

**DISERTASI**

**ANALISIS EKSPRESI GEN mRNA HMGB-1 DAN TLR-2 PROTEIN  
TERHADAP PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIANA PADA MENCIT BALB/c  
DIINDUKSI SALMONELLA TYPHI**

**ANALISIS OF HMGB-1 mRNA GENE AND TLR-2 PROTEIN EXPRESSION  
AFTER GIVING OF MIANA LEAF EXTRACT TO BALB/C MICE-INDUCED  
*Salmonella typhi***



**Lelimiska Irmadani Syarif**

**C013191042**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**

**UNIVERSITAS HASANUDDIN**

**MAKASSAR**

**2024**

**DISERTASI**

**ANALISIS EKSPRESI GEN mRNA HMGB-1 DAN PROTEIN TLR-2  
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN MIANA PADA MENCIT  
BALB/C YANG DIINDUKSI SALMONELLA TYPHI**

**ANALYSIS OF HMGB-1 mRNA GENE EXPRESSION AND TLR-2  
PROTEIN AFTER GIVING OF MIANA LEAF EXTRACT TO BALB/C  
MICE INDUCED BY SALMONELLA TYPHI**

Disusun dan diajukan  
Oleh

**Lelimiska Irmadani Syarif**  
C013191042

*Telah dipertahankan di hadapan Penilai Ujian yang dibentuk dalam rangka  
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran  
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin  
pada tanggal, 24 Januari 2024  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui  
Promotor,

**Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)**  
Nip. 19570416 198503 1 001

Co. Promotor

**dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S**  
Nip. 19501023 197403 1 001

Co. Promotor

**Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok**  
Nip. 195703261988032001

Ketua Program Studi S3  
Ilmu Kedokteran,

**Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes**  
Nip. 19671103 199802 1 001

Dekan Fakultas Kedokteran  
Universitas Hasanuddin,



**Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.PD-KGH, FINASIM Sp.GK**  
Nip. 19680530 199603 2 001

## DAFTAR TIM PENGUJI

- Promotor** : Prof. dr. Mochammad Hatta, M.Sc, Ph.D, Sp.MK(K)
- Co-Promotor** : 1. dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S  
2. Prof. dr Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok
- Anggota** : 1. Prof. DR. Yusminah Hala, MS  
2. Prof. dr. Agussalim Bukhari, M.Med.Klin, Sp.GK(K), Ph.D  
3. dr. Firdaus Hamid, Ph.D, Sp.MK  
4. Dr. dr. Liong Boy Kurniawan, Sp.PK(K)  
5. dr. M. Husni Cangara, Sp.PA (K), Sp.F, Ph.D  
6. DR. dr. Burhanuddin Bahar, MS



KEMENTERIAN PENDIDIKAN KEBUDAYAAN,  
RISET DAN TEKNOLOGI  
**UNIVERSITAS HASANUDDIN**  
**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
JL. PERINTIS KEMERDEKAAN KM. 10, MAKASSAR 90245  
TELEPON (0411) 586200, (6 SALURAN), 584200, FAX (0411) 585188  
Laman: www.unhas.ac.id

### PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : **Lelimiska Irmadani Syarif**  
Nomor Pokok : C013191042  
Program Studi : Ilmu Kedokteran  
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulis saya berjudul : **Analisis Ekspresi Gen mRNA HMGB-1 dan TLR-2 Protein Terhadap Pemberian Ekstrak Daun Miana pada Mencit Balb/c diinduksi *Salmonella typhi***

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

Apabila dikemudian hari terbukti bahwa Sebagian atau seluruh disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 16 Januari 2024

Yang menyatakan,

**Lelimiska Irmadani Syarif**

## KATA PENGANTAR

**Bismillahirrahmanirrahim**

**Assalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh.**

Dengan segala kerendahan hati, izinkanlah penulis menyampaikan rasa Syukur yang tak terhingga kepada Allah SWT atas segala Rahmat dan karunia-Nya, memberikan kelancaran, petunjuk serta kekuatan dalam menyelesaikan Pendidikan dan penyusunan disertasi ini. Shalawat serta salam senantiasa tercurah kepada junjungan kita, Nabi Muhammad SAW yang merupakan suri tauladan bagi seluruh umat manusia.

Penulisan disertasi yang berjudul “Analisis Ekspresi Gen mRNA HMGB-1 dan TLR-2 Protein Terhadap Pemberian Ekstrak Daun Miana pada Mencit Balb/c diinduksi *Salmonella typhi*” ini disusun sebagai salah satu persyaratan dalam menyelesaikan studi pada Program Studi Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Rasa hormat dan terima kasih yang mendalam penulis sampaikan kepada kedua orang tua, Ayahanda **drg. H. Syarifuddin Abdullah, MM** dan Ibunda **Dra. Hj. Elywati S, M.Pd** atas segala do'a yang tak henti-hentinya dimunjatkan, kasih sayang serta dukungannya. Keberhasilan ini merupakan buah dari doa dan restu orang tua yang senantiasa menjadi pendorong semangat penulis untuk terus berusaha dalam menyelesaikan pendidikan ini. Terkhusus untuk adik-adik tersayang, **Kurnia Rahma Syarif, S.Kep, M.Kep** dan **Kurnia Ali Syarif, SH, MH.Li** yang selalu siap sedia meluangkan waktu, memberikan dukungan moral serta membantu dalam segala hal sehingga penulis bisa sampai pada titik ini. Kepada keluarga besar **H. Abdullah Tiro (Alm)** penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya atas segala doa dan dukungan yang telah diberikan.

Selesainya penyusunan disertasi ini tidak terlepas dari dukungan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan rasa hormat dan terima kasih yang sedalam-dalamnya kepada:

1. Bapak **Prof. Dr. Ir. H. Jamaluddin Jompa, M.Sc** selaku Rektor dan penggagas Beasiswa PMDSU Universitas Hasanuddin, yang telah memberikan kesempatan untuk mengikuti Program Pendidikan Doktor dengan Beasiswa dari PMDSU.
2. Ayahanda **Prof. dr. Budu, Sp.M (K), Ph.D** selaku Dekan Pascasarjana, Ibunda **Prof. Dr. dr. Haerani Rasyid, M.Kes, Sp.GK, Sp.PD-KGH** selalu Dekan Fakultas Kedokteran, yang telah memberikan kesempatan dan senantiasa mendorong penulis untuk bisa menyelesaikan studi dan sampai di titik sekarang ini.
3. **Prof. dr. Mochammad Hatta, M.Sc, Sp.MK(K), Ph.D**, selaku promotor dan **dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S** dan **Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D** selaku Co-Promotor yang senantiasa bersedia dan sabar untuk meluangkan waktu membimbing serta mengarahkan sehingga segala persyaratan untuk penyelesaian disertasi dan pendidikan dapat dicapai.
4. **Prof. dr. Agussalim Bukhari, M.Med.Clin, Sp.GK(K), Ph.D, dr. Firdaus Hamid, Ph.D, Sp.MK, Dr. dr. Liong Boy Kurniawan, Sp.PK(K), dr. M. Husni Cangara, Sp.PA (K), Sp.F, Ph.D** dan **DR. dr. Burhanuddin Bahar, MS** selaku dewan penguji yang telah berkesempatan dan meluangkan waktu dalam memberikan arahan, bimbingan dan bantuan dalam penyusunan disertasi ini.
5. **Prof. DR. Yusminah Hala, MS** selaku penguji Eksternal yang telah bersedia menguji dan memberikan saran maupun koreksi perbaikan dalam penyusunan dan penyelesaian disertasi ini.

6. **Dr. dr. Irfan Idris, M.Kes** selaku Ketua Program Studi serta staf administrasi Program Studi Ilmu Kedokteran yang selama ini telah banyak membantu dan mengarahkan selama proses Pendidikan pada program studi ini.
7. **dr. Asty Amaliah Nurhadi, M.Med.Ed** selaku Manajer Akademik dan Pendidikan yang selama ini senantiasa kebersamai, mengarahkan, memberikan dukungan moral, membantu sehingga segala persyaratan dan penyelesaian pendidikan serta penyusunan disertasi dapat tercapai.
8. **dr. Ririn Nislawati, Sp.M (K)** selaku Ketua Program Studi Sarjana Kedokteran, **dr. Shelly Salmah, M.Kes, MHPE, dr. Aussie Fitriani Gaznawie, Sp.JP(K), dr, Faqi Nurdiansyah Hendra, Ph.D, dr. Lia Hafiyani, Ph.D** dan seluruh teman sejawat Staf Dosen, para Staf Administrasi Program Studi Sarjana kedokteran yang tidak dapat disebutkan satu persatu yang juga telah banyak memberikan dukungan, arahan dan bantuan dalam penyusunan dan penyelesaian studi ini.
9. **Dr. dr. St. Rafiah, M.Kes** selaku Kepala Departemen Anatomi, **dr. Muh. Iqbal Basri, M.Kes, Sp.S** dan **dr. Nikmatia Latief, Sp.Rad-(K)RI**, serta Staf Departemen Anatomi yang selama ini telah memberikan dukungan, arahan dan bantuan selama menempuh Pendidikan.
10. Pimpinan dan Staf Laboratorium yang telah membantu banyak dalam proses pengambilan data dan Pelaksanaan penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Imunologi Fakultas Kedokteran Unhas.
11. **Muh. Jufrianto, Sp.d, M.TESOL, Abdul Hakim, Sp.d, M.Pd, Asfiah Syam, Sp.d, M.Pd** yang juga telah membantu dan mendoakan dalam merampungkan penyusunan disertasi ini.

12. **Dr.dr. Fadhilah, M.Kes, Sp.MK** dan **Dr.dr Najdah Hidayah** yang telah menjadi senior yang siap meluangkan waktu dan memberikan contoh yang baik kepada penulis khususnya dalam penyusunan disertasi ini.
13. Teman-teman Awardee Beasiswa PMDSU, teman-teman seperjuangan yang telah saling memberi dukungan, semangat dan inspirasi selama perjalanan panjang Pendidikan ini.
14. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu persatu namun turut berkontribusi, menemani dan memberikan dukungan, bantuan dalam penyusunan dan penyelesaian studi ini.

Semoga Allah SWT senantiasa memberikan Rahmat-Nya, melipatgandakan segala kebaikan kepada semua pihak yang telah membantu. Semoga karya ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan dan kesejahteraan umat manusia. Amin. Terima kasih.

**Wassalamu'alaikum Warohmatullahi Wabarokatuh.**

Makassar, Januari 2024

Lelimiska Irmadani Syarif

## ABSTRACT

LELIMISKA IRMADANI SYARIF. *Analysis of HMGB-1 and TLR-2 Protein mRNA Gene Expression on Miana Leaf Extract Administration in Balb/c Mice Infected with Salmonella typhi* (supervised by Mochammad Hatta, Cahyono Kaelan, Rosdiana Natzir)

The research aims at investigating the effectiveness of the Miana leaf extract in the mice that have been infected with the *Salmonella typhi* bacteria assessed from the parametric expression of HMGB-1 mRNA genes and TLR-2 proteins. The research was designed using the laboratory experimental method with the experimental animals in BALB/c mice in line with the randomly selected inclusive criteria by determining the group based on the order of collection from the cage with the total of 15 samples. The samples were divided into 4 groups with each treatment. Before the treatment, the adaptation was conducted first for one week then the blood sampling (H0) was carried out. Then it was continued by inoculating *Salmonella typhi* bacteria in the mice with as much as 10 CFU. 24 hours after the inoculation, the blood sample measurements (H1) were taken again and on day seven (H7) after the mice were infected with the *Salmonella typhi*. The results of the blood collection were then examined with the real-time PCR to measure the expression of the HMGB-1 mRNA gene and ELISA examination to measure the TLR-2 protein in the samples. The research result indicates that the expression of HMGB-1 mRNA and TLR-2 protein in the Balb/c group of the mice receiving the Miana leaf extract decreases on the seventh day (H7) of the treatment. This is in line with the group of mice receiving the antibiotics (positive control) and the combination group of the antibiotics and the Miana leaf extract, so it can be concluded that the Miana leaf extract has the antibacterial activity towards the *Salmonella typhi* germs in each of these parameters.

Key words: HMGB-1 mRNA, TLR-2 protein, *Salmonella typhi*, Miana leaf extract



## ABSTRAK

LELIMISKA IRMADANI SYARIF. *Analisis Ekspresi Gen m-RNA HMGB-1 dan TLR-2 Protein terhadap Pemberian Ekstrak Daun Miana pada Mencit Balb/c Terinfeksi Salmonella typhi* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Cahyono Kaelan, dan Rosdiana Natzir).

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas pemberian ekstrak daun miana pada mencit yang telah terinfeksi bakteri *Salmonella typhi* dinilai dari parametrik ekspresi gen m-RNA HMGB-1 dan TLR-2 protein. Penelitian ini dirancang menggunakan metode eksperimen laboratorium dengan hewan coba pada mencit Balb/c sesuai kriteria inklusi yang dipilih secara acak dengan penentuan kelompoknya berdasarkan urutan pengambilan dari kandangnya dengan jumlah sampel sebanyak lima belas ekor. Sampel terbagi ke dalam empat kelompok dengan perlakuan masing-masing. Sebelum perlakuan dilakukan adaptasi terlebih dahulu selama satu pekan, kemudian dilakukan pengambilan sampel darah (H0). Lalu, dilanjutkan dengan melakukan inokulasi bakteri *Salmonella typhi* pada mencit sebanyak  $10^3$  CFU. Setelah 24 jam pascainokulasi, dilakukan kembali pengukuran sampel darah (H-1) dan hari ketujuh (H-7) setelah mencit terinfeksi *Salmonella typhi*. Hasil pengambilan darah tersebut kemudian diperiksa dengan *realtime* PCR untuk mengukur ekspresi gen m-RNA HMGB-1 dan pemeriksaan ELISA untuk mengukur TLR-2 protein pada sampel tersebut. Hasil penelitian menunjukkan ekspresi m-RNA HMGB-1 dan TLR-2 protein pada kelompok mencit Balb/c yang mendapatkan ekstrak daun miana mengalami penurunan pada hari ketujuh (H-7) perlakuan. Hal ini sejalan dengan kelompok mencit yang mendapatkan antibiotik (kontrol positif) serta kelompok kombinasi antibiotik dan ekstrak daun miana. Disimpulkan bahwa ekstrak daun miana memiliki aktivitas antibakterial terhadap kuman *Salmonella typhi* pada tiap-tiap parameter tersebut.

Kata kunci: m-RNA, HMGB-1, TLR-2 protein, *Salmonella typhi*, ekstrak daun miana



## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>DAFTAR TIM PENGUJI</b> .....	iii
<b>PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI</b> .....	iv
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	v
<b>ABSTRAK</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xvi
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah .....	4
1.3 Tujuan Penelitian .....	5
1.4 Manfaat Penelitian .....	6
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	7
2.1 Demam Tifoid .....	7
2.1.1 Etiologi Demam Tifoid .....	7
2.1.2 Patomekanisme Tifoid .....	12
2.1.3. Diagnosis Tifoid .....	13
2.1.4 Penatalaksanaan Tifoid .....	15
2.2 Daun Miana .....	21
2.3 HMGB-1 .....	26
2.4 TLR-2 .....	41
2.5 Kerangka Teori .....	47
2.6 Kerangka Konsep .....	47
2.7 Hipotesis .....	48

<b>BAB III METODE PENELITIAN .....</b>	<b>49</b>
3.1 Rancangan dan Subjek Penelitian .....	49
3.1.1 Kriteria Inklusi .....	49
3.1.2 Kriteria Eksklusi .....	49
3.1.3 Kriteria Drop Out .....	49
3.2 Waktu dan Tempat Penelitian .....	49
3.3 Hewan Coba dan Persiapannya .....	50
3.4 Alur Penelitian .....	51
3.4.1 Roadmap Penelitian .....	51
3.4.2 Alur Penelitian .....	52
3.5 Definisi Operasional .....	53
3.6 Variabel Penelitian .....	54
3.6.1 Variabel Bebas .....	54
3.6.2 Variabel Terikat .....	54
3.7 Etik Penelitian .....	54
3.8 Alat dan Bahan .....	55
3.9 Anggaran Penelitian .....	60
<b>BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>65</b>
4.1 Hasil Penelitian .....	66
4.1.1 Hasil Uji Normalitas Ekspresi gen MRNA HMGB-1 dan TLR-2 Protein .....	66
4.1.2 Hasil Perbandingan Ekspresi mRNA HMGB-1.....	69
4.1.3 Hasil Perbandingan Ekspresi TLR-2 Protein .....	84
4.2 Pembahasan .....	101
<b>BAB V KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>108</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>110</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel 1. Agen Antimikroba sebagai terapi demam tifoid.....	21
Tabel 2. Rincian Anggaran Penelitian .....	61
Tabel 3. Hasil Uji Normalitas Ekspresi HMGB-1 .....	67
Tabel 4. Hasil Uji Normalitas Ekspresi TLR-2 Protein .....	68
Tabel 5. Hasil Ekspresi mRNA HMGB-1 H0, H1 dan H7 pada masing-masing Kelompok perlakuan .....	69
Tabel 6. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada kelompok kontrol Negatif (Placebo) pada H0, H1 dan H7 .....	70
Tabel 7. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kontrol Negatif antarhari perlakuan .....	71
Tabel 8. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kontrol Positif (Antibiotik) H0, H1 dan H7 .....	72
Tabel 9. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kontrol Positif Antarhari perlakuan .....	73
Tabel 10. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Ekstrak Daun Miana H0, H1 dan H7 .....	73
Tabel 11. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Ekstrak Daun Miana antarhari perlakuan .....	74
Tabel 12. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) H0, H1 dan H7...	75
Tabel 13. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kombinasi antarhari perlakuan .....	76
Tabel 14. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 Kelompok Perlakuan Pada H0, H1 dan H7 .....	76
Tabel 15. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kontrol Negatif dan Kontrol Positif .....	77
Tabel 16. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada kelompok	

Kontrol Negatif dan Kelompok Ekstrak Daun Miana.....	78
Tabel 17. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada kelompok Kontrol Negatif (Placebo) dan Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) .....	80
Tabel 18. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kontrol Positif (Antibiotik) dan Kelompok Ekstrak Daun Miana ...	81
Tabel 19. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Kontrol Positif (Antibiotik) dan Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) .....	82
Tabel 20. Hasil Analisis Ekspresi mRNA HMGB-1 pada Kelompok Ekstrak Daun Miana dan Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) .....	83
Tabel 21. Hasil Ekspresi TLR-2 Protein H0, H1 dan H7 pada masing- masing Kelompok Perlakuan .....	84
Tabel 22. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada kelompok Kontrol Negatif (Placebo) H0, H1 dan H7 .....	85
Tabel 23. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Negatif antarhari perlakuan .....	86
Tabel 24. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Positif (Antibiotik) H0, H1 dan H7 .....	87
Tabel 25. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Positif antarhari perlakuan .....	87
Tabel 26. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Ekstrak Daun Miana H0, H1 dan H7.....	88
Tabel 27. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Ekstrak Daun Miana antarhari perlakuan .....	89
Tabel 28. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) H0, H1 dan H7 .....	89

Tabel 29. Perbandingan Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) antarhari perlakuan .....	90
Tabel 30. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein semua Kelompok H0, H1 dan H7 .....	91
Tabel 31. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Negatif dan Kontrol Positif .....	92
Tabel 32. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Negatif dan Kelompok Ekstrak Daun Miana .....	93
Tabel 33. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Negatif (Placebo) dan Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) .....	94
Tabel 34. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Positif (Antibiotik) dan Kelompok Ekstrak Daun Miana .....	95
Tabel 35. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Kontrol Positif (Antibiotik) dan Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) .....	96
Tabel 36. Hasil Analisis Ekspresi TLR-2 Protein pada Kelompok Ekstrak Daun Miana dan Kelompok Kombinasi (Antibiotik dan Ekstrak Daun Miana) .....	97
Tabel 37. Persentase Perubahan ekspresi gen mRNA HMGB-1 H1 dan H7..	98
Tabel 38. Persentase Perubahan ekspresi TLR-2 Protein H1 dan H7.....	100

## DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Struktur Kimia Flavonoid .....	23
Gambar 2. Mekanisme keterlibatan HMGB-1 dalam Proses Inflamasi .....	30
Gambar 3. Pengenalan Antigen pada Toll Like Receptors .....	42
Gambar 4. Mekanisme Toll-Like Receptors 2 dalam Keterlibatannya terhadap Proses terjadinya inflamasi .....	43
Gambar 5. Respon TLR2 dan TLR9 pada Infeksi <i>Salmonella typhimurium</i> .....	45

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Demam tifoid merupakan suatu penyakit infeksi yang masih menjadi masalah dunia yang disebabkan oleh bakteri gram negatif, *Salmonella typhi*, dengan manifestasi klinik yang paling sering berupa demam, pusing, mual hingga muntah, penurunan nafsu makan, rasa tidak nyaman diperut hingga konstipasi, dan lidah berselaput (Agu *et al*, 2014). Penyebaran penyakit tifoid hanya dapat ditularkan dari orang ke orang. Penderita yang *carrier* (pembawa) dapat dengan mudah menularkan kuman yang dorman di dalam usus kepada orang lain dengan kontaminasi lewat minuman atau makanan yang kontak dengan pasien ataupun yang pernah terinfeksi tifoid (Alba *et al*, 2016). Faktor lain yang dinilai berkorelasi dengan peningkatan kejadian penyakit demam tifoid adalah sosio ekonomi yang rendah dan kurangnya pengetahuan terhadap proses transmisi dari penyakit tersebut (Watson & Edmunds, 2015).

Secara global, estimasi penyakit demam tifoid diperkirakan berada pada rentan 11-21 juta kasus dengan rata-rata angka kematian berkisar 128.000-161.000. Kasus demam tifoid terbanyak didapatkan pada wilayah Asia Selatan, Asia Tenggara dan *Sub-Saharan Africa* (WHO, 2018).

Berdasarkan kelompok umur rata-rata insiden 81.7 per 100.000 per tahun dengan masing-masing *incidents rate* 148.7 pada kelompok usia 2-4 tahun, 180.3 untuk kelompok usia 5-15 tahun, dan 51.2 per 100.000 per tahun untuk kelompok usia lebih dari 16 tahun dengan rata-rata usia 10.2 tahun (Ochiai *et al*, 2008).

Tingginya tingkat resistensi terhadap antibiotik menyebabkan kuman yang menjadi agen penyebab tifoid tidak lagi memiliki efek maksimal untuk lini pertama terapi tifoid pada beberapa penderita. Sistematis review yang telah dilakukan oleh Britto 2018, menyimpulkan bahwa hingga saat ini tingkat resistensi masih tinggi dan diduga akan berlanjut ke arah gagal terapi pada penderita tifoid. Melihat kondisi tersebut, maka mulai diarahkan untuk mencari terapi tambahan yang memiliki efek yang hampir sama dengan terapi antibiotik, salah satunya dengan pemberian obat herbal. Beberapa tanaman yang telah diujikan dan memiliki efektivitas antimikroba yang sama dengan pemberian antibiotik, namun di Indonesia masih belum diteliti secara mendalam mekanisme kerja tanaman herbal tersebut baik secara imunologi maupun molekuler (Syamsuri *et al*, 2018).

Salah satu tanaman yang banyak ditemukan di Indonesia adalah Daun Miana (*Coleus benth*). Salah satu studi yang menilai etnofarmakologi Miana di Halmahera Barat menilai bahwa daerah ini pemanfaatan Daun Miana sangat bervariasi mulai budidaya hingga diramu untuk dijadikan obat

pada beberapa penyakit diantaranya seperti nyeri pinggang, batuk, bisul, dan ambeien. Efektivitas miana dalam mengobati penyakit tersebut diduga disebabkan oleh karena kandungan zat fitokimia dalam Miana, antara lain flavonoid, tannin, saponin, fitol, asam rosmarik, stroptozocin, steroid, eugenol, minyak atsiri, dan quersetin. Diantara zat fitokimia tersebut, yang memiliki aktivitas antibakteri adalah flavonoid, steroid, tannin, saponin, alkaloid. Selain sebagai antibakteri, kandungan flavonoid dalam tanaman miana dinilai memiliki efektivitas sebagai anti-inflamasi (Wakhidah, 2018).

Kandungan fitokimia dalam daun miana seperti flavonoid sebagai anti-inflamasi yang kemudian juga dinilai mampu memberikan efek terhadap ekspresi Gen HMGB-1 sebagai sitokin pro inflamasi khususnya pada infeksi salmonella typhi. Studi yang telah dilakukan oleh Sesilia 2015 menilai potensi daun miana sebagai imunomodulator pada kasus tuberkulosis dan didapatkan hasil bahwa ekstrak Daun Miana (*Coleus benth*) dapat meningkatkan jumlah limfosit T, CD4 T-Cell, penurunan level IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ . Sedangkan untuk efek antibakteri Daun Miana juga dinilai memiliki efek terhadap Toll-like receptors (TLRs) yang merupakan salah satu protein yang berperan penting dalam pengaktifan respon imunitas tubuh khususnya untuk infeksi yang disebabkan oleh kuman *Salmonella typhi*.

Berdasarkan hal tersebut di atas, maka penulis tertarik untuk melakukan penelitian terkait penilaian terhadap efek pemberian ekstrak

Daun Miana dengan indikator gen mRNA HMGB-1 dan TLR-2 protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*. Oleh karena itu, diharapkan dengan diselesaikannya penelitian ini, dapat menjadi salah satu alternatif terapi khususnya untuk demam tifoid yang efektif, aman dan terjangkau.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian tersebut di atas, maka dirumuskan masalah penelitian sebagai berikut:

1. Bagaimana efek pemberian ekstrak Daun Miana terhadap ekspresi gen HMGB-1 pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*?
2. Apakah ada hubungan antara pemberian ekstrak Daun Miana terhadap ekspresi gen mRNA HMGB-1 pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*?
3. Bagaimana efek pemberian ekstrak Daun Miana terhadap ekspresi TLR-2 Protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*?
4. Apakah ada hubungan antara pemberian ekstrak Daun Miana terhadap ekspresi TLR-2 Protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*?

### **1.3 Tujuan Penelitian**

#### 1.3.1 Tujuan Umum

Untuk menganalisis ekspresi gen HMGB-1 mRNA dan TLR-2 Protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi* setelah pemberian ekstrak Daun Miana.

#### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Untuk mengetahui efek pemberian ekstrak Daun Miana terhadap ekspresi gen mRNA HMGB-1 pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*
2. Untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun miana dengan ekspresi gen mRNA HMGB-1 pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*
3. Untuk mengetahui efek pemberian ekstrak daun miana terhadap ekspresi TLR-2 Protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*
4. Untuk mengetahui hubungan antara pemberian ekstrak daun miana dengan ekspresi TLR-2 Protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*

#### **1.4 Manfaat Penelitian**

1. Dapat menambah pengetahuan tentang efek pemberian ekstrak daun miana terhadap ekspresi gen mRNA HMGB-1 dan TLR-2 Protein pada mencit yang terinfeksi *Salmonella typhi*.
2. Dapat dijadikan sebagai acuan dalam mengembangkan obat tradisional yang dapat digunakan secara luas khususnya dalam mengobati penyakit demam tifoid.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 Demam Tifoid

Demam Tifoid adalah suatu penyakit infeksi akut yang paling sering disebabkan oleh *Salmonella typhi* dan masih menjadi sorotan dunia dalam penanganannya sebab angka kejadian tifoid masih tinggi termasuk di Indonesia yang menyerang sistem gastrointestinal dan tingginya angka kejadiannya sering dikaitkan dengan kondisi lingkungan, higienitas dan kondisi sosio-ekonomi (Dwiyanti, 2017).

##### 2.1.1 Etiologi Demam Tifoid

###### *Salmonella typhi*

*Salmonella typhi* merupakan suatu bakteri yang paling sering menjadi etiologi kasus *salmonellosis*. Bakteri ini berbentuk batang, bersifat gram negatif, motil, patogenik, dan pada permukaan membrannya terdapat suatu polimer polisakarida yang bersifat asam (Hawley, 2003).

Morfologi Bakteri *Salmonella typhi* merupakan bakteri berbentuk batang berukuran 0,7-1,5 um x 2.0-5,0 um. Sebagian besar salmonella yang diisolasi adalah motil dengan flagel peritrik. *S.typhi* mempunyai karakteristik memfermentasikan glukosa dan manosa tanpa memproduksi gas dan tidak

memfermentasikan laktosa. *Salmonella typhi* memerlukan triptofan sebagai faktor pertumbuhan.

*Salmonella typhi* termasuk dalam *Class Enterobacteriales* yang juga merupakan suatu mikroorganisme fakultatif intraseluler, tahan terhadap enzim lisosom dan mampu menghambat fusi fagolisosom sehingga sulit untuk dieliminasi oleh sistem imun (Kresno, 2001; Abbas *et al*, 2014). Karena sifatnya yang intraseluler menyebabkan hampir seluruh bagian tubuh dapat menjadi sasaran bagi *S.typhi* untuk menginvasi dan menimbulkan fokal-fokal infeksi. Salah satu tempat yang paling disenangi oleh salmonella adalah kandung empedu (*vesica biliaris*). Basilnya akan tetap tahan di dalam kandung empedu, jika penatalaksanaan tifoid tidak sempurna. Sehingga sewaktu-waktu dapat mengalir ke dalam lumen usus menjadi karier intestinal. Dan jika imun *host* kembali menurun, memungkinkan untuk terjadinya kekambuhan (*relapse*). (KMK, 2006)

*Salmonella enterica* kemudian dibagi menjadi enam subspecies yaitu *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* dan *indica*, yang memiliki lebih dari 2,500 serovar atau serotype. *Salmonella enterica* kemudian dibagi menjadi enam subspecies. *Enteric*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* dan *indica* (berdasarkan hibridisasi DNA, analisis dan elektroforesis multilokus enzim 16S RNA. Umumnya lebih dari 99,9% *S.*

*enterica* serovar merupakan subspecies *enterica* dan berhubungan infeksi pada manusia dan hewan (Crosa et al.1973 dan Tindal 2005).

Struktur antigen seperti bakteri yang lain, *Salmonella* memiliki variasi permukaan yang berperan untuk melindungi sel, transpor membran, adhesi, kemotaksis, motilitas dan reseptor. Hal tersebut berperan dalam respon imun dan dasar identifikasi serologi di laboratorium. Antigen permukaan *S. typhi* cukup kompleks dan mempunyai peran penting dalam patogenitas. Struktur antigen *Salmonella* berdasarkan analisis antigenik White dan Kauffmann yaitu: Antigen somatik (O), antigen flagella (H) dan antigen kapsular. Antigen O (Ohne) merupakan antigen somatik dengan lipopolisakarida yang kompleks. Antigen ini bagian dari dinding sel dan senantiasa diasosiasikan dengan endotoksin. Antigen flagella H (Hauch) merupakan struktur protein yang berasosiasi dengan flagella. Spesifitas antigen ini tergantung bagaimana protein yang ada dalam flagella (fase motil atau nonmotil) (O'leary, 1989). Antigen Vi (Virulence) adalah antigen kapsular yang tersusun atas polimer asam uronik galaktosamin yang diasosiasikan dengan virulensi. Antigen ini terdapat pada semua strain *S. typhi* (Hashimoto et al., 1995). Antigen O disebut juga sebagai antigen dinding sel karena antigen tersebut adalah *outer layer* dari dinding sel bakteri gram negatif. Antigen O tersusun atas lipopolisakarida (LPS) yang berperan sebagai endotoksin, resisten terhadap pemanasan 100 °C, alkohol

dan asam. Reaksi aglutinasinya berbentuk butir-butir pasir (Joklik et al, 1990). Antigen H bersifat termolabil dapat rusak oleh alkohol, pemanasan pada suhu di atas 60 °C dan asam (Prescott et al, 2005). Antigen H atau antigen flagel terdiri dari suatu protein yang dikode oleh gen flg yang berada pada lokus fliC. Antigen H terdiri dari dua fase yaitu antigen H fase 1 (H1) dan antigen H fase 2 (H2) sehingga terdapat *S. typhi* serovar H1 dan H2. Sedangkan antigen H1 terdiri dari H1-d dan H1-j sehingga dapat dijumpai *S. typhi* serovar H1-d yang tersebar di seluruh dunia dan *S. typhi* serovar H2-j yang hanya dijumpai di Indonesia. Strain bakteri *S. typhi* serovar H-J bersifat kurang motil pada media semi solid agar dan kurang invasif apabila dibandingkan dengan *S. typhi* serovar H-d (Grossman, et al., 1995). Antigen Vi adalah antigen kapsular yang tersusun atas polimer asam uronik galaktosamin yang diasosiasikan dengan virulensi. Antigen ini terdapat pada semua strain *S. typhi* (Hashimoto et al., 1995).

Kompleks lipopolisakarida pada *Salmonella typhi* merupakan endotoksin yang dinilai memiliki peranan penting sebagai penyebab terjadinya demam tifoid. Endotoksin ini bersifat pirogenik serta memperluas area peradangan tempat *S.typhi* berkembang biak.

Pada media *Mac Conkey* koloni tampak transparan karena bakteri tidak memfermentasikan laktosa dengan diameter koloni 2-4 mm. Media ini adalah media yang mengandung garam empedu dan kristal violet yang

fungsinya dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Media tersebut juga mengandung laktosa dengan indikator *neutral Red* yang menunjukkan perubahan pH sehingga membedakan antara bakteri yang memfermentasikan laktosa secara cepat, lambat atau tidak (Talaro et al, 2002). Untuk identifikasi strain anggota famili *Enterobacteriaceae* dilakukan serangkaian uji biokimia IMVIC (Indole Methyl red, Voges Proskauer, Citrate). Bakteri *S. typhi* juga memiliki pili atau fimbriae yang berfungsi untuk adhesi pada sel *host* yang terinfeksi. Pili berbentuk batang lurus dengan ukuran lebih pendek dan lebih kaku bila dibandingkan dengan flagella. Pili tersusun atas unit protein yang disebut pilin, mempunyai struktur yang berbentuk pipa, mempunyai peran dalam proses konjugasi, sebagai reseptor bagi bakteriofag dan berperan pula dalam proses pelekatan (adhesi) antara bakteri dan permukaan sel inang. Oleh karena itu, pili mempunyai peran dalam proses patogenesis bakteri, selain itu pili mampu menginduksi terbentuknya respon imun pada hewan terinfeksi. Suatu bakteri dapat memiliki beberapa tipe pili yang berbeda dalam panjang dan tebalnya serta spesifisitas reseptornya. Beberapa spesies bakteri dari famili *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*, *Serratia*) memiliki patogenesis yang berbeda akibat perbedaan tipe pili ini.

2. Klasifikasi *Salmonella* adalah genus bakteri yang berasal dari

famili *Enterobacteriaceae* dan merupakan patogen yang bertanggung jawab terhadap penyakit pada manusia dan hewan.

### 2.1.2 Patomekanisme Tifoid

Patomekanisme yang terjadi pada penyakit tifoid dimulai saat kuman *Salmonella typhi* masuk ke dalam tubuh *host* baik melalui makanan atau minuman yang telah terkontaminasi oleh kuman tersebut dan masuk ke dalam saluran cerna. Mekanisme pertahanan awal adalah pH asam lambung. Bakteri harus melalui asam lambung yang rendah untuk mencapai usus halus. Setelah mencapai usus halus, bakteri tersebut melakukan penetrasi ke dalam lapisan mukosa usus halus hingga ke lamina propria. Target *Salmonella typhi* di lumen usus adalah sel-sel M yang menutupi jaringan limfoid yang terikat di usus. Di dalam jaringan limfoid ini, *S. typhi* akan memicu kerja dari sistem imun. Terlibatnya sistem imun mengundang makrofag dan sel dendritik untuk berusaha memfagosit bakteri, tetapi gagal dieliminasi. Sehingga, beberapa bakteri tetap berada dalam makrofag di jaringan limfoid usus kecil dan mengalir ke kelenjar getah bening mesenterika di mana ada respon inflamasi yang dimediasi oleh pelepasan berbagai sitokin (WHO, 2013). Selama proses infeksi bakteri terjadi, berbagai sitokin inflamasi dilepaskan seperti IL-1 $\beta$  dan IL-18 diproduksi di jaringan yang terinfeksi sebagai hasil dari pengenalan inang dari pola

molekul terkait mikroba melalui beberapa reseptor imun bawaan (*adaptive immunity*) termasuk reseptor *Toll-like* (TLRs) dan komponen *inflammasome*. Dengan demikian, daerah sekitar peradangan yang terinfeksi *Salmonella* jaringan memungkinkan fungsi efektor sel T CD4 muncul tanpa adanya TCR stimulasi (Pham & McSorley, 2015).

### 2.1.3 Diagnosis Tifoid

Gejala klinis yang sering ditemui pada kasus tifoid berupa demam tinggi, nyeri kepala, mual, muntah, *abdominal discomfort*. Namun pada tahap lanjut, khususnya pada penderita yang sudah menjalani perawatan di rumah sakit, biasanya gejala yang didapatkan lebih berat dan disertai dengan pembesaran organ seperti *hepatomegaly* (41%), *splenomegaly* (20%), toksik (33%), ileus (1%). Sebelum ditemukannya *antibacterial agent*, perdarahan saluran cerna dan perforasi merupakan kondisi klinis yang paling sering ditemukan (1-3%) dan meningkat pada penderita yang tidak mendapatkan terapi (Magosale *at al*, 2013; WHO, 2013). Penyakit tifoid dapat ditransmisikan secara *feco-oral* baik melalui makanan maupun air (Habte, 2018; Farooqui, 2009).

Masa inkubasi demam tifoid berkisar 10-20 hari dengan manifestasi klinis yang ditunjukkan bervariasi dari yang asimptomatik dan simptomatik

dengan gejala ringan sampai berat atau hingga gambaran klinis yang disertai dengan komplikasi bahkan kematian (Sudoyo *et al*, 2009).

Pada minggu pertama hingga minggu kedua setelah infeksi kuman *Salmonella typhi*, gejala awal yang ditemukan adalah demam dengan pola suhu berkisar 39-40°C meningkat setiap harinya, ditemukan penurunan suhu di pagi hari namun kembali mengalami peningkatan pada sore dan malam hari. Pola demam ini sedikit berbeda pada anak-anak dan bayi yang demam tidak beraturan dan biasanya disertai dengan menggigil. Pemeriksaan lanjutan yang dapat dilakukan adalah pemeriksaan laboratorium. Pada pemeriksaan darah tepi, didapatkan leukopenia dan limfositosis yang relatif pada hari kesepuluh setelah demam. Salah satu Metode pemeriksaan uji serologis adalah Tes Widal yang memiliki peran penting dalam proses diagnosis penyakit demam tifoid. Tes ini merupakan reaksi antigen-antibodi di mana titer antibodi yang khas yang ditemukan pada penderita tifoid adalah titer antibodi O 1/160 dan titer antibodi H 1/320. Selain itu, dapat pula dilakukan uji tubex-TF yang merupakan tes aglutinasi kompetitif semi kuantitatif yang sederhana dan cepat. Tes ini cukup akurat dalam mendiagnosis penyakit demam tifoid pada kasus akut sebab hanya menilai adanya antibodi IgM (Sultana, 2016)

Namun, di antara pemeriksaan yang ada, isolasi kuman (biakan) merupakan metode diagnosis pasti (*gold standard*) pada demam tifoid.

Ditemukannya isolate *Salmonella typhi* pada kultur darah atau urin pada penderita yang dicurigai demam tifoid sudah dapat tegakkan diagnosis. Metode dinilai sangat spesifik, tetapi kurang sensitif dalam mendiagnosis tifoid dan rentang waktu yang dibutuhkan lebih lama ( $\pm 7$  hari) serta biaya yang lebih mahal.

Metode terakhir yang lebih rumit adalah dengan identifikasi DNA dari *Salmonella typhi* menggunakan teknik PCR. Meskipun dinilai lebih akurat, namun kadang pula ditemukan kendala dalam mendeteksi *Salmonella typhi* dengan metode ini, seperti risiko kontaminasi yang tinggi sehingga dapat mengaburkan hasil menjadi positif palsu juga biaya yang mahal menjadikan metode ini bukan menjadi pilihan utama yang dapat digunakan dalam menegakkan diagnosis penderita demam tifoid.

#### 2.1.4 Penatalaksanaan Tifoid

Antibiotik adalah semua senyawa kimia yang dihasilkan oleh organisme hidup atau diperoleh melalui sintesis yang memiliki indeks kemoterapi tinggi, manifestasi aktivitasnya terjadi pada dosis yang sangat rendah secara spesifik melalui inhibisi proses vital tertentu pada virus, mikroorganisme ataupun juga berbagai organisme bersel majemuk. Hal yang sama juga didefinisikan oleh Russel, 2004 bahwa istilah antibiotik berasal dari kata antibiosis yang berarti melawan kehidupan. Awalnya

antibiotik selalu dikatakan bahan organik dari mikroorganisme yang sifatnya toksik bagi mikroorganisme lain. Belakangan antibiotik merupakan refleksi dari kelompok mikroorganisme yang antagonis terhadapnya. Dengan demikian, antibiotik dapat didefinisikan sebagai agen kimia, obat atau substansi yang dapat mengurangi atau mengeliminasi pertumbuhan mikroorganisme. Antibiotik dicirikan dengan spesifikasi target atau organisme. Antibiotik dapat berasal dari mikroorganisme, melalui proses sintesis atau semi sintesis.

Jika dilihat dari pendekatan kimianya, antibiotik dibedakan atas sembilan kelompok yaitu B-laktam (Penisilin dan Sefalosporin), aminoglikosida, kloramfenikol, tetrasiklin, makrolida, rifampisin, polipeptida siklik, antibiotik polien dan antibiotik lain (Wattimena dkk., 1987).

Berdasarkan mekanisme kerjanya, antibiotik terbagi atas beberapa kelompok dengan masing-masing peranan. Ada yang berperan dalam mengganggu metabolisme sel mikroba, menghambat sintesis dinding sel mikroba, mengganggu permeabilitas membran sel mikroba, menghambat sintesis protein sel mikroba, serta menghambat sintesis atau merusak asam nukleat sel mikroba (Ganiswara dkk., 1995).

Menurut manfaat dan sasaran kerja antibiotik ada yang cenderung memiliki spektrum kerja sempit, bermanfaat terhadap kokus gram positif dan basil. Antibiotik jenis berikutnya adalah yang memiliki spektrum kerja yang

luas, bermanfaat terhadap kokus gram positif dan basil gram negatif (Wattimena dk., 1987).

Penggunaan antibiotik untuk terapi harus berdasarkan pertimbangan khusus tidak hanya pengetahuan sifat kimia, mekanisme kerja, spektrum ataupun daya kerja. Pengetahuan karakteristik fenomena infeksi, lokasi infeksi, pengenalan penyebab infeksi, kondisi patologik penderita dan pengetahuan menyeluruh tentang antibiotik yang tersedia.

Penggunaan antibiotik dalam terapi pada dasarnya digunakan pada suatu infeksi yang lazimnya tidak dapat ditangani secara berhasil oleh sistem pertahanan tubuh secara alami. Penggunaan antibiotik untuk terapi harus berdasarkan pertimbangan khusus menuju penggunaan antibiotik secara rasional. Seleksi penggunaan suatu antibiotik tidak hanya atas dasar pengetahuan sifat kimia, mekanisme kerja, spektrum aktivitas maupun daya kerjanya. Tetapi ringkasnya, strategi terapi dengan antibiotik ditentukan oleh karakteristik fenomena infeksi, lokasi infeksi, pengenalan penyebab infeksi, kondisi patologik penderita dan pengetahuan menyeluruh tentang antibiotik yang tersedia dalam terapi (Wattimena dkk, 1987).

Menurut *Indonesian Society of Tropical and Infectious Diseases Consultant Consensus 2010* mengenai demam tifoid, antibiotik yang digunakan untuk penanganan demam tifoid adalah Kloramfenikol, Ampisilin, atau -Sulfametoksazol (Saragih and Purba, 2018). WHO 2011

merekomendasikan hal serupa bahwa daerah yang bakteri *S typhi* masih sensitif, hendaknya menggunakan antibiotik lini pertama. Dari beberapa jenis antibiotik tersebut, terdapat beberapa yang diketahui telah resisten terhadap salmonella. Berdasarkan Penetapan Potensi Antibiotik 6, Kultur mikroba diisolasi dari penderita sebagai konfirmasi diagnosa dan membantu membuat keputusan mengenai terapi antibiotik dapat diketahui dengan menentukan potensi aktivitas antibiotik secara in vitro. Dalam Farmakope Indonesia (Wattimena dkk., 1987) dijelaskan bahwa potensi adalah perbandingan dosis sediaan uji dengan dosis larutan standar. Ada beberapa faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba yaitu pertama adalah pH lingkungan. Beberapa obat diketahui lebih aktif pada pH Asam (misalnya nitrofurantoin) sedangkan beberapa antibiotik yang lain lebih aktif pada pH alkali, misalnya aminoglycosides dan sulfonamides. Kedua adalah kandungan medium. Diketahui komponen medium seperti Sodium polyanethol sulfonate pada media kultur darah dan deterjen anionic ternyata menghambat *aminoglycoside*. PABA pada ekstrak jaringan antagonis dengan sulfonamida. Ketiga, kestabilan obat pada suhu inkubasi dimana beberapa antibiotik menjadi hilang aktivitasnya. Keempat, Ukuran inoculum menunjukkan bahwa semakin besar inoculum, semakin kecil penampakan kesensitifan organisme. Kelima, masa inkubasi. Diketahui mikroba tidak mati karena terpapar antibiotik dalam waktu yang ddak lama. Semakin lama

masa inkubasi dilakukan, semakin besar peluang mutan resisten untuk tumbuh. Terakhir adalah aktivitas metabolik. Aktivitas antibiotik akan semakin baik pada saat bakteri memasuki fase pertumbuhan dibanding pada fase istirahat (Jawetz et al. 2013). Penetapan kepekaan antibiotik dapat dilakukan dengan dua cara yaitu teknik difusi dan dilusi. Penetapan dengan teknik difusi agar atau disebut juga metode Kirby-Bauer yang menggunakan cakram kertas yang mengandung antibiotik. Cakram kertas yang mengandung antibiotik ini ditempatkan pada permukaan media padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona yang terbentuk di sekitar cakram diukur dan dijadikan ukuran kekuatan hambatan antibiotik. Penetapan dengan dilusi dilakukan dengan membuat dilusi antimikroba dengan konsentrasi yang diencerkan secara serial, baik dengan media padat maupun media cair. Bakteri kemudian diinokulasi pada media tersebut dan diinkubasi dalam jangka waktu dan suhu tertentu. Melalui cara ini, diperoleh konsentrasi hambat minimum atau *Minimum Inhibitory concentration* (MIC) yaitu konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Uji dengan cara dilusi memerlukan waktu pengerjaan yang lama. Uji ini menggunakan tabung reaksi, tidak praktis dan jarang dipakai.

Jenis antibiotik yang digunakan dalam terapi tifoid adalah penisilin (amoxicillin dan ampicillin), cephalosporin (ceftriaxone dan cefuroxime),

aminoglycoside (streptomycin dan gentamicin), macrolide (erythromycin), fluoroquinolon (ciprofloxacin, ofloxacin dan perfloxacin) dan tetracycline merupakan antibiotik yang sering diberikan untuk mengobati infeksi *S. typhi*. Berdasarkan Pedoman Pengendalian Demam Tifoid, 2006, antimikroba segera diberikan bila diagnosis telah ditegakkan dan antimikroba yang diberikan sebagai terapi awal adalah dari kelompok antimikroba lini pertama untuk tifoid. Pilihan ini sesuai dengan antimikroba dengan kepekaan tertinggi suatu daerah, mengingat lain daerah berarti lain pula tingkat kepekaan antimikrobanya. Sampai saat ini kloramfenikol masih menjadi pilihan pertama. Jika diukur dari segi efikasi dan harga, terdapat kekurangan bila digunakan dalam jangka waktu yang lama, serta cukup sering menimbulkan karier. Adapun antimikroba lini pertama untuk tifoid adalah: Kloramfenikol, Ampicillin atau Amoxicillin, Trimetoprim- Sulfametoxazol. Jika pemberian antimikroba lini pertama dinilai tidak efektif, dapat diganti dengan antimikroba lain atau dipilih antimikroba lini kedua. Antimikroba lini kedua meliputi Seftriakson, Cefixime dan Quinolon. Bila penderita dengan riwayat pernah mendapat tifoid serta memiliki predisposisi untuk *carrier*, maka pengobatan pertama adalah golongan kuinolon (KMK, 2006).

Berdasarkan pertimbangan diatas serta angka kejadian resistensi antibiotik yang semakin meningkat, meskipun beberapa penderita tifoid masih sensitif terhadap antibiotik yang ada saat ini. Maka antibiotik yang

disarankan adalah jenis quinolone dengan dosis masing-masing sebagaimana tercantum dalam tabel berikut.

Tabel 1 Agen Antimikroba sebagai terapi demam tifoid

Susceptibility	Patient	Antibiotic	Dosage
<b>Uncomplicated enteric fever</b>			
Quinolone sensitivity areas	Adult	<b>Responders:</b> Fluoroquinolones, namely Ciprofloxacin or Ofloxacin	15 mg/kg body weight/day × 10 days
		OR 3 <sup>rd</sup> Generation Cephalosporin like Cefixime	15-20 mg/kg body weight/day × 10 days
		<b>Nonresponders:</b> Chloramphenicol OR Amoxicillin	50-75 mg/kg body weight/day × 14 days 75-100 mg/kg body weight/day × 14 days
	Child	<b>Responders:</b> 3 <sup>rd</sup> Generation Cephalosporin like Cefixime	15-20 mg/kg body weight/day × 10 days
		<b>Nonresponders:</b> Chloramphenicol OR Amoxicillin	50-75 mg/kg body weight × 14-21 days 75-100 mg/kg body weight × 14 days
		<b>Quinolone resistance areas</b>	<b>Responders:</b> Cefixime
Quinolone resistance areas	Adult	<b>Nonresponders:</b> Azithromycin	10-20 mg/kg body weight/day × 7 days
	Child	<b>Responders:</b> Azithromycin	10-20 mg/kg body weight/day × 7 days
		<b>Nonresponders:</b> Cefixime	15-20 mg/kg body weight/day × 14 days
<b>Complicated enteric fever</b>			
Quinolone sensitivity areas	Adult	<b>Responders:</b> 3 <sup>rd</sup> and 4 <sup>th</sup> Generation Cephalosporins like Ceftriaxone	60 mg/kg body weight/day IV × 14 days
		Cefotaxime	80 mg/kg body weight/day IV × 14 days
		OR Fluoroquinolone like Ciprofloxacin or Ofloxacin	15 mg/kg body weight/day IV × 14 days
	Child	<b>Nonresponders:</b> Chloramphenicol	100 mg/kg body weight/day IV × 14-21 days
		Ampicillin	100 mg/kg body weight/day IV × 14 days
		<b>Responders:</b> Ceftriaxone or Cefotaxime	50-75 mg/kg body weight/day IV × 14 days
Quinolone resistance areas	Adult	<b>Nonresponders:</b> Chloramphenicol	100 mg/kg body weight/day IV × 14-21 days
		Amoxicillin	100 mg/kg body weight/day IV × 14 days
		<b>Responders:</b> Ceftriaxone or Cefotaxime	60 mg/kg body weight/day IV × 14 days
	Child	<b>Nonresponders:</b> Fluoroquinolone	20 mg/kg body weight/day IV × 14 days
		Ceftriaxone or Cefotaxime	80 mg/kg body weight/day IV × 14 days

## 2.2 Daun Miana

Tanaman ini merupakan tanaman yang banyak tersebar di seluruh dunia, namun asalnya dari Asia Tenggara. Di Indonesia, tanaman ini memiliki nama masing-masing di beberapa daerah, seperti “Kentangan” (Jawa) atau “Si Gresing” (Batak) atau “Jawer kotok” (Sunda). Pemanfaatannya pun selain sebagai tanaman hias karena bentuk dan warna daunnya yang menarik tanaman ini juga sering digunakan sebagai

obat tradisional untuk penderita demam, batuk, bisul, asma, diare dan diabetes mellitus sehingga terus dikembangkan. Miana dapat ditemukan di daerah sekitar pematang, sawah, lading atau kebun (Kusumawati, 2014).

Beberapa studi terkait kandungan fitokimia dalam miana menyatakan bahwa miana mengandung senyawa flavonoid, saponin, steroid dan tannin. Selain itu miana juga mengandung senyawa polifenol, minyak atsiri, karvakrol, metil eugenol, etil salisilat, lendar, alkaloid dan timol, serta senyawa *rosmarinic acid* (RA) dan diastereomer diterpen yang dinilai memiliki efek antibakteri dan antiinflamasi. (Consolacion Ragasa et al. 2001).

Kandungan fitokimia dalam daun miana meskipun belum ada yang menyebutkan secara spesifik jumlah persentase kandungan masing-masing zat fitokimia, namun Kumar dan Pandai dalam studinya menjelaskan bahwa kandungan flavonoid dalam tanaman dinilai memiliki efek sebagai antiinflamasi, antibacterial, antiviral dan anticancer.

Kumar dan Pandey 2013, dalam tulisannya mengelompokkan flavonoid menjadi beberapa grup dengan struktur kimia masing-masing yang dapat dilihat pada gambar berikut ini:

Group of flavanoid	Structure backbone	Examples		
Flavones				
Flavonols				
Flavanones				
Flavanonol				
Isoflavones				
Flavan-3-ols				

Gambar 1. Struktur Kimia dari Flavanoid

Beberapa bagian (kelompok) dari flavonoid dinilai memiliki dampak yang signifikan berkaitan dengan fungsi kekebalan tubuh dan sel-sel inflamasi, seperti hesperidin, apigenin, luteolin dan quercetin. Secara khusus, flavonoid mempengaruhi fungsi enzim-enzim yang memiliki keterlibatan dalam proses inflamasi terutama protein kinase tyrosine dan serine-

threonine. Inhibisi kinase terjadi karena pengikatan kompetitif flavonoid dengan ATP di situs katalitik pada enzim-enzim yang terlibat dalam proses transduksi sinyal dan aktivitas sel-sel imun. Flavonoid dapat menghambat ekspresi isoform dari nitric oxide synthase, cyclooxygenase dan lipoxygenase yang berperan dalam produksi nitric oxide, prostanoide, leukotriene dan mediator inflamasi lainnya seperti sitokin, kemokin ataupun molekul adhesi. Selain itu, flavonoid juga menghambat fosfodiesterase yang terlibat dalam aktivitas sel. Beberapa flavonoid juga dapat menghambat produksi prostaglandin yang merupakan molekul sinyal pro-inflamasi yang kuat. Dalam peranannya sebagai antibakteri, beberapa flavonoid termasuk apigenin, galangin, flavon dan flavonol glikosida, isoflavone, flavanon dan chalcone terbukti memiliki aktivitas antibakteri yang kuat. Salah satu aksi molekul dari flavonoid adalah membentuk kompleks protein melalui ikatan hidrogen dan efek hidrofobik, serta pembentukan ikatan kovalen. Catechin yang merupakan bentuk yang paling direduksi dari unit C3 dalam senyawa flavonoid, telah banyak diteliti aktivitas antimikrobanya, seperti pada *Vibrio cholerae* yang terbukti menginaktivasi toksin kolera, *Streptococcus mutans* dengan menghambat glukosiltransferase bakteri, *Shigella, sp.*, dan bakteri lainnya. Flavonoid lain seperti robinetin, myricetin diketahui menghambat sintesis DNA pada *Proteus vulgaris*. Quercetin dan apigenin memiliki aktivitas inhibitor terhadap DNA gyrase *Escherichia coli*. Sedangkan

naringenin dan sophoraflavanone G memiliki aktivitas antibakteri yang intens terhadap *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap metisilin (MRSA) dan *Streptococcus, sp.* secara signifikan yang kemudian juga dinilai mampu memberikan efek terhadap ekspresi gen HMGB-1 sebagai sitokin pro-inflamasi khususnya pada infeksi *Salmonella typhi*. Studi yang telah dilakukan oleh Pakadang 2015 menilai potensi Daun Miana sebagai imunomodulator pada kasus tuberkulosis dan didapatkan hasil bahwa ekstrak Daun Miana (*Coleus benth*) dapat meningkatkan jumlah Limfosit T, CD4 T Cell, penurunan level IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ .

Dalam pemanfaatannya, Daun Miana mengalami proses ekstrak terlebih dahulu, yakni proses pemisahan bahan padat maupun cair dengan menggunakan pelarut. Prinsipnya adalah menghilangkan analit dari segala bahan di dalam matriks formulasi yang dapat menjadi senyawa pengganggu saat analisisnya. Hasil ekstrak dapat berupa bentuk sediaan yang kering, cair, ataupun kental dengan penyari simplisia yang sesuai (Kemenkes Acuan Sediaan Herbal, 2010).

Teknik dan prosedur dalam mengekstraksi suatu tanaman dilakukan sesuai dengan standar yang telah ditetapkan. Beberapa teknik umum dalam ekstraksi tanaman obat meliputi maserasi, infus, perkolasi, *digestion*, rebusan, ekstraksi panas berkelanjutan (Soxhlet), *aqueous-alcoholic extraction* melalui fermentasi, *counter current extraction*, ekstraksi dengan

bantuan gelombang mikro, ekstraksi ultrasonografi (sonikasi), *superficial fluid extraction*, dan distilasi (distilasi air, uap), ekstraksi phytonic (dengan pelarut hydrofluorocarbon) (Pandey, 2014).

### **2.3 HMGB-1**

*High-mobility group box-1 protein* (HMGB-1) adalah salah satu protein non-histone terbanyak dan merupakan jenis protein HMG yang berkontribusi pada struktur kromatin dan memodulasi ekspresi gen. Setelah dilepaskan dari sel stroma atau imun, akan berinteraksi dengan panel besar reseptor permukaan sel. HMGB-1 memberikan peranan dalam fungsi pengaturan sel, pematangan, proliferasi dan motilitas hingga peradangan, kelangsungan hidup dan kematian sel. High Mobility Group Box 1 (HMGB-1) merupakan protein pengikat DNA nuklear. HMGB-1 merupakan salah satu *Danger Associated Molecular Patterns* (DAMPs) yang mengaktivasi sistem imun bawaan dan bagian dari keluarga High Mobility Group (Kang R et al., 2014).

Gen HMGB-1 manusia terletak di kromosom 13q12 dan enam lokus polimorfik di seluruh lokus gen yang diidentifikasi baru-baru ini (Chen Q et al., 2016). Protein HMGB-1 mempunyai berat molekul 25-30 kDa terdiri dari dua domain DNA-binding homolog yaitu kotak A dan kotak B, masing-masing terdiri dari sekitar 80 residu asam amino dan ujung C terminal asam

bermuatan negatif yang terdiri dari sekitar 30 residu asam aspartat dan glutamat. Struktur HMGB-1 pada Gambar 2.8 memperlihatkan protein HMGB-1 terdiri dari 215 asam amino dalam tiga domain struktural: kotak A (1-79), kotak B (89-162), dan ujung C terminal asam (186-215).

Fungsi Kotak A adalah pengikatan DNA dan menginduksi efek anti-inflamasi, sedangkan domain kotak B memainkan peran penting dalam pengikatan DNA dan merangsang respon proinflamasi. Domain kotak B terdiri dari dua tempat pengikatan penting untuk TLR4 dan RAGE yang memediasi pelepasan sitokin proinflamasi. Secara khusus, 20 asam amino tempat mengikat TLR4 (89-108) adalah urutan minimal yang diperlukan untuk menginduksi aktivitas sitokin. Dua wilayah peptida (1-15, 80-96) dari HMGB-1 mengikat LPS dan LPA (Lee S.A et al., 2014).

Domain Box A dari HMGB-1 berperan dalam pengikatan HMGB-1 dengan DNA yang rusak dan bertindak sebagai antagonis spesifik HMGB-1, menunjukkan efek antiinflamasi. Hal ini juga terlihat pada domain pengikatan heparin dan tempat pemecahan yang dimediasi thrombin. Disisi lain, domain box B berhubungan dengan aktivitas sitokin pada sepanjang lengan HMGB-1 yang distimulasi oleh pelepasan *Tumor necrosis factor a* (TNF a) dan berbagai sitokin proinflamasi dalam makrofag, selain perannya dalam pengikatan DNA. Terdapat dua tempat pengikatan penting yaitu *Toll like receptor 4* (TLR4) (89--108) dan *Receptor for advanced glycation end*

*products* (RAGE) (105--183) yang krusial dalam aktivasi pelepasan sitokin oleh makrofag, dimana 20 residu pertama mewakili jumlah minimum peptida yang diperlukan untuk menginduksi respons inflamasi (Lee S.A., 2014).

HMGB-1 juga dinilai terlibat dalam suatu proses inflamasi (Sirait, 2018). Endotoksemia bersifat mematikan oleh karena mekanisme syok septik yang terjadi, termasuk peningkatan produksi sitokin dan apoptosis leukosit yang luas<sup>21</sup>. Mekanisme molekuler yang mendasari endotoksemia mematikan tidak dipahami sepenuhnya, tetapi satu mediator penting adalah kelompok HMGB-1. Jalur yang melibatkan sel makrofag telah terbukti melepaskan HMGB-1 sebagai respons terhadap LPS selama nekrosis, tetapi tidak saat terpapar rangsangan apoptosis (Lamkanfi, 2012).

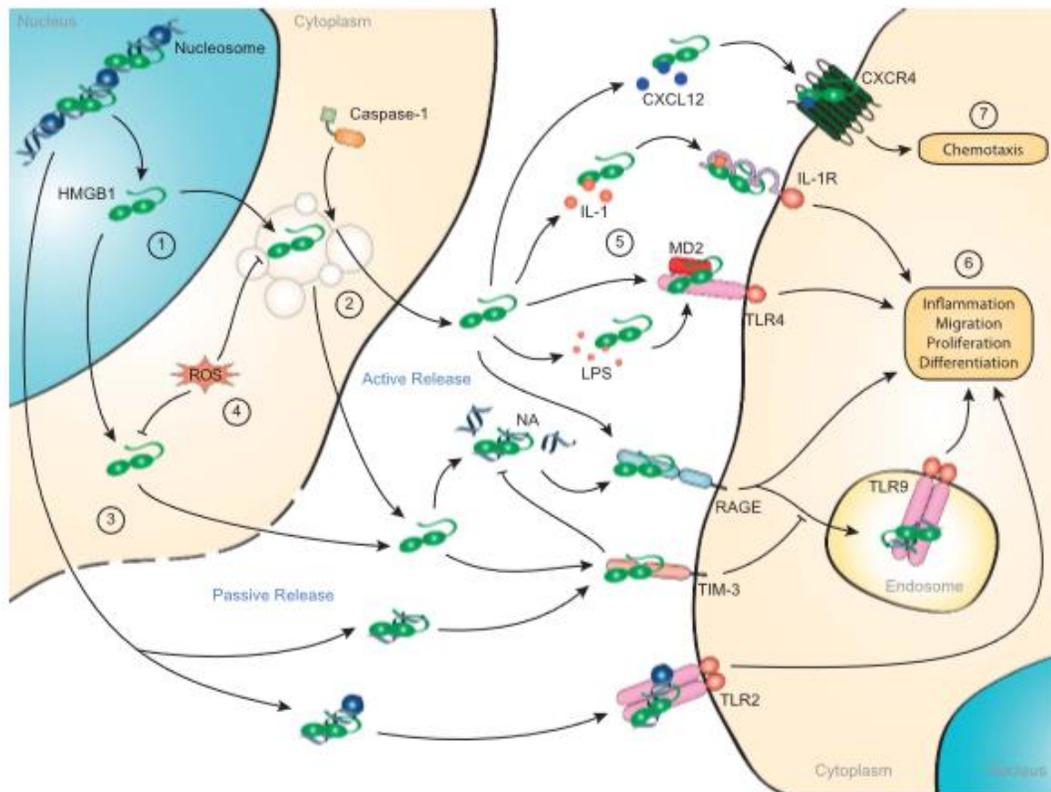
HMGB-1 merupakan bagian dari keluarga HMG. Beberapa Keluarga HMG diantaranya adalah HMGA, HMGN dan HMGB . HMGB-1 termasuk pada kelompok HMGB yang paling banyak diekspresikan (Kang R et al. 2014).

Peran HMGB-1 ada tiga bentuk nuklear, sitosol/sitoplasma dan ekstraseluler. Bentuk HMGB-1 nuklear memiliki peran pada banyak kegiatan DNA, yaitu replikasi, perbaikan, rekombinasi, transkripsi DNA serta stabilitas genomik (Kang R et al., 2014). Dalam sitoplasma, HMGB-1 mengambil bagian dalam mengatur *autophagy* dan menjaga keseimbangan antara *autophagy* dan apoptosis (Tang D et al., 2010). Selain itu, HMGB-1

juga mempromosikan proses autofagi melalui jalur degradasi lisosom. Dalam beberapa kasus HMGB-1 yang berada di membran sel berkontribusi pada aktivasi trombosit dan adhesi sel (Yu Y et al., 2015).

*High Mobility Group Box-1* ekstraseluler memiliki peranan pada proses inflamasi, imunitas, pertumbuhan sel, proliferasi dan kematian sel. Fungsi HMGB-1 ekstraseluler untuk aktivasi sitokin dan kemokin, dimediasi oleh RAGE dan toll like receptors seperti TLR2, TLR 4 dan TLR 9, untuk mengaktivasi jalur signaling akhir seperti *nuclear factor kappa  $\beta$  (NF $\kappa$  $\beta$ )*, *interferon regulatory factor-3 (IRF 3)* dan *phosphatidylinositol 3-kinase* yang kemudian mengaktivasi pengeluaran sitokin proinflamasi *Tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ )*, interleukin 1 (IL 1) dan interleukin 6 (IL 6) oleh makrofag (Yu Y et al., 2015).

Pengamatan ini memicu konsep bahwa HMGB-1 adalah sinyal bahaya endogen prototipe atau alarmin, yang dilepaskan dari makrofag teraktivasi dan sel nekrotik.



Gambar 2. Mekanisme keterlibatan HMGB-1 dalam Proses Inflamasi

HMGB-1 yang disekresikan mengikat reseptor imun, termasuk TLR dan *receptor for advanced glycation and products* (RAGE), untuk memperoleh respons proinflamasi (Van *et al*, 2009). HMGB-1 tidak memiliki sinyal sekresi klasik, sehingga mekanisme HMGB-1 dilepaskan dari sel masih belum jelas. Sitokin proinflamasi, IL-1 $\beta$  dan IL-18 juga tidak memiliki peptida sinyal untuk jalur retikulum endoplasma klasik-Golgi eksositosis. Sitokin-sitokin ini keduanya diproduksi sebagai prekursor tidak aktif dalam sitosol dan dilepaskan dengan cara yang tidak jelas setelah pematangannya oleh

sistein protease caspase 1. Bentuk zimogen sitosolik dari caspase 1 terdiri dari prodomain terminal N, diikuti oleh dua sub unit yang bersama-sama membentuk enzim protease (Arpaia *at al*, 2011; Van *at al*, 2009).

Interaksi HMGB-1 dengan transduksi sinyal selular RAGE, TLR2, TLR4, dan TLR 9 melalui jalur umum yang selanjutnya akan mengaktivasi NF- KB pada gambar 2.10.. Interaksi HMGB-1 dengan LPS, LTA, dan CpG meningkatkan sinyal yang dimediasi TLR4, TLR2, dan TLR9 dan mengarah ke signal akhir aktivasi NF-KB dan produksi sitokin proinflamasi. Diaktifkannya NF- KB akan melepaskan I $\kappa$ B, kemudian akan bertranslokasi ke nukleus dan berikatan dengan DNA dalam bentuk heterodimer p65/p50. Interaksi HMGB-1 dengan CXCL12, yang mengikat CXCR4 akan menginduksi kemotaksis dan perekrutan sel inflamasi (Lee S. A.,2014).

Interaksi HMGB-1 dengan molekul lainnya (contoh LPS bakterial) atau berikatan ke reseptor untuk mengaktivasi berbagai gen proinflamatori. HMGB-1 dihasilkan oleh sel hidup maupun sel mati pada berbagai jaringan. Sekresi HMGB-1 ke lingkungan ekstraseluler dari sel nekrotik maupun makrofag yang teraktivasi, akan menginduksi berbagai sitokin proinflamatori termasuk *tumor necrosis factor (TNF)-  $\alpha$* , *interleukin (IL)-1  $\alpha$* , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, *macrophage inflammatory protein (MIP)-1  $\alpha$* , dan MIP-1  $\beta$ , yang akan mempromosikan terjadinya proses inflamasi kronik. Sekresi HMGB-1 disebut juga mediator fase lambat dari inflamasi yang diinduksi oleh sitokin

proinflamatori dini dan memicu efek immunosupresif dan patologikal yang mengikuti pengeluaran sitokin selanjutnya seperti TNF-  $\alpha$ , IL-1  $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, and IL-8 selama infeksi (Kim S.Y et al., 2017).

Beberapa studi sebelumnya menunjukkan adanya peningkatan Kadar HMGB-1 pada kondisi inflamasi seperti kanker, COPD, atau asthma. Penelitian ini menunjukkan bahwa peningkatan kadar HMGB-1 dan peningkatan jumlah sel yang menghasilkan HMGB-1 telah teridentifikasi pada lokasi spesifik inflamasi dan pada plasma (Hernandez-Pando R et al., 15) Tidak ada peningkatan yang signifikan pada konsentrasi HMGB-1 pada pasien dengan penyakit paru non-TB. Oleh karena itu, kami menyimpulkan bahwa peningkatan kadar HMGB1 pada kelompok tuberkulosis aktif sebagaimana dengan kasus infeksi TB laten merupakan hasil dari infeksi MTB (Magrys A et al., 2013).

Penelitian yang dilakukan oleh Qiu-yue Liu et al., menunjukkan bahwa sebanyak 124 pasien dengan TB paru menunjukkan adanya upregulasi sel imun pada serum. Hasil tersebut mengindikasikan bahwa kadar konsentrasi serum dari limfosit, plasmacyte, neutrofil, dan monosit secara signifikan meningkat pada pasien dengan infeksi MTB dibandingkan dengan subjek kontrol sehat ( $p < 0,01$ ). Sebagai tambahan, hasil studi juga mengindikasikan bahwa makrofag, sel mast dan sel endothelial juga

mengalami peningkatan pada jaringan paru pasien dengan infeksi MTB dibandingkan dengan subjek kontrol sehat. (Liu Q.Y et al., 2016)

Peran proinflamatori yang kuat dari HMGB-1 ditunjukkan pada penyakit autoimun, trauma, sepsis, pneumonia bakterialis dan kondisi patologis termasuk aterosklerosis, arthritis, cedera paru akut seperti infeksi TB. Studi ilmiah menunjukkan bahwa kadar serum HMGB-1 mengalami peningkatan pada pasien dengan tuberkulosis (TB). Sekresi HMGB-1 yang oleh makrofag paru merupakan mediator inflamatori yang penting dan terlibat dalam sekresi sitokin proinflamatori dan pengeluaran *Nitric Oxide* (NO) selama TB paru. Sebagai tambahan terhadap pelepasan sitokin inflamatorik contohnya TNF-  $\alpha$ , HMGB-1 akan mengaktifasi fungsi sel imun dan menginduksi maturasi sel tersebut seperti monosit dan sel dendritik *myeloid/plasmacytoid* (Kim SY et al., 2017).

Selama awal infeksi, makrofag yang teraktivasi akan memproduksi NO yang akan menghasilkan lingkungan oksidasi tinggi. Produksi NO oleh makrofag yang teraktivasi akan mengoksidasi HMGB-1 dan secara temporer menekan inflamasi yang berlebih dan menurunkan imunitas protektif. Selanjutnya, lingkungan oksidatif mengalami penurunan yang diakibatkan Oleh melemahnya aktivasi makrofag, produksi NO yang menurun dan penurunan apoptosis makrofag, menyebabkan penurunan produksi HMGB-1 (Kim S.Y et al., 2017).

Pada fase istirahat, HMGB-1 berada dalam nukleus. Translokasi HMGB-1 ke sitoplasma diatur oleh modifikasi pasca-translasi seperti asetilasi, metilasi dan fosforilasi. Kurangnya sinyal sekresi, HMGB-1 secara aktif disekresikan melalui jalur vesikuler sekretoris caspase-1-dependent. HMGB-1 juga dapat dilepaskan secara pasif dari sel-sel yang rusak baik sendiri atau dalam kompleks dengan RNA, DNA atau nukleosom. Yang menarik, selama kematian sel (apoptosis), produksi ROS menginduksi oksidasi HMGB-1 yang menghambat fungsi proinflamatorinya dan mengalihkan fungsi HMGB-1 ke arah tolerogenitas. Setelah berada di ruang ekstraseluler, HMGB-1 berikatan dengan beberapa reseptor baik dalam bentuk bebas atau kompleks. Reseptor HMGB-1, termasuk RAGE dan TLR4 mengikat HMGB-1 atau HMGB-1 secara bebas dalam kompleks dengan DNA atau LPS. Melalui interaksinya dengan RAGE, internalisasi kompleks HMGB1-DNA meningkatkan aktivasi TLR9 yang terlokalisasi dalam endosom. Namun, pembentukan kompleks HMGB-1 dengan asam nukleat dan berpotensi dengan molekul lain dapat dihambat oleh interaksi langsung dengan TIM-3. Reseptor lain, seperti TLR2, IL-1R dan CXCR4, masing-masing merekrut HMGB-1 dengan nukleosom, IL-1 $\beta$  atau CXCL12. Dengan demikian, keterlibatan HMGB-1 dapat memediasi mekanisme terjadinya peradangan, migrasi sel, proliferasi dan diferensiasi. Selanjutnya,

melalui sumbu CXCL12 / CXCR4, HMGB-1 berperan meningkatkan chemotaxis (Bertheloot & Latz, 2017).

Pelepasan HMGB-1 terjadi selama infeksi atau cedera dengan mekanisme aktif dan pasif. Pengeluaran pasif diinisiasi oleh adanya kerusakan pada integritas seluler terjadi yang secara langsung. Pengeluaran aktif diinisiasi oleh transduksi sinyal seluler melalui interaksi reseptor membrane plasma dengan produk ekstraseluler yang terjadi lebih lambat. Sekresi aktif dari HMGB-1 terjadi ketika monosit, makrofag, sel *Natural-killer*, sel dendritik, sel endothelial, platelet, dan sel komponen imunologis lainnya yang terpajan *microbe associated molecular patterns* (MAMPs), *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) dan mediator inflamasi yang berasal secara endogen termasuk TNF, IL-1 dan INF- $\gamma$  (Anderson U et al., 2011). Sebagai salah satu mediator proinflamasi respons lambat HMGB-1 disekresi oleh makrofag 20 jam setelah aktivasi oleh LPS dari bakteri (Wang et al., 1999).

Sel lainnya yang dapat menstimulasi pelepasan HMGB-1 secara aktif termasuk neuron, astrosit, sel erythroleukemia, sel neuroblastoma dan sel umor lainnya. Sebagian besar sel termasuk monosit dan makrofag dapat mengekspresikan protein HMGB-1 dan mRNA HMGB-1 pada kondisi basal. Akibat aktivasi makrofag oleh LPS, kadar mRNA HMGB-1 akan meningkat dalam beberapa jam dan akan tetap terus meningkat selama 24 hingga 48

jam. Sekresi aktif HMGB-1 ke ekstraseluler dimulai 8-12 jam setelah ligasi dengan TLRs dan terus meningkat selama 18-36 jam (Anderson U et al., 2011).

Pelepasan HMGB-1 yang terjadi selama kematian sel terprogram berasal dari paling tidak 2 sumber yaitu secara langsung dari sel apoptotik dan monosit yang teraktivasi untuk mensekresikan HMGB-1 mengikuti pajanan terhadap sel apoptotik. Bukti terakhir menunjukkan bahwa sel yang mengalami apoptosis dapat menghasilkan sejumlah HMGB-1 yang *immuno detectable* namun secara imunologikal bersifat inaktif, oleh karena itu makrofag yang berkaitan akan gagal menstimulasi pengeluaran TNF dibandingkan dengan saat terjadinya pengeluaran HMGB-1 secara pasif selama nekrosis sel. Hal ini disebabkan adanya *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang dihasilkan oleh mitokondria pada sel apoptotik yang dapat menekan aktivitas inflamatorik dari HMGB-1 dengan mengoksidasi *cysteine* pada posisi 106. Mekanisme ini memberikan pemahaman yang penting mengapa apoptosis gagal untuk mengaktivasi respon inflamatorik yang bermakna karena adanya hambatan pada tahapan oksidasi HMGB-1 yang penting dalam respon inflamatorik. Hasil sebelumnya yang menunjukkan bahwa HMGB-1 endogen (yang didapat dari sel nekrotik) dibutuhkan untuk stimulasi pengeluaran TNF monosit dan HMGB-1 rekombinan (rHMGB-1) yang secara imunologis bersifat inaktif mengonfirmasi pentingnya C106

pada mekanisme molekuler dari inflamasi yang dimediasi oleh HMGB-1. Peran fungsional HMGB-1 endogen sangat penting sebagai molekul pemberi sinyal yang menginformasikan sel lain bahwa kerusakan atau invasi patogen telah terjadi (Anderson U et al., 2011).

Reseptor pertama yang diimplikasikan merupakan *binding-partner* untuk HMGB-1 adalah *Receptor for advanced glycation end products* (RAGE). Reseptor RAGE merupakan anggota superfamili immunoglobulin transmembran, berada di permukaan sel. Ikatan HMGB-1 dengan RAGE kemotaksis dan stimulasi memberikan sinyal untuk memediasi pertumbuhan sel, diferensiasi sel imun, migrasi sel imun dan sel otot polos serta upregulasi reseptor sel permukaan termasuk RAGE dan TLR4. Ikatan HMGB-1 dengan TLR4-MD2 melalui transduksi sinyal yang akan menstimulasi pengeluaran TNF dari makrofag. Pengikatan dan sinyal keduanya membutuhkan suasana redoks-sensitif pada cysteine posisi 106 dan penggantian pada posisi cysteine ini akan mencegah pengikatan HMGB-1 terhadap TLR4. Reseptor TLR4 merupakan reseptor primer dari HMGB-1 dalam memediasi aktivasi makrofag, pengeluaran sitokin, dan kerusakan jaringan (Anderson U et al., 2011).

*High Mobility Group Box 1* merupakan mediator awal pada injuri steril dan merupakan mediator lanjut pada infeksi yang akan mengaktifasi sel imun bawaan untuk memproduksi HMGB-1 yang bermakna dan kemudian

akan menurun pada kemunculan respon TNF awal. Selama iskemia dan bentuk lain dari kerusakan sel steril, HMGB-1 dihasilkan sebagai mediator dini yang akan mengaktivasi pengeluaran lanjut TNF dan sitokin lainnya (Anderson U et al., 2011).

*High Mobility Group Box 1* merupakan protein nuklear non-histon yang memiliki peran penting sebagai *minor-groove binding enhancer*. Secara struktural, HMGB-1 terdiri dari 2 kotak dasar yang berperan dalam pengikatan DNA dan ujung terminal C yang bersifat asidik (Keyel et al., 2011). Berkebalikan dengan sitokin, HMGB-1 berikatan dengan banyak reseptor, yang paling utama adalah TLR4 dan *receptor for advanced glycation end products* (RAGE). Dalam banyak kasus, pengikatan ini ditingkatkan atau dipotensiasi oleh ikatan pada *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) seperti LPS dan sitokin, termasuk IL-1. Walaupun HMGB-1 berikatan dengan berbagai macam reseptor, namun bersifat spesifik dan memiliki interaksi afinitas yang rendah. Sebagai contoh, HMGB-1 tidak berikatan dan tidak bersinergi dengan IL-18. Hal ini disebabkan oleh modifikasi post-translasi dan status redoks (Keyel et al. 2011).

*High Mobility Group Box 1* secara aktif dihasilkan dari sel imun termasuk makrofag, monosit, sel NK, sel dendritik, sel endothelial dan platelet. Sekresi HMGB-1 secara pasif dihasilkan dari sel nekrotik dan sel

yang rusak. Kedua mekanisme dapat memproduksi pengeluaran sejumlah HMGB-1 ekstraseluler (Yang H et al., 2010). *High Mobility Group Box 1 ekstraseluler* mempunyai banyak fungsi seperti aktivasi sitokin dan kemokin, dimana proses ini dimediasi oleh *receptor for advanced glycation end products* (RAGE) dan *toll like receptors* TLR2, TLR 4 dan TLR 9 untuk mengaktifkan jalur signaling akhir seperti NF K $\beta$ , *interferon regulatory factor-3* (IRF 3) dan *phosphatidylinositol 3-kinase* (P13K) yang kemudian mengaktifkan pengeluaran sitokin pro-inflamasi (*Tumour necrosis factor  $\alpha$*  (TNF  $\alpha$ ), interleukin 1 (IL 1) dan interleukin 6 (IL 6) oleh makrofag (Yu Y et al., 2015). Aktivitas inflamatorik dari HMGB-1 bergantung pada status oksidasi dari cysteine 106 yang terletak pada B box DNA-binding domain dari HMGB-1, yaitu wilayah yang penting dalam stimulasi pengeluaran sitokin dan inflamasi. Studi sebelumnya menunjukkan bahwa cysteine 106 dibutuhkan untuk proses sinyal HMGB-1 melalui TLR4 untuk menstimulasi pengeluaran sitokin dan inflamasi (Yang H et al., 2010)

*High Mobility Group Box 1* dapat berikatan dengan reseptor permukaan sel termasuk RAGE, TLR2, TLR4 dan TLR9. Interaksi HMGB-1 dengan reseptor ini menyebabkan transduksi sinyal intraseluler dan memediasi respon seluler termasuk perpindahan sel kemotaktik dan pelepasan sitokin pro inflamatorik (misalnya TNF dan IL-1) secara in vitro dan inflamasi akut secara in vivo (Yang H et al., 2010). Target utama dari

HMGB-1 ekstraseluler adalah TLR4, yang mengarahkan translokasi faktor nuklear kappa B (NFkB) ke nukleus, dan aktivasi faktor regulasi interferon 3 (IRF3) dan activator protein 1 (AP-1) untuk menghasilkan repertoar sitokin inflamasi. HMGB-1 adalah mediator lambat dari kerusakan infeksi, tetapi awal salah satu kerusakan steril. Selama aktivasi sel imunitas, HMGB-1 diekspresikan dan disekresi sekitar 8-12 jam. Umpan positif HMGB-1 memperkuat respons imun melalui induksi sitokin selama stres, infeksi, atau hipoksia (Asavarut P et al., 2013).

*Receptor for Advanced Glycation End products (RAGE)* merupakan protein transmembran dan diekspresikan pada sel endothelial, sel otot polos vascular, neurons, dan makrofag/monosit. Percobaan in vivo menunjukkan bahwa interaksi HMGB-1/RAGE penting dalam pembentukan tumor dan proliferasi. Terdapat 2 jenis *Toll-like receptors (TLRS)* yang terlibat dalam sinyal HMGB-1, yaitu TLR2 dan TLR4. TLR4 berperan sebagai reseptor primer dalam memediasi aktivasi makrofag, pelepasan sitokin dan injury jaringan. Sinyal HMGB-1 melalui TLR4 pada sel darah manusia dan makrofag primer akan menginduksi pelepasan sitokin. HMGB-1 dapat juga menghasilkan sinyal selular melalui TLR2. Park, *et al* mengamati bahwa TLR2 dan TLR4 terlibat dalam aktivasi seluler oleh HMGB-1. *Fluorescent resonance energy transfer (FRET)* dan analisis immuno-presipitasi pada

makrofag menunjukkan bahwa HMGB-1 berikatan dengan TLR2 dan TLR4 pada permukaan sel namun bukan pada RAGE (Yang H et al., 2010).

#### **2.4 Toll Like Receptors- 2 (TLR-2)**

Toll-like receptors (TLRs) merupakan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) yang berperan penting dalam menginisiasi respon imun innate. Secara struktural, TLR merupakan glikoprotein integral yang ditandai dengan adanya domain ekstraselular atau luminal *ligand-binding* yang mengandung motif *leucine-rich repeat* (LRR) dan domain pensinyalan Toll / interleukin-1 (IL-1) homologi (TIR) reseptor di sitoplasma. Ikatan antara ligan dengan TLR melalui interaksi PAMP-TLR menginduksi oligomerisasi reseptor, yang kemudian memicu transduksi sinyal intraseluler.

Hingga saat ini, terdapat 10 TLR telah diidentifikasi pada mamalia dan 12 pada *mouse* dengan masing-masing fungsinya dalam rekognisi PAMP berbeda yang berasal dari berbagai mikroba patogen, termasuk virus, bakteri, jamur, dan protozoa (Mogensen, 2009)

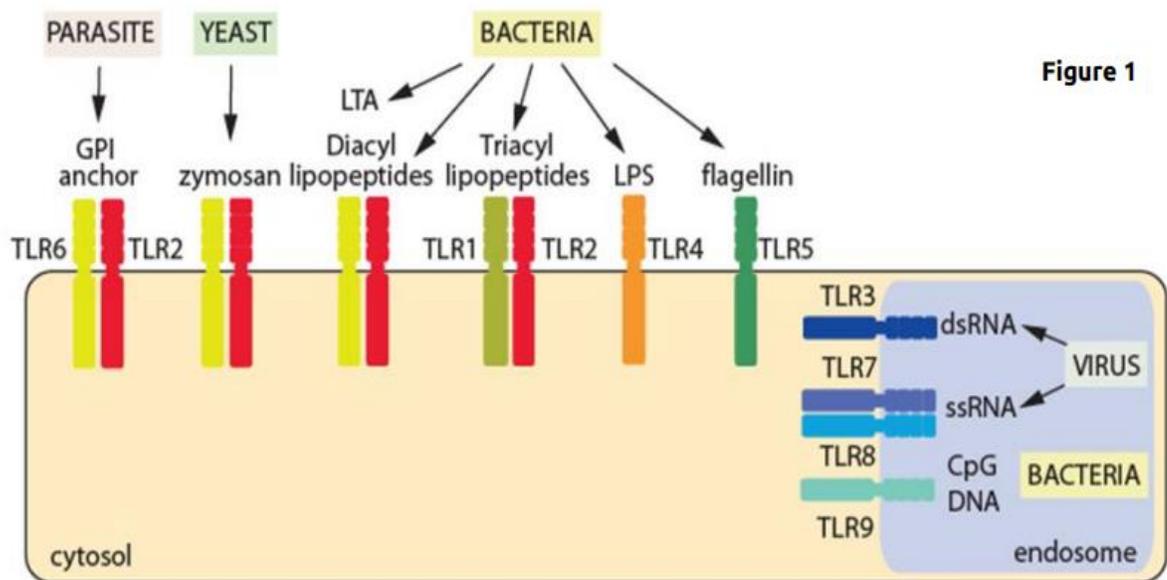
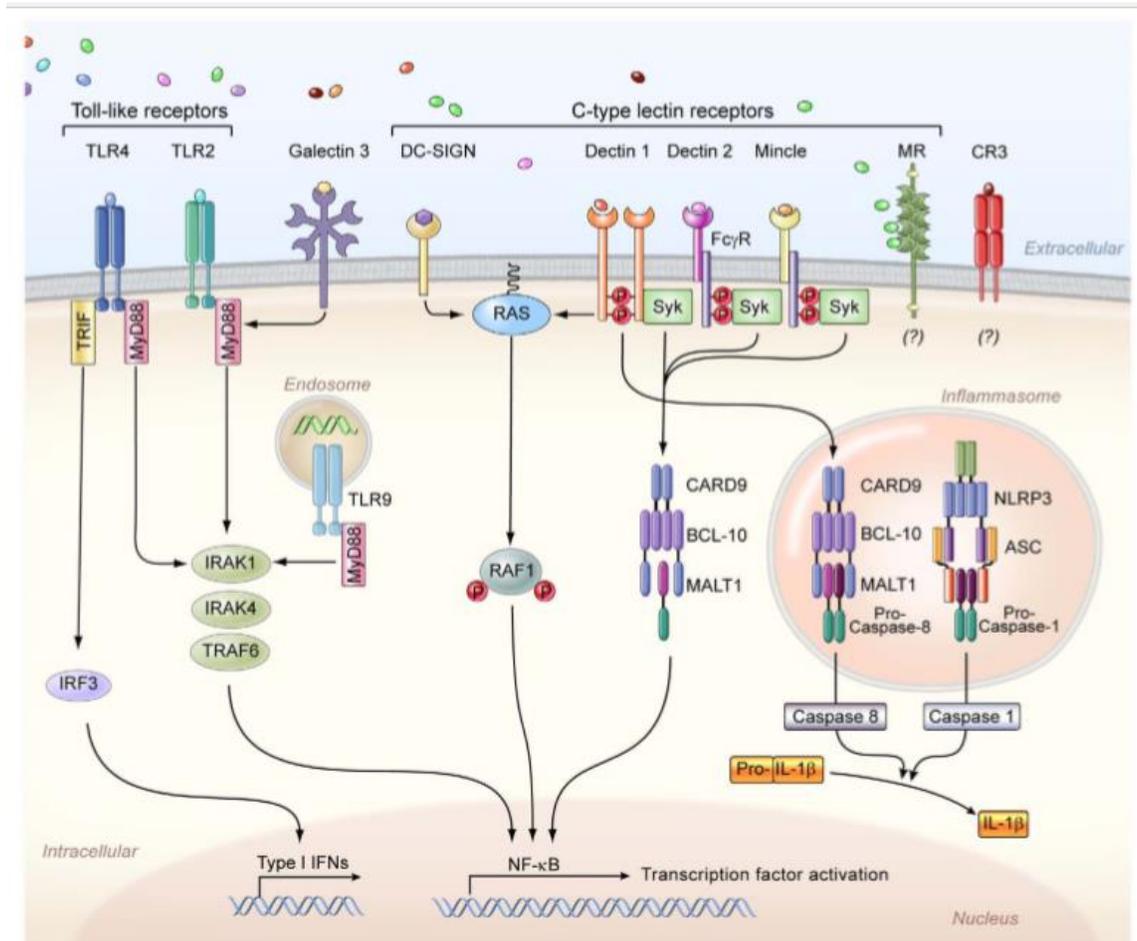


Figure 1

Gambar 3. Pengenalan Antigen pada Toll Like Receptors

TLR merupakan reseptor transmembran tipe I yang terdiri dari domain ekstraseluler yang terlibat dalam pengenalan produk mikroba, dan domain TIR dalam ekor sitoplasma yang menangkap molekul pensinyalan berbeda yang selanjutnya akan mengaktifkan transkripsi gen yang terlibat dalam peradangan dan anti mikroba.

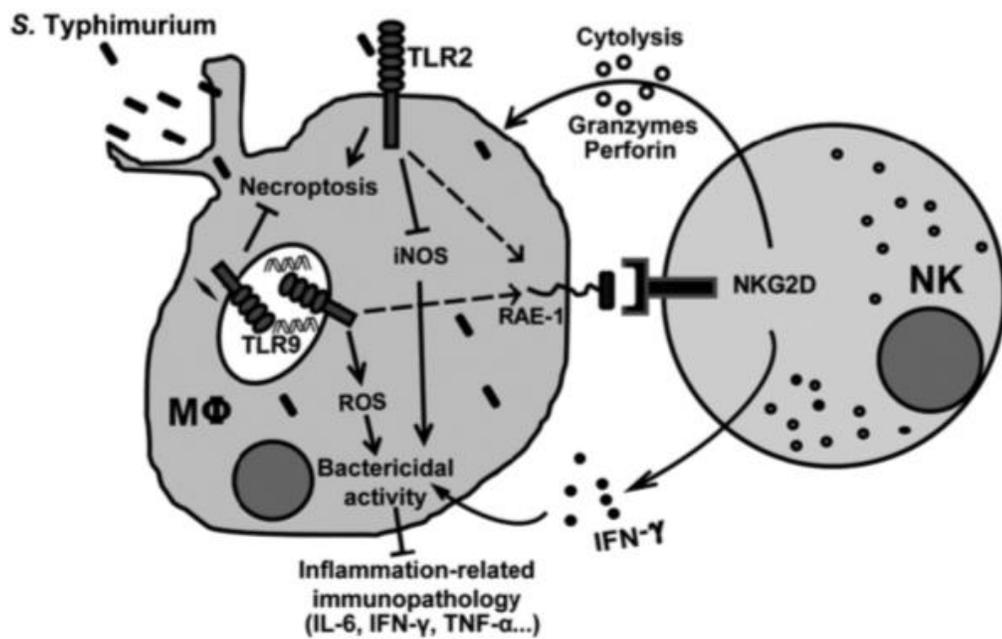


Gambar 4. Mekanisme Toll-Like Receptor 2 dalam keterlibatannya terhadap proses terjadinya inflamasi.

Setelah aktivasi, TLRs mengikat protein adaptor yang memediasi interaksi protein-protein lainnya dalam sitosol dari sel imun untuk propagasi jalur sinyal transduksi *antigen-induced*. Beberapa protein kemudian direkrut untuk bertanggung jawab dalam aktivasi protein hilir lainnya, termasuk protein kinase (IRAK1, IRAK4, dan TBK1) yang semakin memperkuat sinyal

hingga akhirnya mengarah pada peningkatan regulasi atau penekanan gen yang mengatur respon inflamasi serta peristiwa transkripsi lainnya. Peristiwa ini menyebabkan sitokin produksi, proliferasi, dan kelangsungan hidup, sementara yang lain menyebabkan kekebalan adaptif yang lebih besar (Kawasaki, 2014).

Pada infeksi *Salmonella typhi*, *Toll-like receptors* (TLRs) diasumsikan berkontribusi pada resistensi pejamu terhadap mikroba patogen dan mendorong evolusi mekanisme virulensi (Arpaia, 2011). Reseptor seperti Toll (TLRs) menargetkan serangkaian ligan mikroba, termasuk lipopolisakarida (TLR4), lipoprotein (TLR2), flagellin (TLR5), motif CpG yang tidak termetilasi dalam DNA (TLR9), RNA berlipat ganda (strand-stranded) RNA (TLR7 dan TLR8) (Kawai & Atira, 2005). Ekspresi TLR pada sel imun bawaan menghubungkan pengakuan mikroba dengan induksi mekanisme antimikroba, seperti produksi oksigen reaktif, nitrogen dan ekspresi peptida antimikroba (AMP). Selain itu, aktivasi TLR dapat mempromosikan imunitas adaptif melalui kontrol pematangan sel dendritik (DC) (Iwasaki & Medzhitov, 2004).



Gambar 5. Respon TLR2 dan TLR9 pada Infeksi *Salmonella typhimurium*

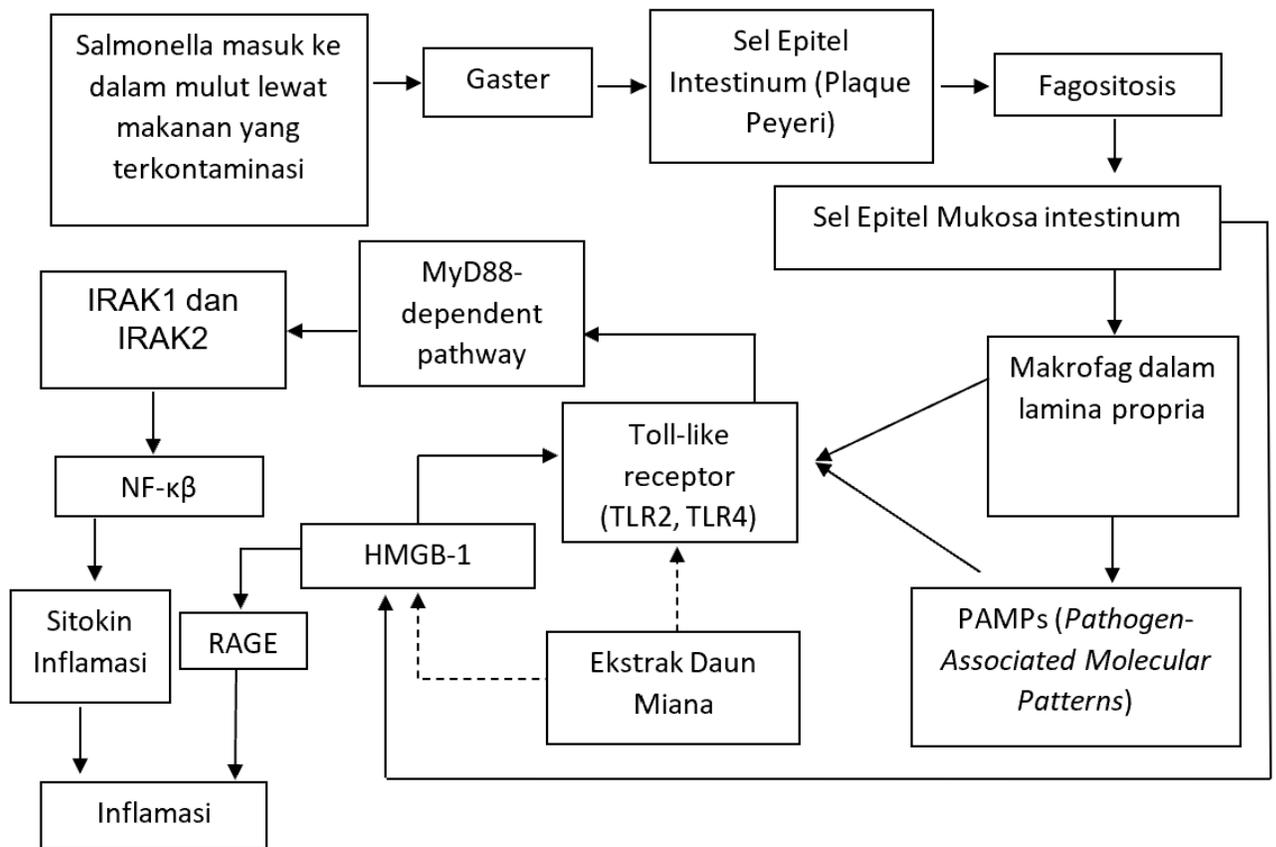
TLR2 dikenal sebagai sinyal pengaktif pada fagosit. Pada infeksi *Salmonella*, produksi sitokin inflamasi dan kemokin mengalami peningkatan yang lebih sedikit pada TLR2 dibanding dengan TLR9, namun jauh lebih tinggi pada level TGF-  $\beta$  yang memiliki peranan utama dalam meregulasi suatu proses inflamasi khususnya IL-10 (Zhan, 2015)

Respon imunitas yang terlibat adalah melalui jalur MyD88 bergantung pada reseptor TLR, termasuk TLR 2 dan yang lainnya kecuali TLR 3 dan TLR7 yang tidak secara langsung melalui jalur ini. Efek utamanya adalah aktivasi NF $\kappa$ B dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Pengikatan ligan dan perubahan terjadi pada TLR merekrut protein adaptor MyD88. Kemudian MyD88 merekrut IRAK4, IRAK1 dan IRAK2. IRAK kinase

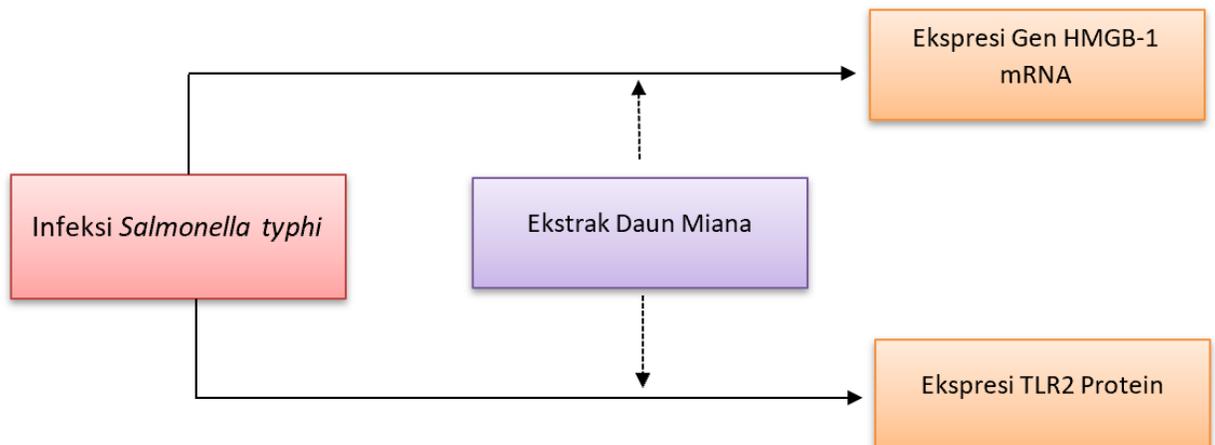
kemudian memfosforilasi dan mengaktifkan protein TRAF6 sehingga memungkinkan NFkB berdifusi ke dalam inti sel dan mengaktifkan transkripsi dan induksi akibat sitokin inflamasi.

Arpaia (2015) telah menilai hubungan antara resistensi inang dan virulensi patogen menggunakan tikus dengan alel fungsional gen Nramp-1 dan sedikit kombinasi TLR. Rendahnya TLR2 dan TLR4 sangat rentan terhadap bakteri patogen intraseluler *Salmonella typhimurium* dan dinilai konsisten dengan penurunan fungsi kekebalan tubuh bawaan (*Adaptive immunity*). Namun, tikus yang tidak memiliki TLR tambahan yang terlibat dalam pengenalan *S. typhimurium* kurang rentan terhadap infeksi. Dalam sel-sel yang kekurangan TLR ini, bakteri gagal untuk mengatur gen *Salmonella pathogenicity island 2* (SPI-2) dan tidak membentuk kompartemen replikasi. Studi ini menunjukkan bahwa pensinyalan TLR meningkatkan tingkat keasaman Salmonella yang mengandung fagosom, dan penghambatan keasaman ini mencegah induksi SPI-2.

## 2.5 Kerangka Teori



## 2.6 Kerangka Konsep



Keterangan:



: Variabel Independen



: Variabel Dependen



: Variabel Independen



: Mengekspresikan



: Pemberian

## 2.7 Hipotesis

- Ada pengaruh pemberian ekstrak daun miana terhadap ekspresi gen HMGB-1 mRNA pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*.
- Ada pengaruh pemberian ekstrak daun miana terhadap ekspresi TLR-2 Protein pada mencit BALB/c yang terinfeksi *Salmonella typhi*