresor tumor VHL memiliki peranan penting dalam regulasi VEGF di mana aktivitas mitogenik pada sel endotel yang dihasilkan oleh sel karsinoma renal dengan mutasi VHL dapat dinetralisasi dengan antibodi terhadap VEGF (Siemester et al., 1996). Dapat disimpulkan bahwa fungsi protein VHL adalah untuk meregulasi VEGF dan gen yang diinduksi oleh hipoksia lainnya.

Beberapa faktor pertumbuhan mayor seperti faktor pertumbuhan epidermal, TGF- α , TGF- β , faktor pertumbuhan keratinosit, *insulin-like growth factor-1* (IGF-1), faktor pertumbuhan fibroblas (FGF), dan *platelet-derived growth factor* (PDGF) dapat meningkatkan ekspresi mRNA VEGF sehingga terdapat hipotesa bahwa pelepasan faktor-faktor tersebut secara parakrin atau autokrin bekerja sama dengan hipoksia lokal dalam meregulasi VEGF (Neufeld et al. 1999).

Sitokin inflamatori seperti IL-1 α dan IL-6 menginduksi ekspresi dari VEGF pada beberapa tipe sel termasuk fibroblas sinovial sehingga memperkuat hipotesis bahwa VEGF mungkin merupakan mediator angiogenesis dan permeabilitas dalam penyakit inflamasi (Neufeld et al. 1999).

Gen VEGF pada manusia diatur dalam 8 ekson yang dipisahkan oleh 7 introns. *Splicing* exon secara alternatif menghasilkan 4 generasi isoform yang berbeda yaitu VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, dan VEGF₂₀₆ yang masing-masing memiliki 121, 165, 189, dan 206 asam amino secara berurutan (Houck et al., 1991). Isoform yang predominan adalah VEGF₁₆₅ di mana isoform ini tidak memiliki residu yang dikode oleh exon 6 sedangkan VEGF₁₂₁ tidak memiliki residu yang dikode oleh exon 6 dan 7. Variasi dari hasil *splice* yang tidak begitu sering ditemukan dapat berupa VEGF₁₄₅ dan VEGF₁₈₃ (Houck et al., 1991).

VEGF natif merupakan glikoprotein berukuran 45 kDa homodimerik yang berikatan dengan heparin di mana VEGF₁₂₁ merupakan polipeptida dengan pH asam yang tidak berikatan dengan heparin sedangkan VEGF₁₈₉ dan VEGF₂₀₆ hampir seluruhnya berada di matriks ekstraseluler (ECM). Hilangnya domain yang berikatan dengan heparin berakibat menurunnya aktivitas mitogenik dari VEGF secara signifikan (**Gambar 2.18.1**) (Houck et al., 1991).



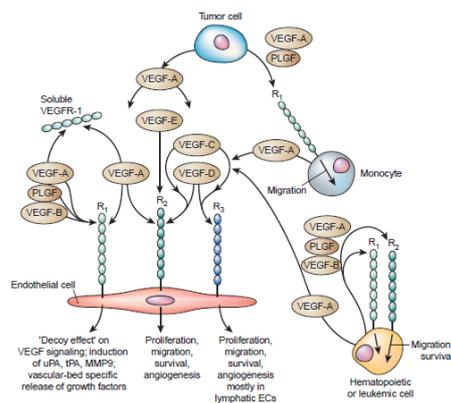
Gambar 2.18.1 Isoform VEGF dan interaksinya dengan reseptor VEGF

Pada perkembangan fase embrionik dan post-natal, VEGF terlibat dalam vaskulogenesis, angiogenesis dan limfangiogenesis. Delesi alel tunggal dari VEGF dan hilangnya VEGFR1 atau VEGFR2 menghasilkan kematian pada embryo akibat defisit dari vaskulogenik atau angiogenik (Ferrara et al., 1996). Secara lebih spesifik VEGF telah terimplikasikan dalam beberapa fungsi lainnya seperti angiogenesis ovarium, formasi tulang endokondral, regenerasi jaringan, kelangsungan hidup sel punca hematologi, regulasi eritropoietin dan proses patologis seperti neoplasma, hematologi, okular, inflamatori dan penyakit iskemik (Gerber et al., 2002).

Data terbaru menunjukkan bahwa pembuluh darah yang sudah terbentuk di usus halus, pankreas, tiroid dan hepar membutuhkan VEGF untuk pemeliharaan pembuluh darah di mana hilangnya VEGF akan mengakibatkan regresi parsial dari jaringan kapiler yang kompleks pada organ tersebut (Kamba et al., 2006). Efek dari VEGF ditargetkan terhadap sel endotel vaskular. Sel-sel tipe lainnya termasuk neuron, osteoblas, sel duktus pankreas, sel progenitor retina dan megakariosit mengekspresikan VEGFR2 namun pada kadar yang lebih rendah dari sel endotel vaskular yang dapat menjelaskan spesifisitas VEGF untuk sel endotel (Matsumoto & Claesson-Welsh, 2001).

Walaupun VEGF memiliki afinitas yang lebih tinggi dengan VEGFR (Kd ~ 10–20pmol/L) dibandingkan dengan terhadap VEGFR2 (Kd ~ 75–125pmol/L), (de Vries et al., 1992) VEGFR2 lebih berperan terhadap hampir semua aktivitas VEGF secara angiogenik termasuk permeabilitas sel endotel vaskular, proliferasi, migrasi, dan ketahanan hidup. Stimulasi VEGF dari VEGFR1 dilaporkan dapat menstimulasi migrasi monosit/makrofag dan kemotaksis, ekspresi *matrix metalloproteinase* (MMP)-9, dan hematopoiesis (Ferrara et al., 2003).

Terdapat 2 tirosine kinase reseptor (RTKs) untuk VEGF yaitu VEGFR-1 dan VEGFR-2. Kedua reseptor ini memiliki 7 domain yang mirip dengan imunoglobulin pada domain ekstraseluler, regio tunggal transmembran dan sekuens tirosin kinase yang memiliki domain kinase-insert (Shibuya et al., 1990). Terdapat pula VEGFR-3 (fms-like-tyrosine kinase (Flt)-4) yang merupakan bagian dari famili RTKs namun bukan reseptor untuk VEGF namun berikatan dengan VEGFC dan VEGFD. Selain RTKs, VEGF juga berinteraksi dengan famili koreseptor yaitu neuropilins (**Gambar 2.18.2**) (Karkkainen et al., 2002).



Gambar 2.18.2 Peranan reseptor VEGF dalam beberapa tipe sel.

2.19. Fungsi VEGF

VEGF memiliki beberapa peran dalam angiogenesis fisiologik. Dalam perkembangan embrionik dan awal post-natal di mana inaktivasi dari satu alel VEGF pada mencit menghasilkan kematian embrio pada hari ke-11 dan ke-12. Kematian ini diakibatkan beberapa anomali perkembangan, vaskularisasi defektif pada beberapa organ dan penurunan bermakna dari sel darah merah yang bernukleasi pada kantung kuning (Ferrara et al., 2013). Inhibisi parsial dari VEGF berakibat pada peningkatan mortalitas, *stunting*, dan perkembangan organ yang terganggu pada masa awal post-natal. Selain itu, perkembangan glomerulus yang defektif juga terjadi pada neonatus yang tidak memiliki VEGF (Eremina et al., 2003).

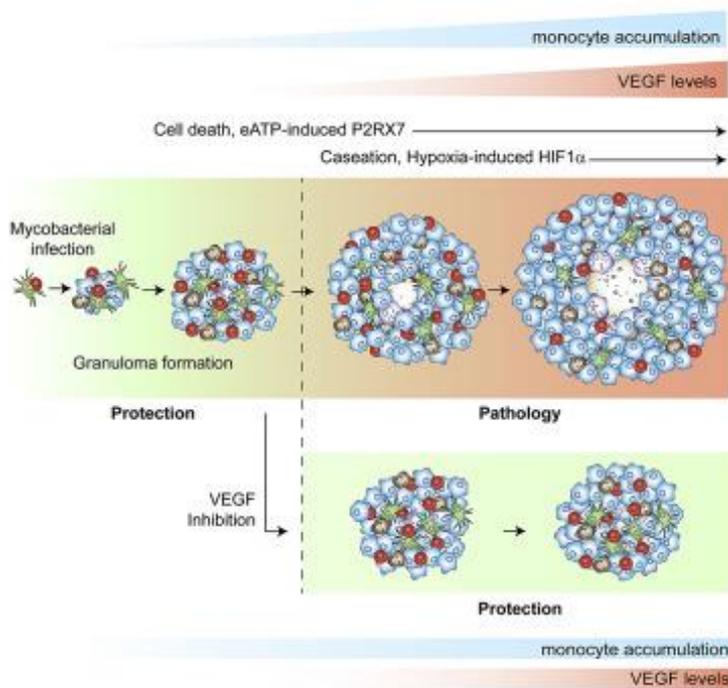
Peranan VEGF juga terlihat dalam perkembangan skeletal dan formasi tulang endokondral di mana VEGF mRNA diekspresikan oleh kondrosit hipertrofik pada lempeng perkembangan epifiseal yang berarti bahwa VEGF dibutuhkan untuk perkembangan dan invasi kartilago oleh pembuluh darah metafiseal (Ferrara et al., 2013). Pertumbuhan folikuler dan perkembangan korpus luteum tergantung terhadap proliferasi pembuluh darah kapiler baru dan ekspresi VEGF mRNA memiliki hubungan terhadap proliferasi pembuluh darah di ovarium (Phillips et al., 1990).

2.20. Peranan VEGF dalam Infeksi

Peranan VEGF terhadap infeksi dimediasi melalui pengaruh VEGF terhadap inflamasi. Vasodilatasi yang terjadi saat inflamasi dipengaruhi oleh bradikinin, histamin, dan VEGF yang dilepaskan pada saat terjadi kerusakan jaringan dan *nitric oxide* yang dihasilkan oleh endotelium vaskular. Histamin dan VEGF mengakibatkan kebocoran pembuluh darah pada saat inflamasi sehingga terjadi eksudasi plasma. Peningkatan permeabilitas vaskular meningkatkan massa jenis sel di dalam pembuluh darah dan tekanan interstitial di luar pembuluh darah di mana tekanan ini dapat meningkatkan kejadian trombotik sehingga aliran darah menjadi stasis. Ketika stasis pada pembuluh darah terjadi, sel imun alami dapat berekstravasasi ke jaringan (Ramakrishnan et al., 2014).

Vascular endothelial growth factor, *CXCL12*, *endothelial monocyte activating peptide-II* (EMAPII) dan *Angiopoietin-2* (Ang2) membantu mediasi ekstravasasi dari monosit dalam keadaan hipoksia. Setelah itu, *human monocyte derived macrophages* (hMDM) beradaptasi terhadap lingkungan hipoksia dan dengan cepat mengekspresikan gen seperti FGF, VEGFR, dan sitokin pro-inflamasi yang dapat diinduksi hipoksia seperti IL-1 beta, TNF- α , dan protein fase akut seperti IL-6 (Bosco et al., 2008).

Pada infeksi kronis seperti tuberculosis, peranan VEGF meningkatkan respons jaringan sehingga terbentuk jaringan granuloma yang berlebihan. Penghambatan pada VEGF memberikan respons perbaikan jaringan, perlindungan dan meningkatkan survival sel terinfeksi. (Gambar 2.20.1) (Harding et al., 2019) Pada infeksi kronis seperti tuberculosis, peranan VEGF meningkatkan respons jaringan sehingga terbentuk jaringan granuloma yang berlebihan. Penghambatan pada VEGF memberikan



Gambar 2.20.1. Respons Penghambatan jalur VEGF pada infeksi tuberculosis

Nuclear factor-kappa b (NFκB) merupakan faktor transkripsi sentral untuk memediasi respons inflamasi yang terlibat dalam ekspresi MCP-1 di mana VEGF akan menginduksi MCP-1 melalui jalur NFκB (Marumo et al., 1999). Sitokin inflamasi seperti IL-1β diinduksi oleh NFκB-COX2 dan dapat menstabilisasi HIF-1 sebagai akibat dari induksi oleh VEGF (Ramakrishnan et al., 2014).

VEGF di dalam infeksi dapat diaktifkan lewat jalur Prostaglandin E2 (PGE2). (Tamura, 2006) (Cheng, et al. 1998) Pada jaringan terinfeksi PGE2 endogen akan dihasilkan dan merangsang VEGF dan *basic fibroblast growth factor* (bFGF) (Cheng, et al. 1998). PGE2 mengaktifasi ERK2 dan JNK, kemudian merangsang VEGF dari endotel untuk respons angiogenesis dan permeabilitas vaskular (Pai, et al 2001).

2.21. Daun Miana (*Coleus scutellaroides* [L] Benth)

Berikut adalah klasifikasi taksonomi dari daun miana (Basrah, 1995):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales

Famili : Lamiaceae
Genus : *Coleus*
Spesies : *Coleus scutellarioides* (L) Benth



Gambar 2.21.1 Tanaman Miana (*Coleus scutellarioides* (L) Benth)

Tanaman Miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth) atau *Solenostemon scutellarioides*, juga dikenal sebagai tanaman iler. Tumbuhan ini berasal dari India dan Thailand. Miana tumbuh di daerah Asia Tenggara. Miana berkembang di Indonesia dan dibudidayakan sebagai tanaman hias karena memiliki warna warni daun yang indah. Miana adalah tanaman tropis yang dapat hidup tahunan. Daunnya memiliki berbagai bentuk dan warna seperti kuning kekuningan, merah, krem dan ungu-hitam. Beberapa kultivar dapat memiliki hampir semua warna tersebut. Semakin gelap bintik-bintik merah pada daun semakin tinggi kemampuannya dalam mentolerir sinar matahari. *Coleus* mekar di musim panas. Jelatang biru ke putih seperti bunga lainnya akan cenderung mengurangi penampilan kelopaknya. *Coleus* tumbuh dengan baik di tanah hangat dengan drainase yang layak tetapi tidak dalam kondisi kering. Tanaman yang tumbuh di bawah sinar matahari yang terlalu banyak dapat layu.

Sebaliknya yang tumbuh di lingkungan kurang cahaya akan memiliki batang yang panjang. (Suva, et al. 2015)

Tanaman ini termasuk famili *Lamiaceae*. Tanaman Miana merupakan sebuah tanaman yang unik karena memiliki varietas yang sangat banyak. Perbedaan varietas didapatkan dari perbedaan warna daun yang sangat beragam. Warna-warni daun disebabkan karena pigmen yang dimilikinya. Formasi pigmen di dalam daun ditentukan secara genetik dan juga dipengaruhi faktor lingkungan seperti cahaya dan lingkungan (Harborne, 1996). Perbedaan warna daun antar varietas Miana ditentukan oleh kandungan pigmen yang termasuk ke dalam golongan flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok fenol yang terbesar yang ditemukan di alam (Achmad S.A., 1986).

Tumbuhan Miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth) banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk beberapa penyakit seperti mata, wasir, bisul, demam nifas, radang telinga, abses, borok, luka bernanah, keputihan, kencing manis, sembelit, dispepsia, cacingan, gigitan ular, dan serangga beracun. Tumbuhan Miana juga dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia (Swantara, 2010). Tanaman Miana berbau harum, rasanya agak pahit, sifatnya dingin. Berkhasiat sebagai peluruh haid (emenagog), perangsang nafsu makan, penetralisir racun (antitoksik) yaitu dapat diminum atau sebagai obat luar bila tergigit ular dan serangga beracun, menghambat pertumbuhan bakteri (antiseptik), menbuyarkan gumpalan darah, mempercepat pematangan bisul dan pembunuh cacing (vermisida), mengandung minyak atsiri, antara lain karvakrol yang bersifat antimikroba, eugenol bersifat menghilangkan nyeri, etil salisilat mengatasi iritasi. Penelitian lain menunjukkan, senyawa kimia polar Miana menghambat pertumbuhan sel leukemia L-1210.

Daun Miana (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) memiliki kandungan flavonoid, tanin, triterpenoid, steroid dan minyak atsiri yang mampu memberikan efek antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi. Penggunaan daun Miana mampu memberikan efek penyembuhan luka pada hewan coba, karena mampu menyebabkan penyempitan luka, membentuk keropeng dan menutup luka (Marpaung, et al . 2014). Pada penelitian untuk penggunaan daun Miana sebagai senyawa antikanker ditemukan bahwa terdapat 4 fraksi toksik dari daun Miana diantaranya adalah fraksi asam palmitat, asam stearat, 9-Oktadekenamida dan Ester dioktil heksadioat (Swantara, 2010).

Daun Miana mengandung minyak atsiri, antara lain karvakrol yang bersifat anti biotik, eugenol bersifat menghilangkan nyeri, etil salisilat menghambat iritasi. Menurut kumala, (2009) Miana merupakan salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Hasil ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides* (L.) Benth.) dapat digunakan sebagai penghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Hal ini disebabkan bagian tumbuhan tersebut mengandung tanin yang secara farmakologi dapat bermanfaat sebagai anti jamur.

Ekstraksi daun miana dapat dipergunakan berbagai maca, dengan sederhana ekstrasi dapat dilakukan dengan metode maserasi. Selanjutnya akan diberikan pelarut. Jenis pelarut organik yang dapat dipergunakan etil asetat, heksan, eter, benzen, toluen, etanol, isopropanol, aseton, dan air. Masing masing pelarut ini akan menghasilkan kandungan yang berbeda. Dalam penelitian Rahmawati ditemukan senyawa Tanin dan Steroid dengan menggunakan pelarut aseton. Sedangkan pada penelitian Pakadang dan Karo mempergunakan metode pelarut etanol memiliki senyawa flavonoid yang lebih tinggi. (Karo et al., 2017; Rahmawati, 2008a, 2008b; Pakadang et al., 2015)

2.22. Efek terapeutik Ekstrak Daun Miana (EDM) dalam penyakit infeksi

Keberadaan bakteri endofit di dalam jaringan tanaman diketahui dapat memacu pertumbuhan tanaman dan kemampuan bakteri untuk mempenetrasi jaringan internal tanaman dapat disebabkan oleh enzim ekstraseluler berupa selulase yang dihasilkan oleh bakteri tersebut. Setelah penetrasi, bakteri tersebut akan berkolonisasi sehingga menghambat pertumbuhan bakteri patogen melalui mekanisme kompetisi ruang dan nutrisi serta produksi zat antibakteri (Kusumawati et al., 2014).

Penelitian yang dilakukan oleh Kusumawati et al menemukan bahwa ekstrak daun miana dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.coli* dan *S.aureus* (Kusumawati et al., 2014). Ekstrak aseton daun miana dapat menghambat pertumbuhan *S.aureus*, *S.epidermidis*, *E.coli* dan *S.enteritidis*. Selain itu, ekstrak etanol daun miana pada konsentrasi 10% dan 20% memiliki daya antibakteri terhadap *S.aureus*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, dan *S.paratyphosa* (Kumala & Desi, 2009). Bakteri endofit yang menetap di tanaman miana memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa antibakteri yang diketahui mengandung derivat asam ftalat (Kusumawati et al., 2014).

Dosis ekstrak daun miana yang dapat memengaruhi proliferasi sel limfosit T pada mencit di adalah 714 mg/kg. Efeknya meningkatkan proliferasi sel T secara signifikan dan berfungsi sebagai imunostimulan (Pakadang et al., 2015).

Studi-studi menemukan bahwa ekstrak daun Miana memperbaiki imunitas dengan cara memodifikasi tingkat dan kualitas respons imun dari sel T, sel B, dan sitokin. Selain itu, ekstrak daun Miana juga memiliki peranan penting dalam pencegahan karena ekstrak daun Miana dapat meningkatkan imunitas inang sebelum paparan terhadap infeksi. Hal ini didukung oleh penelitian Pakadang et al. dimana pemberian ekstrak daun Miana meningkatkan jumlah sel limfosit T, jumlah sel T CD4, kadar

IFN- γ , dan TNF- α serta menurunkan kadar koloni *M.tuberculosis* pada paru-paru mencit Wistar (Pakadang et al., 2015).

Selain itu, ekstrak daun Miana memiliki zat antioksidan berupa antosianin dan memiliki aktivitas antioksidan sebesar 84.64%. Ekstrak daun miana memiliki aktivitas antioksidan khususnya pada ekstrak etil asetat sebesar $84,43 \pm 0,92$ mg AEAC/g. Senyawa flavonoid dari daun miana memiliki aktivitas antioksidan dan senyawa golongan tersebut berupa gugus fungsi OH, C=C aromatik, C-H aromatik, dan C-H alifatik (Podungge et al., 2017).

Studi Rahmawati menunjukkan bahwa bakteri gram negatif memiliki sistem seleksi terhadap zat asing yaitu lapisan lipopolisakarida. Penjelasan adalah bakteri gram positif hanya memiliki lapisan peptidoglikan yang mudah ditembus oleh senyawa antimikroba dan menemukan sasaran kerjanya (Rahmawati F., 2008).

2.23. Efek terapeutik ekstrak Daun Miana dalam infeksi *S.typhi*

Mekanisme antibakterial flavonoid adalah dengan menghambat sintesis asam nukleat dan merusak dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom, sehingga meningkatkan permeabilitas dinding sel yang mengakibatkan kematian sel. Sebuah studi yang menyatakan bahwa mekanisme flavonoid dalam menghambat fungsi membran sel adalah dengan merusak permeabilitas membran sel dan ikatan enzim seperti ATPase dan fosfolipase (Pakadang S.R., 2018).

Mekanisme antibakteri senyawa fenol adalah denaturasi protein sel. Mekanisme tannin sebagai antibakterial adalah aglutinasi protein. Tannin memiliki aktivitas antibakterial akibat kemampuannya

untuk mengaktifkan adhesin dan menghasilkan enzim yang mengganggu transportasi protein di dalam lapisan sel bagian dalam. Tannin juga menarget polipeptida pada dinding sel sehingga struktur dinding sel menjadi cacat (Nuria et al., 2009).

Saponin juga memiliki mekanisme antibakteri dengan cara menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel dan mengurangi *surface tension* dari dinding sel bakteri dan menyebabkan kerusakan permeabilitas membran karena saponin memiliki agen aktif yang mirip dengan deterjen. Saponin berdifusi melalui membran luar dan berikatan dengan membran sitoplasma sehingga mengganggu dan merusak stabilitas dari membran sel (Madduluri et al., 2013).

Alkaloid dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan cara merusak komponen penting dari peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak intak dan mengakibatkan kematian sel. Mekanisme lainnya adalah sebagai DNA *intercellators* dan menghambat enzim topoisomerase (Pakadang S.R., 2018).

Studi Syamsuri menunjukkan efek antibakteri pada mencit BALB/c yang diinfeksi *S.typhi* dengan metode injeksi peritonuem. Efek ini didapatkan dengan supresi TLR 4. Dosis ekstrak daun Miana yang dipergunakan adalah 510 mg/kgBB (Syamsuri, et al. 2018).

2.24. Efek Flavonoid Terhadap HIF-1 α dan VEGF

Flavonoid adalah kelompok polifenolik yang terkandung dalam makanan. S flavonoid dapat dikelompokkan dalam beberapa kelas, yang utamanya diwakili oleh anthocyanidin, flavonol, isoflavonol, flavon, isoflavon, flavanon, isoflavan, flavans, chalcones dan dihydrochalcone. (Björklund

~~et al., 2017) Flavonoid telah diketahui memiliki efek anti-inflamasi, antimutagenik, anti kanker, efek perlindungan antiangiogenik, dan kardiovaskular. (Triantafyllou et al., 2007) Flavonoid adalah kelompok polifenolik yang terkandung dalam makanan. S flavonoid dapat dikelompokkan dalam beberapa kelas, yang utamanya diwakili oleh anthocyanidin, flavonol, isoflavonol, flavon, isoflavan, flavanon, isoflavan, flavans, chalcones dan dihydrochalcone. (Björklund et al., 2017) Flavonoid telah diketahui memiliki efek anti inflamasi, antimutagenik, anti kanker, efek perlindungan antiangiogenik, dan kardiovaskular. (Triantafyllou et al., 2007)~~

Sebuah studi mendapatkan bahwa flavonoid seperti *Flavanone-type 5-O-acetyl 7,39-O-methyl hesperatin*, *49-O-methyl sakuranetin*, *homoisoflavone-type methyl ophiopogonanone B (MOB)* dan senyawa I merupakan inhibitor poten dari HIF-1 α namun tidak memiliki efek inhibisi pada sistem reporter lainnya seperti p21/WAF1 atau p16/INK4a dan diduga efeknya spesifik terhadap HRE (Hasebe et al., 2003).

Metil ophiopogonanone B (MOB) merupakan salah satu senyawa flavonid yang paling efektif dalam menghambat aktivitas reporter dan MOB atau senyawa I dalam konsentrasi 10 μ g/ml dapat menghambat akumulasi dari mRNA VEGF dalam kondisi hipoksik. Kedua senyawa ini juga mengurangi akumulasi HIF-1 α pada kondisi hipoksia. (Hasebe et al., 2003).

Flavopiridol dapat menghambat produksi VEGF yang diinduksi oleh hipoksia pada sel neuroblastoma dan *catechins* pada teh hijau dapat menghambat fosforilasi tirosin reseptor VEGF. Selain itu, catechins juga dilaporkan menghambat angiogenesis in vitro melalui inhibisi dari ikatan reseptor VEGF (Kondo et al., 2002). Flavonoid juga dapat menghambat VEGF melalui penekanan HIF-1 α , dan penghambatan melalui jalur STAT3 fosforilasi tirosin kinase. (Anso, et al. 2010)

~~Flavonoid memiliki peranan dalam pengaturan respons sel yang mengalami cedera. Responsnya adalah melakukan mitofagia, yaitu mengeliminasi dan memperbaiki organel yang rusak, ketimbang mengalami apoptosis. (Bjørklund et al., 2017)(Chirumbolo and Bjørklund, 2017)Flavonoid memiliki peranan dalam pengaturan respons sel yang mengalami cedera. Responsnya adalah melakukan mitofagia, yaitu mengeliminasi dan memperbaiki organel yang rusak, ketimbang mengalami apoptosis. (Bjørklund et al., 2017)(Chirumbolo dan Bjørklund, 2017)~~

2.25. Mencit BALB/c

Mencit BALB/c adalah mencit albino galur tikus rumah yang secara khusus dikembang biakan di laboratorium untuk tujuan penelitian sebagai hewan coba. Tikus ini mulanya dikembangkan di Rumah Sakit Halsey J. Bagg, New York. Selanjutnya, dikembangkan lebih lanjut di laboratorium *Jackson*. Mencit ini yang menjadi asal mencit BALB/c saat ini. (Potter, 1985) Mencit BALB/c ini berguna dalam penelitian imunologi dan infeksi. Mencit BALB/c mudah diinfeksi, dan menimbulkan respons imun yang baik terhadap kondisi tersebut. Banyak model infeksi menggunakan model mencit BALB/c karena menghasilkan respons makrofag terhadap patogen sangat baik. (Steinman and Hemmi, 1985)(Steinman dan Hemmi, 1985)

2.26. Model infeksi *S.typhi*

~~Banyak cara dalam membuat mencit terinfeksi, seperti memberikan makan yang mengandung patogen, menginjeksikan ke dalam atau ke dalam rongga peritoneum. *S.typhi* tidak seperti *S.typhimurium* yang dapat menyebabkan mencit menjadi sakit. Dalam upaya membuat model infeksi maka *S.typhi* dengan menyuntikan kuman sebanyak 10^3 CFU/ml ke dalam peritoneum mencit BALB/c. (Febriza et al., 2019; Idrus et al., 2019)~~Banyak cara dalam membuat mencit terinfeksi, seperti

~~memberikan makan yang mengandung patogen, menginjeksikan ke dalam atau ke dalam rongga~~

2.27. Pemeriksaan ekspresi gen

Ekstraksi Asam Nukleat RNA dan DNA

Boom Original (Boom et al, 1990). Metode Boom merupakan metode yang dilakukan pertama kali oleh Boom et al (1990). Proses isolasi DNA dilakukan dengan cara sebanyak 50 µL sampel isolat *M. tuberculosis* ditambahkan dengan 900 µL *buffer* lisis L6 dan 40 µL suspensi diatom. Larutan tersebut divorteks dengan segera ± 5 detik. Tabung didiamkan selama 10 menit pada suhu ruangan, kemudian tabung reaksi divorteks kembali (5 detik) dan disentrifugasi (15 detik) dalam Eppendorf *microfuge* dengan kecepatan 12.000 x g. Supernatan yang diperoleh dibuang. Pelet yang diperoleh dicuci dengan penambahan 1 mL *buffer* L2, divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (proses ini dilakukan sebanyak 2 kali). Selanjutnya pelet ditambahkan 1 mL dengan etanol 70% (v/v), divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (proses ini dilakukan sebanyak 2 kali). Pelet ditambahkan 1 mL aseton ke dalam tabung, divorteks, disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 x g selama 15 detik. Supernatan yang diperoleh dibuang, diambil peletnya (Boom, 1990).

Setelah asetonnya dibuang, tabung reaksi dikeringkan pada suhu 56°C dengan penutup dalam keadaan terbuka dan dipanaskan selama 10 menit. Buffer elusi (*buffer* TE pH 8) ditambahkan dan tabung reaksi ditutup, divorteks dengan cepat dan diinkubasi selama 10 menit pada suhu 56°C. Tabung reaksi divorteks dengan cepat dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 12.000 x g dan supernatan yang mengandung DNA dapat digunakan. Proses ini dilakukan di dalam *Biological Safety Cabinet Class II* (Boom, 1990).

Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Analisis ekspresi gen melibatkan penentuan pola gen yang diekspresikan pada tingkat transkripsi genetik, dalam keadaan tertentu atau dalam sel tertentu. Pengukuran ekspresi gen adalah alat penting yang digunakan di seluruh penemuan obat, penelitian ilmu kehidupan dan optimalisasi bioproduksi. Analisis ekspresi melibatkan beberapa teknik mulai dari analisis ekspresi gen seluruh genom seperti *microarray* atau sekuensing RNA, hingga teknik ekspresi gen target yang lebih spesifik seperti teknik qPCR. Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif. Jumlah produk PCR (DNA, cDNA atau RNA) yang relatif sedikit, dapat dihitung secara kuantitatif. *Real-time* PCR atau *quantitative* PCR (qPCR) merupakan salah satu metode paling sensitif untuk mendeteksi dan mengukur kuantitas mRNA (O'Connell, 2002).

Real time PCR juga meliputi *Real Time-RT* PCR dimana PCR dilakukan secara *Real Time* menggunakan enzim *Reverse Transcriptase* secara langsung pada waktu yang bersamaan. Real Time- RT PCR memiliki tambahan siklus Reverse Transcription yang memacu perubahan molekul DNA dari molekul RNA.

Prinsip Kerja qPCR

Berdasar pada molekul yang digunakan untuk deteksi, prinsip kerja qPCR dapat dibedakan sebagai berikut:

Prinsip kerja qPCR adalah mendeteksi dan menguantifikasi reporter fluoresen. Sinyal fluoresen akan meningkat seiring dengan bertambahnya produk PCR (amplikon) dalam reaksi. Peningkatan jumlah amplikon yang signifikan pada fase eksponensial berhubungan dengan jumlah inisiasi gen target. Makin tinggi tingkat ekspresi gen target maka deteksi emisi fluoresen makin cepat terjadi (Arya, 2005).

1. Deteksi target non-spesifik menggunakan pewarnaan DNA

Pada *Real Time* PCR, pewarna DNA digunakan sebagai reporter fluoresensi untuk memonitor reaksi *Real Time* PCR. Fluoresensi pada reporter akan terakumulasi seiring dengan proses amplifikasi yang berlangsung. Pencatatan secara kuantitatif dilakukan dengan menghitung pancaran fluoresensi tiap

siklus PCR. Hal tersebut mungkin untuk dilakukan guna memonitor reaksi PCR selama fase eksponensial. Jika grafik digambarkan antara log jumlah awal templat dan hubungan peningkatan fluoresensi reporter selama proses *Real Time* PCR, maka akan didapatkan suatu garis hubungan yang menunjukkan kuantitas gen yang diekspresikan. (Tamam, 2016)

Deteksi target spesifik

Terdapat dua jenis reporter fluoresen yang umumnya digunakan dalam qPCR, yaitu Taqman dan SYBR Green. SYBR Green akan berfluoresensi ketika berikatan dengan seluruh *double-stranded* DNA (dsDNA). Sinyal fluoresens SYBR Green saat berikatan dengan dsDNA direkam setiap siklus sehingga menunjukkan banyak produk yang teramplifikasi selama reaksi berlangsung. Semakin banyak template pada awal reaksi, maka semakin sedikit siklus amplifikasi yang dibutuhkan untuk mencapai titik saat sinyal fluoresens SYBR Green terdeteksi lebih tinggi dari ambang batas (*threshold*) fluoresens yang ditentukan (Bustin, 2000).

Deteksi target spesifik *Real Time* PCR dilakukan menggunakan

beberapa oligonukleotida yang dilabeli pada dua bagian reporter dengan label *fluorescent dye* dan pewarna *quencher dye*. Kuantitas mRNA dalam sel merupakan parameter jumlah gen yang terekspresi. Untuk menganalisa tingkat ekspresi gen, cDNA yang telah disintesis dari mRNA diuji secara :

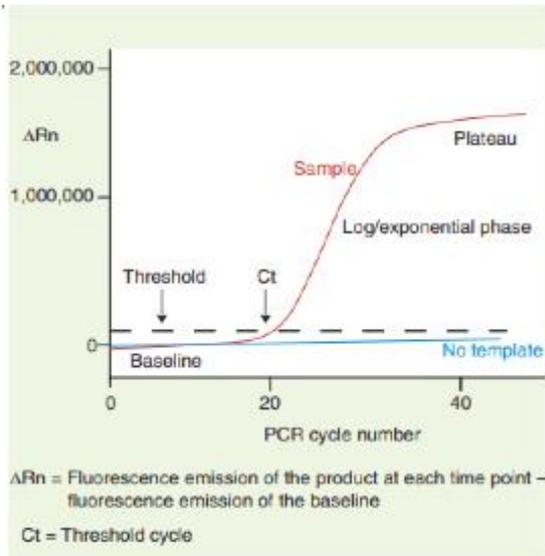
kuantitatif menggunakan real time PCR. Analisis hasil real time PCR dapat dilakukan secara kuantitatif absolut dan kuantitatif relatif. Metode kuantitatif relatif atau yang dikenal juga dengan *comparative threshold method* menghilangkan kebutuhan akan kurva standar yang digunakan dalam perhitungan kuantitatif absolut dan menggunakan perhitungan secara matematika untuk mengukur tingkat kuantitatif relatif ekspresi dari gen target dengan menggunakan gen referensi dan kalibrator dari jaringan (Arya, 2005).

Untuk mengetahui ekspresi suatu gen maka dibutuhkan gen referensi sebagai pembanding internal

(*endogenous control*) jumlah DNA agar tidak terjadi kesalahan interpretasi akibat jumlah DNA yang berbeda. Gen referensi yang digunakan adalah gen yang tidak terpengaruhi oleh lingkungan. Gen yang paling banyak digunakan adalah housekeeping gene seperti actin dan gliseraldehida-3-fosfat-dehidrogenase (GAPDH) (Bustin, 2000).

Hasil qPCR

Hasil *real time* PCR dengan metode comparative threshold meliputi nilai Cq dan *relative quantitation*. Cq/Ct merupakan hasil fraksi jumlah siklus PCR dimana nilai reporter fluoresensi lebih besar dari tingkat deteksi minimal mesin real time PCR sehingga amplikasi meningkat secara signifikan. Nilai Cq/Ct didapat dari jumlah siklus pada proses PCR yang berpotongan dengan garis *threshold*. *Threshold* adalah garis yang menandai peningkatan sinyal fluoresensi secara signifikan berdasarkan variabilitas *baseline*, namun posisi threshold dapat diatur bebas pada setiap titik di fase eksponensial (Life TechnologiesTM, 2015).



2.28. Metode ELISA

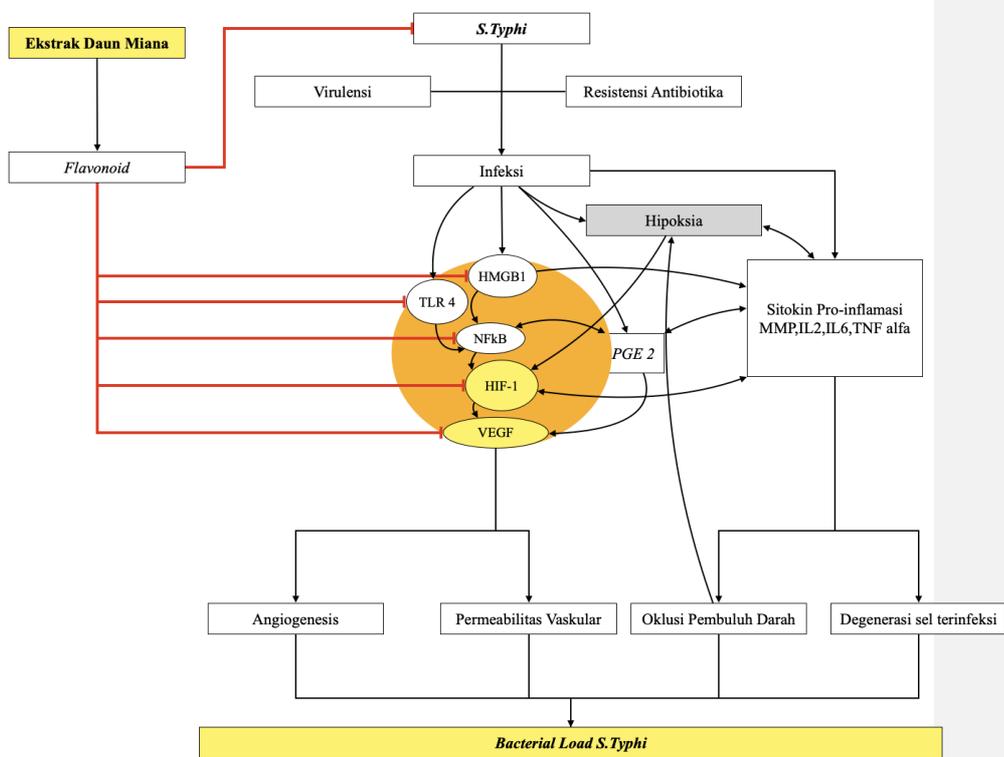
Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) adalah suatu teknik biokimia yang menggunakan bidang imunologi untuk mendeteksi antibodi atau antigen yang terdapat pada suatu sampel. ELISA digunakan sebagai alat diagnostik dalam bidang medis, patologi tumbuhan dan bidang industri (Hnasko, 2015). Penggunaan ELISA melibatkan antibodi dengan spesifitas terhadap antigen tertentu. Sampel dengan jumlah antigen yang tidak diketahui akan diimobilisasi pada suatu permukaan solid yang non spesifik (penyerapan pada permukaan) atau spesifik (melalui penangkapan oleh antibodi lain yang spesifik untuk antigen yang sama). Setelah antigen diimobilisasi akan ditambahkan antibodi pendeteksi untuk membentuk kompleks dengan antigen. Antibodi pendeteksi dapat berikatan juga pada enzim atau dapat dideteksi secara langsung oleh antibodi sekunder yang berikatan dengan enzim melalui biokonjugasi. Antara tiap tahap, plat dicuci dengan larutan deterjen lembut untuk membuang protein yang kelebihan atau antibodi yang tidak terikat. Setelah tahap pencucian terakhir, dalam plat akan ditambahkan substrat enzimatik untuk memproduksi sinyal yang visibel yang menunjukkan kuantitas

antigen dalam sampel. Teknis ELISA yang lama adalah dengan menggunakan substrat kromogenik, terdapat metode-metode terbaru yang lebih sensitif yaitu dengan menggunakan substrat fluorogenik (Hnasko, 2015).

Aplikasi

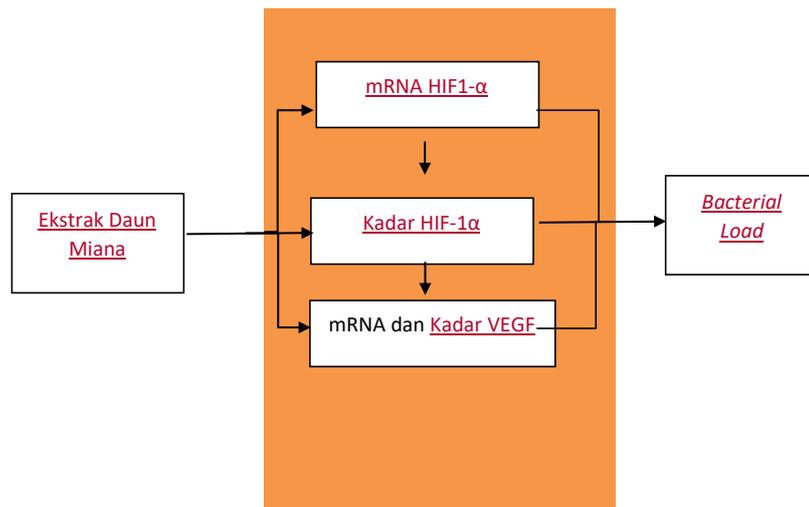
ELISA dapat mengevaluasi kehadiran dari antigen dan antibodi dalam suatu sampel karena hal tersebut ELISA dapat berguna sebagai metode untuk menentukan konsentrasi antibodi dalam serum dan mendeteksi adanya antigen. Metode ELISA juga digunakan pada bidang industri makanan yaitu untuk mendeteksi potensial alergen dalam makanan seperti dalam susu, kacang, walnut, telur dan almond. ELISA dapat digunakan dalam bidang toksikologi untuk menguji dugaan secara cepat pada pembagian kelas obat (Casini, Fontani, Ruggiero, & Balducci, 2015).

3. Kerangka Teori



Gambar 3.1 Kerangka teori

3.1. Kerangka Konsep



Formatted: Outline numbered + Level: 2 + Numbering Style: 1, 2, 3, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0 cm + Indent at: 0 cm

Variabel Independent

Variabel Antara

Variabel Dependent

Gambar 3.2 Kerangka konsep

3.2. Variabel penelitian

Variabel independen :

Ekstrak daun Miana

Formatted: List Paragraph, Outline numbered + Level: 2 + Numbering Style: 1, 2, 3, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 0 cm + Indent at: 0 cm

Variabel antara :

1. Ekspresi mRNA gen HIF-1 α
2. Kadar HIF-1 α dalam darah
3. Kadar VEGF dalam darah

Variabel dependen :

Bacterial load

a. Definisi operasional

Variabel	Definisi	Cara pengukuran	Skala
Ekstrak Daun Miana	Merupakan ekstrak dari daun Miana yang diperoleh dengan metode ekstraksi etanol	Ekstrak daun Miana diberikan secara oral <u>Sesuai pembagian kelompok perlakuan :</u> Tidak diberikan, diberikan EDM, <u>diberikan levofloxacin</u> 714 , diberikan EDM 714 + Levofloxacin 1.95 mg/kgBB .	Nominal
mRNA gen HIF-1 α	Profil ekspresi mRNA gen HIF-1 α yang diekspresikan dalam darah	mRNA dengan menggunakan primer spesifik dan diamplifikasi	Rasio

Formatted: List Paragraph, Numbered + Level: 2 + Numbering Style: a, b, c, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 1,9 cm + Indent at: 2,54 cm

Formatted: Indonesian

Commented [TAYL13]: Ambil salah satu etanol

		dengan teknik <i>Real time</i> PCR dengan satuan <i>fold change</i> (fc)	
Kadar HIF-1 α	Kadar protein solubel HIF-1 α yang diambil dari darah	Diukur dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml	Rasio
Kadar VEGF	Kadar VEGF yang diambil dari darah dalam dalam darah	Diukur dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit. Dibaca konsentrasi protein gen target dengan satuan pg/ml	Rasio
<i>Bacterial load</i>	Jumlah bakteri dalam darah per ml dari carian peritoneum	Diukur jumlah koloni bakteri menggunakan <i>dilution methode</i> dengan satuan CFU/ml	Rasio

b. Hipotesis Penelitian

1. Ekstrak daun Miana dapat menurunkan ekspresi mRNA gen HIF-1 α pada infeksi *S.typhi*.
2. Ekstrak daun Miana dapat menurunkan kadar HIF-1 α pada infeksi *S.typhi*.
3. Ekstrak daun Miana dapat menurunkan ekspresi mRNA VEGF pada infeksi *S.typhi*.
4. Ekstrak daun Miana dapat menurunkan kadar VEGF pada infeksi *S.typhi*.
5. Ekstrak daun Miana dapat menurunkan *bacterial load* *S.typhi*.

Formatted: Numbered + Level: 2 + Numbering Style: a, b, c, ... + Start at: 1 + Alignment: Left + Aligned at: 1,9 cm + Indent at: 2,54 cm

6. Pada infeksi *S.typhi* didapatkan hubungan antara ekspresi mRNA gen HIF-1 α , kadar HIF-1 α dan kadar VEGF dengan *bacterial load*.