

DISERTASI

Efek Pemberian Daun Miana (*Coleus scutellarioides [L]*)
Terhadap Kadar Protein Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha (HIF-
1 α), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Intercellular Adhesin
Molecule (ICAM-1) Pada Mencit Balb/c yang diinfeksi
Mycobacterium tuberculosis



Rosamarlina
C013172021

PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2021

DISERTASI

**EFEK PEMBERIAN DAUN MIANA (COLEUS SCUTELLARIODES L)
TERHADAP KADAR PROTEIN HIF-1 ALPHA, VEGF DAN ICAM-1
PADA MENCIT BALB/C YANG DIINFEKSI
MICOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

Disusun dan diajukan oleh

**ROSAMARLINA
C013172021**

*Telah dipertahankan di hadapan Tim Penguji Ujian dalam rangka
Penyelesaian Studi pada Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 21 Oktober 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor


Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
NIP. 195704161985031001

Co Promotor

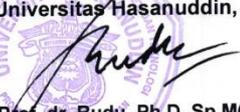
Co Promotor


Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K)
NIP. 197206172000122001


Dr. dr. Ilhamjaya Patellongi, M.Kes
NIP. 195801281989031002


**Ketua Program Studi Doktor
Ilmu Kedokteran,**

dr. Agusajim Bukhari, M.Med,Ph.D,Sp.GK(K)
NIP. 19700821 199903 1 001


**Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,**


Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
NIP. 19661213 199503 1 009



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

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

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Rosamarlina
NIM : C013172021
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Efek Pemberian Daun Miana (*Coleus scutellarioides* [L]) terhadap Kadar Protein HIF-1alpha, VEGF dan ICAM-1 Pada Mencit Balb/c yang Diinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Adalah karya tulisan saya sendiri dan bukan merupakan pengambilan alihan tulisan orang lain, bahwa Disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan Disertasi ini hasil karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, 26 Juni 2021

Yang menyatakan,

Rosamarlina

ABSTRAK

ROSMARLINA. Pengaruh Miana (*Coleus Scutellarioides [L]*) terhadap Ekspresi Vascular Endothelial Growth Factor Mencit Balb/c yang Terinfeksi *Mycobacterium Tuberculosis* (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Irawaty Djaharuddin, dan Ilhamjaya Patellongi).

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek ekstrak daun miana terhadap ekspresi mRNA, gen HIF, dan gen ICAM-1 serta melihat kadar HIF-1 α , kadar ICAM-1, dan kadar VEGF serta hubungannya dengan jumlah bakteri (*bacterial load*) di dalam darah pada mencit yang terinfeksi dengan *mycobacterium tuberculosis*.

Penelitian ini menggunakan mencit Balb/c yang diinfeksi *mycobacterium tuberculosis*. Tikus diperlakukan dan dibagi menjadi empat kelompok terapi yaitu: kelompok placebo, kelompok rifampisin (1,95 mg/g/hari), kelompok miana (750mg/kbBB), dan kelompok miana + rifampisin. Kadar HIF-1 α dari sampel darah diperiksa menggunakan Elisa dan dihitung dengan uji *one-way Anova*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa sebanyak 20 mencit Balb/c dikelompokkan ke dalam 4 grup berbeda yang masing-masing grup terdiri atas 5 mencit. Grup pertama adalah grup placebo, yakni mencit diberikan aquades; grup kedua mencit diberikan rifampisin; grup ketiga mencit diberikan ekstrak daun miana; dan grup keempat mencit diberikan rifampisin dan ekstrak daun miana. Empat grup ini dianalisis kadar HIF-1 α , ICAM-1, dan VEGF pada saat mencit belum diinfeksi *mycobacterium tuberculosis*; setelah diinfeksi *mycobacterium tuberculosis*; dan setelah mencit diberikan intervensi sesuai dengan grupnya.

Kata kunci. miana, VEGF, *mycobacterium tuberculosis*



ABSTRACT

ROSAMARLINA. *The effect of Miana (Coleus scutellariodes [L]) on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in BALB/c Mice Infected with Mycobacterium Tuberculosis* (Supervised by **Mochammad Hatta, Irawaty Djaharuddin, and Ilhamjaya Patellongi**)

The purpose of this study is to determine the effect of Miana leaf extract on the mRNA expression of the HIF gene, and the ICAM-1 gene and to see the levels of HIF-1 α , ICAM-1 levels and VEGF levels, as well as their relationship with the number of bacteria (bacterial load) in the blood, in mice infected with *M. tuberculosis*.

This experimental study used BALB/c mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. Mice were treated and divided into 4 treatment groups, namely: placebo group, rifampin group (1.95 mg/day), miana group (750 mg/kgBW), and miana + rifampin group. HIF-1 alpha levels from blood samples were examined using ELISA and calculated by One-Way ANOVA test.

The results show that a total of 20 BALB/c mice are grouped into four different groups where each group consists of five mice. The first group is a placebo group in which mice are given distilled water. The second group of mice is given rifampicin. The third group of mice is given Miana leaf extract. The fourth group of mice is given rifampicin and Miana leaf extract. These four groups are analyzed for levels of HIF-1 α , ICAM-1, and VEGF when the mice have been infected with *M. tuberculosis*, after being infected with *M. tuberculosis*, and after the mice are given intervention according to their groups.

Keywords: Miana, VEGF, *Mycobacterium tuberculosis*



PRAKATA

Dengan Asma Allah Yang Maha Pengasih dan Maha Penyayang, atas Kasih Sayang-Nya penulis dapat menyelesaikan disertasi ini. Untuk itu penulis ucapkan rasa syukur kehadiran-Nya seraya mengucapkan segala puji bagi Allah Tuhan semesta alam, dengan terselesaikannya Disertasi ini yang merupakan salah satu persyaratan akademik guna memperoleh gelar Doktor dalam Program Doktor Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin (UNHAS).

Penulis menyadari bahwa dalam proses penyelesaian disertasi ini telah melibatkan berbagai pihak, baik secara langsung maupun tidak langsung, perorangan maupun lembaga yang telah memberikan kontribusi dalam penyelesaian penyusunan disertasi ini. Untuk itu dalam kesempatan ini penulis ucapkan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang penulis hormati:

Prof.dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K) selaku Promotor, Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, SpP(K) selaku Co-Promotor, dan Dr. dr. Ilhamjaya A. Patellongi, M. Kes selaku Co-Promotor dan dr Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K) selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran FK UNHAS. Beliau bertiga dengan kepakaran yang melekat telah meluangkan waktu dan memberikan kontribusi bagi terwujudnya disertasi ini. Melalui beliau bertiga dengan kesabaran, perhatian dan keikhlasannya telah memberikan dorongan, koreksi dan saran baik dari aspek metodologi penelitian maupun penyajian isi disertasi secara keseluruhan. Penulis benar-benar merasakan melalui beliau bertiga telah membuka cakrawala/pandangan, mendorong munculnya gagasan, ide-ide pembaharuan khususnya dalam bidang gizi dan biomolekuler kedokteran. Untuk itu sekali lagi penulis menghaturkan penghormatan dan penghargaan yang setinggi-tingginya serta mengucapkan terima kasih dengan iringan doa “semoga amal baik beliau diterima dan mendapat balasan dari Allah Yang Maha Kasih, Maha Sayang dan Maha Pemurah”.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada seluruh staff Akademik Program Doktorat FK UNHAS yang membantu penulis dalam menyelesaikan studi. Teman-teman mahasiswa S3 angkatan 2017 program studi S3 Ilmu Kedokteran FK UNHAS yang telah membantu kelancaran penyusunan Desertasi yang tidak dapat peneliti sebutkan satu persatu.

Kepada keluarga tercinta, ayahanda Syahrir Nurut, SE, MM dan Ibunda Rosda BA (Alm), yang senantiasa memberikan nasehat, dorongan, doa kepada penulis. Teristimewa dan lebih khusus kepada suami tercinta drh. Iswandi, MM dan anak-anak penulis yang terkasih Zahwa Fajra Rashifah dan M. Arkan Radhiyyah yang mendorong penulis secepatnya menyelesaikan penyusunan disertasi ini.

Penulis berharap semoga disertasi ini dapat sedikit memberikan manfaat bagi para perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya pengembangan terapi TB serta dapat dijadikan salah satu rujukan bagi peneliti atau penulis karya ilmiah lainnya. Akhir kata penulis berbesar hati apabila para pembaca sudi memberikan kritik, saran dan masukan dalam rangka proses penulisan dan penelitian berikutnya.

Makassar,
Yang Menyatakan

Rosamarlina

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN DISERTASI.....	Error! Bookmark not defined.
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI	Error! Bookmark not defined.
ABSTRAK	vi
ABSTRACT.....	Error! Bookmark not defined.
PRAKATA.....	Error! Bookmark not defined.
DAFTAR ISI.....	vi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR ISTILAH	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Tujuan Umum	5
1.3.2 Tujuan Khusus.	5
1.4. Manfaat Penelitian	6
1.4.1 Manfaat dari Segi Keilmuan	6
1.4.2 Manfaat dari Segi Klinis	6
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	7
2.1 Definisi <i>Tuberculosis</i>	7
2.2 Sejarah Tuberculosis.....	7

2.3	Epidemiologi <i>Tuberculosis</i>	8
2.4	Klasifikasi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.5	Karakteristik <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	10
2.6	Virulensi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
2.7	Sistem Imunitas terhadap infeksi	12
2.8	Patogenesis <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
2.9	Sistem imunitas terhadap infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.10	Manifestasi Klinis TB	21
2.11	Diagnosis TB	21
2.12	Penatalaksanaan TB	28
2.13	Resistensi Antibiotika Pengobatan TB	30
2.14	<i>Hypoxia-inducible factor (HIF-1α)</i>	34
2.15	Peranan HIF-1 α dalam Infeksi Bakteri	38
2.16	Potensi HIF dalam terapi	41
2.17	Peranan VEGF dalam infeksi	41
2.18	Peranan ICAM-1 dalam infeksi	46
2.19	Penelitian Obat Tradisional Anti Tuberculosis.....	47
2.20	Daun Miana (<i>Coleus scutellaroides</i> [L] Benth).....	51
2.21	Efek Terapeutik Ekstrak Daun Miana (EDM) dalam Penyakit Infeksi	53
2.22	Efek terapeutik ekstrak Daun Miana dalam infeksi <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
2.23	Efek Flavonoid Terhadap HIF-1 α , VEGF dan ICAM-1	55
BAB III KERANGKA TEORI DAN KONSEP		56
3.1	Kerangka Teori	56

3.1.1. Variabel penelitian.....	57
3.2. Definisi Operasional	58
3.3. Hipotesis Penelitian	59
BAB IV METODE PENELITIAN	60
4.1 Penelitian.....	60
4.2 Waktu dan lokasi penelitian.....	60
4.3 Subjek penelitian.....	60
4.4 Metode dan Bahan	61
4.4.1 Bahan Penelitian.....	61
4.5 Protokol studi	64
4.6.1 Cara Pemeriksaan Enzyme Linked Immunosorbant Assay (ELISA) untuk protein HIF-1 dan VEGF dan ICAM-1	65
4.6.2 Pengukuran <i>Bacterial load</i>	65
4.6.3 Analisa Statistik	67
BAB V HASIL PENELITIAN	69
5.1 Uji Normalitas dan Homogenitas.....	69
5.2 Perbandingan kadar protein HIF-1 α	69
5.3 Perbandingan kadar protein VEGF	73
5.4 Perbandingan kadar protein ICAM-1.....	76
5.5 Pengaruh pemberian Rifamfisin dan Miana terhadap <i>bacterial load Mycobacterium tuberculosis</i>	80
BAB VI PEMBAHASAN.....	82
6.1 Perbandingan kadar protein HIF-1 α setelah pemberian Rifamfisin, Miana, Rifamfisin+ Miana dan placebo	83

6.2 Perbandingan kadar protein VEGF setelah pemberian Rifamfisin, Miana, Rifamfisisin + Miana dan placebo	84
6.3 Perbandingan kadar protein ICAM-1 setelah pemberian Rifamfisin, M, Rifamfisis+ Miana dan placebo	84
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	86
7.1. Kesimpulan	86
7.2. Saran	86
REFERENSI	87
LAMPIRAN	

Daftar Tabel

Tabel 1. Kelompok obat OAT.....	30
Tabel 2. Gen terlibat dalam pembentukan resistensi obat pada M.tuberculosis	31
Tabel 3. Kadar protein HIF-1 α dalam setiap grup	69
Tabel 4. Perbedaan rerata kadar HIF-1 α antar grup setelah intervensi	71
Tabel 5. Perbandingan rerata kadar HIF-1 α antar grup setelah intervensi.....	72
Tabel 6. Kadar protein VEGF dalam setiap grup.....	73
Tabel 7. Perbedaan rerata kadar VEGF antar grup setelah intervensi	75
Tabel 8. Perbandingan rerata kadar VEGF antar grup setelah intervensi	76
Tabel 9. Kadar protein ICAM-1 dalam setiap grup	76
Tabel 10. Perbedaan rerata kadar ICAM-1 antar grup setelah intervensi	Error!
Bookmark not defined.	
Tabel 11. Perbandingan rerata kadar ICAM-1 antar grup setelah intervensi.....	79

Lampiran

Lampiran 1: Data hasil Elisa

Lampiran 2: Bacterial Load

Lampiran 3 : Hasil Analisis

Daftar Istilah

Ang2	: <i>Angiopoietin-2</i>
BTA	: Basil Tahan Asam (BTA)
CD	: <i>Cluster of differentiation</i>
CFR	: <i>Case Fatality Rate</i>
COX	: <i>Cyclo-oxygenase</i>
DAMP	: <i>Damage-associated molecular patterns</i>
DNA	: <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DR TB	: <i>Drug Resistant</i>
ECM	: <i>Extracellular matrix</i>
EDM	: Ekstrak daun miana
FAK	: <i>Focal adhesion kinase</i>
MOB	: <i>Homoisoflavone-type methyl ophiopogonanone B</i>
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMAPII	: <i>Endothelial monocyte activating peptide II</i>
EPO	: Erythropoietin
EMB/E	: Etambutol
EPO	: eritropoietin
FGF	: <i>Fibroblasts growth factor</i>
H58	: <i>Halotype 58</i>
HIF-1 α	: <i>Hypoxia inducible factor-1alpha</i>
hMDM	: <i>Human monocyte derived macrophages</i>
HMGB 1	: <i>High mobility group box 1</i>
HRE	: <i>Hypoxia-responsive enhancer elements</i>

ICAM-1	: Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN	: Interferon
IGRA	: interferon-gamma release assay
IKK	: <i>IkappaB kinases</i>
IL	: Interleukin
iNOS	: <i>Inducible nitric oxide synthase</i>
INH	: Isoniazid
LPS	: <i>Lipopolysaccharide</i>
M cells	: <i>Microfold cells</i>
MAPK	: <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDR TB	: <i>Multidrug resistance TB</i>
MMP	: <i>Matrix metalloproteinase</i>
MODS	: <i>Multiple organ dysfunction syndrome</i>
mRNA	: <i>Messenger ribonucleic acid</i>
M TB	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NFkB	: <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NO	: <i>Nitric oxide</i>
NOS	: <i>Nitric oxide synthase</i>
NPV	: <i>Negative predictive value</i>
PAS	: <i>Family of PER, AHR, ARNT and SIM</i>
PCO ₂	: <i>Partial pressure of carbon dioxide</i>
ODDD	: <i>O₂-dependent degradation domain</i>
OAT	: <i>Obat Anti Tuberculosis</i>

PCR	: <i>Polymerase chain reaction</i>
PDGF	: <i>Platelet-derived growth factor</i>
PHD	: <i>Polyly hydroxylase-domain</i>
PMN	: <i>Polymorphonuclear</i>
PO2	: <i>Partial pressure of oxygen</i>
PPV	: <i>Positive predictive value</i>
pVHL	: <i>Protein von-Hippel Lindau</i>
PZA	: <i>Pirazinamid</i>
RES	: <i>Reticuloendothelial system</i>
RIF	: <i>Rifampisin</i>
RISKESDAS	: <i>Riset Kesehatan Dasar</i>
RPM	: <i>Revolutions per minute</i>
RTK	: <i>Receptor tyrosine kinase</i>
CXCL	: <i>Chemokine ligand</i>
TLR	: <i>Toll-like receptor</i>
TNF	: <i>Tumor necrosis factor</i>
VEGF	: <i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	: <i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
WHO	: <i>World Health Organizatio</i>
XDR	: <i>Extensively-Drug Resistant</i>

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Tuberculosis (TB) adalah salah satu penyakit infeksi menular langsung, kuman TB sebagian besar menginfeksi paru, namun dapat juga menginfeksi organ tubuh lainnya. TB sampai saat ini masih menjadi salah satu pembunuh infeksius mematikan dan banyaknya jumlah pasien TB yang meninggal setiap tahunnya sehingga menempati urutan kesepuluh sebagai penyakit penyebab kematian di dunia. Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2018 melaporkan ada sekitar 10 juta kasus infeksi TB dan 1,3 juta kematian di seluruh dunia. Dirjen P2P Kemenkes, 2020 melaporkan lebih dari 4000 orang meninggal dan hampir 30.000 orang menderita TB setiap tahunnya. India (27%), Cina (9%), Indonesia (8%), Filipina (6%), Pakistan (5%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) dan Afrika Selatan (3%) diperkirakan dua pertiga dari beban TB di dunia berasal dari delapan negara ini. Pada tahun 2018 WHO melaporkan, Indonesia diperkirakan ada lebih dari 1 juta kasus TB baru (WHO, 2020).

Tuberculosis disebabkan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* ditularkan secara aerosol. *Droplet nuclei* yang di kandung pada dahak pasien TB yaitu gelembung cairan yang berisi kuman *Mycobacterium tuberculosis*. Kuman TB bentuknya seperti basil tuberkel yang berupa batang ramping, kurus, dan tahan akan asam sehingga di kenal dengan BTA (bakteri tahan asam) yang dapat bertahan di udara bebas dalam beberapa jam. Partikel yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* jika terhirup oleh orang lain, maka orang tersebut akan tertular (Jilani et al., 2021).

Manifestasi klinis TB berupa gejala batuk berdahak progresif lebih dari 3 minggu yang tidak sembuh dengan pengobatan biasa, demam, keringat malam hari, batuk dapat dengan dahak berdarah serta penurunan berat badan. Diagnosis ditegakkan berdasarkan adanya gambaran klinis, ditemukan *Mycobacterium tuberculosis* pada

pemeriksaan penunjang seperti tes cepat molekuler (TCM), pewarnaan sputum Basil Tahan Asam (BTA), kultur sputum dan pemeriksaan foto toraks. Pengobatan pasien TB dengan terapi kombinasi yang terdiri dari 4 obat yang dikenal sebagai obat anti tuberculosis (OAT). Kombinasi OAT ini terdiri atas Isoniazid (INH/H), Rifampisin (R), Pirazinamid (Z) dan Etambutol (E) (Kemenkes, 2014).

Permasalahan penatalaksanaan TB antara lain pengobatan TB memerlukan waktu relatif lama sekitar 6 – 8 bulan, menjadi salah satu alasan pasien TB menghentikan pengobatan setelah merasa sehat walaupun proses pengobatan belum tuntas, permasalahan yang lain adalah resisten obat atau TB-MDR (*Multi Drugs Resistant*), hal ini menyebabkan OAT tidak lagi efektif karena bakteri menjadi resisten terhadap OAT. Selain itu, peningkatan kasus infeksi HIV/AIDS yang berkembang sangat cepat juga menjadi masalah TB dan permasalahan lain adalah adanya pasien TB laten, dimana pasien tidak ditemukan gejala TB aktif tapi ditemukan kuman yang *dormant* (Kemenkes, 2016).

Pengobatan adalah masalah utama dalam pemberantasan TB. Obat Anti Tuberculosis (OAT) memiliki keterbatasan dalam aktivitas membunuh bakteri, maka diperlukan cara untuk memperkuat respon imunitas sebagai mekanisme pertahanan tubuh. Dalam hal ini dipertimbangkan terapi tambahan dengan tujuan meningkatkan respon imunitas terhadap virulensi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga terjadi sinergi efek antibiotika dan immunoregulator.

Ketika bakteri masuk kedalam jaringan akan menginvasi sel inang, maka akan terjadi proses inflamasi. Kondisi hipoksia lokal akan terjadi setelah inflamasi akibat peningkatan aktivitas metabolik, sehingga jaringan terinflamasi ditandai dengan peningkatan suhu yang akan mempengaruhi kadar dan tekanan O₂ lokal yang berlanjut menjadi hipoksia selular pada jaringan tersebut. Keadaan ini mengakibatkan sel mengalami stres hipoksia. Kerusakan selular lebih lanjut yang mengakibatkan kematian sel dapat dihindari dengan berespon saat kondisi ekstrem pada sel yang mengalami hipoksia. Faktor transkripsi yang mengembalikan respon adaptif saat keadaan hipoksia di ketahui sebagai *Hypoxia inducible factor-1 α* (HIF-1 α) (Ramakrishnan et al., 2014).

HIF-1 α memegang peran penting dalam respons imun dan menjadi target terapi untuk menguatkan daya tahan sel. HIF-1 α berperan pada respon inflamasi dalam hal membantu mempertahankan homeostasis energi, peningkatan produksi eritropoietin (EPO), dan *vascular endothelial growth factor* (VEGF) yang berperan dalam proses angiogenesis, serta *nitric oxide synthase* (NOS) yang akan menghasilkan *nitric oxide* (NO) untuk proses vasodilatasi sehingga terjadi peningkatan laju darah ke jaringan yang iskemik dalam memperbaiki hipoksia. (Rius et al., 2008). Menargetkan HIF-1 α dalam menguatkan daya tahan sel menjadi peluang untuk dapat memecahkan permasalahan ini merupakan alternatif lain dalam strategi pengobatan. Selain kedua gen (HIF-1 α dan VEGF), gen Intercellular Adhesin Molecule 1 (ICAM-1) memainkan peran penting dalam invasi sel inang oleh *Mycobacterium tuberculosis*, baik sebagai reseptor atau sebagai molekul aksesori penting (Bhandari et al., 2014).

Penggunaan obat herbal dapat menjadi alternatif dari terapi standar. Saat ini obat herbal, memang telah banyak dirasakan manfaatnya dalam pengobatan berbagai macam penyakit, termasuk penyakit infeksi. Masyarakat Indonesia banyak yang menggunakan pengobatan tradisional saat sakit. Kelemahan penggunaan obat-obatan seperti antibiotika mempunyai efek samping dan dapat menimbulkan resistensi yang menjadi salah satu alasan penggunaan obat-obat tradisional atau herbal. Namun, bukti ilmiah masih kurang yang berkaitan mengenai khasiat, patofarmakologi, serta efek terapeutik pengobatan tradisional dibandingkan dengan penggunaan obat antibiotika.

Miana (*Coleus scutellarioides [L] Benth*) adalah tanaman hias yang berasal dari Asia Tenggara. Miana memiliki daun dan variasi warna yang beraneka ragam, diantaranya ada varian yang berdaun merah kecoklatan ternyata memiliki khasiat dalam pengobatan. Secara empiris, masyarakat Indonesia menggunakan daun Miana untuk mengobati penyakit mata, wasir, bisul, demam nifas, radang telinga, abses, luka bernanah, keputihan, dan cacangan. Daun Miana mengandung flavonoid, fenolic, minyak astiri dan steroid. Kandungan ini memiliki efek antibakteri, dan mempercepat penyembuhan luka yang terinfeksi *Staphylococcus aureus* pada

model hewan kelinci (Marpaung et al., 2014). Hasil penelitian *in vitro* pada ekstrak Miana dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium tuberculosis* (Mpila et al., 2012). Efek anti inflamasi dan anti oksidan juga dimiliki Miana dengan kandungan flavonoidnya . Pada penelitian *in vivo*, ekstrak daun Miana memiliki efek anti inflamasi dengan cara menekan ekspresi IL37 pada model mencit yang terinfeksi *Candida albicans*. Dalam infeksi *Mycobacterium tuberculosis* di model mencit BALB/C, ekstrak daun Miana dapat menekan ekspresi gen m-RNA *toll like receptor-4* (TLR-4) seperti efek yang dihasilkan oleh penggunaan antibiotika (Syamsuri et al., 2018). Saat ini, efek antimikroba ekstrak daun Miana belum diketahui secara menyeluruh, serta bagaimana mekanisme respon inflamasi terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* melalui jalur HIF-1 α , VEGF dan ICAM-1

1.2 Rumusan Masalah

Masalah dalam pemberantasan TB salah satunya adalah pengobatan, obat anti tuberculosis yang ada saat ini dengan kombinasi 4 obat yang terdiri dari Rifampisin, INH, Pirazinamid dan Etambutol diberikan selama 6 – 8 bulan. Pengobatan yang cukup lama ini salah satu penyebab pasien tidak melanjutkan pengobatan. Penelitian obat TB baru terus dilakukan salah satunya penelitian tanaman tradisional Indonesia yang diharapkan bisa menjadi alternatif pengobatan.

Pertanyaan Penelitian

1. Apakah ekstrak daun Miana (*Coleus scutellariodes* [L] Benth) mempengaruhi kadar gen HIF-1 α di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* ?
2. Apakah ekstrak daun Miana (*Coleus scutellariodes* [L] Benth) mempengaruhi kadar VEGF di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* ?

3. Apakah ekstrak daun Miana (*Coleus scutellarioides [L] Benth*) mempengaruhi kadar ICAM-1 di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis* ?
4. Apakah kadar HIF-1 α , kadar VEGF dan ICAM-1 di dalam darah berhubungan dengan jumlah bakteri (*bacterial load*) *Mycobacterium tuberculosis* pada mencit yang terinfeksi?

1.3. Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap kadar HIF-1 α , kadar VEGF, kadar ICAM-1, serta jumlah bakteri (*bacterial load*) di dalam darah pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3.2. Tujuan Khusus.

2. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap kadar soluble HIF-1 α pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*.
3. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap kadar soluble VEGF pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*.
4. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap kadar soluble ICAM-1 pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*.
5. Mengetahui efek ekstrak daun Miana terhadap *bacterial load* pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*.
6. Mengetahui hubungan kadar solubel HIF-1 α , kadar solubel VEGF dan kadar solubel ICAM-1 dengan bacterial load pada mencit yang diinfeksi dengan *Mycobacterium tuberculosis*.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat dari Segi Keilmuan

Penelitian ini akan menambah pengetahuan mengenai efek ekstrak daun Miana terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan TB untuk memberikan luaran yang lebih baik.

Penelitian ini juga akan mengeksplorasi mekanisme ekstrak daun Miana dalam respon infeksi melalui jalur HIF-1 α VEGF dan ICAM-1 kadarnya dalam darah hewan model mencit.

Penelitian ini dapat menjadi dasar bagi penelitian lainnya untuk meneliti potensi ekstrak daun Miana menangani ragam penyakit infeksi lainnya dan meneliti wacana potensi zat aktif yang berperan dalam memodulasi ekspresi HIF-1 α , VEGF dan ICAM-1.

Data dalam penelitian ini dapat dipergunakan sebagai acuan keilmuan yang dapat melengkapi kelayakan untuk menjadikan pengobatan daun Miana sebagai obat herbal terstandar

1.4.2 Manfaat dari Segi Klinis

Penelitian ini dapat memberikan gambaran potensi pengobatan alternatif atau adjuvan dalam penatalaksanaan TB untuk memberikan luaran yang lebih baik

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Definisi Tuberculosis

Tuberculosis (TB) merupakan penyakit infeksi menular langsung yang disebabkan infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang merupakan patogen pada manusia. *Mycobacterium kompleks* mempunyai beberapa spesies antara lain : *Mycobacterium tuberculosis*, *Varian Asian*, *Varian African I*, *Varian African II*, *M. bovis*, *M. leprae* dan lainnya yang merupakan Bakteri Tahan Asam (BTA). Kelompok *Mycobacterium* selain *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat menimbulkan gangguan pada saluran nafas dikenal sebagai *MOTT* (*Mycobacterium Other Than Tuberculosis*) seperti *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium scrofulaceum*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium xenopi* yang terkadang bisa mengganggu penegakan diagnosis dan pengobatan TB. Pemeriksaan bakteriologis yang dapat melakukan identifikasi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* menjadi sarana yang diperlukan dalam diagnosis untuk TB (Amin and Asril, 2014; Kementerian Kesehatan RI, 2015).

2.2 Sejarah Tuberculosis

Tuberculosis adalah penyakit menular yang sudah dikenal sejak tahun 410 sebelum masehi. Hippocrates (460-380 SM) mencatat ada penyakit yang disebut *Phthisis* pada masa Yunani kuno merupakan penyakit sejenis TB. Hingga abad ke-19 diketahui 25% penyakit penyebab kematian di Eropa adalah TB. Robert Koch seorang ilmuwan Jerman yang mengumumkan bahwa ia telah berhasil menemukan penyebab penyakit tuberculosis pada tanggal 24 Maret 1882. Saat itu wabah TB penyebab kematian sedang menyebar di wilayah Eropa dan Amerika. Upaya menyembuhkan TB hingga tuntas belum berhasil sampai akhirnya ditemukan antibiotik streptomycin pada tahun 1943, Streptomycin ditemukan oleh Albert

Scatz (1920-2005) setelah melakukan riset di Universitas Rutgers, New Jersey, Amerika Serikat.

2.3 Epidemiologi *Tuberculosis*

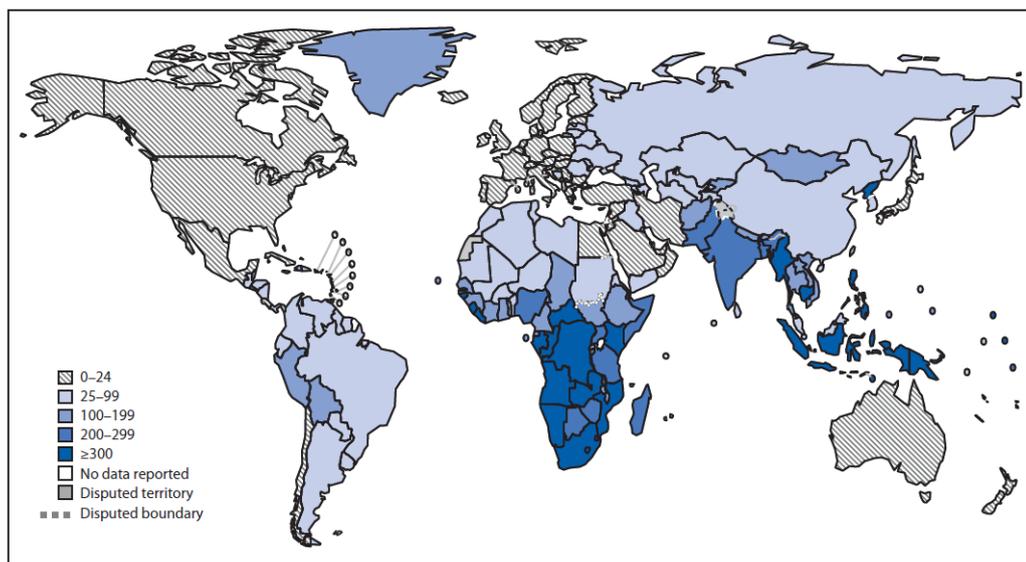
Pada tahun 2017, diperkirakan terdapat 10,4 juta kasus TB baru diseluruh dunia (133 kasus per 100.000 populasi). Sejak tahun 2000 insiden ini menurun sekitar 1,5% pertahunnya (Macneil et al., 2019). Negara yang menyumbangkan 60% dari kasus TB baru di dunia yaitu RRC, India, Indonesia, Nigeria, Pakistan dan Afrika Selatan (WHO, 2018). Secara global, 70% dari jumlah pasien TB berasal dari Asia Tenggara dan Afrika (Macneil et al., 2019). Menurut WHO, secara geografis epidemiologi TB sangat bervariasi (gambar 1). Di Afrika merupakan wilayah dengan tingkat koinfeksi HIV (yang merupakan faktor yang signifikan penyebab endemi TB) serta kasus kematian tertinggi di wilayah tersebut (Macneil et al., 2019).

Kasus kematian akibat infeksi TB pada 2017 sekitar 1,7 juta kematian, 2 diantaranya HIV negatif dan ada 300.000 kematian diantaranya pasien HIV positif (WHO, 2018b). Hal ini menjadikannya TB sebagai salah satu penyakit paling mematikan di dunia dan TB merupakan masalah kesehatan utama diseluruh dunia. Namun kejadian endemik di Afrika dan Asia yang merupakan negara-negara surveilans dengan penanganan tidak tepat serta kurangnya akses terhadap pengobatan yang terjangkau juga banyaknya jumlah masyarakat yang terinfeksi HIV (Wieczorek, 2011). Kemampuan dari *Mycobacterium tuberculosis* untuk hidup secara intraseluler didalam makrofag memungkinkan bakteri ini terlindung dari sistem imun inang dan juga membuat pengobatan sulit untuk dilakukan ketika seseorang sudah terkena infeksi (Wieczorek, 2011)

Laporan pusat data dan informasi kemenkes RI (Infodatin) tahun 2015, menunjukan *Case Notification Rate* (CNR) semua kasus TB ditingkat nasional sejak 1999 cenderung meningkat, tapi data 4 tahun terakhir (2011-2014) CNR mengalami stagnasi (Naderian et al., 2011). Data TB Indonesia tahun 2015 dibandingkan

dengan data tahun 1990 mencapai penurunan angka kesakitan dan kematian akibat TB menjadi setengahnya. Angka prevalensi TB yang pada tahun 1990 sekitar 443 per 100.000 penduduk dan tahun 2015 ditargetkan menjadi 280 per 100.000 penduduk. Berdasarkan hasil prevalensi TB tahun 2013, prevalensi TB paru smear positif per 100.000 penduduk umur 1 tahun keatas sebesar 257 (Marlina, 2018). Peningkatan yang signifikan dari tahun 1999 sampai dengan tahun 2003, proporsi pasien TB paru terkonfirmasi dari 7% menjadi 13%. Indikator ini cenderung menurun dari tahun 2003 sampai dengan tahun 2014. Akan tetapi, pada tahun 2017 indikator ini kembali meningkat menjadi 14% (Marlina, 2018). Gambaran upaya penemuan kasus dapat diukur dengan mengetahui banyaknya semua kasus TB yang ditemukan dan tercatat melalui indikator CNR (100.000 penduduk di wilayah dan periode waktu tertentu). Indikator ini dapat digunakan untuk menggambarkan penemuan semua kasus TB maupun BTA positif (Marlina, 2018).

Data di Indonesia angka notifikasi kasus BTA positif maupun semua kasus TB lainnya menunjukkan pola yang hampir sama. CNR TB cenderung menurun dalam empat tahun terakhir. Penurunan yang signifikan terjadi pada CNR TB semua kasus, dari 138 per 100.000 penduduk pada tahun 2012 menjadi 125 per 100.000 penduduk pada tahun 2015 (Marlina, 2018).



Gambar 1 Kasus TB di seluruh dunia pada tahun 2018 (Macneil et al., 2019)

2.4 Klasifikasi *Mycobacterium tuberculosis*

Kingdom	: Bacteria
Divisio	: <i>Mycobacteria</i>
Class	: <i>Actinomycetes</i>
Ordo	: <i>Actinomycetales</i>
Family	: <i>Mycobacteriaceae</i>
Genus	: <i>Mycobacterium</i>
Spesies	: <i>Mycobacterium tuberculosis</i>

Mycobacteria berbentuk basil, merupakan bakteri aerobik non-spora. Bakteri *Mycobacteria* oleh karena bakteri ini dapat mempertahankan dekolonisasi oleh asam atau alkohol dinamakan basil tahan asam. Bakteri ini memiliki masa pertumbuhan yang lambat, media yang digunakan untuk kultur bakteri ini merupakan media yang diperkaya dengan albumin telur yaitu *Lowenstein Jensen* (LJ). *Mycobacterium tuberculosis* merupakan bakteri penyebab utama infeksi TB dan merupakan patogen pada manusia (Brooks et al., 2007).

2.5 Karakteristik *Mycobacterium tuberculosis*

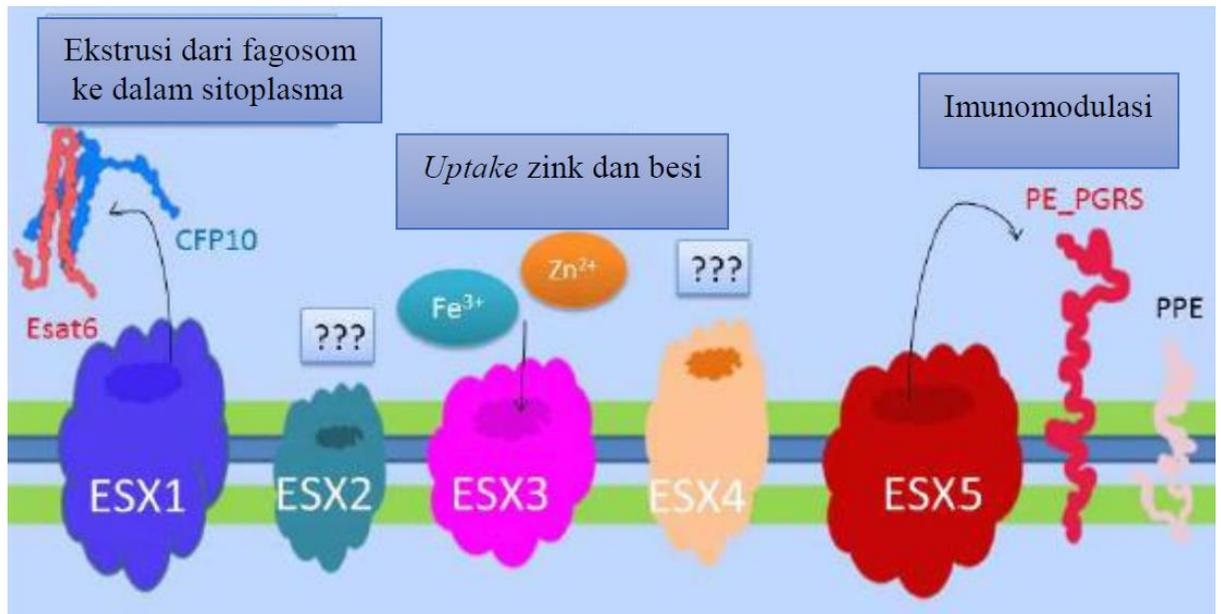
Mycobacterium tuberculosis bersifat non-motile, berbentuk batang lurus atau sedikit melengkung, tidak berspora dan tidak berkapsul, berukuran lebar 0,3 – 0,6 mm dan panjang 1-4 mm bersifat tahan asam dan alkohol setelah pewarnaan dengan phenicated fuchsin (Ziehl-Neelsen). *Acid-fastness* menjadi karakteristik terpenting *Mycobacterium tuberculosis*. Sel *Mycobacterium* mempunyai kemampuan saat penambahan asam tidak mengalami dekolonisasi (perusakan warna secara buatan) yang di sebut sebagai *Acid fast* . Sifat *Acid-fastness* ini mempunyai kandungan lipid kadar tinggi pada dinding sel, sehingga *Mycobacterium* bersifat *waxy*, hidrofobik dan susah diwarnai (Juhlin, 1967).

Mycobacterium tuberculosis pada media kultur LJ akan tumbuh lambat. Bakteri ini akan tumbuh di media LJ sekitar 1-2 bulan. Koloni yang tumbuh berwarna putih, namun khusus pada spesies yang memiliki pertumbuhan cepat akan berwarna kuning terang atau orange karena mengandung pigmen karotenoid. Termasuk dalam spesies *scotochromogenic* dimana jenis warna dan kemampuan strain dalam memproduksi warna saat dikegelapan atau sebagai respon terhadap cahaya digunakan sebagai metode untuk klasifikasi mycobacterium yang berpotensi patogenik (Juhlin, 1967).

2.6 Virulensi *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis adalah organisme yang sangat membutuhkan oksigen untuk tumbuh disebut sebagai organisasi obligat aerob. Sifat obligat aerob ini yang menyebabkan *Mycobacterium tuberculosis* sering ditemui di lobus paru bagian apeks yang dialiri udara cukup banyak. Selain itu bakteri *Mycobacterium tuberculosis* merupakan parasit intraseluler fakultatif, yaitu patogen yang dapat hidup dan berkembang biak di dalam maupun diluar sel hospes (sel fagositik), khususnya pada makrofag dan monosit. Kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* dalam bertahan di makrofag dikendalikan oleh proses kompleks dan terkoordinir. Sistem ini dikontrol oleh ESX-1 sebagai sistem sekresi protein bakteri.

Sistem sekresi protein merupakan faktor virulensi yang utama dari bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Terdapat 5 jenis sistem sekresi pada *Mycobacterium tuberculosis*, diantaranya yaitu ESX1 sampai dengan ESX5 (gambar 1). ESX1 diperlukan untuk virulensi penuh dari *Mycobacterium tuberculosis*, karena ESX1 berfungsi untuk translokasi dari fagosom kedalam sitosol makrofag. Hal ini memungkinkan bakteri terhindar dari proses fagositosis dan terlindung didalam makrofag. Dasar diagnosis imunologi infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada metode IGRA ketika ESX1 mengeluarkan ESAT-6 dan CFP-10 yang merupakan protein kecil sangat imunogenik.



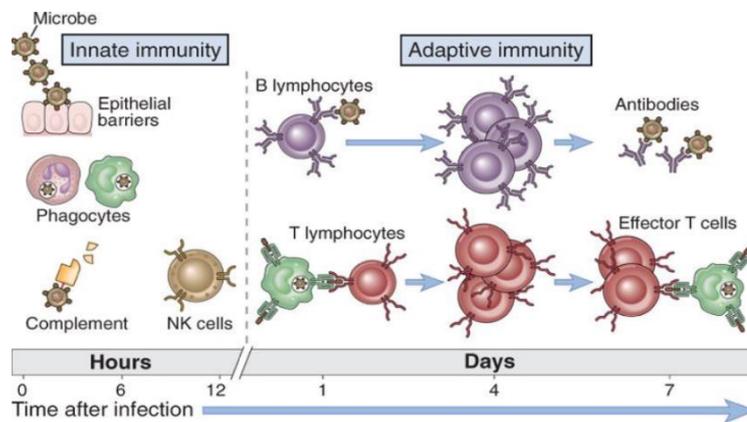
Gambar 2. Sistem sekresi protein (Giovanni Delogu dkk,2013)

Dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* tersusun atas lipid dan polipeptida. Peptidoglikan, arabinogalaktan dan asam mikolat merupakan komponen kerangka dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*. Asam mikolat merupakan suatu asam lemak α -alkil, β hidroksil (C30-C90). Sekitar 40% berat kering *Mycobacterium* adalah asam mikolat. Asam mikolat selain berperan dalam *acid fastness*, berperan penting juga dalam impermeabilitas dinding sel termasuk impermeabilitas terhadap OAT . Virulensi (keganasan), kecepatan pertumbuhan, morfologi koloni dan permeabilitas *Mycobacterium tuberculosis* tergantung komposisi dan jumlah asam mikolat.

2.7 Sistem Imunitas terhadap infeksi

Sistem imun merupakan gabungan dari sel, molekul dan jaringan yang berperan dalam resistensi terhadap infeksi. Reaksi yang merupakan koordinasi dari sel-sel, molekul-molekul dan bahan lainnya terhadap mikroba disebut respon imun. Respon imun merupakan kerjasama dari sel imun, jaringan, dan mediator imun (sitokin) terhadap mikroba atau virus (Abbas et al., 2015). Umumnya sistem imun terbagi dua yaitu non spesifik/innate dan spesifik/adaptif. Imunitas innate sebagai

pertahanan pertama terhadap mikroba sedangkan imunitas adaptif akan timbul apabila pertahanan pertama tidak mampu mengeliminasi patogen yang masuk ke dalam tubuh (**Gambar 3**) (Baratawidjaja and Rengganis, 2014).



Gambar 3. Sistem imun non spesifik dan spesifik
(Baratawidjaja and Rengganis, 2014)

Sel preieloid adalah Sel-sel imun berdiferensiasi berasal dari sel prekursor (induk) dalam sumsum tulang, sedangkan sel monosit makrofag berasal dari sel limposit (T dan B) dan sel premonosit yang berdiferensiasi (Baratawidjaja and Rengganis, 2014). Sistem Fagosit mononuklear terdiri dari sel monosit dan makrofag yang mempunyai fungsi utama dalam fagositosis dan sebagai pusat yang menghubungkan imunitas innate dan imunitas adaptif (Abbas et al., 2015).

1. Sistem Imun Nonspesifik/*Innate Immunity*

Mikroorganisme masuk dengan berbagai cara kedalam tubuh, dapat menimbulkan penyakit dan akan bereaksi dengan immunitas nonspesifik merupakan pertahanan pertama dalam melawan infeksi/benda asing. Imunitas ini memberikan respon awal terhadap mikroba dalam pencegahan, mengontrol dan mengeliminasi infeksi didalam tubuh (Abbas et al., 2015). Imunitas nonspesifik secara fisiologik berupa komponen normal tubuh, imunitas nonspesifik jumlahnya dapat ditingkatkan karena kejadian infeksi, misalnya sel darah putih meningkat selama fase akut pada banyak pasien. Imunitas nonspesifik tidak khusus ditujukan terhadap mikroba tertentu, sudah ada dan siap berfungsi sejak lahir. Mekanismenya tidak

menunjukkan kekhususan terhadap bahan asing tertentu dan mampu melindungi tubuh terhadap banyak patogen potensial yang ada dalam tubuh. Sistem tersebut merupakan pertahanan terdepan menghadapi serangan berbagai mikroba dan dapat memberikan respon langsung (Baratawidjaja and Rengganis, 2014).

2. Sistem Imun Spesifik/Adaptif

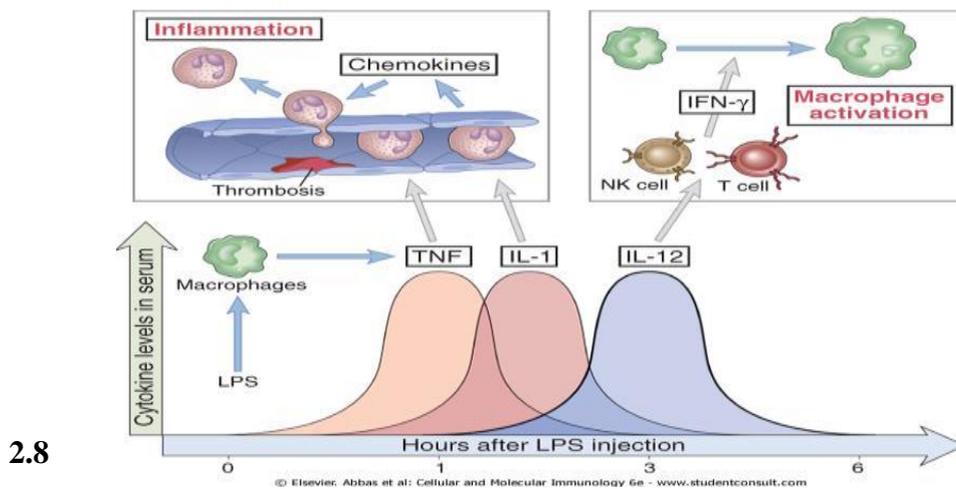
Sistem imun spesifik mempunyai kemampuan mengenali benda asing bagi dirinya. Sistem imun spesifik mengenal benda asing yang pertama kali terpajan dengan tubuh akan segera dikenali. Sensitasi akan timbul setelah pajanan berikutnya, sehingga bila terdapat antigen yang sama dan masuk tubuh untuk kedua kali akan dikenali lebih cepat kemudian dihancurkan sehingga disebut spesifik. Sistem imun spesifik terdiri atas sistem imun humoral dan imunitas seluler. Pada imunitas humoral, sel B akan melepaskan antibodi untuk melawan mikroba ekstraseluler. Sel B dapat diaktivasi yang diawali dengan pengenalan antigen spesifik oleh reseptor permukaan. Antigen dan perangsang lain seperti Th yang akan merangsang sel B spesifik berproliferasi kemudian berdiferensiasi dan berkembang menjadi sel plasma yang memproduksi anti bodi. Anti bodi yang dilepaskan ini akan ditemukan didalam serum. Dalam perkembangannya sel B awalnya akan memproduksi IgM atau isotipe Ig lain (seperti IgG), yang kemudian menjadi matang atau menetap sebagai sel memori. Fungsi utama dari anti bodi ialah pertahanan terhadap infeksi ekstraseluler, virus, dan bakteri serta menetralkan toksin. Masing-masing sel akan berproliferasi terutama atas pengaruh sitokin IL-12 yang meningkatkan jumlah sel imatur. Sedangkan pada imunitas seluler sel T mengaktifkan sel makrofag yang bertujuan menghancurkan mikroba dan memusnakan sel yang terinfeksi di intraseluler. Berbeda dengan sel B, sel T terdiri atas beberapa subset sel dengan fungsi yang berbeda yaitu sel CD4⁺ (Th1, Th2) dan CD8⁺ (CTL atau Tc dan Ts atau sel Tr atau T3). Fungsi utama sistem imun spesifik selular adalah pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, virus, jamur, parasit dan keganasan. Sel CD4 akan mengaktifkan sel Th1 yang dilanjutkan pengaktifan makrofag

untuk menghancurkan mikroba. Sel CD8 dapat memusnahkan sel terinfeksi (Abbas et al., 2015) (Baratawidjaja and Rengganis, 2014).

3. Sitokin

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

Inflamasi merupakan respon kompleks jaringan terhadap infeksi, paparan toksin atau kerusakan sel. Awal inflamasi terjadi peningkatan aliran darah karena adanya vasodilatasi pada tempat terjadinya infeksi atau kerusakan jaringan, sehingga leukosit dapat keluar dari pembuluh darah dan masuk jaringan. Leukosit terutama neutrophil dan monosit, bergerak menuju sasaran akibat kemotaksis. Selain itu juga terjadi pelepasan protease dan radikal bebas. Pada respon yang sehat, respon inflamasi teraktivasi menyingkirkan patogen (kalau peristiwa itu adalah infeksi) dan memulai proses perbaikan lalu mereda (sembuh), namun inflamasi dapat merusak sel yang sehat akibat diproduksinya reactive oksigen species dan enzim lisozom oleh neutrophil dan makrofag dapat merangsang inflamasi lebih lanjut (**Gambar 4**) (Abbas et al., 2015).



Gambar 4. Peranan sitokin pada imunitas nonspesifik terhadap mikroba yang memproduksi LPS (Abbas, Lichtman and Pillai, 2015)

Patogenesis *Mycobacterium tuberculosis*

Infeksi *Mycobacterium tuberculosis* pada manusia ditularkan melalui inhalasi dari droplet aerosol yang mengandung basil tuberkel yang dikeluarkan oleh individu dengan penyakit TB aktif. *Mycobacterium tuberculosis* terkandung di dalam droplet dengan diameter < 5 μm ketika pasien yang terinfeksi batuk, bersin atau berbicara. Untuk dapat meninfeksi, droplet harus masuk ke dalam alveoli di paru. ketika di dalam alveoli, sistem imun penjamu akan merespon dengan mengeluarkan sitokin dan limfokin yang menstimulasi monosit dan makrofag.

Mycobacterium tuberculosis memiliki pertahanan diri terhadap makrofag, sehingga dapat menghindari dari proses penghancuran dan dapat bertahan hidup serta mulai berkembang biak di dalam makrofag. Setelah 1 sampai 2 bulan setelah paparan, terlihat lesi patogenik di paru-paru yang disebabkan oleh adanya infeksi.

Patogenesis TB pada individu yang belum pernah terpajan akan membentuk imunitas seluler yang menimbulkan resistensi terhadap organisme dan menyebabkan terjadinya hipersensitifitas jaringan terhadap antigen TB. Hipersensitifitas jaringan yang destruktif mengakibatkan gambaran patologik berupa granuloma perkijuan dan kavitasi.

Secara detail, strain *Mycobacterium tuberculosis* masuk ke alveoli dan akan difagositosis oleh makrofag alveolar (masuk ke endosom makrofag yang diperantarai oleh reseptor manosa makrofag yang mengenali glikolipid berselubung manosa pada dinding sel tuberkular). Makrofag ini dirangsang oleh ligase *Toll-Like Receptor* (TLRs) dan *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) untuk menghasilkan sitokin dan kemokin pro-inflamatori. Hal ini berakibat pada perekrutan leukosit yang lebih banyak ke sumber infeksi. Neutrofil dan monosit akan datang dan memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* serta mengeluarkan lebih banyak sitokin dan kemokin sehingga mulai terbentuknya granuloma awal. Selain itu, sel dendritik juga memfagositosis *Mycobacterium tuberculosis* kemudian bermigrasi ke kelenjar getah bening untuk mempersentasikan antigen *Mycobacteria* ke limfosit (Sakamoto, 2012).

2.9 Sistem imunitas terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Mekanisme pertahanan tubuh terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* terdiri atas 2 bagian, yaitu respon imun seluler (aktifitas sel T dan Makrofag) bersama dengan sitokin dan respon imun humoral (yang dimediasi oleh antibodi). *Mycobacterium tuberculosis* merupakan patogen intraseluler yang mampu bertahan dalam menghadapi respon imun yang kuat dan karena itu berkembang menjadi penyakit kronis. Pengendalian dari infeksi TB bergantung kepada perkembangan respon imun innate dan adaptif di situs infeksi. Pada prinsipnya, respon imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis* melibatkan dua sel, yaitu makrofag dan sel limfosit T. Bakteri yang difagositosis makrofag selanjutnya akan dihancurkan. Epitop dari hasil penghancuran tersebut berikatan dengan antigen leukosit dan sel lain yang mengikat epitop tersebut dengan permukaan makrofag untuk dipresentasikan oleh sel limfosit T. Sebagian besar sel dan molekul sistem imun yang berperan selama infeksi *Mycobacterium tuberculosis* memiliki beberapa peran dalam reaksi imun (Ashenafi S, 2013).

Mycobacterium tuberculosis yang difagosit oleh sel dendritik dibawa ke kelenjar getah bening, selanjutnya sel dendritik juga akan mengaktifkan sel T CD4⁺ dan

CD8⁺ (namun fungsi efektor sel T dapat tercapai hanya setelah priming dan diferensiasi) sehingga menyebabkan produksi dari IFN- γ dan TNF- α (respon anti-mycobacterial pertama dalam melawan mycobacteria) (Flynn and Chan, 2005; Sharma et al., 2004). TNF- α dapat memstimulasi neutrophil dan makrofag untuk merangsang apoptosis, serta menghancurkan bakteri. Selain itu, TNF- α dan IL-1 β juga merupakan sitokin penting yang mengarahkan pembentukan granuloma (Sakamoto, 2012).

Mycobacterium tuberculosis yang telah melewati barrier epitel dapat di fagositosis oleh sel dendritik. *Mycobacterium tuberculosis* masuk dengan cara mengikat reseptor *dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin* (DC-SIGN) melalui komponen dinding sel *mannosylated lipoarabinan* (ManLAM). Setelah difagositosis, sel dendritik mengalami pematangan dan berpindah ke nodus limpa, dimana mereka akan mempresentasikan antigen kemolukel *Major Histocompatibility Complex* (MHC) serta CDI, untuk memancing sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Sel-sel dendritik yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis* memiliki gangguan kemampuan dalam mempresentasikan antigen lipid yang diperkirakan karena keterlambatan kematangan yang diperantarai oleh komponen dinding sel dan tertahan di paru-paru dalam waktu yang lama (Sakamoto, 2012).

Imunitas terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* dimediasi oleh interaksi antara limfosit T CD4⁺ dan CD8⁺ dan sel makrofag yang mengandung patogen intraseluler. Sel-sel ini berinteraksi satu sama lain melalui jaringan kompleks sitokin. Sel T helper 1 (Th1) dianggap penting, karena sitokin yang dihasilkan (yaitu IL-2 dan IFN- γ) sebagian besar disekresikan oleh individu yang resisten terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Sebaliknya, sitokin sel T helper 2 (Th2) (misalnya IL-4 dan IL-10) ditemukan terutama pada individu yang rentan terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Proliferasi optimal dari Th1 dan Th2 diperkirakan bergantung pada *Antigen Presenting Cells* (APC) dan faktor-faktor *costimulator* seperti IL-2 dan IL-10. IFN- γ merupakan activator makrofag yang penting dan dihasilkan oleh sel TCD4⁺ dan CD8⁺. Selain IFN- γ , TNF- α juga penting

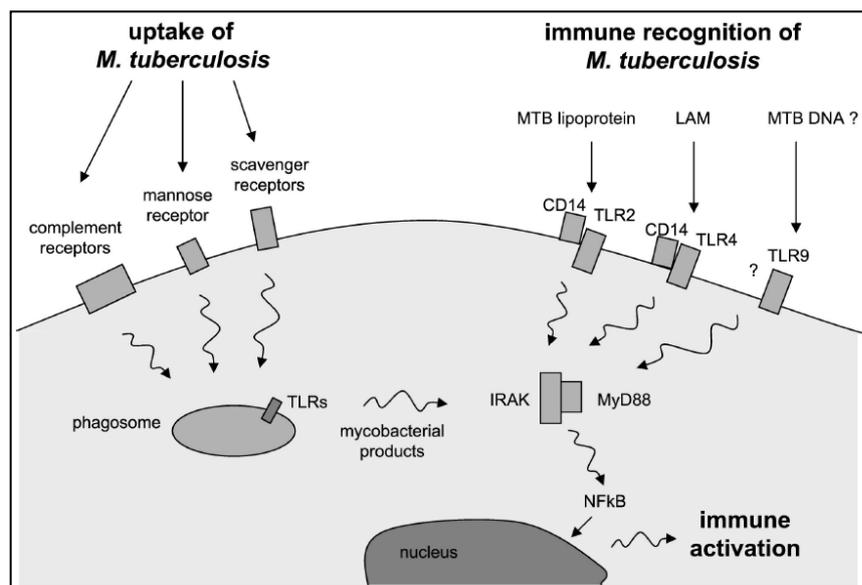
untuk perlindungan terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Sel T CD8⁺ (CTL) juga berperan penting dalam perlindungan terhadap penyakit yang disebabkan oleh *M.tuberculosis* (Huygen et al., 1996). Vaksin DNA merangsang respon yang kuat dari sel T yang spesifik terhadap suatu antigen dengan adanya pelepasan IFN- γ . Studi menunjukkan bahwa sel T CD4⁺ merupakan sumber utama dari IFN- γ (Kamath et al., 1999).

Sitokin sel T (IFN- γ) *Reactive Oxygen Species* (ROS) diproduksi dari aktivasi makrofag memproduksi dan *reactive nitrogen species* (RNS). Sitokin ini terutama disekresi oleh sel Th1 dan limfosit sitotoksik CD8⁺, sel-sel NK, sel-sel *Natural Killer* (NKT) APC dan pada sel B (kuantitas rendah) (Martinez et al., 2009). Diketahui bahwa IFN- γ dan IL-12 merupakan sitokin yang penting dalam perkembangan dan pematangan dari limfosit (Fonseca et al., 2001). IL-12 yang diproduksi oleh sel dendritik membantu dalam menginduksi respon sel T tipe 1 (Cooper et al., 1995). IL-12 merupakan sitokin penting yang mengarahkan diferensiasi Th1 dan produksi IFN- γ , yang dibutuhkan untuk pertahanan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dan patogen intraseluler lainnya. IL-12 juga dapat meningkatkan sel-sel NK dan sel T (Cooper et al., 1995; Sakamoto, 2012).

Selain menginduksi respon Th1, infeksi *Mycobacterium tuberculosis* juga menginduksi komponen Th2. Ekspresi dari IL-4 dan IL-10 disinyalir dapat menurunkan modulasi fungsi makrofag, sehingga mengurangi fungsi mikrobisida makrofag (Jacobs et al., 2000). Penelitian yang berkaitan dengan produksi sitokin dengan perkembangan penyakit tuberculosis menunjukkan bahwa produksi IFN- γ terjadi pada penyakit ringan sedangkan pada stadium lanjut, tingkat IL-4 meningkat bersamaan dengan penurunan produksi IFN- γ (Ashenafi S, 2013; Vidyarani et al., 2006). IL-4 adalah sitokin dari Th2 yang secara umum meningkat pada tahap tuberculosis lanjut dan mempunyai peran *downregulate* Th1 (Vidyarani et al., 2006). Kedua sitokin (IL-4 dan sitokin Th2 yang lain) meningkat pada pasien TB aktif (Sakamoto, 2012).

Sitokin lainnya yaitu IL-10 memiliki sifat *immunosuppressive cytokines* bersama dengan *Transforming Growth Factor* (TGF)- β , keduanya menekan respon Th1,

berperan dalam TB aktif dan cenderung diekspresikan pada pasien tuberculosis (Hirsch et al., 1996). IL-10 diidentifikasi sebagai “*cytokine synthesis inhibitory factor*” sebuah produk dari Th2 setelah adanya stimulasi dari antigen atau protein. Kemampuan sel myeloid dapat di hambat oleh IL-10 (makrofag dan sel dendritik) untuk mengaktivasi sel Th1. IL-10 tidak hanya diproduksi oleh Th2, tetapi juga diproduksi oleh sel B, neutrofil, makrofag dan beberapa subset sel dendritik (Redford et al., 2011). IL-10 dapat diinduksikan oleh netrofil dalam respon terhadap adanya *Mycobacterium tuberculosis* melalui *caspase recruitment domain family*, member 9 (CARD9) atau respon terhadap BCG melalui aktivasi dari tirosin kinase *spleen*, yang mengarah kepada fosforilasi dari protein kinase yang teraktivasi mitogen p38 dan *serine/threonine Akt kinase*. IL-10 menghambat respon imun protektif terhadap patogen dengan menghambat produksi sitokin pro-inflamatori seperti TNF- α dan IL-12 (Redford et al., 2011).



Gambar 5. Fagositosis dan pengenalan imun terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Berbagai reseptor telah diidentifikasi untuk fagositosis *Mycobacterium tuberculosis* oleh makrofag dan sel dendritik.

Setelah infeksi 2-4 minggu, terdapat dua respon terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, yaitu respon *Cell Mediated Immunity* (CMI) yang mengaktivasi makrofag dan juga respon kerusakan jaringan. Respon kerusakan jaringan

merupakan akibat dari reaksi *Delayed Type Hypersensitivity* (DTH) yang menghancurkan makrofag yang mengandung bakteri multiplikasi sehingga menyebabkan kerusakan jaringan sekitar.

2.10 Manifestasi Klinis TB

Gejala klinis TB seringkali tidak khas dan sangat bervariasi, dikarenakan bakteri ini dapat mengenai setiap organ. Mudah kelelahan, lemah, berat badan menurun, demam dan berkeringat saat malam menjadi beberapa gejala penyakit TB. Keterlibatan paru mengakibatkan batuk kronis, batuk darah biasanya berhubungan dengan lesi yang sudah sangat lanjut. Meningitis atau keterlibatan saluran kemih dapat terjadi tanpa adanya tanda-tanda lain TB. Penyebaran melalui darah menyebabkan TB milier dengan lesi pada banyak organ dan angka kematian yang tinggi.

2.11 Diagnosis TB

Penegakan diagnosis TB didasarkan pada manifestasi klinis yang diperkuat oleh pemeriksaan laboratorium penunjang. Pemeriksaan Tes cepat molekuler merupakan pemeriksaan laboratorium untuk mendiagnosis TB, sedangkan tes tuberkulin yang positif tidak menggambarkan penyakit aktif karena infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Beberapa pengujian laboratorium dilakukan untuk menegakkan diagnosis.

2.11.1 Pemeriksaan Bakteriologi

Mycobacterium tuberculosis ditemukan pada pemeriksaan bakteriologik mempunyai arti yang sangat penting dalam menegakkan diagnosis. Bahan untuk pemeriksaan bakteriologik ini dapat berasal dari berbagai macam specimen sesuai lokasi pengambilan yang di curigai seperti dahak, cairan pleura, liquor cerebrospinal, bilasan bronkus, bilasan lambung, kurasan bronkoalveolar (bronchoalveolar lavage/BAL), urin, faeces dan jaringan biopsi (termasuk biopsi jarum halus/BJH). Pemeriksaan bakteriologik dari spesimen dahak dan bahan lain

(cairan pleura, liquor cerebrospinal, bilasan bronkus, bilasan lambung, kurasan bronkoalveolar (BAL), urin, faeces dan jaringan biopsi, termasuk BJH) dapat dilakukan dengan cara pemeriksaan mikroskopik dan biakan kuman (Aditama et al., 2006).

2.11.1.1 Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan 2 spesimen (sewaktu dan pagi/ SP) dahak secara mikroskopis nilainya identik dengan pemeriksaan dahak secara biakan. Pemeriksaan dahak mikroskopis dinilai lebih efisien, mudah, murah, bersifat spesifik dan dapat dilaksanakan di semua unit laboratorium fasilitas pelayanan kesehatan (fasyankes) yang memiliki mikroskop dan tenaga mikroskopis TB terlatih (Kemenkes RI, 2012a). Pemeriksaan sputum BTA secara mikroskopis saat ini dilakukan pada pemeriksaan setelah bulan kedua, kelima dan keenam dalam masa pengobatan TB. Pemeriksaan sputum dilakukan dengan mengumpulkan 2 sampel dahak yang dikumpulkan dalam dua hari kunjungan yang berurutan berupa sewaktu-pagi (SP). Hasil positif dapat diperoleh jika didapatkan basil sebanyak 104/ml sputum atau minimal 5000/ml sputum. Teknik mikroskopis BTA dapat dilakukan dalam waktu relatif cepat, tetapi terkadang terdapat masalah saat pasien dalam pengumpulan sputum dari pasien juga pasien yang tidak bisa mengeluarkan dahaknya. Tidak semua pasien TB terutama TB paru dapat mengeluarkan basil TB pada sputumnya. Kekurangan dari pemeriksaan mikroskopis BTA yaitu Pemeriksaan ini tidak dapat membedakan kuman penyebab TB dengan spesies kuman *Mycobacterium* yang lain (Meita and Lisyani, 2014).

2.11.1.2 Biakan Kuman

Pemeriksaan biakan *Mycobacterium tuberculosis* dapat dilakukan dengan metode konvensional. Hasil pemeriksaan biakan untuk mendapatkan diagnosis pasti, dapat mendeteksi *Mycobacterium tuberculosis* dan juga *Mycobacterium Other Than Tuberculosis (MOTT)*. Pemiakan *Mycobacterium tuberculosis* dapat dilakukan di

berbagai medium seperti medium agar semisintetik, medium telur inspissated (misalnya Lowenstein Jensen).

Pembiakan yang paling sering adalah dengan menggunakan media Lowenstein Jensen. Medium ini mengandung malakit hijau bertujuan untuk menghambat bakteri lain dan lama pertumbuhannya kurang lebih selama 3-6 minggu (Aditama et al., 2006). Diagnosis TB melalui pemeriksaan biakan kuman merupakan metode baku emas (gold standar). Pemeriksaan biakan kuman memerlukan waktu lebih lama (paling cepat sekitar 6 minggu) dan harus dikerjakan di laboratorium dengan peralatan khusus (Kemenkes RI, 2012b).

2.11.2 Pemeriksaan Radiologi

Pemeriksaan standar dalam tatalaksana pengobatan TB ialah foto toraks PA dengan atau tanpa foto lateral. Pemeriksaan lain sesuai indikasi antara lain adalah foto apiko-lordotik, oblik, CTScan. Pada pemeriksaan foto toraks, tuberculosis dapat memberi gambaran bermacam-macam bentuk (multiform).

Gambaran radiologik yang dicurigai sebagai lesi TB aktif:

- a) Bayangan berawan / nodular di segmen apikal dan posterior lobus atas paru dan segmen superior lobus bawah
- b) Kaviti, terutama lebih dari satu, dikelilingi oleh bayangan opak berawan atau nodular
- c) Bayangan bercak milier
- d) Efusi pleura dapat unilateral atau bilateral

Gambaran radiologik yang dicurigai lesi TB inaktif:

- a) Fibrotik pada segmen apikal dan atau posterior lobus atas
- b) Kalsifikasi atau fibrotik
- c) Fibrotoraks/Fibrosis parenkim paru dan atau penebalan pleura (Aditama et al., 2006).

2.11.3 Pemeriksaan Molekuler Polymerase Chain Reaction (PCR)

Pemeriksaan menggunakannya metode PCR (Polymerase Chain Reaction) merupakan Teknik amplifikasi gen untuk mengidentifikasi secara langsung dapat mendeteksi keberadaan kuman TB baik dari isolat maupun dari bahan sediaan spesimen. Teknik amplifikasi gen sangat sensitif walaupun dalam kondisi yang berbeda dibawah standar sekalipun masih dapat mendeteksi keberadaan kuman meskipun jumlahnya hanya 1–10 kuman. Perkembangan yang lebih baik dan cukup bermakna terhadap diagnosis TB adalah teknik amplifikasi asam nukleat (Nucleic Acid Amplification, NAA). Salah satu Teknik pemeriksaan NAA ini adalah teknik PCR, beberapa teknik PCR yang dikembangkan adalah PCR konvensional, Nested PCR dan RT–PCR. Target gen yang sering digunakan adalah MPB 64, TRC 4, IS 1081, div R, 38 kDa dan GC repeats (Katoch, 2004).

2.11.4 Pemeriksaan Serologis

Pemeriksaan serologis untuk diagnosis TB terus berkembang, pemeriksaan serologis untuk tuberculosis pertama kali ditemukan oleh Arloing pada tahun 1898 dengan teknik hemaglutinasi. Pemeriksaan serologis TB Paru sampai saat ini terus berkembang dengan pesat dengan pemeriksaan menggunakan prinsip reaksi antigen-antibodi (Okuda et al., 2004).

Beberapa uji serologi yang digunakan antara lain:

2.11.4.1 Enzym Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Teknik pemeriksaan ini merupakan salah satu uji serologi yang dapat mendeteksi respon humoral berupa proses antigen-antibodi yang terjadi (Aditama et al., 2006). Prinsip dari pemeriksaan ELISA adalah reaksi antibodi (Ag-Ab) setelah penambahan konjugat yaitu antigen atau antibodi yang dilabel enzim dan substrat akan terjadi perubahan warna. Perubahan warna ini yang akan diukur intensitasnya

dengan alat pembaca yang disebut spektrofotometer atau ELISA reader dengan menggunakan panjang gelombang tertentu (Ahmed et al., 2008).

2.11.4.2 Uji Immunochromatographic Tuberculosis (ICT-TB)

Teknik baru dalam alternatif penegakkan diagnosis TB adalah dengan menggunakan Immunochromatography Tuberculosis (ICT-TB) yang merupakan uji serologis yang cepat dan sederhana serta mudah dalam pengoperasiannya. Prinsip kerja ICT-TB ini adalah reaksi antigen pada alat yang akan berikatan dengan OAT dari sampel pasien yang dikonjugasikan ke partikel halus berwarna, yaitu colloidal gold (merah) sebagai pelabel. Partikel tersebut sangat halus (1–20 nm) sehingga daya migrasinya kuat dan dalam waktu yang sangat singkat dapat mencapai garis atau antigen pengikat dan menimbulkan sinyal warna yang spesifik. Kompleks imun yang terbentuk kemudian akan mengalir melalui membran (nitroselulose) yang dilapisi oleh penangkap terhadap antigen mikroba yang sama (Meita and Lisyani, 2014).

2.11.4.2.1 Uji Peroksidase Anti Peroksidase (PAP)

Uji ini merupakan salah satu jenis uji yang mendeteksi reaksi serologis. Uji serologis imunoperoksidase menggunakan alat histogen imunoperoksidase staning untuk menentukan adanya IgG spesifik terhadap kuman TB (Aditama et al., 2006).

2.11.4.2.2 Uji Mycodot

Uji ini mendeteksi antibodi antimycobacterium di dalam tubuh manusia. Uji ini menggunakan antigen lipoarabinomannan (LAM) yang direkatkan pada suatu alat yang berbentuk sisir plastik. Alat ini kemudian dicelupkan ke dalam serum pasien, dan bila di dalam serum tersebut terdapat antibodi spesifik anti LAM dalam jumlah yang memadai yang sesuai dengan aktivitas penyakit, maka akan timbul perubahan warna pada alat yang dapat di deteksi dengan mudah terjadi (Aditama et al., 2006).

Antigen *Mycobacterium tuberculosis* di dalam serum atau plasma manusia dapat dideteksi keberadaannya pada serum pasien pada 1-2 bulan setelah infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis*. *Mycobacterium tuberculosis* memiliki dinding sel untuk melindungi dirinya. Kapsul yang menyelubungi kuman ini memiliki struktur protein yang bergabung dengan unsur lain membentuk antigen yang nantinya akan dikenali oleh tubuh untuk membentuk sistem pertahanan yang akan digunakan untuk mengaktifkan sel-sel imunitas dan komplemen. Pada beberapa isolat antigen *Mycobacterium tuberculosis* yang didapat memiliki beberapa antigen yang berbeda satu sama lain, hal ini menimbulkan antibodi yang berbeda timbul dari pasien yang diteliti (Okuda et al., 2004).

Beberapa jenis antigen yang terdapat pada dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* antara lain *Tuberculous Glycolipid* (TBGL); *Lipoarabinomannan* (LAM); Antigen-60 (A60); golongan trehalose yang mengandung glycolipid, seperti *2,3-di-asiltrehalose*, *2,3,6-triasiltrehalose*, *cord factor* (*6,6'-dimycolate*), dan *sulfolipid I* (*SL-I*).

Setiap antigen ini akan memicu timbulnya imunoglobulin yang berbeda. Perbedaan ini dipengaruhi oleh karena respon HLA manusia. Terkadang reaksi silang tidak bisa dielakkan dalam melakukan tes serologis. Sering kali hal ini menyebabkan terjadinya reaksi false-positif, hal ini disebabkan karena infeksi TB Paru yang bersifat laten. Okuda dkk, 2004 melakukan penelitian dengan menggunakan semua antigen ini, tetapi hanya dengan penggunaan antigen-60 sebagai tes sudahlah cukup (Okuda et al., 2004). Pada beberapa hasil peneltian didapatkan antigen 38-kDa merupakan antigen yang terbaik (Perkins et al., 2003). IgG anti TB di tubuh manusia dihasilkan oleh sel plasma yang merupakan hasil diferensiasi dari Sel B limfosit. IgG merupakan suatu protein globulin yang berfungsi sebagai sistem kekebalan tubuh humoral manusia yang spesifik untuk antigen tertentu. Fungsi utama dari Immunoglobulin adalah mengikat kemudian menghancurkan antigen yang berfungsi sebagai aktivator dari komplemen akan menghasilkan proses opsonisasi. Proses pembentukan IgG diawali oleh destruksi kuman TB oleh makrofag. Proses ini mula-mula terhambat karena mekanisme kuman TB di dalam

menghindari proses fagositosis. Proses dimulai dari pengenalan antigen sangat dipengaruhi oleh jumlah kuman yang ada di dalam tubuh, jika kuman terdapat di luar sel seperti yang dijumpai pada pasien dengan BTA positif, akan menghasilkan proses imunologi humoral yang lebih banyak dibandingkan jika pada pasien dengan kuman yang lebih banyak terdapat di intraseluler karena lebih seringnya kontak dengan bakteri. Proses pembentukan antibodi ini lebih berguna karena dapat melawan kuman di luar sel (Palomino et al., 2007).

2.11.5 *GeneXpert Mycobacterium tuberculosis*

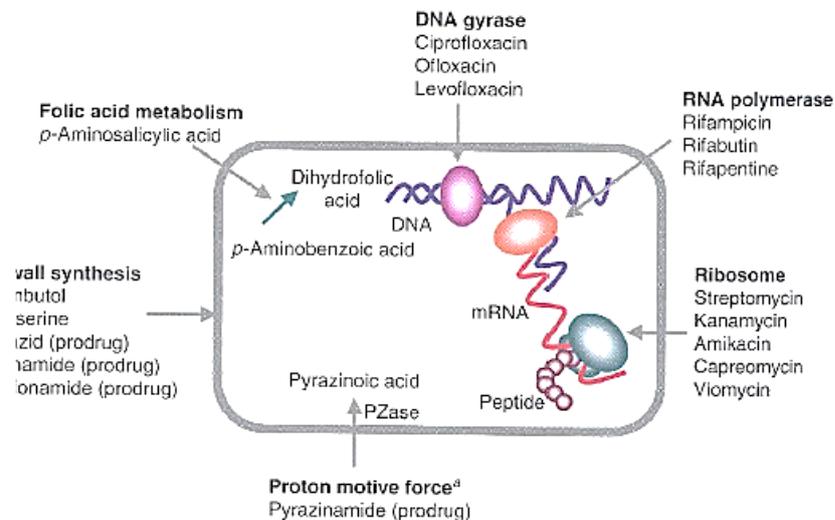
Perkembangan teknologi pemeriksaan molekuler dalam mendiagnosis TB sudah digunakan sejak beberapa waktu lalu. Tahapan pengolahan spesimen dan ekstraksi DNA mempersulit implementasi di Negara dengan sumber daya terbatas. Pemeriksaan *genexpert Mycobacterium tuberculosis* merupakan pemeriksaan molekuler dengan teknologi Nucleic Acid Amplification Technology (NAAT) yang dapat mendiagnosis TB dalam waktu 2 jam. *Mycobacterium tuberculosis Genexpert* merupakan satu-satunya pemeriksaan molekuler yang mencakup seluruh elemen reaksi yang diperlukan termasuk seluruh reagen yang diperlukan untuk proses PCR di dalam satu cartridge.

Pemeriksaan *GeneXpert Mycobacterium tuberculosis* mampu mendeteksi DNA *Mycobacterium tuberculosis* kompleks secara kualitatif dari spesimen langsung. Prinsip kerja dari pemeriksaan ini yaitu deteksi molekuler berbasis Nested Real-Time PCR untuk diagnosis TB. Primer PCR yang digunakan mampu mengamplifikasi sekitar 81 bp daerah inti gen *rpoB*. Pemeriksaan *GeneXpert Mycobacterium tuberculosis* dilakukan dengan mesin/alat *GeneXpert*, menggunakan system otomatis yang mengintegrasikan proses purifikasi spesimen, amplifikasi asam nukleat dan deteksi sekuen target. Sistem tersebut terdiri atas mesin/alat *GeneXpert*, komputer dan perangkat lunak. Setiap pemeriksaan menggunakan cartridge sekali pakai dan dirancang untuk meminimalkan kontaminasi silang (Kemenkes RI, 2015).

2.12 Penatalaksanaan TB

Tatalaksana pelayanan penyakit TB aktif diobati dengan terapi kombinasi yang terdiri atas 3 atau lebih obat (umumnya 4 jenis obat). Selama terapi, pasien dengan TB aktif umumnya diberikan Isoniazid (INH), Rifampisin (RIF), Pirazinamid (PZA) dan Etambutol (E) selama 2 bulan yang merupakan fase intensif (gambar 21). Kemudian terapi dilanjutkan dengan pemberian isoniazid dan rifampisin selama 4 bulan lagi (fase lanjutan) untuk memusnahkan sisa bakteri yang telah masuk kedalam kondisi *dormant*. Tujuan awal dari terapi kombinasi tersebut adalah untuk meminimalkan perkembangan resistensi terhadap streptomisin setelah obat tersebut diperkenalkan pertama kali. Saat ini, standar terapi untuk infeksi TB sensitif obat sangat efektif dalam pembersihan bakteri (Hoagland et al., 2016).

Terapi efektif membutuhkan pemberian obat dalam jangka waktu panjang karena berbagai karakteristik *Mycobacterium tuberculosis* menyebabkan sifat kronis penyakit ini (Cole et al., 1998). Karakteristik tersebut adalah waktu tumbuh bakteri (waktu penggandaan kurang lebih 24 jam), kondisi bakteri *dormant* di dalam makrofag dan *complex*, permeabilitas dan kekerasan permukaan sel bakteri. Monoterapi tidak dilalukan karenamengarahkan pada perkembangan strain resisten obat. Sehingga, terapi kombinasi seharusnya menjadi satu-satunya terapi yang digunakan kecuali untuk pencegahan TB pada pasien HIV, terapi dengan obat tunggal berupa Isoniazid dapat diberikan (WHO, 2011).



Gambar 6. Mekanisme kerja obat OAT (Ma dkk., 2007).

Berbagai obat dalam terapi standar memiliki target populasi *Mycobacterium tuberculosis* yang berbeda-beda (Mitchison, 2005). Isoniazid suatu inhibitor sintesis dinding sel, membunuh secara aktif bakteri yang sedang tumbuh dan fungsi utama dalam pembasmian populasi yang sedang memperbanyak diri (*replicating bacteria*). Rifampisin, suatu inhibitor sintesis RNA, aktif melawan bakteri baik yang sedang memperbanyak diri maupun tidak (*replicating* dan *non replicating bacteria*). Pirazinamid, diperkirakan sebagai suatu inhibitor *proton motive force*, hanya muncul dalam bentuk aktif di bawah kondisi asam selama 2 bulan pertama terapi. Rifampisin dan pirazinamid memerankan fungsi utama dalam perpendekan durasi terapi dari lebih dari 24 bulan menjadi hanya 6 bulan. Mekanisme aksi tiap agen menentukan peran obat dalam terapi *Mycobacterium tuberculosis*. Namun, mekanisme beberapa obat belum dapat diungkap sepenuhnya sehingga beberapa mekanisme aksi pada ilustrasi gambar 6 Berikut masih berupa hipotesis (Ma et al., 2007).

Obat anti-tuberculosis (OAT) digolongkan menjadi 5 kelompok berdasarkan bukti efikasi, potensi, kelas obat dan pengalaman penggunaannya (WHO, 2010). Semua obat lini pertama memiliki standar singkatan dengan 3 huruf atau 1 huruf. Daftar kelompok obat tersebut dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 1. Kelompok obat OAT

Obat OAT lini pertama	Kelompok 1: Oral: Isoniazid (INH/H), Rifampisin/rifampin (RIF/R), Pirazinamid (PZA/Z), Etambutol (EMB/E), Rifapentin (RPT/P) atau Rifabutin (RFB)
Obat OAT lini kedua	Kelompok 2: Aminoglikosida injeksi: Streptomisin (STM/S), kanamisin (Km), Amikasin (Amk), Polipeptida injeksi: Kapreomisin (Cm), Viomisin (Vim)
	Kelompok 3: Fluoroquinolon oral dan injeksi: Ciprofloksasin (Cfx), Levofloksasin (Lfx), Moxifloksasin (Mfx), Ofloksasin (Ofx), Gatifloksasin (Gfx)
	Kelompok 4: Oral: Asam Aara-aminosalisilat (PAS), Sikloserin (CS), Terizidon (Trd), Etionamid (Eto), Protionamid (Pto),
Obat OAt lini ketiga	Kelompok 5: Clofazimin (Cfz), Linezolid (Lzd), Amoksisilin plus Klavulanat (Amx/Clv), Imipenem plus Cilastatin (Ipm/Cln), Klaritomisin (Clr).

2.13 Resistensi Antibiotika Pengobatan TB

Penggunaan obat yang sama berulang-ulang dan panjangnya waktu terapi sering menyebabkan kepatuhan pasien yang rendah dapat terjadi penghentian pengobatan sebelum waktunya. Akibatnya, strain resisten obat pun muncul. Berdasarkan molekuler biologi mycobacterium, mekanisme penyebab munculnya strain resisten dapat dibagi menjadi 2 yaitu mekanisme *acquired resistance* dan mekanisme resistensi intrinsik (Smith et al., 2013).

2.13.1 Mekanisme *Acquired Resistance*

Bakteri patogenik termasuk *Mycobacterium tuberculosis* mampu mengalami resistensi terhadap antibiotik umum yang di gunakan sebelumnya dimana bakteri sensitif terhadap antibiotik tersebut. Konsep resistensi ini disebut “*Acquired Antibiotic Resistance*”. Jenis resistensi ini dapat terjadi akibat mutasi maupun transfer gen horizontal. Pada *Mycobacterium tuberculosis*, transfer horizontal suatu gen resisten melalui plasmid atau elemen transport yang belum dilaporkan. Namun, semua resistensi yang disebabkan *Acquired Resistance*” yang diketahui saat ini terjadi akibat adanya mutasi kromosomal.

Gen yang terlibat pada resistensi *Mycobacterium tuberculosis* dirangkum pada tabel dibawah ini.

Tabel 2. Gen terlibat dalam pembentukan resistensi obat pada *Mycobacterium tuberculosis*

	Obat	Gen	Fungsi gen	Peran
Lini pertama	Isoniazid	<i>katG</i>	Katalase peroksidase	Aktivasi <i>prodrug</i>
		<i>inhA</i>	Enoil ACP reductasi	Target obat
		<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Modulasi aktivasi
		<i>ahpC</i>	Alkil hidroperoksida	Penanda resistensi
	Rifampisin	<i>rpoB</i>	β -subunit RNA polimerasi	Target obat
	Pirazinamid	<i>PnCA</i>	Pirazinamidase	Aktivasi <i>prodrug</i>
		<i>rspA</i>	Potein ribosomal S1	Target obat
	Etambutol	<i>EmbCAB</i>	Arabinosil transferase	Target obat
		<i>embR</i>	Regulator transkripsi EmbCAB	Ekspresi target obat
		Streptomisin	<i>rpsL</i>	Protein ribosomal S12

Lini kedua		<i>Rrs</i>	16S rRNA	Target obat
		<i>gidB</i>	16S rRNA metil transferase	Modifikasi target
	Amikasin/ Kanamisin	<i>Rrs</i>	16S rRNA	Target obat
		<i>EIS</i>	Asetiltransferase	Modifikasi obat
	Etionamid	<i>ethA</i>	Flavin monooksigenase	Aktivasi prodrug
		<i>inhA</i>	Enoil ACP reductase	Target obat
		<i>eth R</i>	Penekan transkripsi ethA	Ekspresi activator prodrug
		<i>ndh</i>	NADH dehydrogenase II	Modulasi aktivitas
		<i>mshA</i>	Glikosil transferase	Aktivasi prodrug
	Fluoroquinolon	<i>gyrA</i>	DNA gyrase subunit A	Target obat
		<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	Ikatan obat

2.13.2 Mekanisme Resistensi Intrinsik

Selain memiliki potensi dalam pengembangan resistensi baru melalui mutasi kromosomal, *Mycobacterium tuberculosis* juga memiliki mekanisme resistensi intrinsik dimana Mekanisme ini memungkinkan terjadinya netralisasi aktifitas antibiotik. Resistensi jenis ini menghasilkan tingginya *background* resistensi yang dapat membatasi penggunaan antibiotik pada pasien TB dan menghambat perkembangan obat baru. Resistensi intrinsik ini dapat dibagi menjadi 2 kategori, yaitu resistensi pasif dan resistensi terspesialisasi (Smith et al., 2013).

2.13.2.1 Mekanisme Resistensi Pasif

Mekanisme resistensi pasif ini dihubungkan dari karakteristik dinding sel *mycobacterium*. Serupa dengan permasalahan pada pengembangan obat dan terapi bakteri Gram negatif, dinding sel *mycobacterium* yang *impermeable* berfungsi sebagai suatu barrier efektif terhadap penetrasi antibiotik. *Mycobacterium* mempunyai dinding sel yang sangat tebal dan terdiri dari banyak lapisan dengan hidrofobitas bervariasi. Lapisan ini membentuk suatu ruang antar lapisan yang serupa dengan periplasma dinding sel bakteri Gram negative (Hoffmann et al., 2008; Zuber et al., 2008). Peptidoglikan *sacculus* ditutupi oleh lapisan arabinogalaktan dan keduanya bersifat hidrofobik sehingga mencegah transport molekul hidrofobik (Brennan and Nikaido, 1995). Dua lapisan ini dihubungkan secara kovalen ke lapisan luar asam mikolat (suatu asam lemak rantai panjang yang membentuk barrier *waxy* atau *non fluid*, yang mencegah penetrasi molekul hidrofobik maupun hidrofilik) (Liu et al., 1995). Sebagai contoh, difusi β -laktam melalui dinding sel *mycobacterium* 1000 kali lebih lambat daripada penetrasi melalui dinding sel *Escherichia coli* (Chambers et al., 1995; Kasik and Peacham, 1968).

Peran dinding sel *mycobacterium* dalam resistensi antibiotik intrinsik ditunjukkan dengan jelas oleh penelitian pada mutan dengan gangguan biosintesis dinding sel. Mutan *M. smegmatis* dengan gangguan sintesis asam mikolat menunjukkan peningkatan *uptake* dan sensitifitas terhadap eritromisin, kloramfenikol, novobiosin dan rifampisin (Liu and Nikaido, 1999). Selain itu, studi mutasi transposon mengkonfirmasi peran integritas dinding sel pada resistensi intrinsik *mycobacterium* (Gao et al., 2003; Philalay et al., 2004). Contohnya, pemasukkan transposon ke dalam operon *kasB* atau *virS-mymA* (suatu gen yang terlibat dalam biosintesis asam mikolat) menyebabkan peningkatan penetrasi kimia dan sensitifitas terhadap beberapa antibiotik (Rifampisin, Ciprofloksasin, INH dan PZA) (Gao et al., 2003; Singh et al., 2005, 2003). Ikatan asam mikolat pada gugus aktif gula (arabinogalaktan atau trehalose) pada dinding sel bakteri dikatalisis oleh suatu keluarga enzim mikoliltransferase yang dulu diketahui sebagai “kompleks antigen 85” (Belisle et al., 1997). Penghilangan gen *fbpA* sebagai pengkode salah

satu mikoliltransferase menghasilkan penurunan level trehalose dimikolat dan peningkatan sensitifitas terhadap antibiotik (Nguyen et al., 2005).

Penelitian ini membuktikan bahwa dinding sel bakteri memiliki peran penting dalam resistensi intrinsik mycobacterium terhadap antibiotik. Walaupun demikian, akibat waktu penggandaan mycobacterium yang sangat lama, lambatnya kecepatan penetrasi obat pada beberapa kasus tetap dapat menghasilkan kadar yang cukup tinggi sebagai inhibitor sebelum terjadinya pembelahan sel. Hal ini membuat permeabilitas dinding sel sebagai suatu hal penting namun bukan penentu utama pada resistensi obat (Brennan and Nikaido, 1995; Chambers et al., 1995; Quinting et al., 1997). Serupa dengan dinding sel Gram negatif, porin mycobacterium naik ke lapisan luar dinding sel sehingga nutrisi dan molekul penting untuk pertumbuhan dapat masuk ke dalam sel bakteri (Niederweis, 2003). Porin ini mungkin juga berperan penting dalam memasukkan antibiotik ke dalam sel melalui lapisan luar dinding sel mycobacterium (Danilchanka et al., 2008). Peran porin dalam *uptake* dan kesensitifan pada *Mycobacterium tuberculosis* belum dijelaskan secara langsung (Smith et al., 2013).

2.13.2 Mekanisme Resistensi Terspesialisasi

Penyebab perlambatan penetrasi antibiotik salah satunya disebabkan karena barrier sel *Mycobacterium tuberculosis* dan *mycobacterium* lainnya juga menjalankan mekanisme resistensi khusus yang memungkinkan terjadi detoksifikasi aktif obat ketika mereka mencapai ruang sitoplasma. Mekanisme resistensi ini dapat dikelompokkan melalui 5 mekanisme, yaitu modifikasi target obat, modifikasi kimia obat, degradasi enzimatis pada obat, peniruan molekuler suatu target obat, pengeluaran obat dengan pompa *efflux* (Smith et al., 2013).

2.14 Hypoxia-inducible factor (HIF-1 α)

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

2008). HIF adalah faktor transkripsi yang dihasilkan ketika terjadi penurunan kadar oksigen di dalam sel atau kondisi hipoksia (Smith et al., 2013).

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

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

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

Ventilasi pulmoner akan berkaitan dengan metabolisme energi di dalam tubuh yang berfungsi untuk memberikan substrat esensial (oksigen) dan membuang sisa metabolisme (karbon dioksida) dan ventilasi terpengaruh dari perubahan tekanan parsial arteri dari oksigen (PO₂) dan karbon dioksida (PCO₂). Hipoksia akut menstimulasi peningkatan *minute ventilation* secara langsung yang memuncak dalam hitungan menit dan kemudian menurun ke kadar pre-hipoksia dalam waktu hitungan menit hingga jam (Smith et al., 2013).

Ketika hipoksia dipertahankan, ventilasi kemudian akan meningkat kembali dalam beberapa jam dan melewati kadar hipoksia akut dan ventilasi akan terus meningkat dalam beberapa hari. Proses ini disebut juga dengan aklimatisasi ventilasi terhadap hipoksia yang ditandai dengan turunnya kadar PCO_2 dan meningkatnya sensitivitas ventilasi hipoksia terhadap stimulus hipoksia akut (Smith et al., 2013).

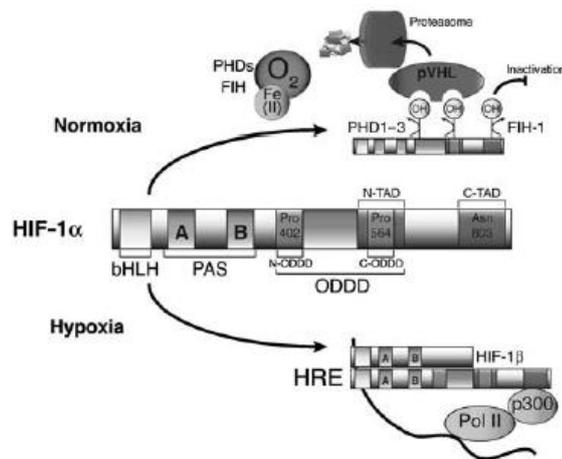
Hipoksia akut juga meningkatkan curah jantung yang diasosiasikan dengan peningkatan laju jantung. Curah jantung kemudian akan kembali normal setelah aklimatisasi walaupun laju jantung dapat tetap tinggi yang dikompensasikan dengan menurunnya volume sekuncup (Smith et al., 2013).

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

Studi *in vivo* pada binatang serta *in vitro* membuktikan bahwa isoform HIF-1 α , HIF-2 α memiliki fungsi penting dalam regulasi ekspresi gen namun terdapat fungsi yang tumpang tindih di antara keduanya yang sangat bervariasi dari satu sel ke sel lainnya. Isoform HIF-3 α belum diketahui secara pasti fungsinya namun *splicing* alternatif dari HIF-3 α menghasilkan protein domain inhibitori PAS yang berfungsi menghambat respons HIF dengan membentuk heterodimer inaktif secara transkripsi dengan HIF-1 α (Makino et al., 2001).

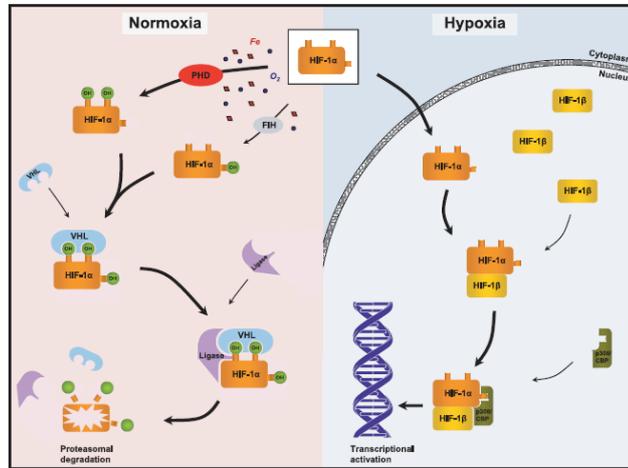
Dalam kondisi normoksia, subunit HIF-1 α memiliki waktu paruh yang sangat singkat (Jewell et al., 2001) dan sel secara terus-menerus mensintesa dan mendegradasi protein HIF- α . Namun, dalam kondisi hipoksia, degradasi dari HIF- α menjadi terhambat (Jiang et al., 1996). Reaksi enzimatis hidrosilasi dua residu prolyl (Pro402 dan Pro564) membantu interaksi antara oksigen dan subunit HIF- α

di mana reaksi ini terjadi pada ODDD (Ivan et al., 2001). Hidroksilasi yang membutuhkan oksigen ini meregulasi interaksi dengan protein supresi tumor von Hippel-Lindau (pVHL) di mana pVHL merupakan komponen rekognisi dari kompleks ligase ubiquitin E3 yang menargetkan HIF- α untuk proteolisis melalui jalur ubiquitin-proteasom (Maxwell et al., 1999).



Gambar 7. Regulasi protein HIF-1 α oleh hidroksilasi prolyl dan degradasi (Weidemann A., 2008).

Dalam kondisi hipoksia, *prolyl hydroxylase-domain* (PHD) tersupresi sehingga protein HIF- α tidak dihancurkan dan berakumulasi. Selanjutnya, HIF- α bertranslokasi ke nukelus dan dimerisasi dengan HIF-1 β . *Heterodimeric transactivating complex* HIF kemudian menempel kepada HRE pada sekuens promoter atau *enhancer* dari target gen (**Gambar 7**) (Weidemann and Johnson, 2008).

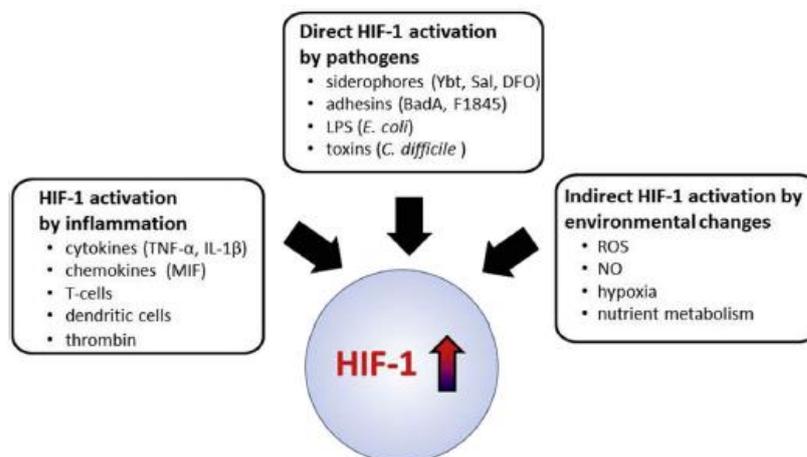


Gambar 8. Aksis PHD-VHL-HIF) (Smith et al., 2013)

Terdapat 3 jenis isoform PHD yaitu PHD1, PHD2, dan PHD3 yang merupakan anggota dari 2-oxoglutarat dan famili dioksigenase yang bergantung dengan zat besi. Aktivitas mereka tergantung dengan oksigen sebagai ko-substrat bersama dengan zat besi, askorbat, dan 2-oxoglutarat sebagai kofaktor obligat. Bersama dengan VHL dan HIF, terbentuklah aksis PHD-VHL-HIF sebagai regulator sentral dari homeostasis oksigen selular (**Gambar 8**) (Smith et al., 2013).

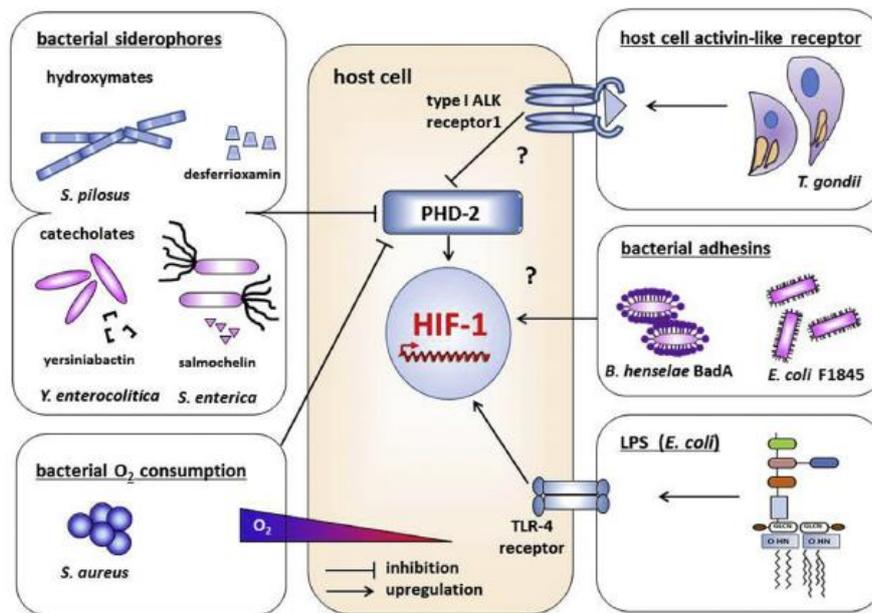
2.15 Peranan HIF-1α dalam Infeksi Bakteri

Eksplorasi fungsi HIF-1α dalam mengaktivasi neutrofil dan makrofag saat infeksi bakteri terbukti ketika ditemukan kadar faktor HIF-1α meningkat ketika beberapa spesies bakteri menginfeksi jaringan tubuh seperti *Streptococcus pyogenes*,



Streptococcus agalactiae, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis murium*, *Psuedomonas aeruginosa* (Zinkernagel et al., 2007), Enterobacteriaceae sp, *Escherichia coli*, *Chlamydia trachomatis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bartonella henselae*, *Shigella flexneri*, *Mycobacterium tuberculosis*, dan *Helicobacter pylori* (**Gambar 9**) (Santos and Andrade, 2017).

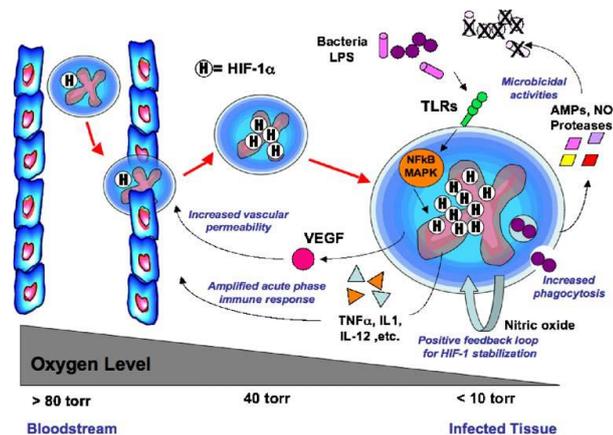
Sebuah studi pada mencit yang tidak memiliki HIF-1 α lebih rentan mengalami infeksi *S. pyogenes* yang invasif dan menurunkan kemampuan fagosit membunuh kuman gram-negatif dan gram-positif in vitro sehingga HIF-1 α memiliki peran penting dalam imunitas adaptif (**Gambar 10**) (Peyssonaux et al., 2005).



Gambar 10. Interaksi antara patogen dan sel inang terhadap aktivasi HIF-1
(Peyssonaux et al., 2005)

Sekuesterasi bakteri terhadap zat besi dapat memiliki efek terhadap stabilisasi HIF-1 α sejak mekanisme perputaran HIF-1 α tergantung terhadap aktivitas hidroksil prolyl yang tergantung terhadap zat besi. Fenomena ini dapat terjadi di plak Peyeri di usus halus dan bakteri seperti *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* atau *Enterobacter aerogenes* dapat menginduksi ekspresi HIF-1 α di plak Peyeri (Werth et al., 2006). Ketika mencit yang tidak memiliki ekspresi HIF-1 α terinfeksi oleh *Y.*

Enterocolitica, mencit tersebut mengalami reaksi yang lebih berat sehingga jalur aktivasi HIF-1 α dipostulasikan berkontribusi terhadap sistem imun alami (Werth et al., 2006).



Gambar 11. Model regulasi transkripsi HIF-1 α di dalam fagosit (Vink et al., 2007)

Sel-sel fagositik seperti neutrofil dan makrofag memiliki kadar HIF-1 α yang rendah ketika berada di lingkungan yang kaya akan oksigen. Ketika sel-sel tersebut direkrut ke jaringan yang terinflamasi, lingkungan di jaringan tersebut relatif hipoksia sehingga meningkatkan kadar selular dari HIF-1 α dan menginisiasi aktivasi dari gen efektor proinflamasi dan bakterisidal. Stimulasi dari HIF-1 α akan maksimum ketika distimulasi oleh pola reseptor rekognisi seperti TLR-4 dan jalur sinyal sel seperti NF κ B dan MAPK. Fagositosis yang dimediasi oleh HIF-1 α kemudian meningkat dan dibantu oleh peptida antimikrobal seperti cathelicidins serta protease granula dengan aktivitas antibakteri langsung. Peningkatan kadar VEGF dan sitokin proinflamasi membantu rekrutment dan aktivasi dari sel efektor imunitas lainnya. Aktivasi dari NOS menghasilkan NO yang memiliki properti antimikrobal dan juga menstabilisasi HIF-1 α sehingga menguatkan sistem imunitas alami di dalam fagosit (**Gambar 11**) (Vink et al., 2007).

Interleukin-1 β dapat mengaktivasi HIF-1 α melalui NF- κ B. Aktivasi dari NF- κ B dikontrol secara mayoritas melalui *IkappaB kinases* (IKK) terutama IKK-beta yang berfungsi sebagai degradasi yang diinduksi oleh fosforilasi dari inhibitor IkappaB dalam responsnya terhadap infeksi dan inflamasi. Sebuah studi menunjukkan

bahwa makrofag yang diderivasi oleh sum-sum tulang yang terinfeksi bakteri grup A streptococci dan *Pseudomonas aeruginosa* dapat menginduksi aktivasi HIF-1 melalui jalur yang dependen terhadap IKK- β (Devraj et al., 2016).

2.16 Potensi HIF dalam terapi

Peranan sentral dari HIF-1 α membuat aktivator dari HIF-1 α menjadi sebuah potensi pengobatan infeksi. Beberapa senyawa farmakologis telah diteliti untuk mengaktifasi HIF dan yang paling banyak diteliti adalah inhibitor dari prolyl hidroksilasi (Kim et al., 2006).

2.17 Peranan VEGF dalam infeksi

Vascular endothelial growth factor (VEGF) merupakan mitogen endotel yang sel spesifik in vitro dan sebuah pemicu angiogenik pada beberapa model mitogen in vitro (Ferrara, 2004). Protein VEGF pertama kali mulai ditemukan ketika pada tahun 1939 Ide et al. mempostulasikan bahwa terdapat faktor yang menstimulasi pertumbuhan pembuluh darah akibat tumor dengan basis respons neovaskularisasi yang kuat (Ide et al., 1939).

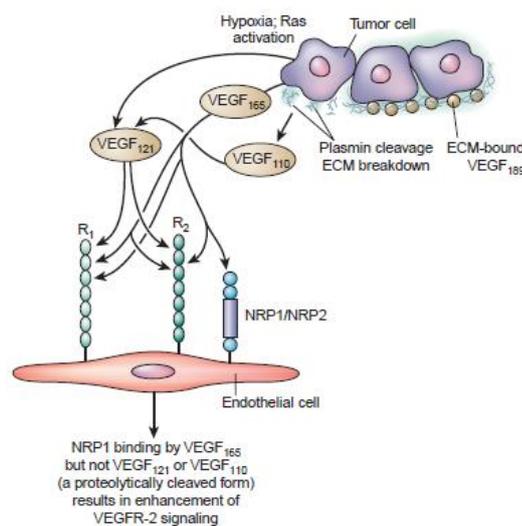
Ekspresi mRNA VEGF diinduksi oleh kadar oksigen yang rendah dan HIF-1 merupakan mediator utama dalam kondisi hipoksia (Dor et al., 2001). Mirip seperti HIF-1 α , gen supresor tumor VHL memiliki peranan penting dalam regulasi VEGF di mana aktivitas mitogenik pada sel endotel yang dihasilkan oleh sel karsinoma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

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

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

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

VEGF natif merupakan glikoprotein berukuran 45 kDa homodimerik yang berikatan dengan heparin di mana VEGF₁₂₁ merupakan polipeptida dengan pH asam yang tidak berikatan dengan heparin sedangkan VEGF₁₈₉ dan VEGF₂₀₆ hampir seluruhnya berada di matriks ekstraseluler (ECM). Hilangnya domain yang berikatan dengan heparin berakibat menurunnya aktivitas mitogenik dari VEGF secara signifikan (**Gambar 12**) (Houck et al., 1991).



Gambar 12. Isoform VEGF dan interaksinya dengan reseptor VEGF (Houck et al., 1991)

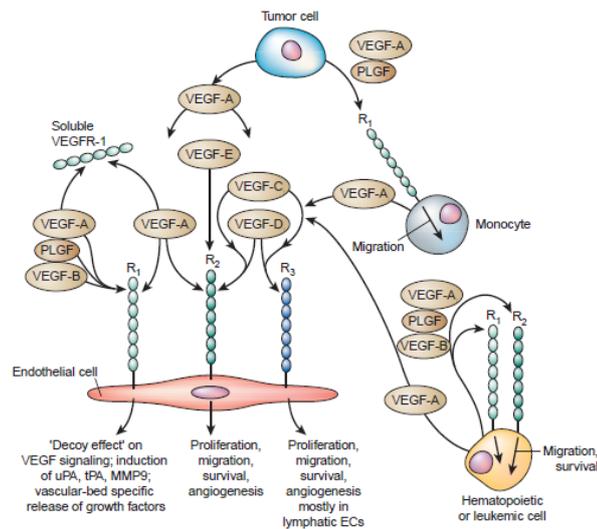
Pada perkembangan fase embrionik dan post-natal, VEGF terlibat dalam vaskulogenesis, angiogenesis dan limfangiogenesis. Delesi alel tunggal dari VEGF dan hilangnya VEGFR1 atau VEGFR2 menghasilkan kematian pada embrio akibat defisit dari vaskulogenik atau angiogenik (Ferrara et al., 1996). Secara lebih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

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

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

Terdapat 2 tirosine kinase reseptor (RTKs) untuk VEGF yaitu VEGFR-1 dan VEGFR-2. Kedua reseptor ini memiliki 7 domain yang mirip dengan imunoglobulin pada domain ekstraseluler, regio tunggal transmembran dan sekuens tirosin kinase yang memiliki domain kinase-insert (Shibuya et al., 1990). Terdapat

pula VEGFR-3 (fms-like-tyrosine kinase (Flt)-4) yang merupakan bagian dari famili RTKs namun bukan reseptor untuk VEGF namun berikatan dengan VEGFC dan VEGFD. Selain RTKs, VEGF juga berinteraksi dengan famili koreseptor yaitu neuropilins (**Gambar 13**) (Karkkainen et al., 2002).



Gambar 13. Peranan reseptor VEGF dalam beberapa tipe sel (Karkkainen et al., 2002)

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

Peranan VEGF juga terlihat dalam perkembangan skeletal dan formasi tulang endokondral di mana VEGF mRNA diekspresikan oleh kondrosit hipertrofik pada lempeng perkembangan epifiseal yang berarti bahwa VEGF dibutuhkan untuk

perkembangan dan invasi kartilago oleh pembuluh darah metafiseal (Ferrara, 2013). Pertumbuhan folikuler dan perkembangan korpus luteum tergantung terhadap proliferasi pembuluh darah kapiler baru dan ekspresi VEGF mRNA memiliki hubungan terhadap proliferasi pembuluh darah di ovarium (Phillips et al., 1990).

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

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

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

2.18 Peranan ICAM-1 dalam infeksi

Intercellular Adhesin Molecule 1 (ICAM-1) atau yang dapat dikenal juga sebagai *Cluster of Differentiating 54* (CD54) merupakan salah satu protein pada manusia yang dikodekan oleh gen ICAM-1. Gen ICAM-1 mengkodekan suatu glikoprotein yang terdapat pada permukaan sel diekspresikan oleh sel endotel dan sel imun. Protein yang dikodekan oleh gen ini adalah sejenis molekul adhesi antarsel yang hadir secara terus menerus dalam konsentrasi rendah di membran leukosit dan sel endotel. Konsentrasinya akan meningkat setelah di stimulasi dari sitokin ICAM-1 dapat dihambat oleh interleukin-1 (IL-1) dan Tumor Necrosis Factor (TNF) dan diekspresikan oleh endotel vaskular, makrofag, dan limfosit. ICAM-1 adalah ligan untuk LFA-1 (integrin), reseptor yang dapat ditemukan pada leukosit. Ketika diaktifkan, leukosit mengikat ke sel-sel endotel melalui ICAM-1 / LFA-1 dan kemudian berpindah ke jaringan. LFA-1 juga ditemukan dalam bentuk larut, yang tampaknya mengikat dan memblokir ICAM-1 (Cavalcanti et al., 2012).

ICAM-1 adalah protein transmembran endotel dan leukosit yang telah lama dikenal peran pentingnya dalam menstabilkan interaksi sel-sel dan memfasilitasi transmigrasi endotel leukosit. ICAM-1 dikarakterisasi sebagai situs untuk masuknya seluler rhinovirus manusia. Karena hubungan ini dengan respon imun, telah dihipotesiskan bahwa ICAM-1 dapat berfungsi dalam transduksi sinyal. Ligasi ICAM-1 menghasilkan efek proinflamasi seperti rekrutmen leukosit inflamasi dengan memberi sinyal melalui kaskade yang melibatkan sejumlah kinase, termasuk kinase p56lyn (Cavalcanti et al., 2012).

ICAM-1 terlarut memiliki efek antagonis pada persimpangan ketat yang membentuk sawar darah-testis, sehingga memainkan peran utama dalam spermatogenesis. Adanya glikosilasi berat dan karakteristik struktural ICAM-1 lainnya memberikan situs pengikatan protein untuk banyak ligan. ICAM-1 memiliki situs pengikatan untuk sejumlah ligan terkait imun. Khususnya, ICAM-1 mengikat ligan adhesi makrofag-1 (Mac-1; ITGB2 / ITGAM), fungsi leukosit terkait antigen-1 (LFA-1), dan fibrinogen. Ketiga protein ini umumnya diekspresikan pada sel endotel dan leukosit, dan mereka mengikat ICAM-1 untuk

memfasilitasi transmigrasi leukosit melintasi endotel vaskular dalam proses seperti ekstrasvasasi dan respons inflamasi. Sebagai hasil dari karakteristik pengikatan ini, ICAM-1 secara klasik memiliki fungsi adhesi antar sel (Cavalcanti et al., 2012).

Dengan peran ICAM-1 dalam adhesi sel-sel dan ekstrasvasasi sehingga dalam infeksi dapat lebih dipahami, peran potensial ICAM-1 dalam transduksi sinyal dihipotesiskan. Sebagian besar penelitian yang melibatkan ICAM-1 dalam beberapa tahun terakhir berfokus pada pertanyaan sentral ini serta pertanyaan terkait tentang kaitannya dalam transduksi sinyal. Para peneliti beralasan bahwa, jika transduksi sinyal ICAM-1 terbukti terjadi, maka perlu untuk mengidentifikasi mekanisme pensinyalan itu, kondisi dan lingkungan di mana pensinyalan akan terjadi, dan titik akhir biologis dari setiap kaskade pensinyalan yang terlibat. Di luar fungsinya yang dideskripsikan secara klasik sebagai molekul adhesi dan masuk virus, ICAM-1 kini telah dicirikan secara meyakinkan sebagai memiliki peran dalam transduksi sinyal. Lebih lanjut, fungsi transduksi sinyal dari ICAM-1 tampaknya terkait terutama dengan jalur proinflamasi. Secara khusus, pensinyalan ICAM-1 tampaknya menghasilkan rekrutmen sel imun inflamasi seperti makrofag dan granulosit (Cavalcanti et al., 2012).

Beberapa famili molekul adhesi ICAM diekspresikan di berbagai jaringan, ICAM-1 dapat diinduksi pada berbagai sel sebagai respon terhadap IL-1 dan INF- γ . Protein ICAM-1 mampu menginduksi IL-2 dalam jumlah besar. Keberadaan ICAM-1 dapat menekan produksi IL-10 dalam sel T helper (Th), yang mungkin mendukung perkembangan sel Th1 (bukan Th2) (Cavalcanti et al., 2012).

2.19 Penelitian Obat Tradisional Anti Tuberculosis

WHO merekomendasikan pemakaian obat tradisional dimasing masing negara termasuk obat herbal dalam peningkatan pemeliharaan kesehatan masyarakat, pencegahan dan pengobatan penyakit, diutamakan penanganan penyakit kronis, penyakit degeneratif dan kanker. Hal ini menunjukkan dukungan WHO untuk kembali ke alam yang dalam hal tertentu lebih menguntungkan. Untuk

meningkatkan pilihan pengobatan dan mengurangi pengaruh musim dan tempat asal tanaman terhadap efek obat, serta lebih memudahkan dalam standarisasi bahan obat maka zat aktif diekstraksi lalu dibuat sediaan fitofarmaka atau bahkan dimurnikan sampai diperoleh zat murni. TB adalah salah satu penyakit kronis yang terus dilakukan penelitian untuk ditemukan obat baru untuk tatalaksananya (Sukandar et al., 2008).

Potensi keanekaragaman hayati di Indonesia sangat besar dan luas, sekitar lebih dari 40.000 jenis tumbuhan tersebar diseluruh pelosok Indonesia. Berbagai jenis kandungan kimia dalam bahan alam dengan banyak potensi, sehingga mampu untuk bahan pangan, kosmetika dan obat-obatan (Agusta, 2000). Tanaman obat banyak mengandung golongan senyawa flavonoid dan akan lebih poten dengan perlakuan hidrolisis dengan asam yang mampu melepaskan flavonoid bebas dari ikatan glikosidanya (Irianti et al., 2018). Penelitian Fabricant dan Farnsworth(2001) menunjukkan 80% dari 122 komponen senyawa pada 94 spesies tanaman tradisional digunakan untuk tujuan etnomedisin. Sebanyak 39% dari 520 obat yang disetujui antara tahun 1983 sampai 1994 berasal dari produk alam atau turunannya, dan 60-80% dari antibakteri dan antikanker berasal dari bahan alam merupakan tanaman tradisional (Wahyono, 2008).

Banyak penelitian tanaman tradisional telah dilakukan untuk mengetahui pengaruh obat herbal dalam pengobatan tuberkulosis, penelitian tanaman tradisional dan pengobatan herbal antara lain

1. Battra di Wilayah Kerja Puskesmas Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui tanaman obat tradisional Indonesia yang dilakukan oleh Battra di wilayah kerja Puskesmas Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan untuk mengobati Tuberkulosis.

Tabel I. Jenis Tanaman Obat Tradisional Yang di Gunakan Oleh Battra Untuk Pengobatan Tuberkulosis di Wilayah Kerja Puskesmas Kabupaten Gowa Sulawesi Selatan

No	Nama Ilmiah/ Family	Khasiat Tanaman	Bagian Tanaman	Cara pemakaian
1.	Miana (<i>Coleous scentellarioides</i> L. <i>Benth</i>) Lamiaceae	Digunakan Sebagai obat untuk: postpartum, dermatitis, sakit perut, asma, batuk, dan gangguan pencernaan.	Daun	Daun myana dicuci bersih terlebih dahulu kemudian diremas atau ditumbuk, air perasannya disaring dan diminum
2.	Jeruk Nipis (<i>Citrus aurantifolia.s</i>) <i>TTRutaceae</i>	Digunakan sebagai antibakteri, antifungal, antioksidan dan antikanker	Buah	Jeruk di cuci bersih dan dibelah di peras kemudian di minum
3.	Daun paliasa(<i>Kleinhovia hospita</i> L) Malvaceae	Digunakan sebagai antikanker, antidiabetes, antioksidan,dan terutama digunakan sebagai agen hepatoprotektor	Daun	Daun palaisa diambil ganjil, dicuci bersih dandirebus

2. Daun Ciplukan (*Physalis angulata* L.) (Indrawati and Latif, 2016)

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang bertujuan untuk mengetahui perbedaan daya hambat dan menentukan konsentrasi ekstrak etanol Daun Ciplukan dan daya hambat rifampisin sebagai kelompok kontrol terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tingkat konsentrasi ekstrak Daun Ciplukan yang dapat menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dimana masa inkubasi empat minggu memperlihatkan hasil akhir sensitive (S), disebabkan kandungan kimia *physalin*, yang banyak ditemukan pada Daun Ciplukan. Tidak terdapat

perbedaan konsentrasi daya hambat antara ekstrak Daun Ciplukan dengan konsentrasi dibanding dengan konsentrasi daya hambat obat Rifampisin terhadap pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Menunjukkan tidak ada perbedaan daya hambat antara kelompok perlakuan mulai dari konsentrasi ekstrak Daun Ciplukan dibanding dengan kelompok kontrol rifampisin.

3. Ekstrak Etil Asetat Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan Daun Sendok (*Plantago major* L.) Secara invitro (Irianti et al., 2018)

Penelitian ini menggunakan metode dilusi cair dengan media Middlebrook (MB) 7H9 dan pengamatan pertumbuhan *M. tuberculosis* menggunakan media Lowenstein Jensen (LJ) sehingga nilai kadar bunuh minimum (KBM) terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dapat ditentukan. Kadar yang di gunakan untuk pengujian adalah 0,25 mg/ml; 0,50 mg/ml dan 1,00 mg/ml. Sedangkan golongan senyawa aktif dideteksi dengan kromatografi lapis tipis (KLT) dan komposisi fase gerak yang sesuai. Aktivitas anti-bakteri pada ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok mempunyai nilai KBM sama yaitu 1,00 mg/ml. Berdasarkan hasil KLT diketahui bahwa terdapat golongan senyawa orto-dihidroksi, senyawa fenolik dan senyawa yang mengarah ke terpenoid untuk kedua ekstrak. Ekstrak larut etil asetat daun kenikir (*Cosmos caudatus* H.B.K) dan daun sendok (*Plantago major* L.) memiliki aktivitas sebagai anti-tuberkulosis. Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) kedua ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok terhadap *M. tuberculosis* yaitu 1,0 mg/mL. Ekstrak etil asetat daun kenikir dan daun sendok mengandung senyawa fenolik, senyawa orto-hidroksi, dan senyawa triterpenoid asam ursolat dan asam oleanolat.

4. Ekstrak Daun Tanaman Kaki Kuda (*Centella asiatica* L. Urban) (Rimporok and Budiarmo, 2020)

Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas daya hambat dan daya bunuh ekstrak daun kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) terhadap pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan menggunakan media Middlebrook 7H9 untuk menentukan nilai Konsentrasi Hambat Minimum

(KHM) dan media Lowenstein Jensen (LJ) untuk menentukan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM), menggunakan konsentrasi ekstrak daun tanaman kaki kuda. Dari hasil penelitian ini disimpulkan bahwa ekstrak daun tanaman kaki kuda (*Centella asiatica* L. Urban) dapat menghambat tetapi tidak dapat membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

Banyak tanaman obat tradisional Indonesia yang di teliti dalam menemukan terapi Anti tuberculosis, penelitian yang dilakukan masih banyak yang bersifat in vitro.

2.20 Daun Miana (*Coleus scutellaroides* [L] Benth)

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

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Subkingdom	: Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Lamiales
Famili	: Lamiaceae
Genus	: <i>Coleus</i>
Spesies	: <i>Coleus atropurpureus</i> (L) Benth

Daun Miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth) termasuk famili *Lamiaceae* dikenal dengan tanaman iler sebagai tanaman hias. Daun miana memiliki varietas yang sangat banyak yang membuat tanaman ini menjadi yang unik. Varietas yang banyak berasal dari variasi warna daun yang sangat beragam. Warna-warni daun yang berbeda beda disebabkan karena pigmen yang dimilikinya. Varietas formasi pigmen di dalam daun dipengaruhi oleh faktor genetik, cahaya dan faktor

lingkungan (Harborne, 1996). Kandungan pigmen yang mempengaruhi perbedaan warna daun antar varietas Miana yang termasuk kedalam golongan flavonoid. Flavonoid merupakan kelompok fenol yang terbesar yang ditemukan di alam (Achmad, 1986).

Daun Miana (*Coleus scutellarioides* [L.] Benth) telah lama banyak digunakan sebagai pengobatan tradisional untuk beberapa penyakit seperti mata, wasir, bisul, demam nifas, radang telinga, abses, borok, luka bernanah, keputihan, kencing manis, sembelit, dispepsia, cacangan, gigitan ular, dan serangga beracun. Tumbuhan Miana juga dapat menghambat pertumbuhan sel leukemia (Swantara, 2010).

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

Daun Miana mempunyai sifat antibiotik karena mengandung minyak atsiri, antara lain karvakrol, eugenol bersifat menghilangkan nyeri, etil salisilat menghambat iritasi. Menurut Kumala (2009) Miana merupakan salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Hasil ekstrak daun Miana juga mengandung tanin yang bermanfaat sebagai anti jamur yang dapat digunakan sebagai penghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* (Swantara, 2010).

Daun Miana berbau harum, rasanya agak pahit, sifatnya dingin. Penelitian lain yang dilakukan di temukan manfaat lain dari daun miana berkhasiat sebagai peluruh haid (emenagog), perangsang nafsu makan, penetralisir racun (antitoksik) yaitu dapat diminum atau sebagai obat luar bila tergigit ular dan serangga beracun, menghambat pertumbuhan bakteri (antiseptik), memecah gumpalan darah, mempercepat pematangan bisul dan pembunuh cacing (vermisida), mengandung

minyak atsiri, antara lain karvakrol yang bersifat antimikroba, eugenol bersifat menghilangkan nyeri, etil salisilat mengatasi iritasi. Senyawa kimia polar daun Miana pada penelitian lain menunjukkan dapat menghambat pertumbuhan sel leukeumia L-1210 (Swantara, 2010).

2.21 Efek Terapeutik Ekstrak Daun Miana (EDM) dalam Penyakit Infeksi

Penelitian yang dilakukan oleh Kusumawati et al didapatkan hasil bahwa ekstrak daun miana dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan *S.aureus* (Kusumawati et al., 2014). Daun Miana yang mengandung ekstrak aseton dapat menghambat pertumbuhan *E.coli* *S.aureus*, *S.epidermidis* dan *S.enteritidis*. Daun miana yang mengandung ekstrak etanol pada konsentrasi 10% dan 20% memiliki daya antibakteri terhadap *S.aureus*, *E.coli*, *Bacillus subtilis*, dan *S.paratyphosa* (Kumala ., 2009). Bakteri endofit yang menetap terdapat dalam dau miana memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa antibakteri yang diketahui mengandung derivat asam ftalat (Kusumawati et al., 2014).

Penelitian yang dilakukan Pakadang,2014 di dapatkan hasil ekstrak daun miana dapat mempengaruhi proliferasi sel limfosit T pada mencit di mana setiap 510 mg/kg ekstrak daun miana pada mencit laki-laki meningkatkan proliferasi sel T secara signifikan dan berfungsi sebagai imunostimulan (Pakadang et al., 2015).

Penelitian yang dilakukan menemukan bahwa ekstrak daun Miana meningkatkan imunitas dengan cara memodifikasi tingkat dan kualitas respons imun dari sel T, sel B, dan sitokin. Selain itu, ekstrak daun Miana juga memiliki peranan penting dalam pencegahan karena ekstrak daun Miana dapat meningkatkan imunitas inang sebelum paparan terhadap infeksi. Hal ini didukung oleh penelitian Pakadang et al. dimana pemberian ekstrak daun Miana meningkatkan jumlah sel limfosit T, jumlah sel T CD4, kadar IFN- γ , dan TNF- α serta menurunkan kadar koloni *M.tuberculosis* pada paru-paru mencit Wistar (Pakadang et al., 2015).

Zat antioksidan yang dimiliki ekstrak daun Miana berupa antosianin dan memiliki aktivitas antioksidan sebesar 84.64%. Ekstrak daun miana memiliki aktivitas antioksidan khususnya pada ekstrak etil asetat. Senyawa flavonoid dari daun miana

memiliki aktivitas antioksidan dan senyawa golongan tersebut berupa gugus fungsi OH, C=C aromatik, C-H aromatik, dan C-H alifatik (Podungge et al., 2017).

Studi yang dilakukan oleh Rahmawati menunjukkan bahwa bakteri gram negatif memiliki sistem seleksi terhadap zat-zat asing yaitu lapisan lipopolisakarida dibandingkan bakteri gram positif. Hal ini disebabkan karena bakteri gram positif hanya memiliki lapisan peptidoglikan yang mudah ditembus oleh senyawa-senyawa antimikroba dan menemukan sasaran untuk bekerja (Rahmawati, 2008).

2.22 Efek terapeutik ekstrak Daun Miana dalam infeksi *Mycobacterium tuberculosis*

Mekanisme antibakterial pada flavonoid dalam kandungan Miana salah satunya adalah dengan menghambat sintesis asam nukleat dan merusak dinding sel bakteri, mikrosom dan lisoom sehingga meningkatkan permeabilitas sebagai akibat dari interaksi antara flavonoid dan DNA bakteri. Terdapat juga studi yang menyatakan bahwa mekanisme flavonoid dalam menginhibisi fungsi membran sel adalah dengan merusak permeabilitas membran sel dan ikatan enzim seperti ATPase dan fosfolipase (Pakadang, 2018).

Mekanisme antibakteri pada senyawa fenol adalah dengan cara mendenaturasi protein sel sedangkan mekanisme tannin sebagai antibakterial adalah aglutinasi protein. Tannin memiliki aktivitas antibakterial akibat kemampuannya untuk mengaktifkan adhesin dan enzim dan mengganggu transportasi protein di dalam lapisan sel bagian dalam. Tannin juga menargetkan polipeptida pada dinding sel sehingga struktur dinding sel menjadi tidak sempurna (Nuria and Faizatun, 2009).

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

lapisan dinding sel tidak intak dan mengakibatkan kematian sel disebabkan karena alkaloid dapat berfungsi sebagai antibakteri dengan cara merusak komponen penting dari peptidoglika. Mekanisme lainnya adalah sebagai DNA *intercellators* dan menghambat zneim topoisomerase (Pakadang, 2018).

2.23 Efek Flavonoid Terhadap HIF-1 α , VEGF dan ICAM-1

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

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

Flavopiridol dapat menghambat produksi VEGF yang diinduksi oleh hipoksia pada sel neuroblastoma dan catechins pada teh hijau dapat menghambat fosforilasi tirosin reseptor VEGF. Selain itu, catechins juga dilaporkan menghambat angiogenesis *in vitro* melalui inhibisi dari ikatan reseptor VEGF (Kondo et al., 2002).