

DISERTASI

**EFEK EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP
EKSPRESI GEN mRNA *Toll-Like Receptors 4* (TLR4) dan *Soluble IL-6*
PADA MENCIT YANG TELAH DIINDUKSI *Salmonella typhi***

**Effect of Extracts of Lime Peel (*Citrus aurantifolia*) on Gene mRNA
Expersion of Toll-Like Receptors 4 (TLR4) and Soluble Interleukin 6
(IL-6) in Mice that has been Induced
with *Salmonella typhi***



**VIVIEN NOVARINA A. KASIM
C013171010**

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

**EFEK EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP
EKSPRESI GEN mRNA *Toll-Like Receptors 4* (TLR4) dan *Soluble IL-6*
PADA MENCIT YANG TELAH DIINDUKSI *Salmonella typhi***

**Effect of Extracts of Lime Peel (*Citrus aurantifolia*) on Gene mRNA
Expression of Toll-Like Receptors 4 (TLR4) and Soluble Interleukin 6 (IL-
6) in Mice that has been Induced
with *Salmonella typhi***

Disertasi

Sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor

Disusun dan diajukan oleh

VIVIEN NOVARINA A. KASIM

Kepada

**PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2020**

DISERTASI

**EFEK EKSTRAK KULIT JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia*) TERHADAP
EKSPRESI mRNA Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) DAN SOLUBLE Interleukin
6 (IL-6) PADA MENCIT YANG TELAH DIINDUKSI
DENGAN *Salmonella typhi***

Disusun dan diajukan oleh

VIVIEN NOVARINA A. KASIM
C013171010

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 8 September 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,


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

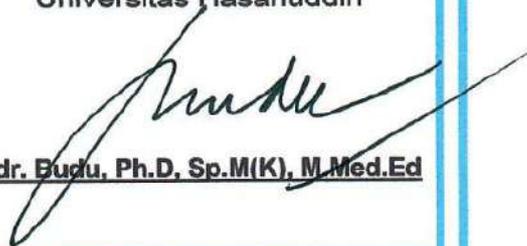

Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,


Prof. Dr. Veni Hadju, M.Sc, Ph.D
Ko-Promotor

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin


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


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

DAFTAR TIM PENGUJI

- Promotor** : Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
- Ko-Promotor** : Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok.
Prof. dr. Veni Hadju, M.Sc, Ph.D
- Anggota** : Prof. Dr. Yusminah Hala, MS
: Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
: Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK(K)
: Prof. Dr. Gemini Alam, M.Sc, Apt
: Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS
: dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Vivien Novarina A. Kasim

Nomor Pokok : C013171010

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, September 2020

Yang menyatakan,



Vivien Novarina A. Kasim

PRAKATA

Alhamdulillah Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga disertasi ini dapat disusun dan diselesaikan dengan baik. Sholawat dan salam kepada Nabi Muhammad SAW dan keluarga, serta para sahabat dan pengikutnya.

Disertasi dengan judul "**Efek Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia*) terhadap Ekspresi mRNA Gen Toll-Like Receptor 4 (TLR-4) dan Soluble IL-6 pada Mencit yang diinduksi *Salmonella typhi***" ini diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Doktor dalam Ilmu Kedokteran pada Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Pertama-tama penulis menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada orang tua tercinta ayahanda **Drs. Abubakar Kasim (rahimahullah)** dan Ibunda **Notji Dunggio, S.Pd** atas segenap kasih sayang dan selalu memberikan dorongan, semangat serta mencurahkan perhatian, bantuan dan doanya kepada penulis. Semoga Allah SWT memberikan rahmat, keselamatan dan semoga kami dapat menjadi anak yang sholeh bagi mereka.

Kepada suami tercinta **Abd. Rahim. Har, SE**, terima kasih yang tak terhingga atas kesabaran mendampingi penulis berbagi suka dan duka, senantiasa memberi semangat, dukungan moral dan materiil serta curahan doa selama penulis menempuh pendidikan dan kepada buah hati kami tersayang

Bilal Althaf Munawwar dan **Syifa Hanin**, yang senantiasa menjadi penyemangat dan penghibur di kala jenuh dan letih selama mengikuti pendidikan.

Selesainya hasil penelitian disertasi ini tidak lepas dari bantuan dari berbagai pihak, sehingga penulis ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang tulus kepada yang terhormat Bapak **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)** sebagai promotor, **Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok** dan **Prof. dr. Veni Hadju, M.Sc, Ph.D** sebagai Co-promotor yang telah meluangkan waktu untuk membimbing penulis mulai dari pengembangan konsep permasalahan, pelaksanaan penelitian sampai penyelesaian disertasi ini.

Melalui kesempatan ini pula penulis menyampaikan ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada:

1. **Prof. Dr. Dwi Aries Tina Pulubuhu, MA** selaku Rektor Unhas yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan di Universitas Hasanuddin.
2. **Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed** selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan kesempatan kepada penulis melanjutkan studi pada program studi S3 Ilmu Kedokteran di Universitas Hasanuddin.
3. **Dr. Agussalim Bukhari, M.Med., Ph.D., Sp.GK(K)** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan saran dan masukan demi kesempurnaan disertasi ini.

4. Dewan Penguji, **Prof. dr. Budu, Ph.D., Sp.M(K), M.Med.Ed, Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK(K), Prof. Dr. Gemini Alam, M.Sc, Apt, Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS., dan dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S** atas kesediaan dan meluangkan waktu untuk menguji sekaligus memberikan bimbingan, saran dan masukan dalam penyelesaian disertasi ini.
5. **Prof. Dr. Yusminah Hala, MS** selaku Penguji Eksternal, atas koreksi dan masukan dalam penyusunan disertasi ini dan kesediaan beliau meluangkan waktu untuk menghadiri rangkaian ujian yang dijalani oleh penulis.
6. Seluruh staf dosen pengajar Prodi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan bekal ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis.
7. Seluruh staf administrasi Prodi S3 Ilmu Kedokteran dan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar yang telah banyak membantu dari awal studi hingga tahap akhir penyelesaian studi.
8. Rektor Universitas Negeri Gorontalo bapak **Dr. Eduart Wolok, ST, MT.** serta segenap Pimpinan dan seluruh teman-teman dosen Fakultas Kedokteran Universitas Negeri Gorontalo yang senantiasa memberikan motivasi, dukungan dan doa.
9. Sahabatku **Dr. dr. Ami Febriza Achmad, M.Kes** serta teman-teman seperjuangan prodi S3 Ilmu Kedokteran khususnya Angkatan 2017, terima

kasih atas bantuan, dukungan dan motivasi serta kebersamaan kita selama menempuh studi.

10. Terkhusus pula kepada **Kakak, Adik, Kakak Ipar dan Adik Ipar**, tak lupa penulis menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya atas bantuan, motivasi dan doa sehingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini dengan baik.

11. Lembaga Pengelola Dana Pendidikan Beasiswa Untuk Dosen Indonesia Dalam Negeri (LPDP BUDI-DN) yang telah memberikan dukungan berupa bantuan dana pendidikan dan penelitian selama menempuh studi doktoral.

Ucapan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya juga penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang namanya tidak tercantum dalam prakata ini namun telah banyak membantu dan memberikan dukungan kepada penulis dalam menyelesaikan disertasi ini.

Semoga Allah SWT memberikan balasan yang jauh lebih baik dan melipatgandakan amal kebaikan seluruh pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi ini dan semoga disertasi ini dapat mendatangkan manfaat dan kemaslahatan bagi banyak orang, Amin Ya Rabbal Alamin.

Kami selalu terbuka terhadap bimbingan, saran dan kritik membangun guna pengembangan dan penyempurnaan hasil penelitian disertasi ini. Akhirnya hanya kepada Allah SWT kami bermunajat dan berdoa semoga segala usaha dan kerja keras penulis dalam rangka penyusunan dan penyelesaian hasil penelitian

disertasi ini senantiasa mendapat ridho-Nya sehingga berguna bagi pengembangan khasanah keilmuan.

Makassar, September 2020

Penulis

Vivien Novarina A. Kasim

ABSTRAK

VIVIEN NOVARINA A. KASIM. *Efek Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia) terhadap Ekspresi Gen mRNA Toll Like Receptor 4 (TLR-4) dan Kadar Interleukin 6 (IL-6) pada Mencit yang telah Diinduksi Salmonella Typhi* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Rosdiana Natzir, Veni Hadju).

Penelitian ini bertujuan mengetahui efektivitas ekstrak kulit jeruk nipis (EKJN) terhadap ekspresi gen mRNA Toll Like Receptor 4 (TLR-4) dan kadar interleukin 6 (IL-6) pada mencit yang diinduksi *Salmonella typhi*.

Jenis penelitian adalah eksperimen laboratorium dengan desain pre test post test dengan kelompok kontrol. Sampel terdiri dari 20 mencit Balb/c yang dibagi dalam 4 kelompok. Dua kelompok intervensi EKJN dosis 510 mg/kgBB dan dosis 750 mg/kgBB. kelompok kontrol positif (*levofloxacin*) dan negatif (*aquades*). Analisis statistik dengan menggunakan uji paired T, uji repeated Anova, dan uji korelasi pearson.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa intervensi EKJN selama 5 hari mampu menurunkan ekspresi mRNA gen TLR-4 dengan dosis 510 mg/kgBB ($p=0,06$) dan dosis 750 mg/kgBB ($p=0,04$), dapat menurunkan kadar IL-6 kecuali pada kontrol negatif ($p=0,15$) serta dapat menekan jumlah koloni bakteri *Salmonella typhi* pada semua kelompok. Kecepatan penurunan kadar IL-6 paling tinggi terdapat pada kelompok yang diberikan EKJN 750 mg/kgBB ($velocity=-5,64\%$). Kadar IL-6 berkorelasi positif dengan jumlah koloni bakteri ($r=0,362$, $p=0,025$) dan ekspresi mRNA gen TLR-4 berkorelasi positif dengan jumlah koloni bakteri ($r=0,408$, $p=0,013$). Kesimpulan penelitian ini bahwa EKJN efektif berpengaruh pada ekspresi mRNA gen TLR-4, kadar IL-6 dan menurunkan jumlah koloni bakteri *Salmonella typhi*.

Kata kunci: TLR-4, IL-6, *Salmonella Typhi*, Citrus Aurantifolia, Kulit Jeruk Nipis



ABSTRACT

VIVIEN NOVARINA A. KASIM. Effects of Lime Peel Extract (*Citrus aurantifolia*) on Toll Like Receptor 4 (TLR-4) mRNA Gene Expression and Interleukin 6 (IL-6) Levels in Mice that Have Been Induced by *Salmonella Typhi* (supervised by **Mochammad Hatta, Rosdiana Natzir**, and Veni Hadju).

This study aims to determine the effectiveness of lime peel extract (EKJN) on Toll Like Receptor 4 (TLR- 4) mRNA gene expression and Interleukin 6 (IL-6) levels in mice induced by *Salmonella typhi*.

This research is a type of experimental laboratory research design with a pre-test and post-test with control group design. The sample consisted of 20 Balb/c mice divided into 4 groups. There were 2 intervention groups, EKJN 510 mg/kgBB and 750 mg/kgBB, control positive (levofloxacin) and control negative (aquades). Statistical analysis using paired T test, repeated Anova test, and Pearson correlation test.

The results show EKJN intervention for 5 days could reduce TLR 4 gene mRNA expression with doses of 510 mg/kgBW ($p = 0.06$) and 750 mg/kgBW ($p = 0.04$), reduced IL-6 levels except negative control ($p = 0.15$) and suppressed the number of *Salmonella typhus* bacterial colonies in all groups. The highest rate of decrease in IL-6 levels was found in the group EKJN 750 mg / kgBW (velocity = -5.64 %). The level of IL-6 was positively correlated with the number of bacterial colonies ($r = 0.362$, $p = 0.025$) and the expression of the TLR-4 mRNA gene was positively correlated with the number of bacterial colonies ($r = 0.408$, $p = 0.013$). The conclusion is that EKIN effectively influences the expression of TLR-4 gene mRNA, IL-6 levels and decreases the number of *Salmonella typhus* bacterial colonies.

Keywords : TLR-4, IL-6, *Salmonella typhi*, *Citrus aurantifolia*, Lime peel extract.



DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
DAFTAR TIM PENGUJI	iv
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA	vi
ABSTRAK	xi
ABSTRACT	xii
DAFTAR ISI	xiii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xix
BAB I	1
PENDAHULUAN	1
1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	6
1.3. Tujuan Penelitian.....	7
1.3.1. Tujuan Umum	7
1.3.2. Tujuan Khusus.....	7
1.4. Manfaat Penelitian.....	7
BAB II	9
TINJAUAN PUSTAKA	9
2.1. Tinjauan Tentang Demam Tyfoid	9
2.1.1. Defenisi Demam Tyfoid.....	9
2.1.2. Epidemiologi Demam Tyfoid	10
2.1.3. Etiologi Demam Tyfoid.....	11
2.1.4. Patogenesis Demam Tyfoid	11
2.1.5. Gejala Klinis Demam Tyfoid.....	16
2.1.6. Komplikasi Demam Tyfoid	18

2.1.7. Pemeriksaan Penunjang Diagnosis Demam Tyfoid.....	19
2.2. Tinjauan Tentang <i>Salmonella typhi</i>	25
2.2.1. Klasifikasi <i>Salmonella typhi</i>	25
2.2.2. Morfologi <i>Salmonella Typhi</i>	27
2.2.3. Anatomi Bakteri.....	27
2.2.4. Sifat Biokimia	34
2.2.5. Respon Imun Tubuh Terhadap <i>Salmonella Typhi</i>	35
2.3. Tinjauan Tentang Imunitas	36
2.3.1. Imunitas	36
2.3.2. Imunitas Alami dan Adaptif	37
2.3.3. Imunitas Humoral dan Imunitas Seluler	40
2.3.4. Pengenalan Mikroba oleh Imunitas Alami.....	42
2.3.5. Stimulasi Respon Imunitas Alami Melawan Mikroba.....	48
2.4. Toll-Like Receptor 4	50
2.4.1. Sejarah dan Definisi TLRs	50
2.4.2. Klasifikasi TLR	53
2.4.3. Penandaan Toll-like Receptors.....	56
2.4.4. Pengenalan TLR Terhadap Bakteri.....	58
2.5. Interleukin 6 (IL-6)	67
2.6. Tinjauan Tentang Jeruk Nipis (<i>Citrus Aurantifolia</i>)	71
2.6.1. Klasifikasi tumbuhan jeruk nipis	71
2.6.2. Morfologi tumbuhan jeruk nipis	71
2.6.3. Deskripsi simplisia kulit buah jeruk nipis	72
2.6.4. Manfaat tumbuhan jeruk nipis	73
2.6.5. Kandungan kimia <i>Citrus aurantifolia</i>	75
2.7. Hubungan Infeksi <i>Salmonella typhi</i> , mRNA TLR-4 d dan Soluble IL-6 dengan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis,	92
2.8. Kerangka Teori.....	96
2.9. Kerangka Konsep.....	97

2.10. Definisi Operasional variable dan Kriteria Objektif.....	97
2.11. Hipotesis.....	98
BAB III	100
METODOLOGI PENELITIAN	100
3.1. Rancangan Penelitian	100
3.2. Lokasi dan Waktu Penelitian	102
3.2.1. Lokasi Penelitian.....	102
3.2.2. Waktu Penelitian	102
3.3. Subjek Penelitian.....	102
3.4. Bahan Dan Protokol Penelitian.....	104
3.4.1. Bahan dan Peralatan	104
3.4.2. Protokol Penelitian	105
3.5. Perlakuan pada Subyek Penelitian.....	117
3.5.1. Ekstraksi RNA (Boom Method)	118
3.5.2. Protokol Realtime PCR	119
3.5.3. ELISA soluble kadar Interleukin 6	122
3.6. Etika Penelitian.....	123
3.7. Jenis Dan Cara Pengumpulan Data	126
3.8. Analisis Data	126
3.9. Alur Penelitian	128
BAB IV	132
HASIL DAN PEMBAHASAN.....	132
4.1. Hasil Penelitian.....	132
4.1.1. Efek pemberian ekstrak kulit jeruk nipis terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit Balb/c yang diinduksi <i>S. typhi</i>	135
4.1.2. Efek pemberian ekstrak kulit jeruk nipis terhadap kadar Interleukin 6 (IL-6) pada mencit Balb/c yang diinduksi <i>S. typhi</i>	139

4.1.3. Efek pemberian ekstrak kulit jeruk nipis terhadap ekspresi gen mRNA <i>Toll Like Receptor 4</i> (TLR-4) pada mencit Balb/c yang diinduksi <i>S. typhi</i>	145
4.1.4. Hubungan kadar interleukin 6, ekspresi gen mRNA toll like receptor 4 dan jumlah kolonisasi bakteri pada mencit Balb/c yang telah diinduksi <i>Salmonella typhi</i>	151
4.2. Pembahasan Hasil Penelitian.....	152
4.2.1. Efek pemberian ekstrak kulit jeruk nipis terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit Balb/c yang diinduksi <i>S. typhi</i>	155
4.2.2. Efek pemberian ekstrak kulit jeruk nipis terhadap kadar Interleukin 6 (IL-6) pada mencit Balb/c yang diinduksi <i>S. typhi</i>	160
4.2.3. Efek pemberian ekstrak kulit jeruk nipis terhadap ekspresi mRNA gen <i>Toll-Like Receptor 4</i> (TLR-4) pada mencit Balb/c yang diinduksi <i>S. typhi</i>	165
4.2.4. Hubungan kadar IL-6, ekspresi mRNA TLR-4 dan jumlah kolonisasi bakteri pada mencit Balb/c yang telah diinduksi <i>Salmonella typhi</i> .	171
BAB V	177
KESIMPULAN DAN SARAN	177
5.1. KESIMPULAN	177
5.2. SARAN.....	178
DAFTAR PUSTAKA	179

DAFTAR TABEL

Tabel 1.	Klasifikasi Salmonella menurut Kauffman-White ²³	35
Tabel 2.	Cell-associated PRRs pada imunitas innate	45
Tabel 3.	SRMs pada Imunitas Innate	47
Tabel 4.	Klasifikasi TLR, ligand an spesies yang dikenali ⁴⁰	53
Tabel 5.	Rancangan Penelitian	101
Tabel 6.	Jenis dan Cara Pengumpulan Data	126
Tabel 7.	Hasil skrining fitokimia analisa kualitatif ekstrak kulit jeruk nipis (EKJN)	133
Tabel 8.	Efek ekstrak kulit jeruk nipis terhadap jumlah koloni bakteri berdasarkan waktu pengamatan sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan setelah intervensi (H30).	135
Tabel 9.	Perbedaan rata-rata jumlah koloni bakteri antara kelompok perlakuan EKJN 510, EKJN 750, kontrol positif dan kontrol negatif pada waktu pengamatan sesudah intervensi (H10)	138
Tabel 10.	Efek ekstrak kulit jeruk nipis terhadap kadar Interleukin 6 berdasarkan waktu pengamatan sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan setelah intervensi (H30).	139
Tabel 11.	Perubahan rerata kadar interleukin 6 pada masing-masing kelompok pada baseline (H0), sebelum intervensi (H5) setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan setelah intervensi (H30)	141
Tabel 12.	Perbandingan persentase kecepatan penurunan rerata kadar interleukin 6 pada kelompok pengamatan sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan (H30)	142
Tabel 13.	Perbedaan kadar IL-6 antara kelompok perlakuan EKJN 510, EKJN 750, kontrol positif dan kontrol negatif berdasarkan waktu pengamatan setelah intervensi pada H10 dan H30	144
Tabel 14.	Efek ekstrak kulit jeruk nipis terhadap ekspresi gen mRNA TLR-4 berdasarkan waktu pengamatan sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan setelah intervensi (H30).	145
Tabel 15.	Perubahan rerata ekspresi gen mRNA TLR-4 pada masing-masing kelompok pada baseline (H0), sebelum intervensi (H5) setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan setelah intervensi (H30)	147

Tabel 16. Perbedaan rata-rata ekspresi mRNA gen TLR-4 antara kelompok perlakuan EKJN 510, EKJN 750, kontrol positif dan kontrol negatif pada waktu pengamatan sesudah intervensi (H10)	149
Tabel 17. Perbedaan rata-rata ekspresi mRNA gen TLR-4 antara kelompok perlakuan EKJN 510, EKJN 750, kontrol positif dan kontrol negatif pada waktu pengamatan pasca pemeliharaan (H30)	150
Tabel 18. Korelasi ekspresi mRNA gen TLR-4, kadar IL-6 dan kolonisasi bakteri	151

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Patogenesis masuknya kuman Salmonella Typhi ¹⁸	12
Gambar 2.	Respon Imun terhadap bakteri ¹⁸	15
Gambar 3.	Mikroskopis kuman Salmonella (CDC: Melissa Brower)	27
Gambar 4.	Imunitas alami dan adaptif ²⁶	37
Gambar 5.	Imunitas humoral dan seluler ²⁶	41
Gambar 6.	Lokasi seluler dari PRRs pada imunitas innate ²⁷	46
Gambar 7.	Struktur Molekul TLR ³⁰	51
Gambar 8.	Struktur, lokasi, dan kekhususan TLRs mamalia ²⁷	54
Gambar 9.	Signal-Transduction Pathways melalui NFκB ⁴³	58
Gambar 10.	Peran TLR pada Imunitas innate ⁴⁴	59
Gambar 11.	Fungsi sinyal Toll-like receptor ²⁶	60
Gambar 12.	Jalur persinyalan dan fungsi TLRs ²⁷	62
Gambar 13.	Gambaran mekanisme yang terlibat dalam pengaturan crosstalk mikrobiota-host oleh flavonoid ¹¹	64
Gambar 14.	Beberapa penelitian in vitro Flavonoid pada ekspresi gen TLR dan protein ¹¹	65
Gambar 15.	Beberapa penelitian in vivo Flavonoid pada ekspresi gen TLR dan protein ¹¹	66
Gambar 16.	Fungsi dari makrofag ²⁷	70
Gambar 17.	Jeruk nipis (Citrus aurantifolia)	72
Gambar 18.	Simplisia kulit buah jeruk nipis (Kemenkes RI, 2011)	73
Gambar 19.	Struktur kimia dan senyawa perwakilan dari famili utama flavonoid ¹¹	78
Gambar 20.	Efek perlindungan dari Total Flavonoid (TF) terhadap kerusakan hepar. TF mengatur stress oksidatif dan reaksi inflamasi melalui penghambatan sinyal TLR4 / MyD88 dan aktivasi pensinyalan Sirt1 / Nrf2 ⁵⁸	82
Gambar 21.	Analisis kimia dari komponen utama * minyak esensial kulit lemon ⁵⁹	83
Gambar 22.	Kerangka Teori	96
Gambar 23.	Kerangka Konsep	97

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Infeksi Salmonella adalah penyakit patogen enterik primer yang dapat menyerang manusia dan hewan. Oleh karena itu, hal ini menjadi masalah kesehatan masyarakat. Sampai saat ini penyebab paling umum keracunan makanan oleh spesies Salmonella disebabkan oleh *Salmonella typhimurium* (*S. typhimurium*). Infeksi *S. typhimurium* bermanifestasi dalam waktu 48 jam setelah mengonsumsi makanan yang terkontaminasi, dengan gejala mual, muntah, dan, diare ¹. Kejadian infeksi yang berasal dari makanan yang terpapar salmonella enteriditis dan strain multi-obat yang resisten (MDR) terhadap salmonella enterica serovar typhi (*S. typhimurium*) telah meningkat secara substansial ².

Penyakit infeksi akut usus halus yang disebabkan oleh *Salmonella typhi* disebut sebagai demam typhoid mencapai kasus sebanyak 22 juta per tahun di dunia dan menyebabkan 216.000-600.000 kematian. Komplikasi serius seperti perforasi ileum, bakteremia, dan infeksi endovaskular ³ dapat terjadi hingga 10%, khususnya pada individu yang menderita tifoid lebih dari 2 minggu dan tidak mendapat pengobatan yang adekuat. *Case Fatality Rate* (CFR) diperkirakan 1–4% dan pada kasus yang tidak mendapatkan pengobatan, CFR dapat meningkat hingga 20% ⁴

Di Indonesia, tifoid harus mendapat perhatian serius dari berbagai pihak, karena penyakit ini bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Permasalahannya semakin kompleks dengan meningkatnya kasus-kasus karier (*carrier*) atau *relaps* dan resistensi terhadap obat-obat yang dipakai, sehingga menyulitkan upaya pengobatan dan pencegahan. Pada tahun 2008, angka kesakitan tifoid di Indonesia dilaporkan sebesar 81,7 per 100.000 penduduk ⁴. Demam Tifoid dapat menurunkan produktivitas kerja, meningkatkan angka ketidakhadiran anak sekolah, karena masa penyembuhan dan pemulihannya yang cukup lama, dan dari aspek ekonomi, biaya yang dikeluarkan tidak sedikit.

Melihat angka kejadian terserangnya demam tifoid, perlunya pengobatan yang adekuat untuk demam tifoid yang selain untuk penyembuhan total juga untuk meminimalisir komplikasi yang timbul pada penderita demam tifoid. Pengobatan demam tifoid dilakukan dengan cara pengobatan kausatif. Salah satunya adalah kloramfenikol yang saat ini menjadi pengobatan demam tifoid yang paling sering diresepkan oleh dokter karena ke efektifitasannya yang masih tinggi dan harganya yang relative ⁵. Resistensi kuman *Salmonella typhi* terhadap kloramfenikol sudah mulai tinggi.

Resistensi bakteri khususnya *S. typhimurium* membawa kita pada penanganan baru berupa terapi *adjuvant* yakni tanaman tradisional yang dapat dimanfaatkan sebagai antimikroba. Salah satunya adalah tanaman jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) ⁵. Kulit jeruk nipis mengandung bahan aktif yang diduga

dapat memberikan efek antibakteri. Bahan tersebut antara lain minyak atsiri (essential oil) yang dapat berinteraksi dan mengubah permeabilitas membrane sel mikroorganisme sehingga menyebabkan kematian mikroorganisme tersebut⁶. Berdasarkan penelitian sebelumnya, jeruk nipis juga mengandung Flavonoid. Konsentrasi Flavonoid yang lebih tinggi terdapat pada bagian kulit jeruk nipis dibandingkan dengan bagian lainnya seperti biji, buah, air perasannya⁷. Adanya kandungan Flavonoid membuat kulit jeruk nipis memiliki daya antibakteri dan antioksidan. Beberapa studi membuktikan bahwa kulit jeruk nipis memiliki daya antibakteri optimal terhadap bakteri⁸.

Studi secara in vitro (Pratiwi, Suswati, Abdullah, 2013) didapatkan hasil bahwa ekstrak kulit jeruk nipis (*C. aurantifolia*) memiliki daya antimikroba terhadap bakteri *Salmonella typhi* ($p=0.000$) dan r^2 sebesar 0,34. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit jeruk nipis, semakin menekan pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, nilai KHM (Kadar Hambat Minimum) ekstrak kulit jeruk nipis berada pada konsentrasi 12,5% dan nilai KBM (Kadar Bunuh Minimum) ekstrak kulit jeruk nipis pada konsentrasi 6,25%⁵. Penelitian lainnya ditemukan bahwa Flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri melawan *E.coli* melalui penghambatan DNA gyrase, menghambat sintesis asam nukleat dan fungsi membran sitoplasma⁹.

Terdapat bukti yang menunjukkan bahwa beberapa jenis flavonoid, termasuk flavanon, flavonol, flavanols, dan isoflavon, memodifikasi komposisi mikrobiota. Study yang dilakukan oleh Etxeberria et al.¹⁰ yang secara ekstensif

mengkompilasi penelitian terbaru mengenai dampak senyawa fenolik, sebagai bahan kimia murni atau dalam konteks makanan, pada komunitas mikroba. Baik dilakukan dalam penelitian *in vitro* maupun *in vivo* (dalam intervensi hewan dan manusia) ¹¹.

Di antara komponen yang ada dalam *Citrus aurantifolia*, flavonoid telah disarankan sebagai antioksidan yang dapat memodulasi jalur pensinyalan yang dimediasi oleh TLRs (Toll-Like Receptors). Interaksi antara sel inang dan mikroba dikenal sebagai *crosstalk* dimana ini terjadi ketika molekul mikro organisme tertentu dikenali oleh TLRs di sel tubuh, terutama di sel epitel usus dan di sel kekebalan tubuh. TLR merupakan garis pertahanan pertama melawan patogen, memainkan peran penting dalam imunitas *innate* dan *adaptive*. Flavonoid telah mampu memodifikasi komposisi mikrobiota, untuk memodulasi ekspresi gen dan protein TLR, dan mengatur molekul yang terlibat dalam jalur TLR ¹¹

Kemampuan patogen memasuki tubuh manusia telah ada penanda dalam bentuk molekul yang akan dikenal oleh pertahanan manusia (sistem imunitas *innate*). Molekul penanda khusus bakteri gram negative adalah lipopolisakarida (LPS) ¹² dan TLR4 berinteraksi dengan bakteri (LPS). Pada Jalur TLR dapat dimodulasi oleh flavonoid pada tingkat yang berbeda. Ekspresi gen TLR dan ekspresi sel membrane mikroba, dapat dipengaruhi oleh flavonoid. Pada kondisi homeostatik, *Intestinal Epithelial Cells* (IEC) memiliki ekspresi gen TLR2 dan TLR4 yang rendah dalam hal ini pada konteks sehat,

aktivasi TLR rendah; Namun, dalam jika terjadi peradangan, ekspresi TLR pada IEC meningkat dan kemudian memicu sinyal TLR¹¹.

Pengikatan antara LPS dan TLR-4 akan memunculkan sinyal aktivasi yang akan mengaktifkan ketiga sel imunitas innate ini. Ketiga jenis sel tersebut kemudian melepas sejumlah sitokin proinflamasi seperti TNF α , IL-1 dan IL-6. Penelitian yang dilakukan oleh Galdiero et. al, dimana tujuan dari penelitian ini adalah untuk memverifikasi apakah *Salmonella typhimurium* porins dapat mempengaruhi ekspresi gen interleukin-1 (IL-1) dan interleukin-6 (IL-6). Monosit manusia diobati dengan porins, dan total RNA dianalisis dengan blotting untuk mengevaluasi ekspresi IL-1 alfa, IL-1 beta dan IL-6 dalam kultur sel yang diobati maupun yang tidak diobati. Porins menginduksi peningkatan signifikan pada IL-1 dan IL-6 transkrip. Peningkatan ini terkait dengan dosis porins, dan itu memuncak 5 jam setelah perawatan. Hasil yang sama diperoleh ketika polimiksin B ditambahkan ke preparasi porin untuk menghilangkan jejak lipopolisakarida (LPS) yang terkait dengan porins. Peningkatan porin-mediated dalam transkrip interleukin tidak memerlukan sintesis protein de novo, dan itu karena peningkatan paruh waktu IL-1 dan IL-6 mRNA, lebih pada peningkatan laju transkripsi gen. Data ini menunjukkan bahwa porins dapat mempengaruhi respon inflamasi dan imunologi dengan meningkatkan ekspresi gen-gen sitokin

13

Mengingat tingginya angka kesakitan tifoid serta meningkatnya kasus-kasus karier atau *relaps* dan resistensi kuman *salmonella typhi*, maka upaya

mengkombinasikan antara agen antimikroba dan obat herbal telah menjadi topik tren terkini. Namun penelitian tidak cukup untuk membuktikan bahwa kombinasi ini bermanfaat untuk mengobati demam tifoid. Masih banyak penelitian diperlukan untuk menemukan kemungkinan efek kombinasi ini. Penelitian ini didahului dengan studi eksplorasi untuk memastikan efek antimikroba dari Ekstrak kulit jeruk nipis terhadap *S. Typhimurium*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka diajukan beberapa rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah ekstrak kulit jeruk nipis berpengaruh pada jumlah kolonisasi bakteri pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*?
2. Apakah ekstrak kulit jeruk nipis berpengaruh pada kadar soluble Interleukin 6 (IL-6) pada mencit yang telah diinduksi *Salmonella typhi*?
3. Apakah ekstrak kulit jeruk nipis berpengaruh pada ekspresi mRNA gen TLR4 (*Toll-like Receptor 4*) pada mencit yang telah diinduksi *Salmonella typhi*?
4. Bagaimana hubungan antara jumlah kolonisasi bakteri dengan kadar IL-6 dan hubungan antara jumlah kolonisasi bakteri dengan ekspresi mRNA gen TLR-4 pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Untuk mengetahui efektivitas ekstrak kulit jeruk nipis terhadap ekspresi mRNA gen TLR-4 dan kadar IL-6 pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*.

1.3.2. Tujuan Khusus

- a. Mengetahui efek ekstrak kulit jeruk nipis terhadap jumlah kolonisasi bakteri pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*
- b. Mengetahui efek ekstrak kulit jeruk nipis terhadap kadar soluble IL-6 pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*.
- c. Mengetahui efek ekstrak kulit jeruk nipis terhadap ekspresi mRNA gen TLR-4 pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*.
- d. Mengetahui hubungan ekstrak kulit jeruk nipis dengan kadar soluble IL-6 dan hubungan ekstrak kulit jeruk nipis dengan mRNA gen TLR-4 pada mencit yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*.

1.4. Manfaat Penelitian

Pada dasarnya suatu penelitian tidak dapat memecahkan semua masalah yang ada, akan tetapi selalu diupayakan untuk mempersempit kesenjangan antara kenyataan. Penelitian ini tidak tertutup dari keterbatasan,

tetapi masih diharapkan dapat memberikan manfaat baik dalam bidang ilmu maupun praktis.

1. Aspek Pengembangan Ilmu

- a. Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumber informasi ilmiah mengenai ekstrak kulit jeruk sebagai antinflamasi dan antimikroba melalui kadar soluble IL-6 dan ekspresi mRNA TLR-4 terhadap infeksi *Salmonella typhi*
- b. Penelitian ini sebagai titik tolak bagi penelitian selanjutnya dan dapat dijadikan sebagai data dasar untuk penelitian lanjutan dari ekstrak kulit jeruk nipis sebagai *nutraceutical*.

2. Manfaat Aplikasi

Manfaat penelitian ini dalam penerapannya di masyarakat adalah mendukung pengalaman/penggunaan empiris ekstrak kulit jeruk nipis dalam pengobatan dan mendukung program pemerintah dalam penanggulangan penyakit demam typhoid ataupun penyakit infeksi lainnya.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Tinjauan Tentang Demam Tyfoid

2.1.1. Defenisi Demam Tyfoid

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Penyakit ini masih sering dijumpai di negara berkembang yang terletak di subtropis dan daerah tropis seperti Indonesia ¹⁴.

Penyakit demam tifoid (typhoid fever) yang biasa disebut tifus merupakan penyakit menyerang bagian saluran pencernaan. Selama terjadi infeksi, kuman tersebut bermultiplikasi dalam sel fagositik mononuklear dan secara berkelanjutan dilepaskan ke aliran darah ¹⁵. Demam tifoid termasuk penyakit menular yang tercantum dalam Undang undang nomor 6 Tahun 1962 tentang wabah. Kelompok penyakit menular ini merupakan penyakit yang mudah menular dan dapat menyerang banyak orang sehingga dapat menimbulkan wabah ¹⁴. Demam tifoid dikenal juga dengan sebutan Typhus abdominalis, Typhoid fever, atau enteric fever. Istilah tifoid ini berasal dari bahasa Yunani yaitu typhos yang berarti kabut, karena umumnya penderita sering disertai gangguan kesadaran dari yang ringan sampai yang berat ¹⁴.

2.1.2. Epidemiologi Demam Tyfoid

Demam tifoid merupakan penyakit infeksi yang dijumpai di seluruh dunia, secara luas di daerah tropis dan subtropis terutama di daerah dengan kualitas sumber air yang tidak memadai dengan standar higienis dan sanitasi yang rendah yang mana di Indonesia dijumpai dalam keadaan endemis

Dari laporan *World Health Organization* (WHO) pada tahun 2003 terdapat 17 juta kasus demam tifoid per tahun di dunia dengan jumlah kematian mencapai 600.000 kematian dengan *Case Fatality Rate* (CFR = 3,5%). Insidens rate penyakit demam tifoid di daerah endemis berkisar antara 45 per 100.000 penduduk per tahun sampai 1.000 per 100.000 penduduk per tahun. Tahun 2003 insidens rate demam tifoid di Bangladesh 2.000 per 100.000 penduduk per tahun. Insidens rate demam tifoid di negara Eropa 3 per 100.000 penduduk, di Afrika yaitu 50 per 100.000 penduduk, dan di Asia 274 per 100.000 penduduk . Indisens rate di Indonesia masih tinggi yaitu 358 per 100.000 penduduk pedesaan dan 810 per 100.000 penduduk perkotaan per tahun dengan rata-rata kasus per tahun 600.000 – 1.500.000 penderita. Angka kematian demam tifoid di Indonesia masih tinggi dengan CFR sebesar 10%. Tingginya insidens rate penyakit demam tifoid di negara berkembang sangat erat kaitannya dengan status ekonomi serta keadaan sanitasi lingkungan di negara yang bersangkutan (Nainggolan R., 2009).

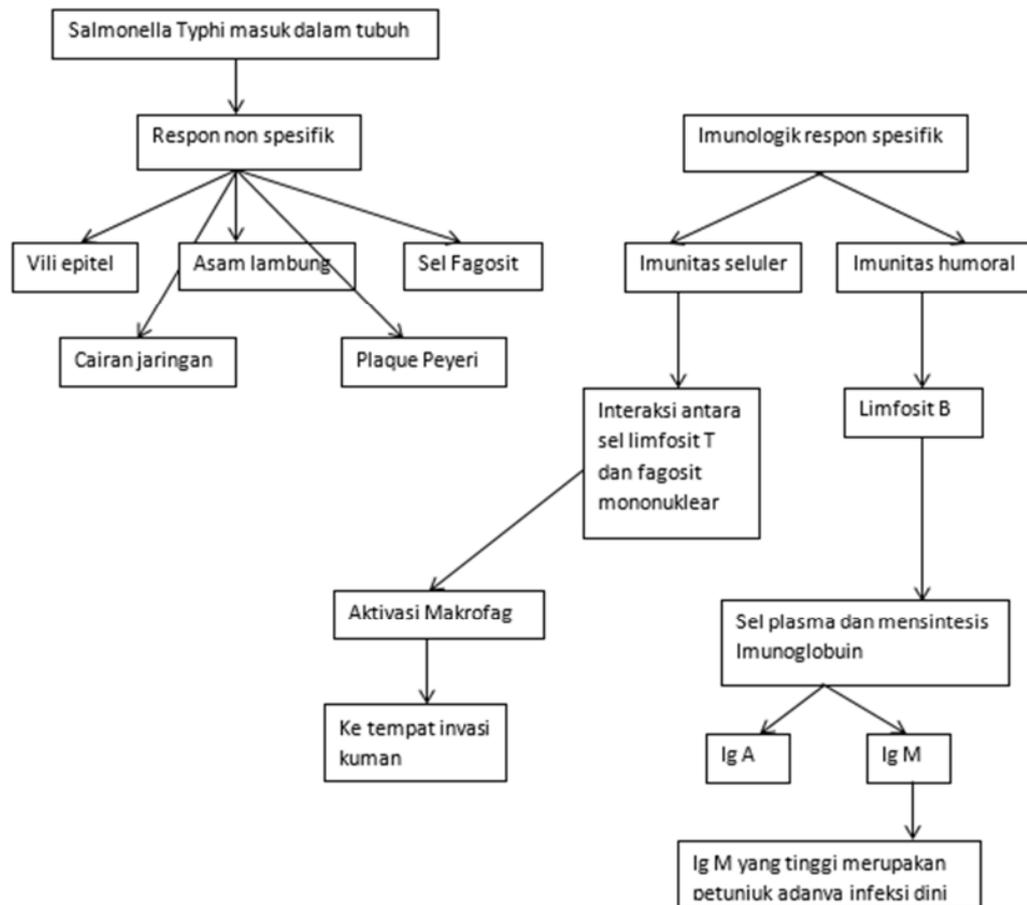
2.1.3. Etiologi Demam Tyfoid

Demam tifoid disebabkan oleh bakteri *Salmonella typhi* atau *Salmonella paratyphi* dari Genus *Salmonella*. Bakteri ini berbentuk batang, gram negatif, tidak membentuk spora, motil, berkapsul dan mempunyai flagela (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup sampai beberapa minggu di alam bebas seperti di dalam air, es, sampah dan debu. Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan (suhu 60°C) selama 15 – 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan khlorinasi¹⁶.

Salmonella typhi adalah bakteri batang gram negatif yang menyebabkan demam tifoid. *Salmonella typhi* merupakan salah satu penyebab infeksi tersering di daerah tropis, khususnya di tempat-tempat dengan higiene yang buruk.

2.1.4. Patogenesis Demam Tyfoid

Perjalanan penyakit *S. typhi* melalui beberapa proses, diawali dengan masuknya kuman melalui makanan dan minuman yang tercemar melalui jalur oral-fekal, yang kemudian tubuh akan melakukan mekanisme pertahanan melalui beberapa proses respon imun baik lokal maupun sistemik, spesifik dan non-spesifik serta humoral dan seluler¹⁷



Gambar 1. Patogenesis masuknya kuman Salmonella Typhi ¹⁸

S. typhi yang masuk ke saluran cerna tidak selalu akan menyebabkan infeksi, karena untuk menimbulkan infeksi *S. typhi* harus dapat mencapai usus halus. Keasaman lambung ($\text{pH} \leq 3,5$) menjadi salah satu faktor penting yang menghalangi *S. typhi* mencapai usus halus. Namun sebagian besar kuman *S. typhi* dapat bertahan karena memiliki gen ATR (*acid tolerance response*). *Achlorhydria* akibat penuaan, gastrektomi, pompa proton

inhibitor, pengobatan histamin antagonis reseptor H₂, atau pemberian antacid dapat menurunkan dosis infeksi yang mempermudah kuman untuk lolos menuju usus halus ¹⁸

Setelah masuk ke saluran cerna dan mencapai usus halus, *S. typhi* akan menemui dua mekanisme non spesifik yaitu motilitas dan flora normal usus berupa bakteri-bakteri anaerob. Motilitas usus bersifat fisik berupa kekuatan peristaltik usus untuk menghanyutkan kuman keluar. 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 berkembangbiak. Kuman akan berkembang biak dalam sel mononuklear sebelum menyebar ke dalam aliran darah ¹⁹

Di dalam sel fagosit mononuklear, kuman masuk menginfeksi *Peyer's patches*, yaitu jaringan limfoid yang terdapat di ileum terminal dan bermultiplikasi, kemudian 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. Bakteriemia primer berakhir setelah kuman masuk ke dalam organ *retikuloendotelial system (RES)* di hati limpa, kelenjar getah bening mesenterium dan kelenjar limfoid intestinal untuk berkembang biak. Di organ ini kuman menjalani masa inkubasi selama 10-14 hari, dalam

organ RES kuman berkembang pesat dan kembali masuk ke peredaran darah dan menimbulkan bakteriemia sekunder. Pada saat terjadi bakteriemia sekunder, dapat ditemukan gejala-gejala klinis dari demam tifoid 18,20

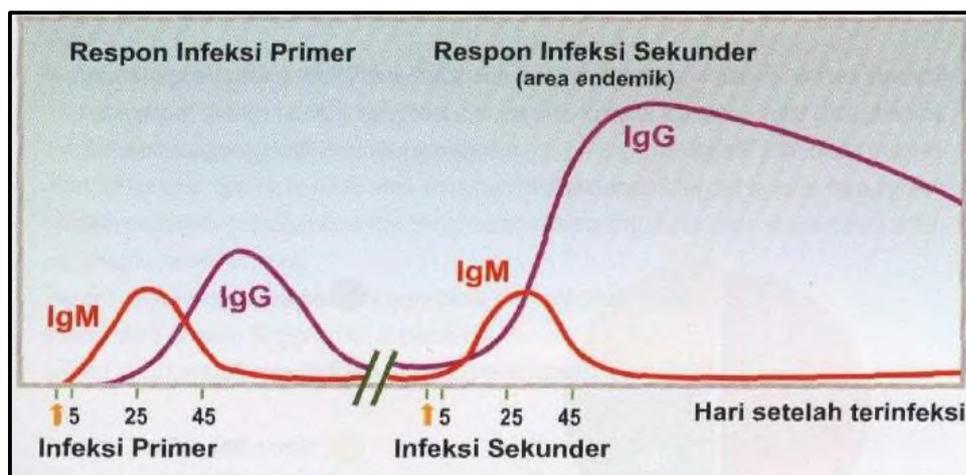
Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat poten untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Sebagai reseptor, Komponen CD14 akan berikatan dengan LPS. Ikatan tersebut kemudian berikatan pula dengan kelompok molekul *Toll-like receptors* (TLR). Aktivasi yang terjadi akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivasi reseptor sitokin : reseptor 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 IFN- α , IFN- β , IL-10); reseptor TNF (untuk TNF, CD4OL, Fas); reseptor superfamili immunoglobulin (IL-1, M-CSF). Laju infeksi demam tifoid sangat ditentukan oleh aktivitas aktivasi reseptor tersebut. Berbagai sitokin tersebut mengikuti sirkulasi sistemik, menginduksi produksi prostaglandin, memengaruhi stabilitas pusat termoregulasi berefek terhadap pengaturan suhu tubuh dan menyebabkan demam ¹⁸

Sitokin tersebut pula yang menimbulkan dampak pada pusat nafsu makan menyebabkan nafsu makan menurun, memengaruhi ambang nyeri, sehingga timbul nyeri pada kepala, sendi, otot-otot, dan nyeri pada daerah saluran cerna. Sitokin memengaruhi perubahan pada *plaque peyeri*,

inflamasi pada mukosa saluran cerna, menyebabkan motilitas saluran cerna terganggu, sehingga muncul keluhan mual, muntah, diare, nyeri abdomen, perdarahan, perdarahan, perforasi, sedangkan konstipasi terjadi pada tahap lanjut. Kondisi patologis akibat infeksi merangsang hiperaktivitas RES dan menimbulkan pembengkakan hati dan limpa ¹⁵

Pentingnya imunitas dalam penegakan diagnosis ditunjukkan dari kenaikan titer antibodi terhadap antigen *S. typhi*. Peran imunitas seluler yaitu dalam penyembuhan penyakit. Pada infeksi primer, respon humoral melalui sel limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan merangsang terbentuknya immunoglobulin (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)

21



Gambar 2. Respon Imun terhadap bakteri ¹⁸

2.1.5. Gejala Klinis Demam Tyfoid

Gejala klinis demam tifoid seringkali tidak khas dan sangat bervariasi yang sesuai dengan patogenesis demam tifoid. Spektrum klinis demam tifoid 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. Hal ini mempersulit penegakan diagnosis berdasarkan gambaran klinisnya saja¹⁶. Gejala klinis demam tifoid pada anak biasanya lebih ringan jika dibanding dengan penderita dewasa. Masa inkubasi rata-rata 10 – 20 hari. Setelah masa inkubasi maka ditemukan gejala prodromal, yaitu perasaan tidak enak badan, 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.

Demam merupakan keluhan dan gejala klinis terpenting yang timbul pada semua penderita demam tifoid. 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*. Gejala menggigil tidak biasa didapatkan pada demam tifoid tetapi pada penderita yang hidup di daerah endemis malaria, menggigil lebih mungkin disebabkan oleh malaria¹⁴. Demam tifoid 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. 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 :

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 gelisah¹⁶.

2.1.6. Komplikasi Demam Tyfoid

Menurut Sudoyo (2010), komplikasi demam tifoid dapat dibagi atas dua bagian, yaitu:

1. Komplikasi Intestinal

a. Perdarahan Usus

Sekitar 25% penderita demam tifoid dapat mengalami perdarahan minor yang tidak membutuhkan tranfusi 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 demam tifoid dengan perforasi mengeluh nyeri perut yang hebat terutama di daerah kuadran kanan bawah yang kemudian meyebar 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: osteomielitis, periostitis, spondilitis, dan artritis.
- g. Komplikasi neuropsikiatrik: delirium, meningismus, meningitis, polineuritis perifer, psikosis, dan sindrom katatonia.

2.1.7. Pemeriksaan Penunjang Diagnosis Demam Tyfoid

Penegakan diagnosis demam tifoid didasarkan pada manifestasi klinis yang diperkuat oleh pemeriksaan laboratorium penunjang. Penelitian yang menggunakan berbagai metode diagnostik untuk mendapatkan metode terbaik dalam usaha penatalaksanaan penderita demam tifoid secara menyeluruh masih terus dilakukan hingga saat ini.

Diagnosis definitif demam tifoid tergantung pada isolasi *S.typhi* dari darah, sumsum tulang atau lesi anatomi tertentu. Adanya gejala klinis dari karakteristik demam tifoid atau deteksi dari respon antibodi spesifik adalah

sugestif demam tifoid tetapi tidak definitif. Kultur darah adalah *gold standard* dari penyakit ini (WHO, 2003). Dalam pemeriksaan laboratorium diagnostik, dimana patogen lainnya dicurigai, kultur darah dapat digunakan. Lebih dari 80% pasien dengan demam tifoid terdapat *Salmonella typhi* di dalam darahnya. Kegagalan untuk mengisolasi organisme dapat disebabkan oleh beberapa faktor: (i) keterbatasan media laboratorium, (ii) penggunaan antibiotik, (iii) volume spesimen, atau (iv) waktu pengumpulan, pasien dengan riwayat demam selama 7 sampai 10 hari menjadi lebih mungkin dibandingkan dengan pasien yang memiliki kultur darah positif (WHO, 2003). Aspirasi sumsum tulang adalah standar emas untuk diagnosis demam tifoid dan sangat berguna bagi pasien yang sebelumnya telah diobati, yang memiliki sejarah panjang penyakit dan pemeriksaan kultur darah yang negatif. 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 (WHO, 2003). Pemeriksaan laboratorium untuk membantu menegakkan diagnosis demam tifoid dibagi dalam empat kelompok, yaitu:

A. Pemeriksaan Darah Tepi

Penderita demam tifoid 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.

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 demam tifoid atau bukan, akan tetapi adanya leukopenia dan limfositosis relatif menjadi dugaan kuat diagnosis demam tifo. Penelitian oleh Darmowandowo (1998) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya mendapatkan hasil pemeriksaan darah penderita demam tifoid berupa anemia (31%), leukositosis (12.5%) dan leukosit normal (65.9%)¹⁶

B. Pemeriksaan bakteriologis dengan isolasi dan biakan kuman

Diagnosis pasti demam tifoid dapat ditegakkan bila ditemukan bakteri *Salmonella 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.

Kultur organisme penyebab merupakan prosedur yang paling efektif dalam menduga demam enterik, dimana kultur untuk demam tifoid dapat menjelaskan dua pertiga dari kasus septikemia yang diperoleh dari komunitas yang dirawat di rumah sakit. 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.

Media pembiakan yang direkomendasikan untuk *S.typhi* adalah media empedu (gall) dari sapi dimana dikatakan media Gall ini dapat meningkatkan positivitas hasil karena hanya *S.typhi* dan *S.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 (Bourbeau dan Pohlman, 2001). Hasil yang menunjukkan ditemukannya bakteri dalam darah dengan cara kultur disebut bakteremi, dan merupakan penyakit yang mengancam jiwa, maka pendeteksiannya dengan segera sangat penting.

Indikasi kultur darah adalah jika dicurigai terjadi bakteremi atau septikemi dilihat dari gejala klinik, mungkin akan timbul gejala seperti : demam, mual, muntah, menggigil, denyut jantung cepat (*tachycardia*), pusing, hipotensi, syok, leukositosis, serta perubahan lain dalam sistem organ dan atau laboratoris (Provan, 2005). 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.

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 resiko aspirasi terutama pada anak.

Salah satu penelitian pada anak menunjukkan bahwa sensitivitas kombinasi kultur darah dan duodenum hampir sama dengan kultur sumsum tulang (Wain *et al*, 2008). Hasil biakan yang positif memastikan demam tifoid akan tetapi hasil negatif tidak menyingkirkan demam tifoid, karena hasilnya tergantung pada beberapa faktor. Faktor-faktor yang mempengaruhi hasil biakan meliputi jumlah darah yang diambil, perbandingan volume darah dari media empedu dan waktu pengambilan darah (Sudoyo A. W., 2010).

Bakteri dalam feses ditemukan meningkat dari minggu pertama (10-15%) hingga minggu ketiga (75%) dan turun secara perlahan. Biakan urine 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.

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. Salah satu penelitian pada anak menunjukkan bahwa sensitivitas kombinasi kultur darah dan duodenum hampir sama dengan kultur sumsum tulang (Handoyo, 2004). 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. 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. 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.

C. 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* (Wain dan Hosoglu, 2008).

Penelitian oleh Haque et al. (1999) mendapatkan spesifisitas PCR sebesar 100% dengan sensitivitas yang 10 kali lebih baik daripada penelitian sebelumnya dimana mampu mendeteksi 1-5 bakteri/ml darah. Penelitian lain oleh Massi et al. (2003) mendapatkan sensitivitas sebesar 63% pada tes Tubex bila dibandingkan dengan uji Widal (35.6%). 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 dan Hosoglu, 2008).

2.2. Tinjauan Tentang *Salmonella typhi*

2.2.1. Klasifikasi *Salmonella typhi*

Salmonella sp. merupakan kingdom *Bacteria*, phylum *Proteobacteria*, class *Gamma Proteobacteria*, ordo *Enterobacteriales*, *Salmonella sp.* family

dari *Enterobacteriaceae*, genus *Salmonella* dan species yaitu e.g. *S. enteric* (Todar, 2008).

Salmonella sp. pertama ditemukan (diamati) pada penderita demam tifoid pada tahun 1880 oleh Eberth dan dibenarkan oleh Robert Koch dalam budidaya bakteri pada tahun 1881 (Todar, 2008). *Salmonella* sp. adalah bakteri bentuk batang, pada pengecatan gram berwarna merah muda (gram negatif). *Salmonella* sp. berukuran $2\ \mu$ sampai $4\ \mu \times 0,6\ \mu$, mempunyai flagel (kecuali *S. gallinarum* dan *S. pullorum*), dan tidak berspora (Julius, 1990). Habitat *Salmonella* sp. adalah di saluran pencernaan (usus halus) manusia dan hewan. Suhu optimum pertumbuhan *Salmonella* sp. ialah 37°C dan pada pH 6-8 (Julius, 1990).

Dalam skema kauffman dan white tatanama *Salmonella* sp. di kelompokkan berdasarkan antigen atau DNA yaitu kelompok I *enteric*, II *salamae*, IIIa *arizonae*, IIIb *houtenae*, IV *diarizonae*, V *bongori*, dan VI *indica*. Komposisi dasar DNA *Salmonella* sp adalah 50-52 mol% G+C, mirip dengan *Escherichia*, *Shigella*, dan *Citrobacter* (Todar, 2008). Namun klasifikasi atau penggunaan tatanama yang sering dipakai pada *Salmonella* sp. berdasarkan epidemiologi, jenis inang, dan jenis struktur antigen (misalnya *S.typhi*, *S .thipirium*). Jenis atau spesies *Salmonella* sp. yang utama adalah *S. typhi* (satu serotipe), *S. choleraesuis*, dan *S. enteritidis* (lebih dari 1500 serotipe). Sedangkang spesies *S. paratyphi A*, *S. paratyphi B*, *S. paratyphi C* termasuk dalam *S. enteritidis* (Jawezt *et al*, 2008).

2.2.2. Morfologi *Salmonella Typhi*

Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif batang, tidak membentuk spora, motil, berkapsul dan berflagella (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup pada pH 6-8 pada suhu 15-41⁰C (suhu optimal 37 0C). Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4⁰C selama satu jam dan suhu 60⁰C selama 15 – 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan khlorinasi. Terjadinya penularan *S. typhi* pada manusia yaitu secara jalur fekal-oral. Sebagian besar akibat kontaminasi makanan atau minuman yang tercemar ^{17,20}



Gambar 3. Mikroskopis kuman Salmonella (CDC: Melissa Brower)

2.2.3. Anatomi Bakteri

Bakteri tersusun atas dinding sel dan isi sel. Disebelah luar dinding sel terdapat selubung atau kapsul. Di dalam sel bakteri tidak terdapat membrane

dalam (endomembran) dan organel bermembran seperti kloroplas dan mitokondria. Struktur tubuh bakteri dari lapisan luar hingga bagian dalam sel yaitu flagela, dinding sel, membrane sel, mesosom, lembaran fotosintetik, sitoplasma, DNA, plasmid, ribosom, dan endospore ²²

1. Flagela

Flagela terdapat salah satu ujung, pada kedua ujung atau pada permukaan sel. Fungsinya untuk bergerak. Berdasar letak dan jumlahnya, tipe flagella dapat dibedakan menjadi monotrik, amfitrik, lofotrik, dan peritrik. Flagela terbuat dari protein yang disebut flagelin. Flagella berbentuk seperti pembuka sumbat botol. Fungsinya adalah untuk bergerak. Flagella berputar seperti baling-baling untuk menggerakkan bakteri. Flagela melekat pada membrane sel.

3. Dinding sel

Dinding sel tersusun atas peptidoglikan yakni polisakarida yang berikatan dengan protein. Dengan adanya dinding sel ini, tubuh bakteri memiliki bentuk yang tetap. Fungsi dinding sel adalah untuk melindungi sel. Berdasarkan struktur protein dan polisakarida yang terkandung di dalam dinding sel ini, bakteri dapat dibedakan menjadi bakteri gram positif dan gram negatif. Pada bakteri gram negatif, peptidoglikan terletak di antara membran plasma dan membran luar dan jumlahnya lebih sedikit. Umumnya bakteri gram negatif lebih patogen.

Bakteri gram-negatif dinding sel gram negatif mengandung 10-20 % peptidoglikan, diluar lapisan peptidoglikan ada struktur membran yang tersusun dari protein fosfolipida dan lipopolisakarida. Apabila diberi pewarna gram menghasilkan warna merah.

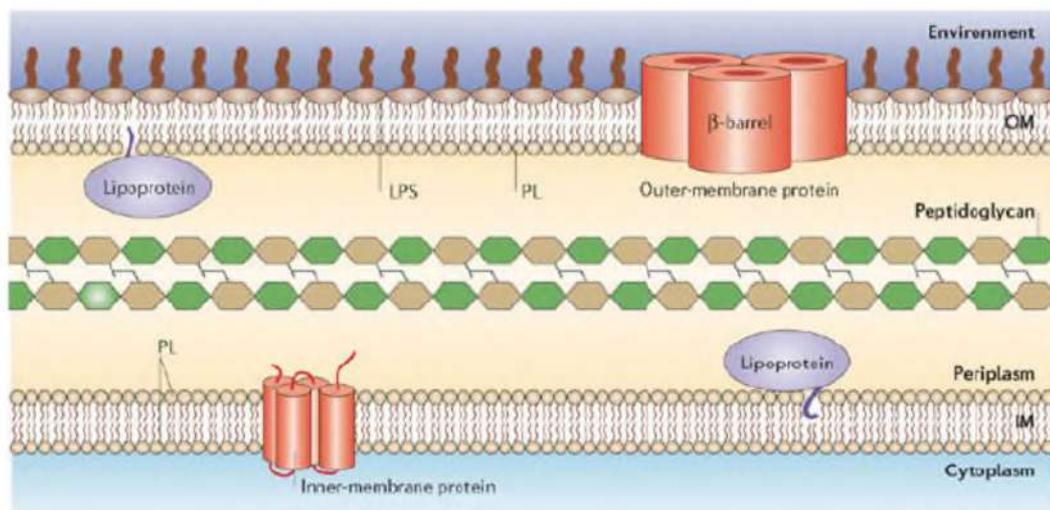
Di sebelah luar dinding sel terdapat kapsul. Tidak semua sel bakteri memiliki kapsul. Hanya bakteri patogen yang berkapsul. Kapsul berfungsi untuk mempertahankan diri dari antibodi yang dihasilkan selinang. Kapsul juga berfungsi untuk melindungi sel dari kekeringan. Kapsul bakteri tersusun atas persenyawaan antara protein dan glikogen yaitu glikoprotein.

Dinding sel *S. typhi* dibentuk 20% nya oleh lapisan lipoprotein. Sementara itu lapisan fosfolipid dan LPS membentuk 80% dinding sel kuman *S. typhi*. Lipopolisakarida yang terdiri dari lipid A, oligosakarida, dan polisakarida yang merupakan bagian terpenting dan utama yang menentukan sifat antigenik dan aktivitas eksotoksin. Lipid A merupakan asam lemak jenuh yang menentukan aktivitas endotoksin dari LPS yang selanjutnya dapat mengakibatkan demam dan reaksi imunologis sang pejamu ¹⁶.

Outer Membran Protein (OMP) ialah dinding sel terluar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang berfungsi sebagai sawar untuk mengendalikan aktivitas masuknya cairan ke dalam membran sitoplasma serta berfungsi sebagai reseptor bakteriofag dan

bakteriolisin ¹⁸.

Antigen OMP merupakan bagian dinding sel yang terletak di luar membrane sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang membatasi sel terhadap lingkungan sekitarnya. OMP ini terdiri dari 2 bagian yaitu bagian protein porin dan protein non porin. Porin merupakan komponen utama OMP, terdiri atas ompC, ompD dan ompF dan merupakan saluran hidrofilik yang berfungsi untuk difusi solute dengan BM < 6.000. Sifat resisten terhadap proteolysis dan denaturasi pada suhu 85-100°C. Protein non porin terdiri atas protein ompA, protein A dan lipoprotein, bersifat sensitive terhadap protease, tetapi fungsinya masih belum diketahui dengan jelas.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Gambar 4. Struktur dinding bakteri gram negatif

4. Membrane sel

Membrane sel tersusun atas molekul lemak dan protein, seperti halnya membran sel organisme yang lain. Membrane sel bersifat semipermeable dan berfungsi mengatur keluar masuknya zat keluar atau ke dalam sel.

5. Mesosom

Pada tempat tertentu terjadi penonjolan membran sel kearah dalam atau ke sitoplasma. Tonjolan membrane ini berguna untuk menyediakan energi atau pabrik energi bakteri. Organ sel (organel) ini disebut mesosom. Selain itu mesosom berfungsi juga sebagai pusat pembentukan dinding sel baru diantara kedua sel anak pada proses pembelahan.

6. Lembar fotosintetik

Khusus pada bakteri berfotosintesis, terdapat pelipatan membrane sel kearah sitoplasma. Membran yang berlipat-lipat tersebut berisi klorofil, dikenal sebagai lembar fotosintetik (tilakoid). Lembar fotosintetik berfungsi untuk fotosintesis contohnya pada bakteri ungu. Bakteri lain yang tidak berfotosintesis tidak memiliki lipatan demikian.

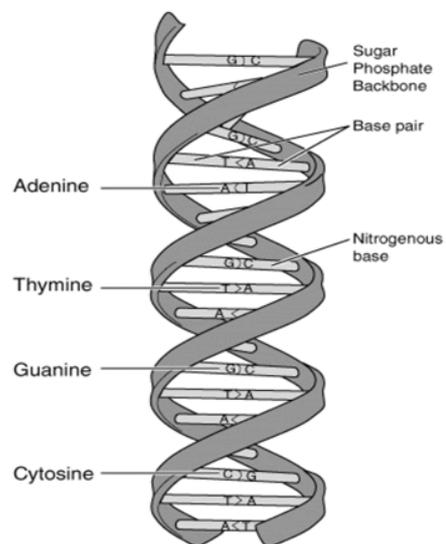
7. Sitoplasma

Sitoplasma adalah cairan yang berada di dalam sel (cytos = sel, plasma= cairan). Sitoplasma tersusun atas koloid yang mengandung berbagai molekul organik seperti karbohidrat, lemak, protein, mineral, ribosom, DNA, dan enzim-enzim. Sitoplasma merupakan tempat berlangsungnya reaksi-reaksi metabolisme.

8. DNA

Asam deoksiribonukleat (deoxyribonucleic acid, disingkat DNA) atau asam inti, merupakan materi genetic bakteri yang terdapat di dalam sitoplasma. Bentuk DNA bakteri seperti kalung yang tidak berujung pangkal.

Bentuk demikian dikenal sebagai DNA sirkuler. DNA tersusun atas dua utas polinukleotida berpilin. DNA merupakan zat pengontrol sintesis protein bakteri, dan merupakan zat pembawa sifat atau gen. DNA ini dikenal pula sebagai kromosom bakteri. DNA bakteri tidak tersebar di dalam sitoplasma, melainkan terdapat pada daerah tertentu yang disebut daerah inti. Materi genetik inilah yang dikenal sebagai inti bakteri.



Gambar 5. DNA Sirkuler

9. Plasmid

Selain memiliki DNA kromosom, bakteri juga memiliki DNA nonkromosom. DNA nonkromosom bentuknya juga sirkuler dan terletak di luar DNA kromosom. DNA nonkromosom sirkuler ini dikenal sebagai plasmid. Ukuran plasmid sekitar 1/1000 kali DNA kromosom. Plasmid mengandung gen-gen tertentu misalnya gen kebal antibiotik, gen patogen. Seperti halnya DNA yang lain, plasmid mampu melakukan replikasi dan membentuk kopi dirinya dalam jumlah banyak. Dalam sel bakteri dapat terbentuk 10-20 plasmid.

10. Ribosom

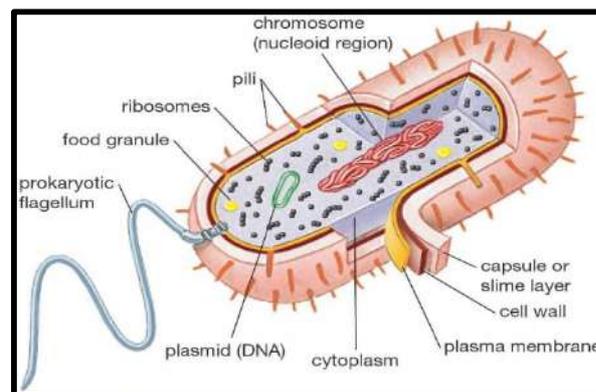
Ribosom merupakan organel yang berfungsi dalam sintesis protein atau sebagai pabrik protein. Bentuknya berupa butir-butir kecil dan tidak diselubungi membran. Ribosom tersusun atas protein dan RNA. Di dalam sel bakteri *Escherichia coli* terkandung 15.000 ribosom, atau kira-kira $\frac{1}{4}$ masa sel bakteri tersebut. Ini menunjukkan bahwa ribosom memiliki fungsi yang penting bagi bakteri.

11. Endospora

Bakteri ada yang dapat membentuk endospora, pembentukan endospora merupakan cara bakteri mengatasi kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan. Endospora tahan terhadap panas sehingga tidak mati oleh proses memasak biasa. Spora mati di atas suhu 120 C. jika kondisi telah membaik, endospora dapat tumbuh menjadi bakteri seperti sedia kala.

12. Reproduksi bakteri

Bakteri bereproduksi secara vegetatif dengan membelah diri secara biner. Pada lingkungan yang baik bakteri dapat membelah diri tiap 20 menit. Pembuahan seksual tidak dijumpai pada bakteri, tetapi terjadi pemindahan materi genetik dari satu bakteri ke bakteri lain tanpa menghasilkan zigot. Peristiwa ini disebut proses paraseksual. Ada tiga proses paraseksual yang telah diketahui, yaitu transformasi, konjugasi, dan transduksi.



Gambar 6. Kuman *S. typhi* secara skematik ¹⁸

2.2.4. Sifat Biokimia

Salmonella sp. bersifat aerob dan anaerob fakultatif, pertumbuhan *Salmonella* sp. pada suhu 37°C dan pada pH 6-8. *Salmonella* sp. memiliki flagel jadi pada uji motilitas hasilnya positif, Pada media BAP (*Blood Agar Plate*) menyebabkan hemolisis. Pada media MC (*Mac Conkey*) tidak memfermentasi laktosa atau disebut *Non Laktosa Fermenter* (NLF) tapi

Salmonella sp. memfermentasi glukosa, manitol dan maltosa disertai pembentukan asam dan gas kecuali *S. typhi* yang tidak menghasilkan gas. Kemudian pada media indol negatif, MR positif, Vp negatif dan sitrat kemungkinan positif. Tidak menghidrolisiskan urea dan menghasilkan H₂S (Julius,1990).

Tabel 1. Klasifikasi Salmonella menurut Kauffman-White²³

Grup	<i>Salmonella</i> Serotype	O Antigens	H antigens	
			Phase 1	Phase
A	S. Paratyphi A	1, 2, 12	A	-
B	S. Paratyphi B	1, 4, (5), 12	B	1,2
	S. Stanley	1, 4, (5), 12, 27	D	1,2
	S. Typhimurium	1, 4, (5), 12	I	1,2
C1	S. Paratyphi C	6, 7, (Vi)	C	1,5
	S. Choleraesuis	6, 7	C	1,5
C2	S. Manhattan	6, 8	D	1,5
D	S. Sendai	1, 9, 12	A	1,5
E1	S. Typhi	9, 12, Vi	d	-
	S. Dublin	1, 9, 12, (Vi)	g. p	-
	S. Anatum	3, 10	e. h	1, 6

2.2.5. Respon Imun Tubuh Terhadap *Salmonella Typhi*

Ketika tubuh terinfeksi *S. Typhi* maka tubuh akan mengadakan respon dan menentukan efek bakteri terhadap penjamu. Ketika *S. Typhi* pertama kali masuk ke dalam tubuh bakteri akan dihancurkan oleh makrofag. Bakteri yang akan dikenal oleh berbagai reseptor yang terletak di permukaan fagosit²⁴

Toll-like receptors berperan dalam mengamati dan menghancurkan *salmonella typhil* oleh makrofag. Makrofag mengenali melalui identifikasi komponen *lipoarabinomannan* (LAM) dinding sel. TLR4 berperan penting dalam respon imun alamiah dengan membentuk faktor transkripsi tertentu sinyal dan respon pertahanan. Aktivasi makrofag oleh TLR4 menghasilkan produksi sitokin yang berperan penting dalam pembentukan granuloma. Granuloma adalah struktur sel yang terdiri dari makrofag, limfosit dan sel dendritic²⁴.

Pada saat infeksi *Salmonella typhi*, terjadi sitokin proinflamasi seperti IL-1 β dan IL-6, IFN- γ dan TNF- α disintesis dan terjadi inflamasi sistemik. Setelah sitokin disekresi maka aktivitas sel T helper 1 (Th1) dan T helper 2 (Th2) dimulai. Sinyal dari sitokin yang diinjeksi oleh interaksi sel host dan bakteri adalah hal yang krusial dalam perkembangan penyakit. Keseimbangan antara sitokin proinflamasi dan antinflamasi akan mengontrol pencegahan kerusakan host karena inflamasi yang berlebihan²⁵

2.3. Tinjauan Tentang Imunitas

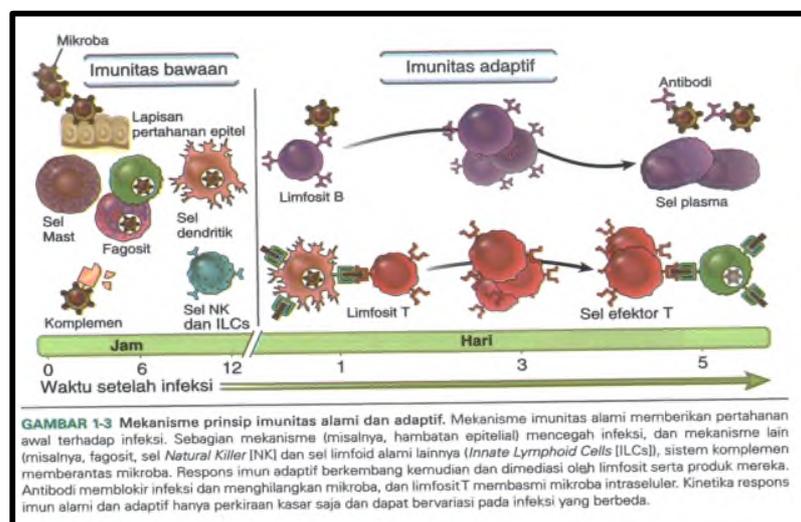
2.3.1. Imunitas

Imunitas didefinisikan sebagai pertahanan terhadap penyakit, terutama penyakit infeksi. Kumpulan sel-sel, jaringan dan molekul-molekul yang berperan dalam pertahanan infeksi disebut sistem imun, sedangkan reaksi

terkoordinasi sel-sel dan molekul tersebut dalam pertahanan terhadap infeksi, disebut sebagai respon imun. Immunologi adalah ilmu yang mempelajari sistem imun, termasuk respon terhadap mikroba pathogen, dan kerusakan jaringan serta peranannya pada penyakit.

2.3.2. Imunitas Alami dan Adaptif

Mekanisme pertahanan inang terdiri dari imunitas alami, yang memberikan perlindungan segera terhadap infeksi, dan imunitas adaptif yang berkembang lebih lambat namun memberikan perlindungan yang lebih spesialis terhadap infeksi (gambar 7)



Gambar 4. Imunitas alami dan adaptif ²⁶

Imunitas alami (juga disebut natural immunity dan native immunity) selalu ada pada individu-individu sehat, dan disiapkan untuk menghambat

masuknya mikroba dan untuk mengeliminasi mikroba yang berhasil memasuki jaringan inang (host) secara cepat. Imunitas adaptif (disebut juga imunitas spesifik atau imunitas dapatan) memerlukan ekspansi dan diferensiasi limfosit sebagai respon terhadap mikroba sebelum memberikan pertahanan yang efektif. Imunitas ini beradaptasi terhadap adanya infeksi mikroba.

Pertahanan lini pertama pada imunitas alami dilakukan oleh barrier epitel kulit dan mukosa serta oleh sel dan antibiotik alami yang berada di epitel, yang semuanya berfungsi untuk menghambat masuknya mikroba. Bila mikroba menghancurkan epitel dan memasuki jaringan atau sirkulasi, mereka diserang oleh fagosit, limfosit spesifik yang disebut sel limfoid alami misalnya sel Natural Killer (NK), dan beberapa protein plasma, termasuk protein dari sistem komplemen.

Keseluruhan mekanisme imunitas alami ini secara spesifik mengenali dan bereaksi terhadap mikroba. Selain memberikan pertahanan awal terhadap infeksi, respon imun alami meningkatkan respon imun adaptif terhadap agen-agen infeksius.

Sistem imun adaptif terdiri atas limfosit dan produk-produknya, misalnya antibodi. Respon imun adaptif terutama penting terhadap pertahanan mikroba infeksius yang bersifat patogenik terhadap manusia (yaitu dapat menyebabkan penyakit) dan mampu melawan imunitas alami. Sementara mekanisme imunitas alami mengenali struktur-struktur yang sama-sama dimiliki oleh berbagai kelas mikroba, sel-sel imunitas adaptif (limfosit), mengekspresikan

reseptor yang secara spesifik mengenali berbagai molekul yang diproduksi oleh mikroba serta molekul-molekul non infeksius.

Setiap bahan yang secara spesifik dapat dikenali oleh limfosit dan antibody disebut antigen. Respon imun adaptif seringkali menggunakan sel-sel serta molekul dari sistem imun alami untuk mengeliminasi mikroba, dan fungsi imunitas adaptif untuk memperkuat mekanisme antimikroba imunitas alami.

Dua tipe reaksi utama terhadap sistem imun alami adalah inflamasi dan pertahanan anti virus. Inflamasi terdiri dari akumulasi dan aktivasi leukosit dan protein plasma pada lokasi infeksi atau kerusakan jaringan. Sel-sel dan protein tersebut bertindak bersama untuk membunuh terutama mikroba ekstraseluler dan eliminasi jaringan yang rusak. Pertahanan imun alami terhadap virus intraseluler diperantarai oleh sel *Natural Killers (NK)* yang membunuh sel yang terinfeksi virus dan oleh sitokin yang disebut interferon tipe 1 yang menghambat replikasi virus di dalam sel inang.

Sistem imun alami memberi respon yang sama terhadap pertemuan kembali dengan sebuah mikroba, sedangkan sistem imun adaptif berespons lebih efisien pada tiap pertemuan kembali dengan suatu mikroba. Dengan kata lain sistem imun alami tidak mengingat pertemuan pertama dengan mikroba dan akan kembali ke dasar setelah setiap pertemuan, sehingga memori merupakan gambaran utama pada sistem imun adaptif.

Sistem imun adaptif menggunakan strategi berikut untuk memerangi sebagian besar mikroba :

- Antibodi yang disekresi akan mengikat mikroba ekstraseluler, menghambat kemampuan mereka untuk menginfeksi sel inang dan merangsang penelanan serta penghancuran oleh fagosit.
- Fagosit menelan mikroba dan membunuh mereka, dan sel T helper memperkuat kemampuan mikrobisidal fagosit.
- Sel T helper mengarahkan leukosit untuk menghancurkan mikroba dan meningkatkan fungsi pertahanan epitel untuk mencegah masuknya mikroba.
- Limfosit T sitotoksik membunuh sel yang terinfeksi mikroba.

Respon imun adaptif berkembang dalam tahapan-tahapan, yang masing-masing sesuai dengan reaksi tertentu limfosit ²⁶

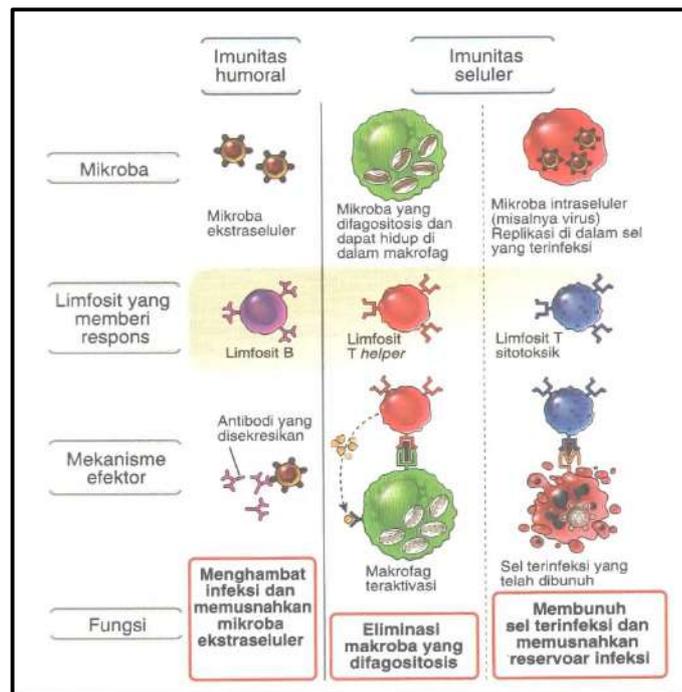
2.3.3. Imunitas Humoral dan Imunitas Seluler

Dua jenis imunitas adaptif yaitu imunitas humoral dan imunitas seluler, diperantarai oleh sel-sel dan molekul yang berbeda dan masing-masing dirancang untuk memberikan pertahanan terhadap mikroba ekstra dan intra seluler (Gambar 8)

1. Imunitas Humoral

Imunitas humoral diperantarai oleh protein yang dinamakan antibodi, yang diproduksi oleh sel-sel yang disebut limfosit B. Antibodi masuk ke dalam sirkulasi dan cairan mukosa, lalu menetralkan dan mengeliminasi mikroba serta

toksin mikroba yang berada diluar sel-sel inang, dalam darah, cairan ekstraseluler yang berasal dari plasma dan di dalam lumen dari organ-organ mukosa, seperti traktus gastrointestinalis dan traktus respiratorius.



Gambar 5. Imunitas humoral dan seluler ²⁶

Salah satu fungsi terpenting antibody adalah menghentikan mikroba yang berada pada permukaan mukosa dan dalam darah agar tidak mendapatkan akses menuju sel-sel inang dan tidak membentuk koloni di dalam sel serta jaringan ikat inang. Melalui cara ini, antibody mencegah infeksi berkembang. Antibodi tidak dapat mencapai mikroba yang hidup dan membelah di dalam sel yang terinfeksi.

2. Imunitas Seluler

Pertahanan terhadap mikroba intraseluler tersebut dinamakan imunitas seluler karena prosesnya diperantarai oleh sel-sel yang disebut sel limfosit T. Beberapa limfosit T mengaktifasi fagosit untuk menghancurkan mikroba yang telah dimakan oleh sel fagosit ke dalam fagosit intraseluler. Limfosit T lainnya membunuh berbagai jenis sel inang yang terinfeksi mikroba infeksius di dalam sitoplasmanya. Dalam kedua kasus tersebut, sel T mengenali antigen yang ditampilkan pada permukaan sel, yang menunjukkan adanya mikroba di dalam sel tersebut.

Terdapat beberapa perbedaan penting antara sel B dan sel T. Sebagian besar sel T hanya mengenali antigen protein saja, sedangkan sel B dan antibody mampu mengenali berbagai jenis molekul, yaitu protein, karbohidrat, asam nukleat dan lemak.

Imunitas pada seseorang dapat diinduksi oleh infeksi atau vaksinasi (imunitas aktif) atau diberikan pada seseorang melalui transfer antibody atau limfosit dari seseorang yang terimunisasi aktif (imunitas pasif) ^{26,27}

2.3.4. Pengenalan Mikroba oleh Imunitas Alami

Kemampuan pathogen memasuki tubuh manusia (untuk mencari kehidupan) dan kemampuan tubuh manusia untuk mendeteksi kedatangannya (sebagai musuh manusia) adalah bentuk keadilan Tuhan terhadap semua makhluknya (manusia dan pathogen sama-sama makhluk Tuhan). Pada

pathogen telah ada penanda dalam bentuk molekul yang akan dikenal oleh pertahanan manusia (sistem imunitas *innate*) sehingga kedatangan musuh ini dapat diantisipasi manusia dan makhluk Tuhan lainnya. Karakteristik molekul penanda pada pathogen yaitu :

1. *Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMPs)*

Penanda ini hanya ada pada mikroba yang membahayakan manusia, tidak ada pada sel manusia (mamalia). PAMPs ini berbeda-beda tergantung jenis pathogen (virus, bakteri gram negative, bakteri gram positif, dan jamur), tetapi satu jenis PAMPs dapat ditemukan pada jenis pathogen yang berbeda (Tabel 2.2). Penanda ini hanya ada pada mikroba pathogen sehingga menjadi pembeda yang membuat imunitas alami hanya berespon terhadap mikroba pathogen dan tidak terhadap sel sendiri.

Penanda-penanda itu adalah molekul-molekul yang sangat vital untuk kehidupan pathogen bersangkutan sehingga sepanjang zaman tidak bisa berubah (mutasi) misalnya *double-stranded* RNA pada virus, LPS (lipopolisakarida) pada bakteri gram negative, *lipoteichoic acid* pada bakteri gram positif. Kecepatan evolusi pada mikroba lebih cepat dari manusia sehingga mutasi lebih gampang terjadi pada mikroba. Akan tetapi telah diciptakan PAMPs yang tidak dapat bermutasi sejak imunitas innate berkembang, PAMPs tidak berubah sampai sekarang.

2. *Damaged-Associated Molecular Patterns (DAMPs)*

Imunitas innate dapat mengenal molekul endogenous yang diproduksi

atau dilepas oleh sel yang rusak atau mati. Kematian atau kerusakan sel dapat terjadi akibat infeksi atau sebab lain seperti racun kimia, trauma, terbakar, atau iskemia/hipoksia (steril injury).

Ada dua perangkat pada imunitas innate untuk mengenal PAMPs atau DAMPs yaitu :

1. *Pattern Recognition Receptors (PRRs)*

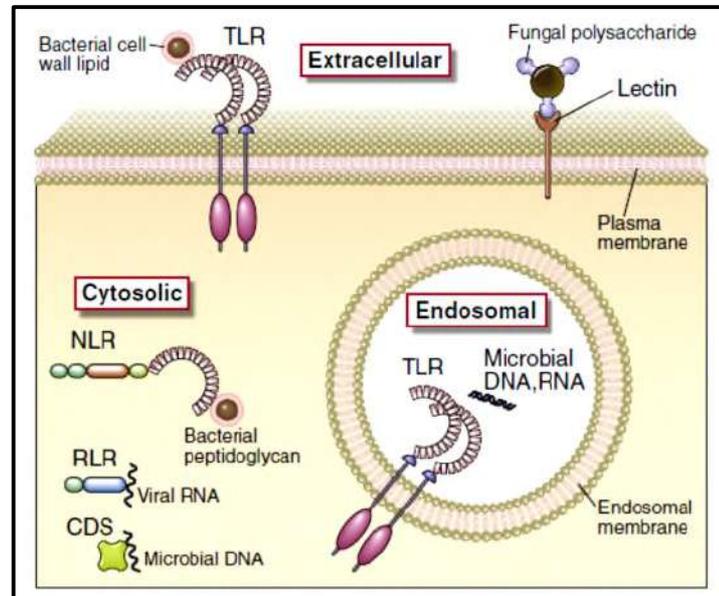
Bermacam-macam tipe reseptor seluler yang dapat mengikat PAMPs dan DAMPs berada pada berbagai sel yang berperan dalam imunitas innate seperti fagosit (makrofag, neutrophil, dan sel dendritic) dan sel epitel yang membatasi tubuh dengan dunia luar.

Patogen yang berbeda dapat memiliki PAMPs yang sama sehingga spesifisitas imunitas innate tidak spesifik terhadap antigen patogen tertentu seperti imunitas adaptif, tetapi spesifik PAMPs. Oleh karena itu mikroba yang berbeda tetapi memiliki PAMPs yang sama dapat dikenal oleh reseptor yang sama (Tabel 2)

Tabel 2. Cell-associated PRRs pada imunitas innate

PRRs	Lokasi	Contoh	PAMP / DAMP ligands
<i>Toll-like receptors (TLRs)</i>	Membran plasma dan membrane endosomal sel dendritic, fagosit, sel B, sel endotel, dll	TLR 1-9	LPS, peptidoglikan, produk sel rusak
<i>NOD-like receptors (NLRs)</i>	Sitoplasma fagosit, sel epitel dan sel lain	NOD1/2 NLRP <i>family</i> (<i>inflammasome</i>)	Flagelin, LPS, Kristal urat, produk sel rusak
<i>RIG-like receptors (RLRs)</i>	Sitoplasma fagosit dan sel lain	RIG-1, MDA-5	RNA virus
<i>C-type lectin like receptors</i>	Membrane plasma fagosit	Reseptor mannose Dektin	Karbohidrat pada permukaan mikroba dengan terminal mannose dan fructose, Glukan pada dinding sel jamur
<i>Scavenger receptor</i>	Membran plasma fagosit	CD36	<i>Microbial diacylglycerides</i>
<i>N-formyl met-leu-phe receptors</i>	Membran plasma fagosit	FPR dan FPRL 1	Peptida mengandung residu <i>N-formylmethionyl</i>

NOD, *nucleotide oligomerization domain-containing protein*; RIG-1, *retinoic acid-inducible gene 1*; MDA-5, *melanoma differentiation-associated gene 5*



Gambar 6. Lokasi seluler dari PRRs pada imunitas innate ²⁷

2. Soluble Recognition Molecules (SRMs)

Berbagai protein dalam darah dan cairan ekstraseluler yang dapat mengenal PAMPs. Protein-protein ini berperan memfasilitasi pembersihan mikroba dari darah atau cairan ekstraseluler dengan cara meningkatkan penangkapan mikroba oleh sel-sel imunitas innate dan mengaktifkan pembunuhan kuman ekstraseluler.

Tabel 3. SRMs pada Imunitas Innate

SRMs	Lokasi	Contoh	PAMP ligands
<i>Pentraxins</i>	Plasma	<i>C-reactive protein</i>	<i>Microbial phosphorylcholine</i> dan <i>phosphatidylethanolamine</i>
<i>Collectins</i>	Plasma	<i>Mannose-binding lectin</i>	Karbohidrat pada permukaan mikroba dengan terminal mannose dan fructose.
	Alveoli	Surfactant proteins (SP-A dan SP-B)	Berbagai struktur mikroba
<i>Ficolins</i>	Plasma	<i>Ficolin</i>	<i>N-Acetylglucosamine</i> dan <i>lipoteichoic acid</i> yang ada pada dinding sel bakteri gram positif
<i>Complement</i>	Plasma	C3	Permukaan mikroba misalnya LPS
<i>Natural antibodies</i>	Plasma	IgM	<i>Phosphorylcholine</i> pada membrane bakteri dan membrane sel apoptotik

Pentraksin

Pentraksin (protein pentamerik) terdiri atas sejumlah protein plasma yang juga mampu mengenal struktur tertentu pada mikroba dan berpartisipasi dalam imunitas innate. Yang termasuk dalam golongan pentaksin adalah *C-reactive protein* (CRP), Serum amyloid P (SAP) dan PTX3. CRP sangat meningkat jumlahnya dalam darah pada inflamasi akut sehingga disebut *acute-phase reactant*. CRP diproduksi oleh hati atas stimulasi sitokin IL-1 dan IL-6

yang disintesis oleh fagosit aktif dalam respon imunitas innate. CRP mengenal molekul ligan pada membrane mikroba, jamur dan sel apoptotic.

2.3.5. Stimulasi Respon Imunitas Alami Melawan Mikroba

Jika mikroba hinggap dikulit maka ia akan terlempar oleh aliran udara dan keringat dipermukaan kulit, atau dibunuh oleh peptide antimikroba (misal *β defensin*) yang ada pada kulit. Jika mikroba ingin masuk melalui saluran napas maka mikroba akan dihalangi oleh bulu hidung. Kalau berhasil masuk lebih dalam, akan bertemu musin yang akan membungkusnya, kemudian dikirim keluar melalui “escalator” silia epitel saluran napas, atau bertemu dengan antibakteri *β-defensin* dan *cathelicidins* yang akan membunuhnya. Kalau berhasil masuk lebih dalam lagi sampai alveolus, sudah menunggu makrofag alveolar yang akan menelannya. Demikian adalah contoh simulasi “pergulatan” mikroba sebagai penyerang dengan sistem pertahanan imunitas alami manusia.

Kerusakan fisik epitel (misalnya luka) akan mempermudah mikroba masuk melewatinya, sesampainya di jaringan di bawah epitel (subepitelial) telah ditunggu oleh sel dendritic dermal, makrofag dan sel mast yang berjaga. Mikroba dikenal kedatangannya karena memiliki penanda PAMPs yang segera akan berikatan dengan reseptor (misalnya TLR) dari ketiga jenis penjaga subepitelial. Pada saat reseptor-reseptor itu menangkap ligannya (PAMPs)

maka muncullah sinyal aktivasi yang akan mengaktifkan ketiga sel imunitas innate ini. Ketiga jenis sel tersebut kemudian melepas sejumlah sitokin proinflamasi seperti IL-1 (oleh sel dendritic dan makrofag), TNF α (oleh sel dendritic dan makrofag) dan histamine (oleh sel mast), untuk memicu respon inflamasi di jaringan subepitelial yang didatangi mikroba itu.

Sitokin TNF α dan IL-1 yang dilepas oleh makrofag bersama dengan histamine dan TNF α dari sel mast menuju ke endotel pembuluh darah untuk memicu peran endotel menghentikan neutrophil yang lewat. Endotel berespon dengan mengeluarkan molekul adhesi ke permukaannya (selektin dan ligan integrin) untuk menahan neutrophil. Selanjutnya neutrophil difasilitasi oleh endotel melalui peningkatan permeabilitas kapiler untuk keluar dari aliran darah menuju ke jaringan yang ada mikroba.

Mikroba yang lolos masuk ke jaringan dan ditangkap oleh fagosit (makrofag, neutrophil, dan sel dendritic) akan difagositosis sehingga mikroba berada dalam vakuol yang disebut fagosom (endosom). Fagosom ini segera menyatu dengan lisosom yang didalamnya ada enzim lisozim membentuk fagolisosom, maka bertemulah mikroba dengan enzim pencerna protein ini sehingga mikroba dicerna dan hancur. Memang ada mikroba yang tidak mempan oleh lisozim, karena dinding selnya terdiri atas lemak (misal mikobakterium), tetapi fagosit masih punya senjata penghancur lain berupa radikal bebas yaitu *Reactive Oxygen Species* (ROS) dan *Nitrite Oxyde* (NO).

Sel dendritic yang menangkap mikroba dan menghancurkannya dalam

fagolisosom, terutama bertugas memperkenalkan sejumlah antigen yang ada pada mikroba yang sudah dihancurkan itu, ke sel T naif yang menunggu (menjaga) dilimfonodus. Untuk itu sel dendritic memajang antigen-antigen itu di permukaannya, menggunakan molekul *major histocompatibility complex* (MHC) dan dibawa ke limfonodus terdekat lewat aliran limfe untuk dipresentasikan kepada sel T naif (peran sebagai *Antigen Presenting Cell*, APC). Proses ini akan memulai respon imunitas adaptif (*Cell Mediated Immunity*, CMI).

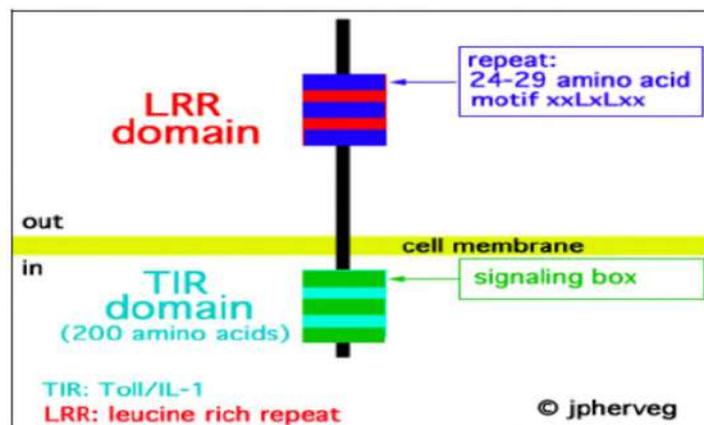
Sebagian dari kuman atau bahan kuman sudah hancur akan hanyut terbawa aliran limfe menuju limfonodus. Disana sudah menunggu sel B naif dan sel dendritic folikular yang akan menangkapnya. Jika sel B naif sudah mengenal kehadiran antigen maka mulailah respon imunitas adaptif (imunitas humoral)

2.4. Toll-Like Receptor 4

2.4.1. Sejarah dan Definisi TLRs

Penamaan *Toll-like receptors* (TLRs) berasal dari kemiripan struktur dan fungsi pada reseptor transmembrane yang ditemukan pada lalat *Drosophila melanogaster*. Dinamai *Toll*, yang dalam bahasa Jerman berarti “fantastis” atau “aneh”. Analisis rangkaian gen memperlihatkan adanya *encoded* protein transmembran dengan domain intrasitoplasmik baru yang mirip dengan

reseptor interleukin-1 (IL-1) pada tikus. Selain mengatur perkembangan tahap embrionik, bentuk mutan *Toll* juga mengganggu pertahanan antijamur dari lalat. Selanjutnya diketahui bahwa defek pada jalur *Toll* menyebabkan gangguan respons imun terhadap penyebab infeksi lainnya. Janeway dkk. (1997), menemukan homolog reseptor *Toll* *Drosophila* pada manusia. Saat ini dikenal sebagai TLR4, yang terdiri atas domain intrasitoplasmik *Toll-like receptors/ IL-1 receptors*, namun domain ekstraselular imunoglobulin (Ig) mirip dengan reseptor IL-1. Terlihat kemiripan struktur pada reseptor lalat, yang terdiri atas *leucine-rich repeats*. Kemiripan ini menunjukkan suatu metode lama reseptor pengenalan yang dipertahankan melalui evolusi dan digunakan oleh manusia dan serangga. Saat TLR pertama kali ditemukan untuk mengenal *pathogen-associated molecular patterns*, TLR merupakan reseptor terpenting dalam pengenalan pola mikroorganisme pada sistem imunitas alami ^{28,29}



Gambar 7. Struktur Molekul TLR ³⁰

Struktur molekul TLR terdiri dari region ekstraseluler (LRR) yang kaya *leucine* terdiri 24-29 asam amino dan region intraseluler yang disebut TIR terdiri 200 asam amino³⁰. TLR merupakan reseptor transmembran yang dikodekan oleh *germline* dengan karakteristik berupa *leucinrich domain* (LRR) ekstraseluler dan domain intraseluler atau sitoplasmik yang homolog dengan *interleukin-1 receptor* (TIR)³¹⁻³³. LRR ditemukan pada sejumlah protein dan terlibat dalam pengenalan ligan dan transduksi sinyal. Domain LRR dipisahkan dari region transmembran oleh domain LRR *carboxy-terminal*. Domain TIR dibutuhkan untuk *intracellular signaling*. TLR diekspresikan oleh berbagai sel misalnya makrofag dan sel dendritik³². TLR berfungsi sebagai *pathogen recognition receptors* (PRRs), mengenali *pathogenassociated molecular patterns* (PAMPs) yang unik pada mikroba dan penting dalam pertahanan diri mikroba. Ligasi PAMPs pada TLR akan menginduksi sel imun dan mengaktifkan sejumlah jalur dalam imunitas alami yaitu inflamasi, koagulasi dan kematian sel³⁴. Pengenalan PAMPs ini menyebabkan sistem imunitas alami mampu membedakan antara bahan *self* dan *non-self*³⁵.

TLRs merupakan protein homologous pada membrane sel APC yang berfungsi sebagai reseptor fungsional yang mengaktifkan leukosit untuk menimbulkan mentrigger respons imun *innate* atau respons inflamatori dalam melawan patogen. Protein ini ditemukan pertama kali pada *Drosophila* sebagai protein Toll. Reseptor ini terdiri dari daerah yang kaya dengan *leucine* pada ekstrasel dan pada region ekor sitoplasma yang merupakan reseptor dari IL-1

dan IL-8 dan disebut Toll/IL-1 reseptor (TIR) ^{36,37}. Reseptor untuk pengenalan terhadap patogen dan produk mikroba akan menimbulkan imunitas *innate* ³⁸. Fungsi tersebut dihubungkan dengan reseptor kinase yang kemudian menstimulasi produksi sitokin dan substansi mikrobisidal. Seperti fungsi terhadap *C albicans* telah berkembang, jika sebelumnya disebutkan TLR2, kemudian berkembang dengan TLR4 dengan ligan zymosan dan mannan ³⁹.

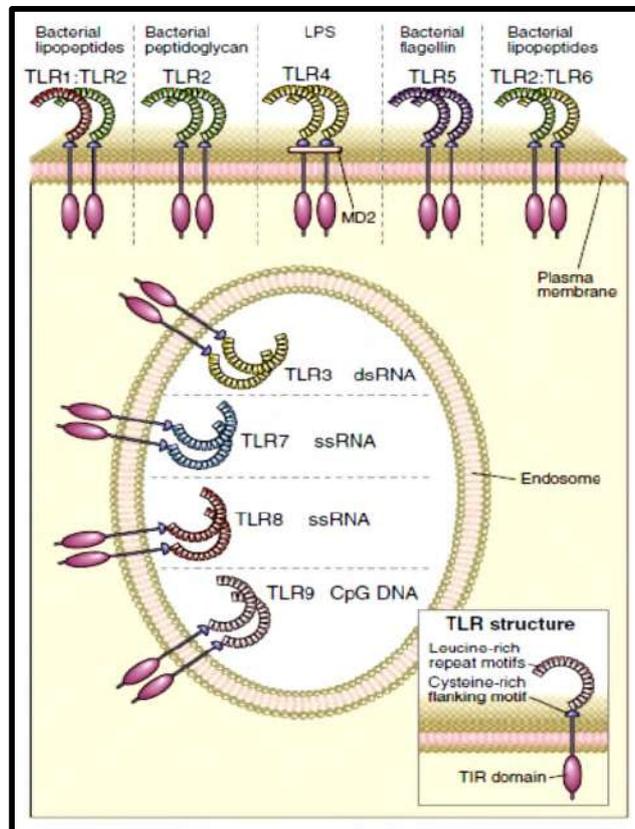
2.4.2. Klasifikasi TLR

Tabel 4. Klasifikasi TLR, ligand an spesies yang dikenali ⁴⁰

TLR subfamily	LIGAN	SPESES
TLR1 + TLR2	Triacyl lipopeptides	Bakteri
TLR2	Zymosan	Jamur
TLR3	dsDNA	Virus
TLR4	Lipopolysaccharide	Bakteri gram negative
TLR5	Flagellin	Bakteri
TLR6 + TLR2	Diacyl polipeptides	Mikoplasma
TLR7	ssRNA	Virus, penjamu
TLR8	ssRNA	Virus, penjamu
TLR9	DNA, hemozin	Bakteri, virus, plasmodium
TLR10	Tidak diketahui	Bakteri
TLR11	Profilin-like protein	Toksoplasma, bakteri

Sebagian besar spesies mamalia diperkirakan memiliki 10 hingga 15 tipe TLR.

Tiga belas TLR ditemukan pada manusia dan tikus ^{29,40}. Tabel 4 memperlihatkan 11 TLR yang telah diketahui, dengan ligan dan spesiesnya



Gambar 8. Struktur, lokasi, dan kekhususan TLRs mamalia ²⁷

Saat ini telah diketahui 11 macam TLR, yang dibagi menjadi dua tipe yaitu; *surface-expressed* TLRs, yang aktif melawan komponen dinding sel bakteri; dan reseptor intraselular, yang mengenali pola molekul virus. Semua TLR memiliki kemiripan struktur dan fungsi namun respons yang berbeda terhadap komponen mikroorganisme. TLR yang berperan dalam imunitas terhadap bakteri adalah TLR 1,2, 4, 5, dan 6 yang dapat mengenali komponen dinding sel bakteri, sehingga disebut juga sebagai TLR ekstraseluler ⁴¹

Pengenalan komponen dinding sel bakteri merupakan peran dari 5 jenis TLR yaitu TLR 1,2,4,5, dan 6, yang disebut juga sebagai TLR ekstraselular karena ekspresinya pada permukaan sel dan domain ekstra selular⁴². TLR4 merupakan reseptor yang pertama kali ditemukan pada manusia^{31,42} dan dapat mengenali lipopolisakarida bakteri negatif-Gram. TLR4 juga dapat mengenali protein yang dikode oleh virus pada traktus respiratorius, dan *self-protein* seperti protein *heat-shock* dan β -defensin. Selain itu, protein matriks yaitu fibronektin dan fibrinogen protein plasma juga dikenali melalui TLR4^{31,42}

TLR2 dapat mengenali banyak ligan, misalnya lipopeptida bakteri, zimosan jamur, protein parasit dan virus serta *lipoteichoic acid* (LTA) bakteri positif-Gram. TLR2 dan TLR4 terdapat pada permukaan sel dan dapat mengenali bakteri.¹⁶ Banyaknya pengenalan ligan ini terjadi karena pembentukan heterodimer TLR2 dengan dua TLR lain, yakni TLR1 atau TLR6, yang dapat mendiskriminasikan sedikit perubahan struktur ligan. Heterodimer TLR1/TLR2 dapat mengenali *triacylated lipoprotein*, sedangkan TLR2/TLR6 dapat mengenali *diacylated lipoprotein*. TLR5 dapat mendeteksi domain terbatas pada monomer flagelin, protein struktur utama yang membentuk flagella pada bakteri negatif-Gram. Flagela merupakan organel penggerak yang berperan pada virulensi, kemotaksis, adhesi dan invasi permukaan pejamu.

TLR9 mengenali asam nukleat yaitu hipometilasi CpG, yang umumnya terdapat pada DNA prokariotik dan tidak terdapat pada genom eukariotik. TLR9

juga diaktivasi oleh hemozoin, hem yang terdiri dari produk degradasi hemoglobin eritrosit yang terinfeksi oleh parasit malaria. TLR3, TLR7, dan TLR8 dapat mengenali asam nukleat misalnya TLR9, tapi lebih baik dalam pengenalan RNA *single-stranded* (ss) dan *double-stranded* (ds) dibandingkan DNA^{29,31}.

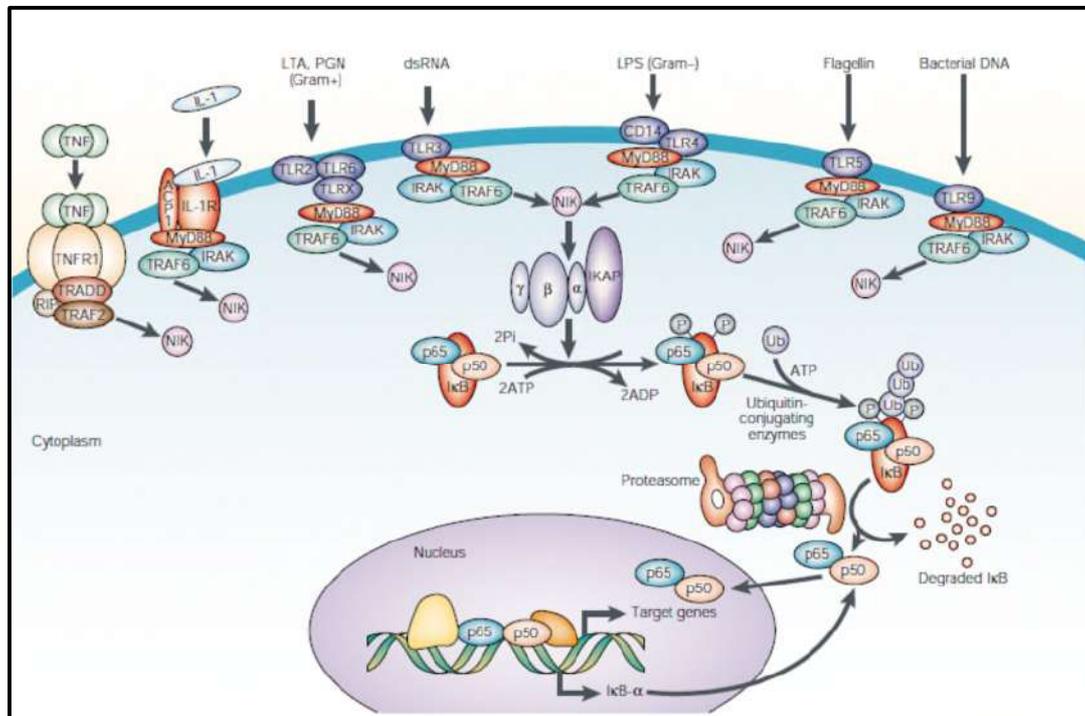
Sel imun yang mengekspresikan TLR antara lain monosit, makrofag, granulosit, sel natural killer, dan sel B, sel T. Sel non-imun juga mengekspresikan TLR misalnya keratinosit, fibroblast, dan sel epitel. TLR terutama ditemukan pada sel yang memulai respons imun primer, yaitu di permukaan sel, membran plasma sel, serta kompartemen intrasel, berupa retikulum endoplasmik dan endosome^{29,40}

2.4.3. Penandaan Toll-like Receptors

Jalur penandaan TLR terdiri atas, jalur yang tergantung pada *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) yang umum terhadap semua TLR, dan jalur yang tidak tergantung pada *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) yang selektif terhadap TLR3 dan TLR4^{31,40,42}. Jalur yang tergantung pada *myeloid differentiation factor 88* (MyD88) akan menginduksi sitokin inflamasi atau TRIF (*Toll-IL-1R domain containing adaptor-inducing interferon β*) yang akan menginduksi produksi interferon tipe 1 yang juga merupakan sitokin inflamasi⁴⁰. TLR 3 dan TLR 4 akan mengaktifkan jalur yang tidak bergantung pada

MyD88, yang akan menyebabkan produksi IFN- β .¹⁷ Aktivasi MyD88 memulai kaskade penandaan, yang menyebabkan aktivasi berkesinambungan kinasi dan translokasi faktor transkripsi sentral dari *nuclear factor* (NF)- κ B dan *interferon regulatory factor* (IRF)-3. Akhirnya MyD88 berhubungan dengan *toll/interleukin* (IL)-1 *receptor* (TIR) *adaptor-containing adapter protein* terhadap kompleks yang akan menarik *IL-1 receptor-associated kinase* dan *tumor necrosing factor* (TRAF)-6, yang selanjutnya akan mengaktivasi kompleks I κ B Kinase (IKK)^{31,40,42}.

Pada penandaan MyD88, molekul adaptor TIR *domain-containing adaptor-inducing interferon* (IFN)- β (TRIF) ditarik ke bagian intrasel TLR3 secara langsung atau ke TLR4 melalui *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM), yang selanjutnya menyebabkan aktivasi *tankbinding kinase 1* (TBK-1) dan TRAF-6. Keduanya merupakan tempat terjadinya induksi respons imun yang didominasi oleh (NF)- κ B atau respons imun yang didominasi oleh IRF-3 dengan pola aktivasi IFN tipe 1^{31,40,42}.



Gambar 9. Signal-Transduction Pathways melalui NFκB⁴³

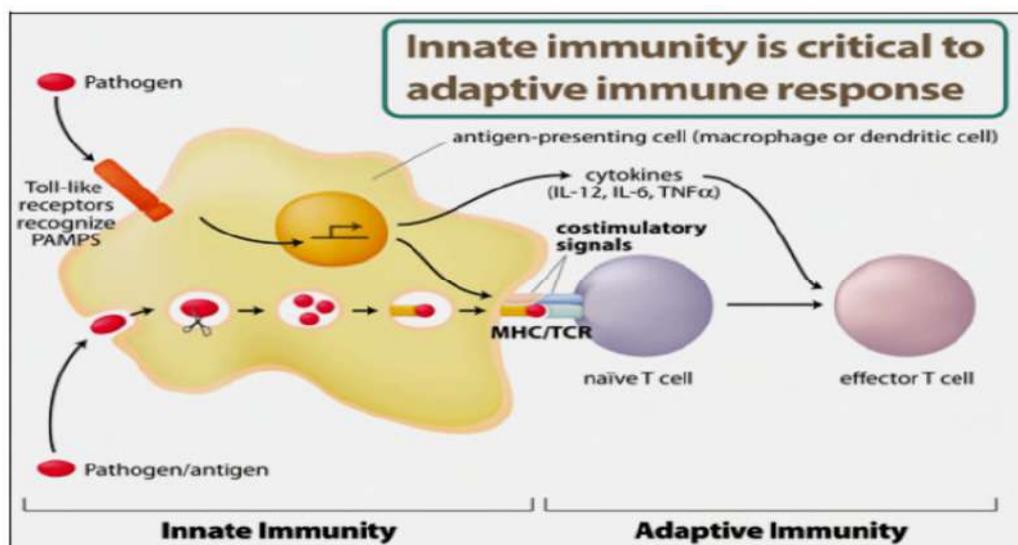
2.4.4. Pengenalan TLR Terhadap Bakteri

Pemahaman tentang peranan reseptor dan protein tambahan yang terlibat dalam imunitas terhadap bakteri merupakan hal penting terhadap intervensi pengobatan infeksi bakteri. Identifikasi TLR merupakan langkah maju memahami mikroorganisme, terutama bakteri. Ekspresi TLR berbeda tergantung atas tipe sel. Fungsi TLR yang telah diketahui berupa pengenalan PAMPs eksogen dan ligan endogen, dengan tambahan protein intraseluler yang termasuk dalam kelompok *nucleotide-binding oligomerization domain*

(NOD) serta diidentifikasi sebagai PRR untuk produk degradasi peptidoglikan

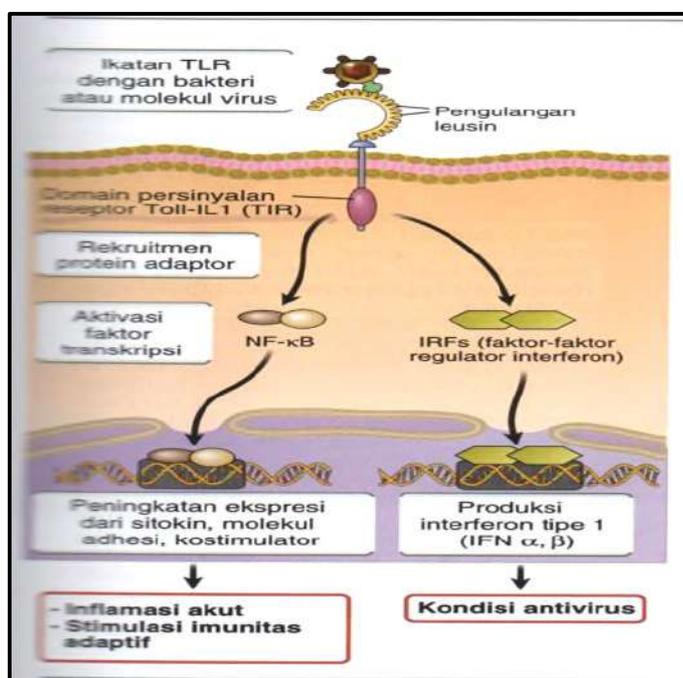
³⁴. Bakteri negatif-Gram dapat dikenali dan mengaktifkan RPR TLR4.

Patogen seperti bakteri, virus, fungi dan protozoa mengekspresikan seperangkat molekul yang bersifat “class-specific” dan “mutation resistant” yang dinamakan PAMP (pathogen-associated molecular pattern). Sebaliknya sel tubuh yang terlibat dalam sistem immune natural (innate/nonspecific) dapat mengenali PAMP melalui motif PRR (pattern recognition receptor). Terlihat pada gambar 6, pada imunitas alami, patogen dikenali TLR, menimbulkan signaling dalam sel dan mempengaruhi ekspresi sitokin. Patogen juga dapat diekspresikan makrofag dalam MHC dan menimbulkan imunitas adaptif ⁴⁴



Gambar 10. Peran TLR pada Imunitas innate ⁴⁴

Sinyal yang dibangkitkan oleh penempelan TLRs mengaktifkan faktor transkripsi yang merangsang ekspresi gen yang menyandi sitokin, enzim, dan protein lain yang terlibat dalam fungsi antimicrobial dari fagosit yang teraktivasi dan sel lainnya, hal ini terlihat pada gambar 24 Diantara faktor transkripsi paling penting yang diaktivasi oleh sinyal TLR adalah NF- κ B (*nuclear factor* κ B), yang mempromosikan ekspresi berbagai sitokin dan molekul adhesi endothelial. Mutasi diturunkan yang jarang dari molekul yang meneruskan sinyal TLRs ke bawah berkaitan dengan infeksi berulang dan berat, yang menggaris bawahi pentingnya jalur ini dalam pertahanan inang melawan mikroba.



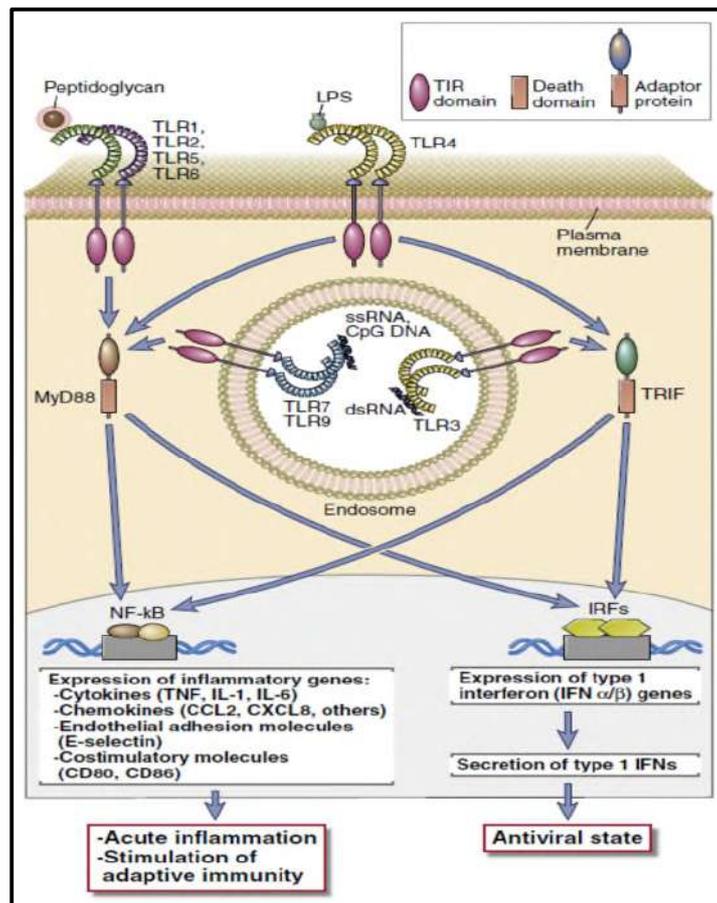
Gambar 11. Fungsi sinyal Toll-like receptor ²⁶

Terdapat perbedaan jalur pengaktifan sinyal TLR oleh MyD88 (bersama MAL) dan *TRIF adapter protein* (bersamaan dengan TRAM). Aktivasi TLR4 menyebabkan penarikan MyD88 dan TRIF, tetapi pengaktifan TLR2 hanya menyebabkan penarikan MyD88. Aktivasi TLR4 menyebabkan koinduksi *nitric oxidesynthesis* (NOSII) dan TNF- α , sedangkan aktivasi TLR2 hanya mengaktifkan TNF- α . NOSII dan TNF- α merupakan gen kunci pada imunitas alami dan inflamasi ⁴⁵

Reseptor yang dijumpai oleh Toll mirip pada mamalia (sekarang dikenal sebagai TLR4) menunjukkan bahwa reseptor tersebut dapat menginduksi ekspresi gen yang berperan dalam respon inflamasi. Disamping itu ditemukan bahwa adanya *point mutation* gen TLR4, strain tikus tidak responsif terhadap LPS. Aktivasi imunitas alamiah (*innate immunity*) merupakan tahap yang penting dalam perkembangan *antigen-specific acquired immunity* ³⁰.

Komponen bakteri yang berperan sebagai *stimulating innate immunity*, antara lain : lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan, lipoprotein (lipopeptida), dan DNA bakteri ⁴⁰. Komponen-komponen ini disebut sebagai *ligand*, yang kemudian berikatan dengan reseptor TLRs. Salah satu anggota dari *TLRs genes* adalah gen TLR4, yang mentranskripsi reseptor TLR4. *Ligand* dari reseptor TLR4 adalah LPS dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella sp.* ^{30,46}. Pada bakteri, LPS adalah endotoksin. Apabila bakteri ini berhasil menginfeksi tubuh, maka komponen inilah yang menyebabkan inflamasi atau peradangan. Dengan demikian peran reseptor TLR4 adalah sangat penting

untuk mengontrol sejak awal terjadinya peradangan akibat infeksi bakteri *Salmonella sp.*⁴⁷



Gambar 12. Jalur persinyalan dan fungsi TLRs²⁷

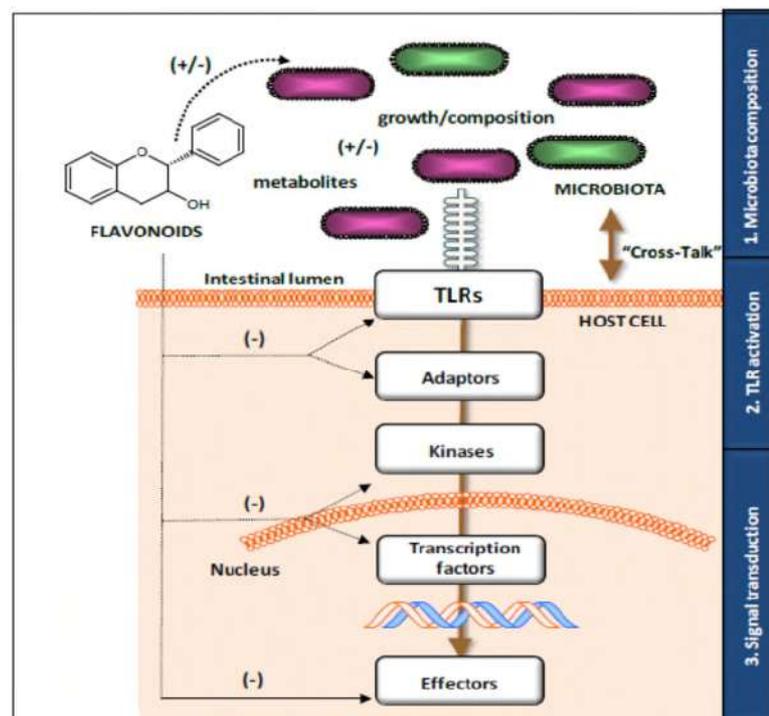
Gen TLR4 berperan mentranskripsi protein TLR4. Protein ini berfungsi sebagai reseptor pada permukaan sel fagosit yang dapat mengenali LPS bakteri *Salmonella sp.* Adanya protein reseptor TLR4 pada permukaan sel fagosit, akan memudahkan sel tersebut dalam menangkap *Salmonella sp.* yang berhasil menembus dinding usus dan mukosa usus. Hal ini merupakan awal proses fagositosis dari sel fagosit, termasuk makrofag. Selanjutnya

makrofag akan menghancurkan *Salmonella sp.* menjadi partikel-partikel kecil yang kemudian ditampilkan pada permukaan selnya. Pada saat yang demikian sel makrofag berperan sebagai *Antigen Presenting Cells* (APC). Peran makrofag ini merupakan respons imun non spesifik atau imun bawaan atau *innate immunity*. Reaksi tersebut selanjutnya akan menginduksi terjadinya respons imun spesifik yang diperantarai oleh sel T helper dan sel B untuk memproduksi antibodi spesifik. Pada manusia dan tikus, telah dibuktikan bahwa terjadinya mutasi pada gen TLR4, berdampak terhadap penurunan kemampuan individu dalam mengenali LPS dari bakteri *Salmonella sp.* Individu tersebut akan menjadi peka dan mudah terinfeksi bakteri *Salmonella sp.*⁴⁸

Jalur TLR dapat dimodulasi oleh flavonoid pada tingkat yang berbeda (Gambar 26). Baik ekspresi gen TLR dan ekspresi membran sel, yang secara langsung berkaitan dengan fungsi TLR, dapat dipengaruhi oleh flavonoid. Di bawah kondisi homeostasis IEC memiliki ekspresi rendah TLR2 dan TLR4, dan karena itu dalam konteks yang sehat, aktivasi TLR rendah; Namun, dalam skenario inflamasi, ekspresi TLR pada IEC meningkat dan kemudian sinyal TLR dipicu (De Kivit, S et al, 2014). Hasil terbaik mengenai efek down-regulatory flavonoid telah terbukti pada aktivasi TLR (yaitu, LPS sebagai in vitro aktivator TLR4) dan kurang berefek jika pada kondisi non stimulasi (yaitu, pada hewan/subyek sehat).

Makrofag J774 yang dirangsang LPS yang diterapi dengan flavonol engeletin dan astilbin menunjukkan penghambatan ekspresi gen TLR4

(Huang, H et al, 2011). Selain itu, kaempferol-3-O-sophoroside memberikan efek *down-regulated* ekspresi permukaan sel TLR2 dan TLR4 di sel endotel (Kim, T.H; Ku, S.K, Bae, J.S., 2012). Flavanoid seperti naringenin dan hesperidin telah menunjukkan efek yang serupa. Secara khusus, naringenin menurunkan-mengatur ekspresi protein TLR2 dan TLR4 dan tingkat mRNA TLR2. Tes lain dilakukan in vitro pada sel 3T3-L1 selama diferensiasi adipocyte dan in vivo pada C57Bl / 6j tikus setelah diet tinggi lemak, memberikan efek penghambatan naringenin pada ekspresi gen TLR2 (Yoshida, H et al, 2013)



Gambar 13. Gambaran mekanisme yang terlibat dalam pengaturan crosstalk mikrobiota-host oleh flavonoid ¹¹

Flavonoid dapat bertindak pada tiga tingkat yang berbeda dengan memodulasi: (1) komposisi mikrobiota, dengan cara langsung (flavonoid) atau tidak langsung (metabolit) yang mempengaruhi pertumbuhan; (2) Aktivasi Toll-like receptor (TLR), dengan cara bertindak pada reseptor dan protein adaptornya; (3) transduksi sinyal, dengan cara mengganggu kinase hulu dan hilir serta faktor transkripsi yang terlibat dalam aktivasi respon inflamasi dan kekebalan.

Berikut ini adalah beberapa penelitian *in vitro* dan *in vivo* flavonoid pada ekspresi gen TLR dan protein :

Antioxidants 2014, 3 657

Table 1. Flavonoids on TLR gene and protein expression in *in vitro* studies.

Flavonoid	Dose	Duration ¹	TLR ²	Studied Target	Cell (Challenge)	Reference
FLAVONOLS Engeletin			↓ TLR4	mRNA		
Astilbin	10/50 µM	2 h	↓ TLR4	mRNA	J774 macrophages (LPS)	[53]
Kaempferol-3-O-sophoroside	–	6 h	↓ TLR2 ↓ TLR4	Protein	Endothelial cells	[54]
Quercetin	25 µM	1 h	↓ TLR2 ↓ TLR4	Protein	PBMC	[55]
FLAVANONES Naringenin	1 µg/mL	48 h	↓ TLR2	Protein/mRNA	J774 macrophages (<i>C. trachomatis</i>)	[56]
Naringenin	100 µM	–	↓ TLR2	mRNA	3T3L1 cells (adipocyte differentiation)	[57]
FLAVANOLS Epigallocatechin-3-gallate	1 µM	24 h	↓ TLR4	Protein/mRNA	RAW 264.7 macrophages (LPS)	[58]
Epigallocatechin-3-gallate	10 µM	24 h	↔ TLR4	mRNA	Murine bone marrow-derived DCs (unstimulated)	[59]
FLAVONES Baicalin	40/80 µM	24 + 3 h	↔ TLR1-9	mRNA	Human oral keratinocytes (LPS)	[60]
Baicalin	5/10 µg/mL	0.5–6 h	↓ TLR2 ↓ TLR4	Protein/mRNA Protein/mRNA	PC12 and primary rat neurons (oxygen glucose deprivation)	[61]

Notes: ¹ Treatment duration is showed when detailed in the article, if it is not provided a (–) is showed; ² Changes in gene expression are summarized by means of an increase (↑), decrease (↓) or not affected (↔) by the intervention.

Gambar 14. Beberapa penelitian *in vitro* Flavonoid pada ekspresi gen TLR dan protein ¹¹

Table 2. Flavonoids on TLR gene or protein expression in *in vivo* studies.

Flavonoid	Dose	Duration	TLR ^{1,2}	Studied Target	Cell	Reference
FLAVONES Luteolin	Daily dose of 10 and 25 mg/kg body weight	24/78 h	↓ TLR4 ↓ TLR5	Protein/ mRNA	Cerebral cortex from p.o. ³ fed SD rats	[62]
Baicalin	One dose of 50 mg/kg body weight	4 h	↓ TLR2 ↓ TLR4	Protein/ mRNA	Mice hippocampus cells (carotid arteries ligation)	[61]
FLAVANONE S Naringenin EXTRACTS	1% included in food	16 weeks	↓ TLR2	mRNA	Adipocytes C57BL/6J mice after HFD	[57]
<i>Achyrocline satureoides</i> (Quercetin and Luteolin)	One dose of 100 mg/kg	1 h	↓ TLR4	Protein	Neutrophils from p.o fed Wistar rats	[63]
Cocoa (Procyanidins)	5%/10% included in food	3 weeks	↔, ↓ TLR2 ↔, ↔ TLR4 ↔, ↓ TLR7 ↔, ↑ TLR9 ↔, ↓, ↔ TLR2	mRNA	Small intestine and mesenteric lymph nodes from p.o fed Wistar rats	[64]
Cocoa (Procyanidins)	10% included in food	7 weeks	↓, ↑, ↔ TLR4 ↔, ↓, ↔ TLR7 ↔, ↑, ↑ TLR9	mRNA	Small intestine, Peyer's patches and mesenteric lymph nodes from p.o fed Wistar rats	[65]
Cocoa (Procyanidins)	10% included in food	6 weeks	↔ TLR2 ↔ TLR4 ↔ TLR7 ↓ TLR9	mRNA	Large intestine from p.o fed Wistar rats	[30]
Orange juice (Flavonones)	One dose of 300 kcal drink of orange juice	1/3/5 h	↓ TLR2 ↓ TLR4	mRNA Protein	Mononuclear cells from healthy subjects given high-fat high-carbohydrate meal	[66]
Orange juice (Flavonones)	One dose of 300 kcal drink of orange juice	1/3/5 h	↔ TLR4	mRNA Protein	Mononuclear cells from healthy subjects given high-fat high-carbohydrate meal	[67]

Notes: ¹ The TLR changes are expressed as the effect on each studied tissue in the same order as mentioned on the cell/challenge column separated among them with a comma; ² Changes in gene expression are summarized by means of an increase (↑), decrease (↓) or not affected (↔) by the intervention; ³ p.o. means *per os* or administration by oral route.

Gambar 15. Beberapa penelitian *in vivo* Flavonoid pada ekspresi gen TLR dan protein¹¹

2.5. Interleukin 6 (IL-6)

Salah satu tanggapan paling awal dari sistem kekebalan tubuh bawaan untuk infeksi dan kerusakan jaringan adalah sekresi sitokin oleh sel-sel jaringan, yang sangat penting untuk peradangan akut. Sitokin imunitas innate memiliki beberapa sifat dan fungsi umum (Gambar 19).

Sitokin adalah protein yang dibuat oleh sel-sel yang mempengaruhi perilaku sel-sel lain. Sitokin bertindak pada reseptor sitokin tertentu dalam sel yang mereka pengaruh. Sitokin merupakan protein-protein kecil sebagai mediator dan pengaruh imunitas, inflamasi dan hematopoiesis. Sitokin adalah salah satu dari sejumlah zat yang disekresikan oleh sel-sel tertentu dari sistem kekebalan tubuh yang membawa sinyal antara sel-sel local dan memiliki efek pada sel-sel lain. Sitokin dihasilkan sebagai respon terhadap stimulus sistem imun. Sitokin bekerja dengan mengikat reseptor-reseptor membrane spesifik, yang kemudian membawa sinyal ke sel melalui second messenger (tirosin kinase), untuk mengubah aktivitasnya (ekspresi gen).

Respon-respon terhadap sitokin diantaranya meningkatkan atau menurunkan ekspresi protein-protein membrane termasuk reseptor-reseptor sitokin, proliferasi dan sekresi molekul-molekul efektor. Sitokin bisa bereaksi pada sel-sel yang mensekresinya atau aksi autokrin, pada sel-sel terdekat dari sitokin disekresi atau aksi parakrin. Sitokin bisa juga bereaksi secara sinergis dua atau lebih sitokin bereaksi secara bersama-sama atau secara antagonis

sitokin menyebabkan aktivitas yang berlawanan. Sitokin anti inflamasi adalah serangkaian molekul immune regulator mengontrol respon sitokin pro inflamasi. Sitokin bekerja dalam kaitan dengan inhibitor sitokin spesifik yang larut untuk mengatur respon kekebalan tubuh manusia. Peran fisiologisnya dalam peradangan dan peran patologis pada kondisi inflamasi sistemik semakin diketahui. Sitokin antinflamasi mayor termasuk antagonis reseptor interleukin (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 dan IL-13. Reseptor sitokin spesifik untuk IL-1, TNF α dan IL-6 juga berfungsi sebagai inhibitor sitokin proinflamasi.

Sitokin diproduksi terutama oleh makrofag dan jaringan sel dendritik, meskipun jenis sel lainnya, termasuk endotel dan beberapa sel epitel juga bisa menghasilkan. Sebagian besar sitokin ini bekerja pada sel yang dekat dengan sel asal (aksi parakrin). Pada beberapa infeksi berat, cukup dari sitokin yang dapat diproduksi yang dimasukkan dalam sirkulasi dan bertindak dari kejauhan (aksi endokrin). Berbagai sitokin memiliki tindakan yang sama atau tumpang tindih, atau secara fungsional unik. Satu sitokin dapat menstimulasi produksi orang lain, sehingga menyiapkan cascades itu memperkuat reaksi atau menginduksi reaksi baru. Sitokin imunitas innate melayani beberapa peran: menginduksi peradangan, menghambat replikasi virus, mempromosikan tanggapan sel T, dan membatasi kekebalan tubuh bawaan ²⁷.

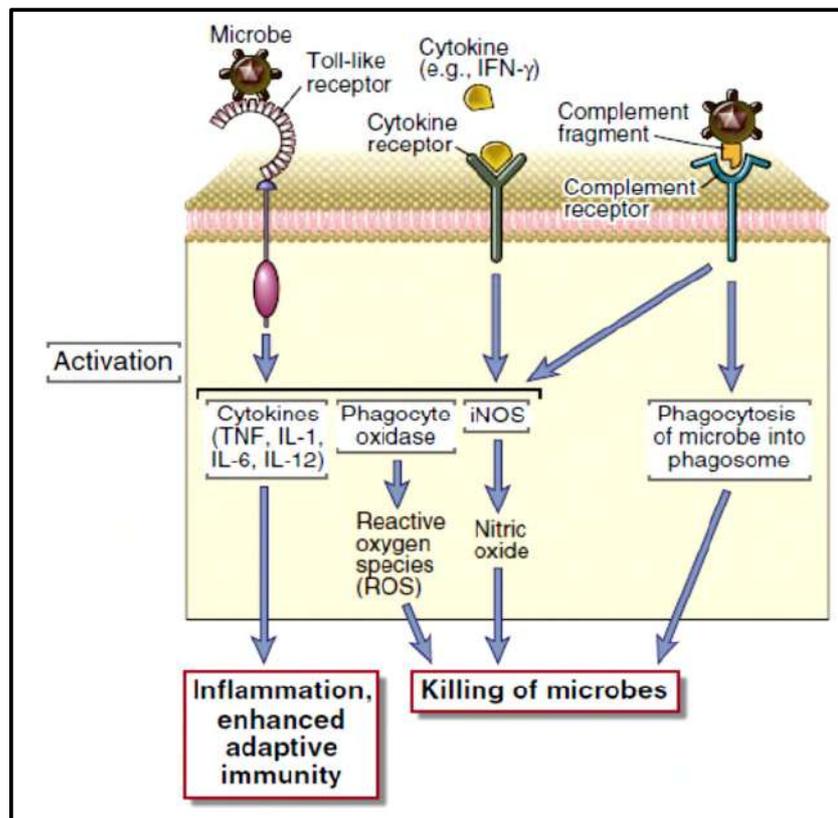
IL-6 adalah sitokin penting lainnya pada reaksi inflamasi akut yang memiliki efek lokal dan sistemik. Ini menginduksi mediator sintesis berbagai inflamasi lainnya di hati, merangsang produksi neutrophil di sumsum tulang,

dan mempromosikan diferensiasi IL-17 dalam menghasilkan sel T pembantu. IL-6 disintesis oleh fagosit mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblas, dan sel lain dalam menanggapi PAMPs dan sebagai reaksi terhadap IL-1 dan TNF. IL-6 adalah homodimer termasuk keluarga tipe I cytokine. Reseptor untuk IL-6 terdiri dari polipeptida yang mengikat sitokin rantai dan subunit sinyal-transduksi (disebut gp130) yang juga merupakan komponen sinyal reseptor untuk sitokin lain. Reseptor IL-6 melakukan pensinyalan jalur yang mengaktifkan faktor transkripsi STAT3.

Interleukin 6 berfungsi dalam imunitas non spesifik dan spesifik yang diproduksi oleh fagosit mononuclear, sel endotel, vascular, fibroblast dan sel lain sebagai respon terhadap mikroba dan sitokin lain ⁴⁹. Interleukin 6 memiliki *pleiotropic*, yang pada awal munculnya ditemukan sebagai sel B yang menstimulasi faktor-2 yang menginjeksi sel B aktif dalam produksi antibody. IL-6 dikombinasikan dengan TGF- β , menginjeksi diferensiasi sel T CD4-positif menjadi sel Th-17 sedangkan IL-6 menghambat injeksi TGF- β , yang mengatur perkembangan sel T regulator (Treg). Akibat ketidakseimbangan ini Th-17/Treg dapat menyebabkan produksi protein fase akut seperti CRP. Fibrinogen serum amyloid dan hepcidin sambil mengurangi sintesis albumin dalam hepatosit.

TNF, IL-1, dan IL-6 memiliki beberapa efek inflamasi lokal dan sistemik. TNF dan IL-1 bertindak atas leukosit dan endothelium menginduksi peradangan akut, dan kedua sitokin menginduksi ekspresi IL-6 dari leukosit

dan sel jenis lain. TNF, IL-1, dan IL-6 memediasi efek sistemik pelindung inflamasi, termasuk induksi demam, sintesis protein fase akut oleh hati, dan peningkatan produksi leukosit oleh sumsum tulang. TNF sistemik dapat menyebabkan kelainan patologis yang menyebabkan syok septik, termasuk penurunan jantung fungsi, trombosis, kebocoran kapiler, dan kelainan metabolik karena resistensi insulin (gambar 20)



Gambar 16. Fungsi dari makrofag²⁷

2.6. Tinjauan Tentang Jeruk Nipis (*Citrus Aurantifolia*)

2.6.1. Klasifikasi tumbuhan jeruk nipis

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Sapindales
Keluarga	: Rutaceae
Genus	: Citrus
Spesies	: Citrus aurantifolia
Nama Binomial	: Citrus aurantifolia (Christm.) Swingle ⁵⁰

2.6.2. Morfologi tumbuhan jeruk nipis

Jeruk nipis termasuk salah satu jenis citrus jeruk. Jeruk nipis termasuk jenis tumbuhan perdu yang banyak memiliki dahan dan ranting. Tingginya sekitar 0,5-3,5 m. Batang pohonnya berkayu ulet, berduri, dan keras. Sedangkan permukaan kulit luarnya berwarna tua dan kusam. Daunnya majemuk, berbentuk ellips dengan pangkal membulat, ujung tumpul, dan tepi beringgit. Panjang daunnya mencapai 2,5-9 cm dan lebarnya 2-5 cm. Sedangkan tulang daunnya menyirip dengan tangkai bersayap, hijau dan lebar 5-25 mm. Bunganya berukuran majemuk/tunggal yang tumbuh di ketiak daun atau di ujung batang dengan diameter 1,5-2,5 cm. Kelopak bunga berbentuk seperti

mangkok berbagi 4-5 dengan diameter 0,4-0,7 cm berwarna putih kekuningan dan tangkai putik silindris putih kekuningan. Daun mahkota berjumlah 4-5, berbentuk bulat telur atau lanset dengan panjang 0,7-1,25 cm dan lebar 0,25-0,5 cm berwarna putih.

Tanaman jeruk nipis pada umur 2 1/2 tahun sudah mulai berbuah. Buahnya berbentuk bulat sebesar bola pingpong dengan diameter 3,5-5 cm berwarna (kulit luar) hijau atau kekuning-kuningan. Tanaman jeruk nipis mempunyai akar tunggang. Buah jeruk nipis yang sudah tua rasanya asam. Tanaman jeruk umumnya menyukai tempat-tempat yang dapat memperoleh sinar matahari langsung ⁵¹

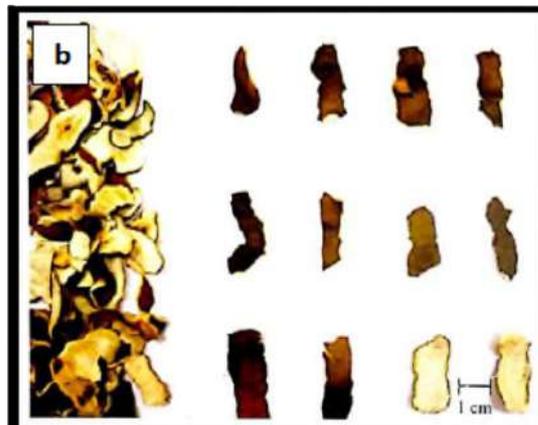


Gambar 17. Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

2.6.3. Deskripsi simplisia kulit buah jeruk nipis

Pada penelitian ini kami mengambil ekstrak kulit jeruk nipis, berdasarkan penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa khasiat

antimikroba berupa kandungan fenol dan flavonoid lebih banyak kandungannya terdapat pada kulit dibandingkan pada daun ⁷. Irisan tipis kulit buah dengan tepi tidak rata, permukaan luar berwarna hijau kecoklatan, permukaan bagian dalam putih kekuningan, bau khas, rasa kelat, pahit, dan sedikit asam (Kemenkes RI, 2011). Gambar simplisia kulit buah jeruk nipis ditampilkan pada gambar 22.



Gambar 18. Simplisia kulit buah jeruk nipis (Kemenkes RI, 2011)

2.6.4. Manfaat tumbuhan jeruk nipis

Jeruk nipis telah banyak dimanfaatkan sebagai pengobatan secara turun temurun. Jeruk nipis memiliki khasiat empiris sebagai obat batuk, obat penurun panas, dan obat pegel linu (Depkeskesos RI, 2001). *Citrus aurantifolia* dapat digunakan untuk menyembuhkan berbagai penyakit. Penelitian sebelumnya telah dilakukan uji aktivitas terhadap *Citrus aurantifolia* dan menunjukkan tanaman ini mempunyai aktivitas untuk menyembuhkan sakit

tenggorokan, sinusitis, bronchitis, asma, demam dingin, rheumatoid arthritis, obesitas, selulit, herpes serta bisa membersihkan kulit berminyak dan jerawat. Menurut American Journal of Essential Oils and Natural Products (2014) tanaman ini mempunyai aktivitas antioksidan, antikolinesterase, antituberculosis, dan antibakteri^{50,51}

Kulit buah *C.aurantifolia* telah ditemukan sangat berguna secara domestik. Di dapur, digunakan untuk memasak, penambah rasa untuk makanan, kue dan ayam panggang. Untuk hiasan salad dan menambah rasa pada air minum. Digunakan untuk mandi dan mencuci rambut, dan juga, sebagai pewangi untuk menyegarkan bau sampah dan tumpukan komposit. Ini juga berfungsi sebagai alami penyegar ruangan. Telah ditemukan berguna sebagai repellent; digunakan untuk mengusir nyamuk dari tubuh, ngengat dari kain dan kucing dari kebun. Kulit buah jeruk telah diubah menjadi gas yang mudah menguap melalui daya tinggi microwave. Gas kemudian disuling menjadi cairan digunakan untuk membuat plastik⁵¹

Citrus aurantifolia Swingle yang dibudidayakan di Calabria, Italia. Produk utama yang diperoleh dari kulit *C.aurantifolia* adalah permen dan minuman manis, sedangkan minyak adalah produk minor, digunakan sebagai penyedap dalam manisan dan minuman. *C.aurantifolia* juga dikenal sebagai obat yang meringankan demam, sakit tenggorokan, batuk, pilek dan gangguan pencernaan. Temuan dari penelitian terbaru menunjukkan bahwa *C.aurantifolia* penting untuk pengobatan obesitas yang diinduksi obat, karena

mempengaruhi asupan makanan serta beragam proses terlibat dalam pengeluaran energi dan pemanfaatan bahan bakar, semuanya menekan kenaikan berat badan. Selain itu, ekstrak kulit dari *C. aurantifolia* penting dipelajari untuk mengevaluasi kapasitas antioksidan mereka melalui metode yang berbeda yakni potensi acetylcholinesterase (AChE) dan aktivitas penghambatan butyrylcholinesterase (BChE) ⁷

2.6.5. Kandungan kimia *Citrus aurantifolia*

Citrus aurantifolia adalah tanaman obat dan makanan penting yang banyak dibudidayakan di banyak bagian dunia. Ini dihargai karena kualitas gizi dan banyak manfaat kesehatan.

Tanaman ini digunakan secara tradisional obat sebagai antiseptik, antivirus, antijamur, anthelmintik, astringen, diuretik, obat penolak nyamuk, untuk pengobatan penyakit perut, sembelit, sakit kepala, radang sendi, pilek, batuk, sakit tenggorokan dan digunakan sebagai stimulan nafsu makan. Penggunaan jeruk nipis sebagai antibakteri telah banyak dikembangkan, terlihat pada penggunaan-penggunaan produk-produk rumah tangga sudah mencampurkan bahan alam atau ekstraksi dari jeruk nipis dan melabel sebagai antibakteri. Penelitian tentang manfaat jeruk nipis juga telah banyak dilakukan dalam menganalisis aktivitasnya sebagai antibakteri, antioksidan dan antiinflamasi.

Manfaat kesehatan dari citrus *aurantifolia* ini berhubungan dengan tingginya jumlah senyawa fotokimia dan bioaktif seperti flavonoid, limonoid, fenol, karotenoid, mineral dan vitamin ⁵¹ Analisis dari ekstrak heksana kulit buah *C. aurantifolia* teridentifikasi mengandung 44 komponen volatil, termasuk monoterpena (16,00%), sesquiterpenes (6,55%), coumarin (27,37%), asam lemak (9,78%), dan beberapa senyawa aromatik dan non-aromatik beroksigen lainnya (40,30%) ⁵²

Dari beberapa kajian yang didapatkan, kandungan kulit *citrus aurantifolia* paling banyak menyajikan golongan senyawa flavonoid, essential oils (minyak atsiri), dan fenol. Pada penelitian ini didapatkan bahwa pada ekstrak kulit jeruk nipis mengandung senyawa, polifenol, flavonoid, tannin, saponin, alkaloid dan triterpenoid. Beberapa senyawa ini akan dibahas satu persatu;

A. Flavonoid

Secara kimia, flavonoid adalah polifenol yang umumnya ditemukan terkonjugasi menjadi gula (sebagai bentuk glikosilasi) meskipun beberapa dari mereka dapat eksis sebagai aglikon bebas. Struktur flavonoid dasar adalah inti flavan yang terdiri dari rangka 15 karbon yang tersusun dalam dua cincin fenil yang terikat oleh jembatan tiga-karbon yang umumnya disiklisisasi dengan oksigen, kemudian membentuk tiga cincin berlabel A, B, C (Gambar 29). Berbagai kelas flavonoid berbeda dalam tingkat oksidasi dan pola substitusi

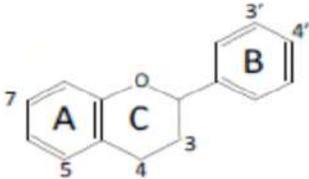
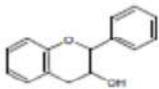
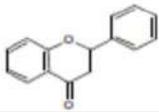
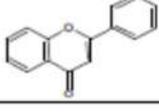
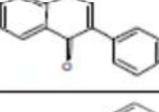
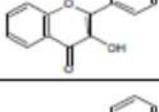
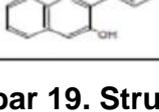
pada cincin C sementara senyawa individu dalam kelas berbeda dalam pola pada substitusi cincin A dan B. Kelas utama flavonoid adalah flavonol, flavon, flavanon, isoflavon, flavanol dan anthocyanidin ¹¹.

Berikutnya adalah golongan flavonoid. Diketahui bahwa kulit jeruk nipis mengandung bahan aktif yang diduga dapat memberikan efek antibakteri, yakni salah satunya juga adalah flavonoid. Flavonoid dalam aktivitas antibakterinya melawan bakteri bisa terjadi disebabkan oleh penghambatan DNA gyrase. Ohemeng dkk. Meneliti 14 flavonoid dari berbagai struktur untuk aktivitas penghambatan terhadap DNA gyrase *E. coli*, dan untuk aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhimurium* dan *Stenotrophomonas maltophilia* [68]. Ditemukan bahwa DNA girase *E. coli* dihambat dengan tujuh senyawanya, termasuk quercetin, apigenin dan pentahydroxyflavone ⁹

Flavonoid menghambat sintesis asam nukleat. Flavonoid juga dapat menghambat fungsi membrane sitoplasma. Pada konsentrasi sesuai dengan nilai MIC (*minimum inhibitory concentration*), sophoraflavanone G dapat meningkatkan polarisasi fluoresensi liposom secara signifikan. Peningkatan ini menunjukkan perubahan fluiditas membran di daerah hidrofilik dan hidrofobik, menunjukkan bahwa sophoraflavanone G mengurangi fluiditas lapisan luar dan dalam membran. Naringenin juga menunjukkan efek membran tetapi pada konsentrasi yang jauh lebih tinggi. Korelasi antara aktivitas antibakteri ini dan gangguan membran disarankan untuk mendukung teori bahwa

sophoraflavanone G menunjukkan antibakteri aktivitas dengan mengurangi fluiditas membran sel bakteri ⁹.

Jeruk kaya akan flavonoid dan yang paling melimpah flavonoid pada ekstrak *C. aurantifolia* meliputi: apigenin, rutin, quercetin, kaempferol, nobiletin, hesperidin, hesperitin, dan neohesperidin.

Basic structure	
	
Chemical structure	Family name: representative compounds
	Flavanols: epicatechin, epicatechin-3-gallate, epigallocatechin-3-gallate
	Flavanones: eriodictyol, hesperetin, naringenin
	Flavones: baicalein, chrysin, eupalidin, luteolin
	Isoflavones: daidzein, equol, genistein
	Flavonols: quercetin, morin, kaempferol, myricetin
	Anthocyanidins: cyanidin, delphinidin, malvidin

Gambar 19. Struktur kimia dan senyawa perwakilan dari famili utama flavonoid ¹¹

Flavonoid memiliki sifat yang kuat kemampuan untuk memodifikasi reaksi tubuh terhadap alergen, virus, dan karsinogen. Flavonoid menunjukkan anti-alergi, anti-inflamasi, antimikroba dan aktivitas anti kanker. Quercetin, salah satu flavonoid yang paling aktif memiliki aktivitas anti-inflamasi yang signifikan karena langsung menghambat beberapa proses awal peradangan. Quercetin juga menunjukkan sifat anti-tumor yang luar biasa dan mungkin memiliki efek positif dalam memerangi atau membantu mencegah kanker, prostatitis, penyakit jantung, katarak, alergi / radang dan penyakit pernapasan seperti bronkitis dan asma [9].

Flavonoid terdistribusi secara luas pada kerajaan tumbuhan yang memiliki pigmen, sering berfluoresensi setelah radiasi UV. Flavonoid juga berperan sebagai regulator metabolik dan melindungi sel dari radiasi UV. Flavonoid memiliki fungsi kunci dalam mekanisme pengenalan biokimia dan transduksi signal, mirip dengan regulator pertumbuhan.

Flavonoid dalam tumbuhan mempunyai empat fungsi : 1) Sebagai pigmen warna, 2) Fungsi fisiologi dan patologi, 3) Aktivitas Farmakologi, dan 4) Flavonoid dalam makanan. Aktifitas Farmakologi dianggap berasal dari rutin (glikosida flavonol) yang digunakan untuk menguatkan susunan kapiler, menurunkan permeabilitas dan fragilitas pembuluh darah, dll. Gabor menyatakan bahwa flavonoid dapat digunakan sebagai obat karena mempunyai bermacam macam bioaktivitas seperti antiinflamasi, anti bakteri, anti kanker, antifertilitas, antiviral, antidiabetes, antidepresant, diuretic, dll.

Semakin banyak penelitian dimana flavonoid menjadi subyek medis. Dilaporkan flavonoid memiliki banyak manfaat, termasuk aktivitas antiinflamasi, oestrogenik, penghambatan enzim, antimikroba, antiallergic, antioksidan, aktivitas vascular dan antitumour sitotoksik⁹. Beberapa peneliti telah melaporkan hubungan sinergi yang terjadi secara alami antara beberapa golongan flavonoid dan agen antibakteri lainnya dalam melawan strain bakteri yang resisten. Contoh berikut yang mempunyai aktivitas antibakteri adalah epicatechin gallate (golongan flavan-3-ols)⁵³ dan sophoraflavanone (golongan flavanones dan glycosides)⁵⁴. Adapun flavon alami yang dimodifikasi secara sintesis untuk aktivitas antibakteri adalah kompleks 5-hidroksi-7,4-dimethoxyflavone dengan sejumlah logam transisi dimana meningkatkan aktivitas antibakteri⁵⁵. Dua penelitian kelompok telah menggambarkan penggunaan flavonoid in vivo. Sebuah studi oleh Vijaya dan Ananthan, pemberian oral dari golongan flavonols dan glycosides lainnya 142,9mg/kg Quercetin atau 214,3 mg/kg Quercetrin pada kelinci percobaan melawan infeksi Shigella. Dilaporkan juga bahwa suntikan intraperitoneal 1,58 mg/kg sophoraisoflavan A atau 3,16mg/kg 6,8-diprenylgenistein memberikan perlindungan yang signifikan terhadap tikus yang tertantang dengan $\sim 9,5 \times 10^8$ unit pembentuk koloni (CFU) dari *Salmonella typhimurium*⁵⁶.

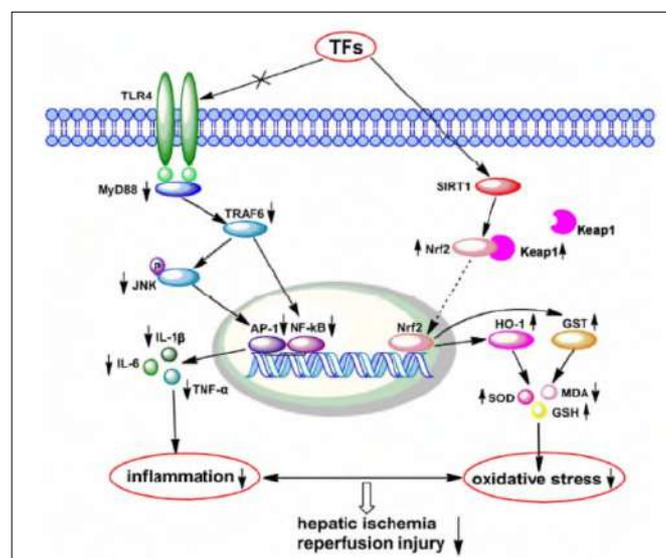
Beberapa kelompok penelitian telah berusaha untuk menentukan apakah aktivitas flavonoid bersifat bakteristatik atau bakterisida dengan melakukan studi *time-kill*. Dalam percobaan tersebut, epigallocatechin gallate

[89], galangin [75] dan 3-O-octanoyl- (+) - catechin [94] telah terbukti menyebabkan pengurangan 1000 kali lipat atau lebih dalam jumlah yang layak MRSA-YK, *S. aureus* NCTC6571 dan EMRSA-16, masing-masing. Ini menunjukkan bahwa flavonoid mampu aktivitas bakterisida. Namun, baru-baru ini telah ditunjukkan bahwa 3-O-octanoyl - (-) - epicatechin menginduksi pembentukan agregat pseudomultiseluler baik dalam antibiotik-sensitif dan strain resisten antibiotik *S. aureus* [94]. Jika fenomena ini diinduksi oleh senyawa lain dalam kelas flavonoid, pertanyaan muncul terkait interpretasi hasil dari studi *time-kill*. Itu mungkin bahwa flavonoid tidak membunuh sel bakteri tetapi hanya menginduksi pembentukan agregat bakteri dan dengan demikian mengurangi jumlah CFU dalam jumlah yang layak ⁹.

Penelitian yang dilakukan di Jepang (2012) tentang efek dari flavonoid citrus yakni naringenin dapat menghambat ekspresi TLR2 pada adiposit. Naringenin adalah suatu zat yang aktif dari flavonoid golongan Flavanones dan glycosidanya yang terkandung dalam seluruh family jeruk dan tomat. Efek ini dimediasi sebagian melalui aktivasi *peroxisome proliferator-activated reseptor* γ . Selain itu, naringenin menekan ekspresi TLR2 yang disebabkan oleh *co-culture of differentiated* adiposit dan makrofag dan juga menghambat ekspresi TLR2 tumor necrosis factor- α (TNF- α) dengan menghambat pengaktifan faktor Nf- κ B dan jalur c-Jun NH2-terminal kinase pada adiposit yang berbeda. Selanjutnya, naringenin menurunkan ekspresi TLR2 pada jaringan adiposa tikus dengan diet tinggi lemak. Hasil ini berkorelasi dengan peningkatan

hiperglikemia dan penekanan mediator inflamasi, termasuk TNF- α dan monosit. protein kemotaktik-1⁵⁷. Secara keseluruhan, data ini menunjukkan bahwa naringenin menunjukkan sifat anti-inflamasi, dengan menghambat ekspresi TLR2 di adiposit.

Hasil RT-PCR pada penelitian yang dilakukan di China membuktikan bahwa flavonoid menurunkan regulasi tingkat gen inflamasi termasuk interleukin-1 beta (IL-1), interleukin-1 (IL-6), dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hepatoproteksi yang diinduksi oleh flavonoid menghambat TLR4 / MyD88 dan mengaktifkan jalur signaling Sirt1 / Nrf2. Blokade dari TLR4 jalur oleh flavonoid menghambat aktivitas transkripsi NF- κ B dan AP-1 dan reaksi inflamasi⁵⁸



Gambar 19. Efek perlindungan dari Total Flavonoid (TF) terhadap kerusakan hepar. TF mengatur stress oksidatif dan reaksi inflamasi melalui penghambatan sinyal TLR4 / MyD88 dan aktivasi pensinyalan Sirt1 / Nrf2⁵⁸

B. Minyak Atsiri atau *Essential Oils*

Buah jeruk dan jus adalah sumber penting antioksidan seperti asam askorbat, flavonoid, dan juga senyawa fenolik. Kulit jeruk, sebagai limbah industri pertanian, adalah potensinya sumber Essential Oils (EO) (Fernandez-Lopez et al., 2005). Sejak citrus EO terutama terletak di kulit buah; sangat tepat dilakukan daur ulang kulit ini, produk yang berharga dapat diperoleh dalam bentuk minyak kupas ⁵⁹

No.	Compound	Retention time (min)	%
1	DL-limonene	6.59	46.93
2	γ -terpinene	6.89	16.89
3	tri-cyclen	7.27	6.67
4	1-beta-pinene	5.46	4.69
5	2-beta-pinene	5.29	3.86
6	Beta-bisabolene	15.55	3.15
7	3-cyclohexenone	9.19	2.19
8	bicycloheptene	13.96	2.19
9	alpha pinene	5.54	1.81
10	neryl acetate	12.6	1.63
11	δ , 2-Octadien	12.92	1.29

* The minor components have not been shown

Gambar 20. Analisis kimia dari komponen utama * minyak esensial kulit lemon ⁵⁹

Minyak atsiri atau biasa disebut juga essential oils, kandungan monoterpenya bersifat lipofilik, cenderung berdifusi ke fasa struktur membrane bakteri dibandingkan ke fasa air, menyebabkan destabilitas membrane dimana membrane menjadi *swelling* kemudian permeabilitas membrane meningkat sehingga merusak membrane yang mengikat protein sel

bakteri dan terjadi kematian mikroorganismenya⁶⁰. Unsur kimia utama pada minyak atsiri adalah *D-limonene*, yang menyebabkan aroma yang tajam pada jeruk nipis dan bersifat antibakteri dan gastroprotektif⁶ untuk mengatasi gastrotoksitas. Minyak atsiri juga menunjukkan aktivitas penghambatan spektrum terhadap berbagai bakteri Gram positif dan bakteri Gram negative (Edris, 2007; Lang dan Buchbauer, 2012; Teixeira et al., 2013). Efikasi antibakteri dapat bervariasi dengan minyak serta dengan bakteri yang berbeda.

Interaksi *Essential Oils* (EO) dan komponennya dengan polisakarida, asam lemak dan fosfolipid membuat membran bakteri menjadi mudah terbakar (*more permeable*) sehingga menyebabkan hilangnya ion dan kandungan seluler dan sel menjadi mati. Gangguan pada aktivitas pompa proton, kehilangan integritas membran,⁵⁹ kebocoran kandungan seluler dapat menyebabkan hilangnya viabilitas. Mekanisme kerja penting lainnya adalah denaturasi protein sitoplasma dan inaktivasi sel-sel otak yang menyebabkan kematian sel bakteri⁶¹.

Konsentrasi minimum EO 99,9% populasi bakteri setelah inkubasi pada 35-37 °C selama 24 jam dianggap MBC (minimum bactericidal concentration) (Azizkhani et al., 2013). Konsentrasi EO di sumur yang menghasilkan lempeng tanpa koloni yang terlihat menjadi MBC⁵⁹.

EO juga mempunyai efek sebagai antinflamasi dengan penghambatan lipooxygenase, pencegahan sintesis leukotren, penghambatan enzim COX-2,

menghambat sitokin pro-inflamasi (IL-1, TNF α) dan juga mempunyai efek sitotoksik pada sel eukariotik⁶¹ sehingga beresiko toksisitas berupa iritasi dan korosi sehingga membatasi penggunaan.

C. Fenol

Senyawa fenolat merupakan komponen senyawa yang memiliki satu atau lebih gugus hidroksil yang terikat pada cincin aromatic. Basic struktur dari senyawa fenolat adalah fenol.

Kulit jeruk nipis juga diketahui mengandung senyawa Fenolat yang bisa meningkatkan permeabilitas membrane. Mekanisme aksi penghambatan senyawa fenolat pada mikroorganisme di karenakan oleh gangguan pada integritas membran sel dan sintesis komponen struktural bakteri. Aktivitas antimikroba dari senyawa fenolik terkait dengan inaktivasi enzim seluler, yang tergantung pada tingkat penetrasi zat ke dalam sel atau disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran. Permeabilitas membrane yang meningkat merupakan faktor utama dalam mekanisme antimikroba, dimana senyawa dapat mengganggu membran dan menyebabkan hilangnya integritas sel dan kematian sel akhirnya⁶².

Penelitian yang dilakukan oleh Loizzo et.al (2012), Jumlah total fenolat dari sampel *C. aurantifolia* yang ditentukan dengan metode Folin-Ciocalteu. Kandungan total fenol pada ekstrak kulit yang menggunakan pelarut MeOH (methanol) didapatkan 7,6% lebih besar dibandingkan menggunakan pelarut

n-hexana fraction hanya sebesar 1%, yang dinyatakan dalam milligram pergram ekstrak.

D. Tanin

Bahan aktif lainnya yang mempunyai efek antibakteri dari kulit jeruk nipis adalah tanin, yang dapat mempengaruhi permeabilitas membran sitoplasma. Tanin dinamakan juga asam tanat dan asam glutamat. Biasanya tidak berwarna tetapi ada juga yang berwarna coklat. Istilah tannin yang dipakai ahli pangan ada dua yaitu; tanin terkondensasi (*condensed tannin*) dan tannin terhidrolisasi (*hidrolized tannin*). Tanin merupakan salah satu senyawa kimia yang termasuk dalam golongan polifenol yang diduga dapat mengikat salah satu protein membrane yang dimiliki oleh bakteri dan apabila hal ini terjadi maka dapat merusak ketersediaan reseptor pada permukaan sel bakteri sehingga mengganggu proses metabolisme sel tersebut. Tanin telah dibuktikan dapat membentuk kompleks senyawa yang irreversibel dengan prolin, yaitu suatu protein lengkap, yang mana ikatan ini mempunyai efek penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel.

Tanin adalah senyawa fenol yang memiliki berat molekul 500-3000 daltons (Da). Tanin diklasifikasi atas dua kelompok atas dasar tipe struktur dan aktivitasnya terhadap senyawa hidrolitik, yaitu tanin terkondensasi (*condensed tannin*) dan tanin yang dapat dihidrolisis (*hyrolyzable tannin*). Mekanisme kerja

senyawa tanin yaitu menghambat pembentukan polipeptida dinding sel bakteri yang menyebabkan lisisnya dinding sel sehingga sel bakteri mati.

Sifat utama tanin tumbuh-tumbuhan tergantung pada gugusan fenolik - OH yang terkandung dalam tanin, dan sifat tersebut secara garis besar dapat diuraikan sebagai berikut:

Secara kimia sifat tanin adalah sebagai berikut:

- 1) Tanin memiliki sifat umum, yaitu memiliki gugus phenol dan bersifat koloid.
- 2) Semua jenis tanin dapat larut dalam air, metanol, etanol, aseton dan pelarut organik lainnya. Kelarutannya besar, dan akan bertambah besar apabila dilarutkan dalam air panas.
- 3) Dengan garam besi memberikan reaksi warna. Reaksi ini digunakan untuk menguji klasifikasi tanin, karena tanin dengan garam besi memberikan warna hijau dan biru kehitaman.
- 4) Tanin akan terurai menjadi *pyrogallol*, *pyrocatechol* dan *phloroglucinol* bila dipanaskan sampai suhu (99 -102 oC).
- 5) Tanin dapat dihidrolisa oleh asam, basa dan enzim.

Secara fisik sifat tanin adalah sebagai berikut:

- 1) Umumnya tanin mempunyai berat molekul tinggi dan cenderung mudah dioksidasi menjadi suatu polimer, sebagian besar tanin bentuknya amorf dan tidak mempunyai titik leleh.

- 2) Tanin berwarna putih kekuning-kuningan sampai coklat terang, tergantung dari sumber tanin tersebut.
- 3) Tanin berbentuk serbuk atau berlapis-lapis seperti kulit kerang, berbau khas dan mempunyai rasa sepat (astrigent).
- 4) Warna tanin akan menjadi gelap apabila terkena cahaya langsung atau dibiarkan di udara terbuka.
- 5) Tanin mempunyai sifat atau daya bakterostatik, fungistatik dan merupakan racun.

E. Saponin

Senyawa saponin sebagai antibakteri bekerja dengan menurunkan tegangan permukaan sehingga terjadi kebocoran sel yang menyebabkan senyawa intraseluler keluar. Merupakan senyawa glikosida kompleks yaitu senyawa hasil kondensasi suatu gula dengan suatu senyawa hidroksil organik yang apabila dihidrolisis akan menghasilkan gula (glikon) dan non-gula (aglikon). Saponin ini terdiri dari dua kelompok: Saponin triterpenoid dan saponin steroid. Saponin banyak digunakan dalam kehidupan manusia, salah satunya terdapat dalam perak yang dapat digunakan untuk bahan pencuci kain (batik) dan sebagai shampoo. Saponin dapat diperoleh dari tumbuhan melalui metoda ekstraksi.

Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi. Saponin membentuk larutan koloidal dalam

air dan membentuk busa yang mantap jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam. Saponin merupakan golongan senyawa alam yang rumit, yang mempunyai massa dan molekul besar, dengan kegunaan luas.

Saponin diberi nama demikian karena sifatnya menyerupai sabun "Sapo" berarti sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa bila dikocok dengan air. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Dikenal juga jenis saponin yaitu glikosida triterpenoid dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai spirotekal. Kedua saponin ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Aglikonya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam suasana asam atau hidrolisis memakai enzim.

Di kehidupan sehari-hari kita sering melihat peristiwa buih yang disebabkan karena kita mengocok suatu tanaman ke dalam air. Secara fisika buih ini timbul karena adanya penurunan tegangan permukaan pada cairan (air). Penurunan tegangan permukaan disebabkan karena adanya senyawa sabun (bahasa latin = sapo) yang dapat mengkacaukan ikatan hidrogen pada air. Senyawa sabun ini biasanya memiliki dua bagian yang tidak sama sifat kepolaranya. Dalam tumbuhan tertentu mengandung senyawa sabun yang biasa disebut saponin. Saponin berbeda struktur dengan senyawa sabun yang ada. Saponin merupakan jenis glikosida. Glikosida adalah senyawa yang terdiri dari glikon (Glukosa, fruktosa, dll) dan aglikon (senyawa bahan alam lainnya). Saponin umumnya berasa pahit dan dapat membentuk buih saat dikocok

dengan air. Selain itu juga bersifat beracun untuk beberapa hewan berdarah dingin. Saponin merupakan glikosida yang memiliki aglikon berupa steroid dan triterpen. Saponin steroid tersusun atas inti steroid (C 27) dengan molekul karbohidrat. Steroid saponin dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang dikenal sebagai saraponin.

Saponin triterpenoid tersusun atas inti triterpenoid dengan molekul karbohidrat. Dihidrolisis menghasilkan suatu aglikon yang disebut sapogenin. Masing-masing senyawa ini banyak dihasilkan di dalam tumbuhan. Tumbuhan yang mengandung saponin ini biasanya memiliki Genus Saponaria dari Keluarga Caryophyllaceae. Senyawa saponin juga ditemui pada famili sapindaceae, curcubitaceae, dan araliaceae.

Saponin ada pada seluruh tanaman dengan konsentrasi tinggi pada bagian-bagian tertentu, dan dipengaruhi oleh varietas tanaman dan tahap pertumbuhan. Fungsi dalam tumbuh-tumbuhan tidak diketahui mungkin sebagai penyimpan karbohidrat atau merupakan waste product dan metabolisme tumbuh-tumbuhan kemungkinan lain adalah sebagai pelindung terhadap serangan serangga.

Sifat-sifat Saponin :

- 1) Mempunyai rasa pahit
- 2) Dalam larutan air membentuk busa stabil
- 3) Menghemolisa eritrosit
- 4) Merupakan racun kuat untuk ikan dan amfibi

- 5) Membentuk persenyawaan dengan kolesterol dan hidroksiteroid lainnya
- 6) Sulit untuk dimurnikan dan diidentifikasi
- 7) Berat molekul relative tinggi dan analisis hanya menghasilkan formula empiris yang mendekati.

Adapun kandungan saponin yang terdapat pada *citrus aurantifolia*, dimana dapat menghambat DNA-polymerase. Saponin merupakan jenis dari phytonutrien yang banyak ditemukan pada kacang-kacangan, ginseng dan lidah buaya. Detergen alami dapat menurunkan tekanan antar molekul karena mempunyai gugus hidrokarbon yang larut lemak (berada pada membran sel) dan gugus larut air (berada pada lingkungan air). Saponin terdiri dari gugus gula yang berikatan dengan aglikon/ sapogenin yang merupakan hasil hidrolisis dari glikosida yang dapat menghambat DNA-polymerase sehingga sintesa asam nukleat terganggu yang akhirnya dapat mengganggu inti sel dari bakteri. Mekanisme Saponin sebagai anti mikroba adalah terjadinya ikatan antara saponin dengan sterol (protein bakteri) pada permukaan membran sel bakteri yang dapat meningkatkan permeabilitas membran sel bakteri sehingga dapat mengubah struktur dan fungsi membran, menyebabkan denaturasi protein, sehingga membran sel akan rusak dan lisis.

F. Alkaloid

Kandungan lainnya yakni Alkaloid, dapat merusak membrane mikroba dan dapat mengganggu sintesa asam nukleat pada bakteri. Alkaloid sebagai

antibakteri diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang akan menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati. Alkaloid dari tanaman kebanyakan merupakan senyawa amina tersier dan yang lainnya terdiri dari nitrogen primer, sekunder, dan quartener. Semua alkaloid mengandung paling sedikit satu atom nitrogen yang biasanya bersifat basa dan sebagian besar atom nitrogen ini merupakan cincin aromatis. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut ⁶³.

2.7. Hubungan Infeksi *Salmonella typhi*, mRNA TLR-4 dan Soluble IL-6 dengan Ekstrak Kulit Jeruk Nipis,

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat poten untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Mikroba dikenal kedatangannya karena memiliki penanda PAMPs (yakni khusus bakteri gram negative adalah lipopolisakarida atau LPS) yang segera akan berikatan dengan reseptor TLR yakni TLR-4 khusus untuk LPS.

Pada saat reseptor-reseptor itu menangkap ligannya (PAMPs) maka

muncullah sinyal aktivasi yang akan mengaktifkan ketiga sel imunitas innate ini. Ketiga jenis sel tersebut kemudian melepas sejumlah sitokin proinflamasi seperti TNF α , IL-1 dan IL-6. Aktivasi yang terjadi akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivasi reseptor sitokin. IL-6 adalah sitokin penting lainnya pada reaksi inflamasi akut yang memiliki efek lokal dan sistemik. Ini menginduksi mediator sintesis berbagai inflamasi lainnya di hati, merangsang produksi neutrophil di sumsum tulang, dan mempromosikan diferensiasi IL-17 dalam menghasilkan sel T pembantu. IL-6 disintesis oleh fagosit mononuklear, sel endotel vaskular, fibroblas, dan sel lain dalam menanggapi PAMPs dan sebagai reaksi terhadap IL-1 dan TNF. Laju infeksi demam tifoid sangat ditentukan oleh aktivitas aktivasi reseptor tersebut. Berbagai sitokin tersebut mengikuti sirkulasi sistemik, menginduksi produksi prostaglandin, memengaruhi stabilitas pusat termoregulasi berefek terhadap pengaturan suhu tubuh dan menyebabkan demam¹⁸

Pada penelitian ini kami mengambil ekstrak kulit jeruk nipis, berdasarkan penelitian sebelumnya didapatkan hasil bahwa khasiat antimikroba berupa kandungan fenol dan flavonoid lebih banyak kandungannya terdapat pada kulit dibandingkan pada daun⁷. Kandungan dari senyawa-senyawa yang terdapat pada kulit jeruk nipis dipelajari dapat sebagai antimikroba.

Untuk kandungan minyak atsiri Minyak atsiri atau biasa disebut juga essential oils, kandungan monoterpenya bersifat lipofilik, cenderung

berdifusi ke fasa struktur membrane bakteri dibandingkan ke fasa air, menyebabkan destabilitas membrane dimana membrane menjadi *swelling* kemudian permeabilitas membrane meningkat sehingga merusak membrane yang mengikat protein sel bakteri dan terjadi kematian mikroorganisme ⁶⁰.

Kandungan Flavonoid dalam aktivitas antibakterinya melawan bakteri bisa terjadi disebabkan oleh penghambatan DNA gyrase, menghambat sintesis asam nukleat. Flavonoid juga dapat menghambat fungsi membrane sitoplasma dan mengganggu metabolisme energi ⁹.

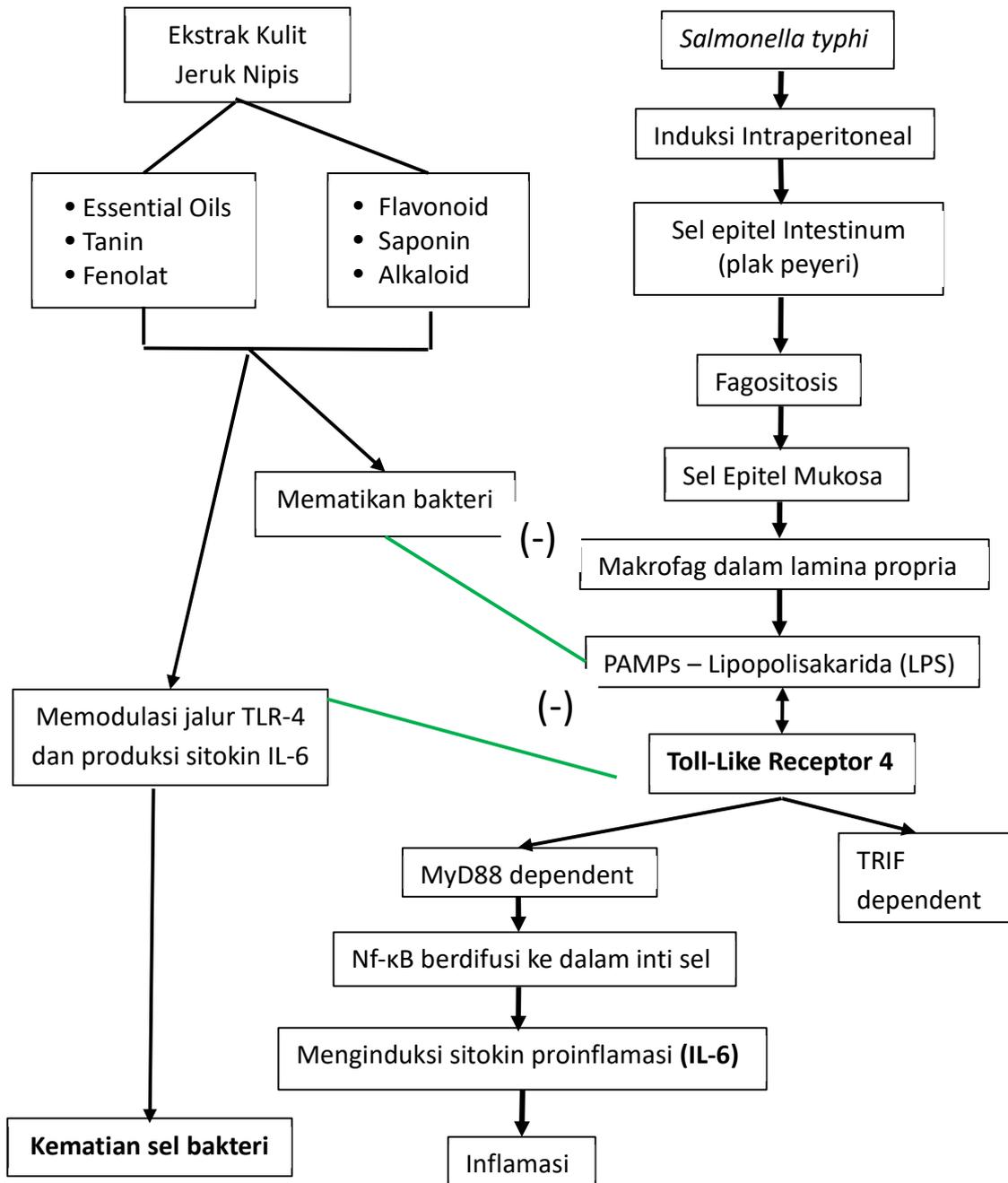
Penelitian yang dilakukan di Jepang (2012) tentang efek dari flavonoid citrus yakni naringenin dapat menghambat ekspresi TLR2 pada adiposit. Naringenin adalah suatu zat yang aktif dari flavonoid golongan Flavanones dan glycosidanya yang terkandung dalam seluruh family jeruk dan tomat. Efek ini dimediasi sebagian melalui aktivasi *peroxisome proliferator-activated reseptor* γ . Selain itu, naringenin menekan ekspresi TLR2 yang disebabkan oleh *co-culture of differentiated* adiposit dan makrofag dan juga menghambat ekspresi TLR2 tumor necrosis factor- α (TNF- α) dengan menghambat pengaktifan faktor Nf- κ B dan jalur c-Jun NH2-terminal kinase pada adiposit yang berbeda. Selanjutnya, naringenin menurunkan ekspresi TLR2 pada jaringan adiposa tikus dengan diet tinggi lemak. Hasil ini berkorelasi dengan peningkatan hiperglikemia dan penekanan mediator inflamasi, termasuk TNF- α dan monosit. protein kemotaktik-1 ⁵⁷. Secara keseluruhan, data ini menunjukkan

bahwa naringenin menunjukkan sifat anti-inflamasi, dengan menghambat ekspresi TLR2 di adiposit.

Hasil RT-PCR pada penelitian yang dilakukan di China membuktikan bahwa flavonoid menurunkan regulasi tingkat gen inflamasi termasuk interleukin-1 beta (IL-1), interleukin-6 (IL-6), dan *tumor necrosis factor alpha* (TNF). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hepatoproteksi yang diinduksi oleh flavonoid menghambat TLR4 / MyD88 dan mengaktifkan jalur signaling Sirt1 / Nrf2. Blokade dari TLR4 jalur oleh flavonoid menghambat aktivitas transkripsi NF- κ B dan AP-1 dan reaksi inflamasi ⁵⁸

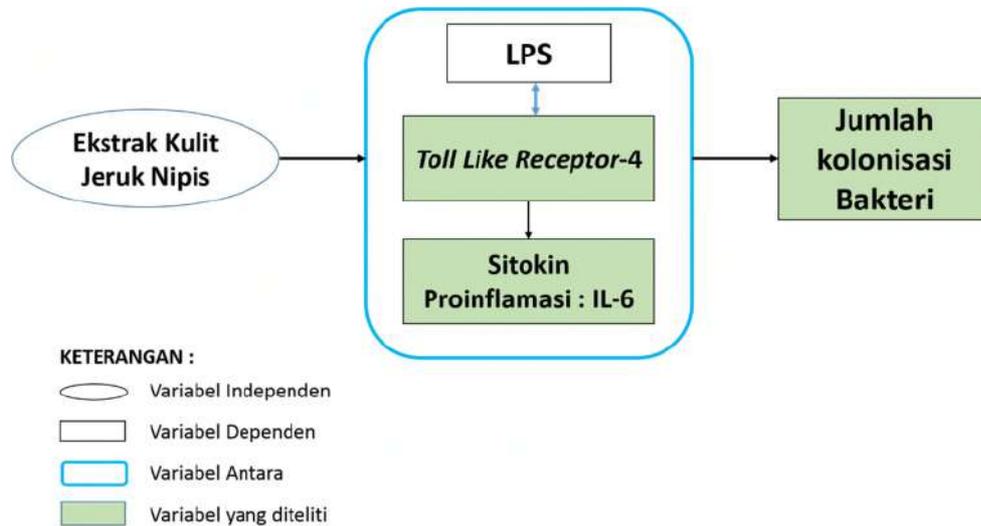
Kandungan Fenolat memiliki mekanisme aksi penghambatan senyawa fenolat pada mikroorganisme dikarenakan oleh gangguan pada integritas membran sel dan sintesis komponen struktural bakteri. Aktivitas antimikroba dari senyawa fenolik terkait dengan inaktivasi enzim seluler, yang tergantung pada tingkat penetrasi zat ke dalam sel atau disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran. Permeabilitas membrane yang meningkat merupakan faktor utama dalam mekanisme antimikroba, dimana senyawa dapat mengganggu membran dan menyebabkan hilangnya integritas sel dan kematian sel akhirnya ⁶².

2.8. Kerangka Teori



Gambar 21. Kerangka Teori

2.9. Kerangka Konsep



Gambar 22. Kerangka Konsep

Adapun variable pada penelitian ini adalah :

- Variable independen : Ekstrak kulit jeruk nipis
- Variable dependen : jumlah kolonisasi bakteri *Salmonella typhi*
- Variabel Antara : *Lipopolysaccharide* (LPS), TLR4, soluble IL-6
- Variabel yang diteliti : Ekpresi gen mRNA TLR-4, Soluble IL-6, dan Jumlah kolonisasi bakteri *S. typhi*

2.10. Definisi Operasional variable dan Kriteria Objektif

1. Ekstrak kulit jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*)

Merupakan isolate essential oils, flavonoid, tannin, saponin, fenolat dan alkaloid yang diperoleh melalui proses ekstraksi dari kulit jeruk nipis

dengan konsentrasi > 80%

2. Ekspresi mRNA Gen TLR4

Profil ekspresi mRNA gen TLR4 (*Toll-like Receptor 4*) yang diukur dengan realtime PCR

3. Soluble Interleukin 6

sitokin penting lainnya pada reaksi inflamasi akut yang memiliki efek lokal dan sistemik. Ini menginduksi mediator sintesis berbagai proinflamasi lainnya di hati, merangsang produksi neutrophil di sumsum tulang

4. Jumlah kolonisasi *Salmonella typhi*

Merupakan specimen bakteri yang diperoleh dari kultur jaringan ileum distal, limpa dan hepar setelah 7 hari intervensi

2.11. Hipotesis

1. Ekstrak kulit jeruk nipis dapat menurunkan jumlah kolonisasi bakteri pada mencit yang telah diinduksi *Salmonella typhi*
2. Ekstrak kulit jeruk nipis dapat menurunkan kadar soluble IL-6 pada kelompok mencit yang terinfeksi *Salmonella typhi* dibandingkan kelompok control
3. Ekstrak kulit jeruk nipis dapat menurunkan Ekspresi mRNA gen TLR4 (*Toll-like Receptor 4*) pada kelompok mencit yang terinfeksi *Salmonella*

typhi dibandingkan kelompok control

4. Terdapat hubungan antara jumlah kolonisasi bakteri *Salmonella typhi* dengan kadar IL- dan hubungan antara ekspresi mRNA gen TLR-4 kelompok mencit yang terinfeksi *Salmonella typhi*