

DISERTASI

EFEK CURCUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) dan Kadar Reseptor Vitamin D (VDR) PADA MENCIT BALB/c YANG TELAH TERINDUKSI DENGAN *SALMONELLA TYPHI*

Effect of Curcumin on Gene mRNA Expreessin of Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) and Vitamin D Receptor in BALB/c Mice that has been Induced with *Salmonella Typhi*



**AMI FEBRIZA ACHMAD
C013171004**

**SEKOLAH PASCASARJANA
PROGRAM DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS HASANUDDIN**

2020

**EFEK CURCUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA Cathelicidin
Antimicrobial Peptide (CAMP) dan Kadar Reseptor Vitamin D (VDR) PADA
MENCIT BALB/c YANG TELAH TERINDUKSI DENGAN *SALMONELLA*
*TYPHI***

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kedokteran

Disusun dan diajukan oleh

AMI FEBRIZA ACHMAD

Kepada

PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN

SEKOLAH PASCA SARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2020

DISERTASI

**EFEK CURCUMIN TERHADAP EKSPRESI GEN mRNA CATHELICIDIN
ANTIMICROBIAL PEPTIDE (CAMP) DAN KADAR RECEPTOR VITAMIN D (VDR)
PADA MENCIT BALB/C YANG TELAH TERINDUKSI DENGAN
SALMONELLA TYPHI**


Disusun dan diajukan oleh

**AMI FEBRIZA ACHMAD
C013171004**


telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Disertasi
pada tanggal 4 September 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui
Komisi Penasehat,


Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok(K)
Promotor


Prof. Dr. dr. Suryani Asjad, M.Sc, Sp.GK(K)
Ko-Promotor

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,


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


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

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin


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

SURAT PERNYATAAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ami Febriza Achmad

Nomor Mahasiswa : C013171004

Program Pendidikan : Doktor (S3)

Program Studi : Ilmu Kedokteran

Menyatakan secara benar, jujur dan bertanggung jawab bahwa disertasi yang berjudul "Efek Curcumin terhadap Ekspresi mRNA Gen Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) dan Kadar Reseptor Vitamin D (VD) pada Mencit BALB/c yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*" adalah **asli dan bukan plagiat/bebas dari plagiat**.

Jika dikemudian hari ternyata disertasi ini sebagian/seluruhnya mengandung unsur plagiat maka disertasi dibatalkan dan bersedia menerima sanksi secara hukum dari Fakultas maupun Universitas.

Demikian Surat Pernyataan ini dibuat tanpa tekanan siapapun.

Makassar 23 Agustus 2020



Ami
Ami Febriza Achmad

DAFTAR TIM PENGUJI

PROMOTOR : Prof. dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Bio

CO-PROMOTOR : Prof. Dr. dr. Suryani As'ad, M.Sc, Sp.GK(K)

CO-PROMOTOR : Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)

ANGGOTA :

1. Prof. Dr. Yusminah Hala, MS
2. Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed
3. Prof. Veni Hadju, M.Sc, Ph.D
4. Prof. Dr. Gemini Alam, M.Sc, Apt
5. Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS
6. dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan pada Allah SWT atas nikmat kesempatan dan keseharian serta karuniaNya sehingga dapat menyelesaikan penulisan disertasi dengan judul “Efek Curcumin terhadap Ekspresi mRNA Gen Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) dan Kadar Reseptor Vitamin D (VD) pada Mencit BALB/c yang telah diinduksi dengan *Salmonella typhi*”. Disertasi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar kesarjanaan S3 di Universitas Hasanuddin Program Studi Ilmu Kedokteran.

Selesainya penulisan disertasi ini berkat bantuan berbagai pihak, sehingga penulis ingin menyampaikan rasa hormat, terima kasih dan penghargaan tak terhingga pada **Prof.dr. Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok** sebagai Promotor, **Prof. Dr.dr. Suryani As’ad, M.Sc, Sp.GK(K)** dan **Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph,D, Sp.MK(K)** sebagai co-promotor yang telah banyak memberikan inspirasi, membantu mengatasi masalah, memberikan bimbingan dan motivasi sampai penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Terima kasih juga kepada tim penguji, **Prof. Dr. Yusminah Hala, MS, Prof. dr. Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med.Ed** yang senantiasa membimbing, memberikan inspirasi dan memotivasi terus menerus. **Prof. Veni Hadju, M.Sc, Ph.D** dan **Prof. Dr. Gemini Alam, M.Sc, Apt** yang dalam penulisan ini sangat banyak memberikan masukan dan arahan. Dr. dr. Burhanuddin Bahar, MS yang sangat baik dan bersedia meluangkan waktu untuk berdiskusi dalam pengolahan data penelitian saya. Serta **dr. Cahyono Kaelan, Ph.D, Sp.PA(K), Sp.S** yang memberikan dukungan dalam penelitian ini.

Penulis juga menyampaikan terima kasih yang sangat dalam sebagai wujud penghargaan yang tulus kepada kedua orang tua tercinta ayahanda Achmad Habib dan ibunda Adrina Zadaruddin. Teristimewa kepada suami tercinta Iqramansyah terima kasih yang tak terhingga atas segala kesabaran, semangat, motivasi dan dukungan moril dan material serta curahan doa selama penulis menempuh pendidikan. Kepada ananda kami tersayang Ayla Muzayna, Muh. Azzam, dan Aleena Mayesha, terima kasih atas dukunagn, pengertian dan doa kalian selama penulis menjalani pendidikan ini.

Penulis juga ingin mengucapkan terima kasih setinggi-tingginya kepada :

1. LPDP yang telah memberikan bantuan beasiswa pendidikan BUDI DN selama penulis mengikuti pendidikan di Universitas Hasanuddin.
2. Jajaran Pimpinan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Makassar yang telah memberikan izin kepada penulis untuk mengikuti pendidikan program S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin, serta senantiasa mendukung segala proses pendidikan penulis.
3. Seluruh staf dan pengajar S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah banyak membantu penulis dalam menyelesaikan proses administrasi dan lainnya selama penulis mengikuti proses pendidikan.
4. Semua pihak yang telah ikut membantu dalam kelancaran penulisan disertasi ini.

Tiada kata dapat kami ucapkan selain ungkapan terima kasih yang tidak terhingga serta panjatan doa kepada Allah SWT, semoga bantuan, simpati dan doa yang disampaikan penulis mendapat balasan dan pahala yang berlipat dari Allah SWT. Semoga disertasi ini dapat bermanfaat bagi semua masyarakat. Amin.

Makassar, September 2020

Penulis

Ami Febriza Achmad

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL.....	i
HALAMAN PERSETUJUAN.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI.....	iv
LEMBAR PENGUJI	v
PRAKATA.....	vi
ABSTRAK.....	viii
ABSTRACT.....	ix
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
A. LATAR BELAKANG	1
B. RUMUSAN MASALAH.....	2
C. PERTANYAAN PENELITIAN.....	2
D. TUJUAN PENELITIAN.....	3
E. MANFAAT PENELITIAN.....	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
A. TINJAUAN TENTANG CURCUMIN	5
B. TINJAUAN TENTANG CATHELICIDIN ANTIMICROBIAL PEPTIDE ...	9
C. TINJAUAN TENTANG VITAMIN D.....	20
D. HUBUNGAN CURCUMIN, VITAMIN D DAN	23
CATHELICIDIN ANTIMICROBIAL PEPTIDE (CAMP)	
E. TINJAUAN TENTANG SALMONELLA TYPHI.....	24
F. TINJAUAN TENTANG IMUNITAS	36
G. KERANGKA TEORI	44
H. KERANGKA KONSEP.....	45
I. DEFENISI OPERASIONAL	45
J. HIPOTESIS.....	46

BAB III. METODE PENELITIAN.....	47
A. RANCANGAN PENELITIAN	47
B. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN	47
C. SUBJEK PENELITIAN.....	48
D. BAHAN DAN PROTOKOL PENELITIAN	49
E. JENIS DAN CARA PENGUMPULAN DATA.....	55
F. ANALISIS DATA	56
G. ETIKA PENELITIAN	56
H. ALUR PENELITIAN	59
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN	62
A. HASIL.....	62
B. PEMBAHASAN.....	70
BAB. V KESIMPULAN DAN SARAN.....	75
A. KESIMPULAN	75
B. SARAN	76
DAFTAR PUSTAKA.....	77
LAMPIRAN	

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Senyawa Curcumin (i)	5
Gambar 2. Senyawa Curcumin (ii)	6
Gambar 3. Gambar skematik interaksi peptida antimikroba LL-37 atau cathelicidin dengan membrane plasma hewan dan membran sitoplasma bakteri	9
Gambar 4. Gambar resonansi magnetik nuklear LL-37 yang terikat pada misel dodecylphosphocholine. Gambar menunjukkan struktur heliks α -amphipathic dan mendukung mekanisme <i>carpet-like mechanism</i>	13
Gambar 5. Struktur dasar cathelicidin LL-37/hCAP 18 untuk manusia dan CRAM tikus	14
Gambar 6. Gambar skematik gen CAMP dan Proses Pembentukan Cathelicidin (LL-37).....	15
Gambar 7. Sintesis Cathelicidin/hCAP18	16
Gambar 8. Fungsi Biologik yang Multipel dari Cathelicidin yang Berfungsi Sebagai Pertahanan Alamiah pada Permukaan Epitel Inang Melawan Infeksi Bakteri	19
Gambar 9. Sintesis dan Metabolisme Vitamin D	21
Gambar 10. Mekanisme vitamin D memodulasi sekresi cathelicidin dan beta-2-defensi	24
Gambar 11. Klasifikasi S. Typhi	25
Gambar 12. Mikroskopis kuman Salmonella	27
Gambar 13. Gambar kuman S. typhi secara skematik	28
Gambar 14. Struktur dinding bakteri Sel Gram Negatif	29
Gambar 15. Skema Patofisiologi Infeksi Demam Tifoid.....	32
Gambar 16. Skema Patogenesis Infeksi Demam Tifoid	34
Gambar 17. Lokasi seluler dari reseptor sistem imun alami	40
Gambar 18. Fungsi sinyal Toll-Like Receptor	41

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Jenis Peptida Antimikroba Pada Manusia.....	10
Tabel 2. Cathelicidin antimicrobial peptide yang telah teridentifikasi pada mamalia.....	11
Tabel 3. Zat Yang Dapat Meningkatkan Ekspresi gen CAMP	17
Tabel 4. Klasifikasi <i>Salmonella</i> menurut Kauffman-White.....	28
Tabel 5. PAMPs dan DAMPs pada Imunitas Innate	38
Tabel 6. Perbedaan dinamika perhitungan koloni bakteri antar kelompok sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30).....	62
Tabel 7. Perbedaan dinamika kadar Vitamin D Reseptor antar kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)	64
Tabel 8. Perubahan rerata kadar vitamin D Reseptor pada masing-masing kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30).....	65
Tabel 9. Perbedaan dinamika ekspresi mRNA gen CAMP antar kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30).....	67
Tabel 10. Perubahan rerata ekspresi mRNA gen CAMP pada masing-masing kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30).....	68
Tabel 11. Korelasi jumlah koloni bakteri, kadar Vitamin D dan ekspresi mRNA gen CAMP	70

ABSTRACT

AMI FEBRIZA ACHMAD. *The Effect of Curcumin on Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) mRNA Gene Expression and Vitamin D Receptor (VDR) Levels in Mice Having been Induced with Salmonella Typhi* (supervised by **Rosdiana Natsir, Suryani As'ad, and Mochammad Hatta**)

The aim of this study is to determine the effect of curcumin on Cathelicidin (CAMP) mRNA gene expression and Vitamin D receptor (VDR) levels in mice having been induced with *Salmonella typhi*.

This research type was an experimental laboratory research with a pre-test post-test with control group design. The sample consisted of 25 BALB / C mice divided into five study groups. The data were analyzed statistically using paired T test, repeated Anova test, and Pearson correlation test.

The results of the research indicate that curcumin at a dose of 200 mg/kg BB, 400 mg/kg BB, 200 mg/kg BB and Vitamin D, and positive control group with Levofloxacin are able to increase CAMP mRNA gene expression after intervention for five days. Such an increase is the highest in the group given a positive control with Levofloxacin and almost coincides with curcumin group of 200 mg/kg BB and Vitamin D. Mice group that receives curcumin treatment, together with Vitamin D indicates an increase with a mean level of CAMP mRNA gene expression after five days of administration (mean \pm SD; H3; 8.05 ± 0.47 , H10; 13.53 ± 0.22 , p-value 0.002).

Key words: curcumin, CAMP, VDR, *Salmonella typhi*



ABSTRAK

AMI FEBRIZA ACHMAD. *Efek Curcumin terhadap Ekspresi gen mRNA Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) dan Kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada Mencit yang Telah Diinduksi oleh Salmonella typhi (dibimbing Rosdiana Natzir, Suryani As'ad, Mochammad Hatta).*

Penelitian ini bertujuan mengetahui efek curcumin terhadap ekspresi gen mRNA gen Cathelicidin (CAMP) dan kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada mencit yang telah diinduksi dengan Salmonella typhi.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan desain pretest posttest with control group. Sampel terdiri dari dua puluh lima mencit BALB/C yang dibagi dalam lima kelompok penelitian. Analisis dilakukan secara statistik dengan menggunakan uji paired T, uji repeated anova dan uji korelasi Pearson.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa curcumin dosis 200 mg/kgBB, curcumin dosis 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kgBB dan Vitamin D, serta kelompok kontrol positif dengan Levofloxacin, mampu meningkatkan ekspresi mRNA gen CAMP, setelah intervensi selama 5 hari peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP paling tinggi pada kelompok yang diberikan kontrol positif yang diberikan Levofloxacin, dan hampir berhimpitan dengan kelompok curcumin 200 mg/kgBB dan vitamin D. Kelompok mencit yang mendapatkan terapi curcumin bersama vitamin D, memperlihatkan peningkatan rata-rata kadar ekspresi mRNA gen CAMP setelah pemberian terapi selama 5 hari (mean \pm SD H3; 8.05 \pm 0.47, H10; 13.53 \pm 0.22, p-value 0.002).

Kata kunci: *Curcumin, CAMP, VDR, Salmonella Typhi*

Ami Febriza Achmad
2020

BAB I

PENDAHULUAN

A. LATAR BELAKANG

Salmonella Typhi atau *S.Typhi* adalah basil Gram negatif yang menyebabkan demam tifoid pada manusia. Bakteri ini bisa bertahan dalam phagosome sehingga bisa lolos dari sistem imunitas tubuh. Beberapa komplikasi demam tifoid yaitu perforasi ileum, bakteremia, dan infeksi endovaskular (1,2). Terapi umum demam tifoid adalah agen antimikroba, seperti kloramfenikol, ampicilin, dan Cotrimoxazole (trimetoprim-sulfametoksazol). Cotrimoxazole biasanya digunakan untuk terapi demam tifoid pada orang dewasa dan anak-anak, termasuk carrier, sebagai alternatif ampicilin dan kuinolon. Cotrimoxazole menghambat sintesis asam folat yang dibutuhkan oleh bakteri untuk mensintesis asam nukleat (3). Curcumin adalah senyawa aktif utama curcuma (*Curcuma longa*), yang banyak digunakan sebagai terapi tradisional untuk demam dan gangguan gastrointestinal di benua Asia. Curcumin memiliki efek anti-inflamasi dan anti-bakteri. Ini mungkin berikatan dengan reseptor vitamin D dan merangsang ekspresi protein anti-bakteri yang disebut Cathelicidin (4,5).

Antibiotik pertama untuk mengobati demam tifoid adalah kloramfenikol, digunakan pada tahun 1948 dan selanjutnya menjadi terapi pilihan sampai tiga dekade di samping ampicilin dan trimetoprim-sulfametoksazol (6,7). Laporan pertama mengenai resistensi *S. Typhi* terhadap kloramfenikol pada tahun 1974 (8), dua puluh tahun kemudian dilaporkan resistensi *S. Typhi* terhadap kloramfenikol, ampicilin, dan trimetoprim-sulfametoksazol, atau dikenal sebagai MDR (multiple drug resistance) *S. typhi* (9). Saat ini peningkatan resistensi *S.Typhi* terhadap terapi lini kedua yaitu sefalosporin generasi ke-3 dan golongan kuinolon juga telah banyak dilaporkan (10–13).

Mekanisme anti-mikroba kurkumin berkorelasi dengan kemampuannya untuk mengikat reseptor vitamin D (VDR) sebagai ligan potensial. Kondisi ini meningkatkan ekspresi peptida antimikroba Cathelicidin (CAMP) dan membasmi bakteri. Selain itu, Curcumin dapat meningkatkan ekspresi mRNA CAMP; sehingga dapat meningkatkan kadar Cathelicidin pada jaringan(4). Cathelicidin adalah peptida kecil yang memiliki kesamaan struktur dengan protein antimikrobal lainnya, seperti defensin. Cathelicidin memiliki kemampuan untuk membasmi bakteri Gram positif dan Gram-negatif dan juga beberapa jamur dan parasit. Cathelicidin menginfiltrasi

membran bakteri untuk mengubah integritas membran, namun beberapa bakteri diketahui memiliki resistensi intrinsik terhadap Cathelicidin. Bakteri-bakteri seperti *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, dan *Proteus mirabilis*, dapat mensintesis enzim protease tertentu yang dapat menghancurkan Cathelicidin (14).

Berdasarkan banyaknya kasus resistensi terhadap antibiotik dalam kasus demam tifoid, maka upaya mengkombinasikan antara agen antimikroba dan obat herbal telah menjadi topik tren terkini. Namun penelitian tidak cukup untuk membuktikan bahwa kombinasi ini bermanfaat untuk mengobati demam tifoid. Masih banyak penelitian diperlukan untuk menemukan kemungkinan efek kombinasi ini. Penelitian ini didahului dengan studi eksplorasi untuk memastikan efek antimikroba dari curcumin terhadap *S. Typhi*.

B. RUMUSAN MASALAH

Berdasarkan latar belakang seperti tersebut di atas, maka dapat diajukan beberapa rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah curcumin berpengaruh pada ekspresi gen mRNA CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) pada mencit balb/c yang telah diinduksi dengan *Salmonella Typhi*?
2. Apakah curcumin berpengaruh pada kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada mencit balb/c yang telah diinduksi dengan *Salmonella Typhi*?
3. Apakah curcumin berpengaruh pada jumlah kolonisasi bakteri pada mencit balb/c yang telah diinduksi dengan *Salmonella Typhi*?

C. PERTANYAAN PENELITIAN

1. Apakah terdapat perbedaan tingkat ekspresi gen mRNA CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) pada kelompok mencit yang mendapatkan curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin dosis 400 mg/kg BB, curcumin 200 mg/kg BB dan vitamin D, dan membandingkan dengan kelompok kontrol levofloxacin 750 mg?
2. Apakah terdapat perbedaan kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada kelompok mencit yang mendapatkan curcumin, curcumin dan vitamin D, dan membandingkan dengan kelompok kontrol levofloxacin 750 mg?
3. Apakah terdapat perbedaan jumlah kolonisasi bakteri *Salmonella Typhi* pada kelompok mencit yang mendapatkan curcumin dosis 200 mg/kg BB,

curcumin dosis 400 mg/kg BB, curcumin dosis 200 mg/kg BB dan vitamin D, serta membandingkan dengan kelompok kontrol levofloxacin 750 mg ?

D. TUJUAN PENELITIAN

TUJUAN UMUM

Untuk mengetahui efek curcumin terhadap ekspresi gen mRNA CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) dan kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada mencit balb/c yang telah terinduksi dengan *Salmonella Typhi*

TUJUAN KHUSUS

1. Untuk mengetahui efek pemberian curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kg BB dan vitamin D terhadap jumlah koloni bakteri antar kelompok sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30), dibandingkan dengan kelompok kontrol pada mencit bab/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*
2. Untuk mengetahui efek pemberian curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kg BB dan vitamin D terhadap kadar vitamin D Reseptor antar kelompok sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30), dibandingkan dengan kelompok kontrol pada mencit bab/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*
3. Untuk mengetahui efek pemberian curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kg BB dan vitamin D terhadap ekspresi mRNA gen CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) antar kelompok sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30), dibandingkan dengan kelompok kontrol pada mencit bab/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*
4. Untuk mengetahui hubungan antara dosis curcumin dengan jumlah koloni bakteri, kadar Vitamin D Reseptor dan ekspresi mRNA gen CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) pada mencit bab/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

E. MANFAAT PENELITIAN

Pada dasarnya suatu penelitian tidak dapat memecahkan semua masalah yang ada, akan tetapi selalu diupayakan untuk mempersempit kesenjangan antara kenyataan. Penelitian ini tidak tertutup dari keterbatasan, tetapi masih diharapkan dapat memberikan manfaat baik dalam bidang ilmu maupun praktis.

1. Aspek Teoritis (keilmuan)

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumber informasi tentang mekanisme efek curcumin sebagai anti-mikroba dalam infeksi *Salmonella Typhi*

2. Aspek Penelitian

Sebagai data yang bisa dijadikan dasar untuk penelitian lanjutan curcumin sebagai obat herbal terstandar

3. Aspek Praktis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan gambaran tentang efek anti-mikroba curcumin sehingga diharapkan dapat digunakan sebagai terapi adjuvant yang dapat meningkatkan efektivitas terapi utama, sehingga akan mengurangi jumlah kolonisasi bakteri *Salmonella Typhi*

BAB II

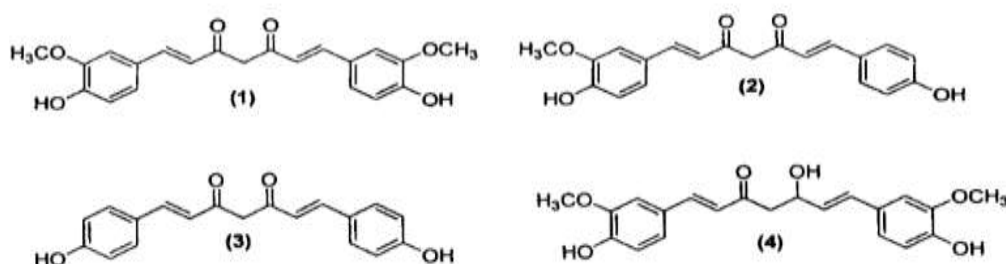
TINJAUAN PUSTAKA

A. TINJAUAN TENTANG CURCUMIN

1. Senyawa Curcumin

Curcumin merupakan senyawa kurkuminoid yang merupakan pigmen warna kuning pada rimpang temulawak dan kunyit. Senyawa ini termasuk golongan fenolik. Kurkuminoid yang sudah diisolasi berwarna kuning atau kuning jingga, dan berasa pahit. Kurkuminoid mempunyai aroma yang khas dan tidak bersifat toksik. Kelarutan kurkumin sangat rendah dalam air dan eter, namun larut dalam pelarut organik seperti etanol dan asam asetat glasial. Curcumin stabil pada suasana asam, tidak stabil pada kondisi basa dan adanya cahaya. Pada kondisi basa dengan pH di atas 7,45, 90% kurkumin terdegradasi membentuk produk samping berupa trans-6-(4'-hidroksi-3'-metoksifenil)-2,4-dioksa-5-heksenal (mayoritas), vanilin, asam ferulat dan feruloil metan. Sementara dengan adanya cahaya, kurkumin terdegradasi menjadi vanilin, asam vanilat, aldehyd ferulat, asam ferulat dan 4-vinilguaiakol (15).

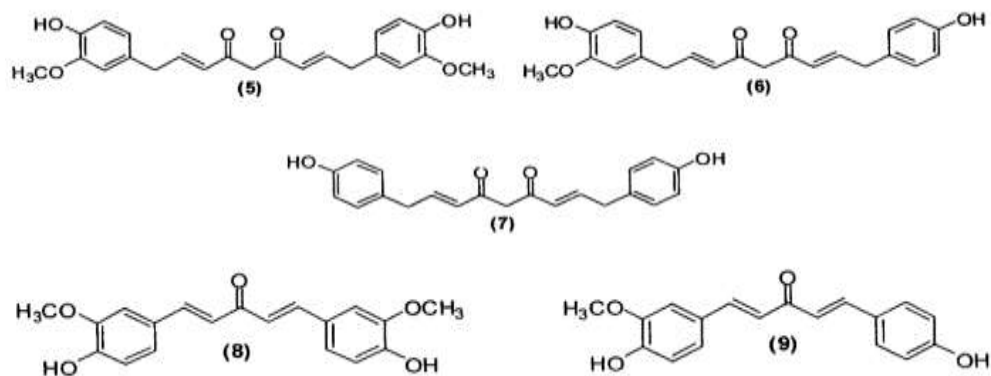
Senyawa kurkuminoid yang diisolasi dari rimpang tanaman kunyit antara lain bisferuloilmetan atau curcumin(1), 4-hidroksi-sinamoil feruloil atau demetoksikurcumin(2) dan bis(4-hidroksisinamoil)-metan atau bisdemetoksikurcumin(3) yang merupakan senyawa turunan diariheptanoid, disamping itu ditemukan juga suatu turunan kurkuminoid yang tidak simetri, yaitu dihidrokurcumin(4) (16).



Gambar 1. Senyawa Curcumin (i)

Hasil yang juga diperoleh dari isolasi *Curcuma longa* adalah beberapa turunan curcumin berupa homolog dengan rantai C9 yang diberi nama Curcumin I (5), Curcumin II (6) dan Curcumin III (7) selanjutnya diisolasi pula beberapa homolog

curcumin dengan rantai C5 yaitu 1,5-bis(4-hidroksi-3-metoksifenil)-penta-(1E,4E)-1,4 dien-3-on (**8**) dan 1-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-5(4-hidroksifenil)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-on (**9**) (16).



Gambar 2. Senyawa Curcumin (ii)

2. Efek Curcumin

2.1 Anti Inflamasi

Aktivitas curcumin dalam kunyit yang banyak diteliti dalam satu dekade terakhir ini adalah aktivitasnya sebagai obat anti inflamasi. Suatu penelitian (17), menyatakan bahwa pemberian curcumin dengan dosis 1000 mg/kg BB pada tikus yang di injeksi dengan karagenin 1% menunjukkan efek anti-inflamasi dengan terjadinya menekan atau menghambat udem sebesar 78,3 %. Laporan lain tentang efek anti inflamasi curcumin, yang menyatakan efek anti inflamasi curcumin dengan dosis 50-200 mg/kg BB dan pengurangan ukuran edema sebanyak 50% bisa dicapai dengan dosis 48 mg/kg (18).

Anti-inflamasi curcumin karena curcumin mampu menghambat biosintesis prostaglandin. Hambatan biosintesis prostaglandin ini dengan jalan menghambat aktivitas protein Cyclooxygenase-2. Protein ini berperan sebagai katalisator biosintesis prostaglandin dari asam arakidonat (19).

Cyclooxygenase-2 (COX-2) mengkatalis sintesis prostanoid, yaitu famili metabolit dari asam arakidonat. Termasuk prostaglandin, prostasiklin dan tromboksan. COX-2 adalah isoform yang bisa terinduksi karena adanya growth factor, sitokin dan molekul pro-inflamasi yang lain. Adanya enzim COX-2 ini, maka mediator radang dilepaskan sehingga menyebabkan terjadinya inflamasi yang ditandai dengan 4 hal, yaitu kemerahan, nyeri, kebengkakan dan kenaikan suhu (20).

Curcumin telah terbukti dapat menghambat sejumlah molekul yang berbeda yang terlibat dalam inflamasi termasuk fosfolipase, lipooksigenase, COX-2, leukotrien, tromboksan, prostaglandin, oksida nitrat, kolagenase, elastase, hyaluronidase, MCP-1, protein interferon-inducible, faktor nekrosis tumor, dan interleukin-12 (19).

Penelitian telah membuktikan bahwa bisdemethylcurcumin (BDC) lebih manjur sebagai agen anti-inflamasi seperti yang ditunjukkan oleh penekanan aktivasi NF- κ B yang menginduksi pembentukan TNF, lebih potent sebagai anti-proliferatif, dan dalam menginduksi spesies oksigen reaktif (ROS). Analog hispolon, yang kekurangan satu unit aromatik dalam kaitannya dengan kurkumin, juga menunjukkan peningkatan aktivitas anti-inflamasi dan anti-proliferatif (21). Efek menguntungkan dari kurkumin sebagai anti inflamasi pada sepsis dimediasi oleh upregulasi PPAR- γ , yang menyebabkan penekanan sitokin pro-inflamasi, ekspresi dan pelepasan TNF- α (22).

2.2 Anti Oksidan

Curcumin yang diisolasi dari kunyit sangat potensial sebagai antioksidan yang diduga disebabkan oleh gugus fenolik dan 1,3-diketon. Senyawa antioksidan alami polifenolik ini bersifat multifungsional dan dapat berfungsi sebagai (1) penangkal radikal bebas seperti superoksida dan radikal hidroksil, (2) pengkelat logam seperti besi (Fe) (3) menghambat aktivitas enzim oksidatif seperti sitokrom p-450, dan (4) peredam terbentuknya oksigen radikal (23). Aktivitas antioksidan gugus fenolik ditunjukkan dengan adanya penghambatan lipid peroksidasi dan penangkal radikal bebas seperti 1,1'-diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) dan 2,2'-azinobis (3-ethyl-benthiazoline-6-sulphonic acid (ABTS+) (24).

Penelitian terhadap pemberian curcumin pada punggung mencit menunjukkan penghambatan pertumbuhan sel tumor kulit yang terinduksi oleh benzo[a]piren atau DMBA (7,12-dimetilbenz[a]anthrasen). Aktivitas antioksidan senyawa curcumin dapat terjadi karena pembentukan radikal bebas dihambat oleh senyawa kurkumin dengan cara menekan aktivitas sitokrom p450 (isoenzim yang penting untuk bioaktivasi awal pada benzo[a]pyrene) atau adanya spesies oksigen reaktif dideaktivasi secara enzimatis oleh GST (glutathione S-transferase) sehingga dapat menghambat aktivitas mutagenik dari benzo[a]pyrene (24,25).

3. Efek Antimikroba Curcumin

Pada penelitian Ramprasad dan Sirsi (26) menunjukkan bahwa, curcumin mempunyai sifat antibakteri, terutama terhadap *Micrococcus pyrogenes var. aureus*. Fenol dan senyawa turunannya dalam curcumin telah terbukti mempunyai sifat bakteristatik dan bakterisidal sehingga sering digunakan sebagai desinfektan. Senyawa fenol berfungsi sebagai antimikroba dengan cara mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel dan bersifat aktif terhadap sel vegetatif bakteri, tetapi tidak terhadap spora bakteri. Curcumin juga diduga memiliki struktur yang mirip dengan senyawa nordihidroguaiaretik (NDGA) yang mempunyai sifat antibakteri yang kuat. Penelitian oleh Shih dan Harris melaporkan bahwa NDGA pada konsentrasi 1000 ppm mempunyai pengaruh letalitas yang kuat terhadap *Escherichia coli* (27).

Penelitian yang dilakukan oleh Tyagi, et al bertujuan untuk melihat aktivitas antibakteri curcumin, terhadap empat kelompok bakteri, yaitu Gram positif (*Staphylococcus aureus* dan *Enterococcus faecalis*) dan Gram negatif (*Escherichia coli* dan *Pseudomonas aeruginosa*). Hasil penelitian tersebut membuktikan kebocoran membran pada bakteri Gram negatif dan Gram positif pada paparan curcumin (28). Sebuah penelitian oleh Rai, et al menunjukkan bahwa curcumin dapat menghambat proliferasi sel bakteri dengan menghambat dinamika perakitan FtsZ (protofilamen bakteri), yang mengalami polimerasi membentuk cincin Z (Z-ring) pada bagian tengah sel yang memicu pembelahan/proliferasi sel bakteri. Perakitan dan stabilitas protofilamen FtsZ telah terbukti berperan penting dalam sitokinesis bakteri. Hasilnya, curcumin menghambat pembentukan cincin Z sitokinetik (Z-ring), sehingga akan menghambat proliferasi bakteri (29).

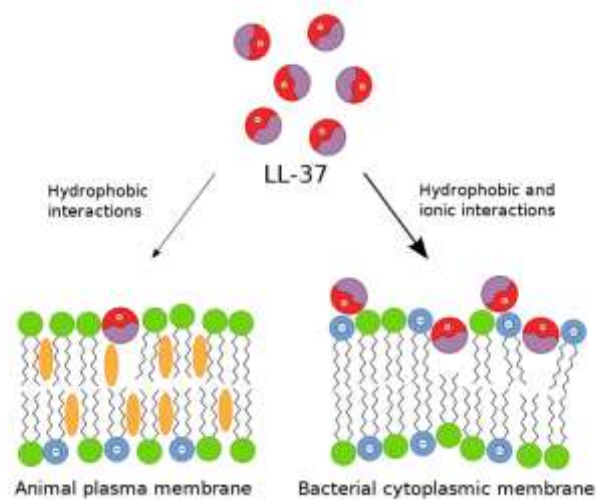
Pada penelitian *in vivo* menunjukkan bahwa pemberian dosis curcumin 100 mg/kg, melindungi tikus dari pneumonia yang disebabkan oleh *S. aureus*, termasuk strain resisten methicillin (MRSA), dengan target pada protein α -hemolysin (HIIa) *S. Aureus* (30). Penelitian *in vivo* lain terhadap mencit yang diinduksi dengan *S. Typhi*, setelah tiga hari pemberian curcumin dosis 200 mg/kg, terdapat banyak koloni bakteri yang pada bagian distal ileum. Namun, jumlah koloni ini berkurang setelah lima hari pemberian curcumin (31).

B. TINJAUAN TENTANG CATHELICIDIN ANTI MICROBIAL PEPTIDE (CAMP)

1. Peptida Antimikroba

Antimicrobial peptides (AMP) atau peptide antimikroba adalah suatu grup molekul yang diproduksi oleh sel-sel dan jaringan dalam tubuh makhluk hidup yang berperan penting sebagai sistem pertahanan tubuh, mulai dari prokariot hingga manusia diketahui memproduksi AMP di dalam tubuhnya (32). Peptida antimikroba diketahui berperan aktif sebagai antibakteria dan anti jamur. Beberapa diantaranya bahkan mempunyai efek sebagai antivirus dan anti parasit (33).

Peptida antimikroba berasal dari prekursor yang lebih besar dan tersusun dari panjang rantai 100 asam amino, bersifat kationik pada pH netral, amfipatik (memiliki kedua sifat hidrofilik dan hidrofobik dalam strukturnya), dan memiliki aktivitas antimikroba spektrum luas. Aktivitas antimikroba yang tinggi dan sitotoksisitas yang relatif rendah adalah karena adanya perbedaan mendasar dalam komposisi lipid membran organisme bakteri dan multiseluler. Di sisi luar membran bakteri, terdapat sangat banyak fosfolipid yang bermuatan negatif, sedangkan di sisi luar membran organisme multiseluler tidak memiliki muatan. Dengan demikian, karakter kationik dari peptida antimikroba menjelaskan spesifisitasnya terhadap membran bakteri (34).



Gambar 3. Gambar skematik interaksi peptida antimikroba LL-37 atau cathelicidin dengan membrane plasma hewan dan membran sitoplasma bakteri (34)

Selain itu, AMP sangat bervariasi dalam struktur. Contoh sederhana, AMP tersusun mulai dari rantai peptida single α -heliks, ikatan β -sheet dan disulfida yang mengandung peptida. Pada manusia ada dua kelas utama AMP, defensins dan

cathelicidin. Beberapa defensin berbeda telah ditemukan pada manusia, namun hanya satu jenis cathelicidin (34).

Defensin adalah famili peptida antimikroba yang memiliki karakteristik ikatan β -sheet dan kerangka tiga jembatan disulfida. Defensin memiliki aktivitas antimikroba yang luas dan banyak diekspresikan oleh sel epitel manusia dan sel-sel darah. Ada dua famili defensin yang diekspresikan pada manusia, yaitu α dan β -defensin, dikategorikan berdasarkan lokasi sistein dan pola disulfida-jembatan. α -defensin paling menonjol diekspresikan oleh sel Paneth di usus halus dan neutrofil, sementara β -defensin lebih banyak diekspresikan oleh berbagai sel darah dan epitel. Beberapa peptida antibakteri pada manusia yang telah diidentifikasi dapat dilihat pada tabel berikut (34).

Tabel 1. Jenis Peptida Antimikroba Pada Manusia

Famili	Nama lain	Referensi
α-defensin	HNP1	(35)
	HNP2	
	HNP3	
	HNP4	
	HD5	
	HD6	
β-defensin	hBD-1	(35,36)
	hBD-2	
	hBD-3	
	hBD-4	
Cathelicidin	LL-37	(37)

2. Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP)

Peptida antimikroba merupakan molekul efektor dari sistem imun alamiah yang memegang peranan sentral dalam pertahanan sebagai antimikroba. Cathelicidin merupakan salah satu jenis peptida antimikroba (38), merupakan peptida molekul kecil (terdiri dari 12-100 asam amino) yang mempunyai aktivitas antimikroba

spektrum luas, diperkirakan mempunyai fungsi dalam sistem imun alamiah, sebagai pertahanan pertama melawan mikroorganisme (39).

Cathelicidin memiliki prosequence N-terminal, diikuti oleh sequence variabel C-terminal, yang memiliki aktivitas antimikroba tinggi saat terbentuk secara enzimatik. Karena prosequence tersebut sangat identik dengan protein yang disebut cathelin, yang pada awalnya diidentifikasi sebagai inhibitor Cathepsin L, maka nama cathelicidin pun diambil untuk kelompok peptida antimikroba ini (40). Cathelicidin, dalam berbagai jumlah, telah ditemukan di setiap spesies mamalia sampai saat ini.

Manusia dan tikus mempunyai satu cathelicidin, sedangkan sapi dan babi mempunyai beberapa cathelicidin (41). Cathelicidin manusia dan tikus disandi oleh gen yang serupa dan mempunyai struktur α -heliks, spektrum antimikroba, serta distribusi di jaringan yang serupa sehingga cathelicidin tikus sering dipakai sebagai analisis *in vivo* cathelicidin manusia (42).

Tabel 2. Cathelicidin antimicrobial peptide yang telah teridentifikasi pada mamalia

Spesies	Cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP)
Kuda	eCATH-1, -2, dan -3
Babi	Prophenin, PR-39, PAMP-23, -36, & -37, Protegrins 1-5
Sapi	Indolicidin, dodecapep, Bac5 & 7, BAMP-27, -28 & -34
Domba	s-dodecapep, oaBac6 & 11, sBac5 & 7.5, SAMP-29 & -34
Kambing	chBac5 & 7.5, chMAP-28 & -34
Kera	RL-37
Manusia	LL-37, hCAP18
Kelinci	CAP18
Mencit (mouse)	CRAMP
Tikus (rat)	rCRAMP

Seperti ditunjukkan pada Tabel 2, manusia hanya memiliki satu peptida antimikroba cathelicidin yang disebut LL-37 (43) atau hCAP18, yang merupakan pro-peptida (44). Nama LL-37 berdasarkan peptida yang mature, terdiri dua residu leusin dan mengandung total 37 asam amino. Sedangkan hCAP-18, berasal dari homolog

kelinci CAP18, sebuah peptida antimikroba kationik berukuran 18 kDa. Dalam disertasi ini, peptida mature akan disebut LL-37, prekursor LL-37 disebut sebagai pro-LL-37, prekursor dengan sinyal peptida disebut sebagai pra-pro-LL-37 dan gennya disebut sebagai sebagai CAMP.

Cathelicidin pada manusia disebut human cathelicidin anti-microbial protein (hCAP) yang terdiri dari sebuah domain C-terminal aktif yang terdiri dari 37 asam amino sehingga disebut juga LL-37 yang mencerminkan panjang dari residu 37 asam amino dengan residu 2 leusin (44,45). Human cathelicidin anti-microbial protein mempunyai massa molekul 18 kDa sehingga disebut juga hCAP18 (44,46). Studi in vitro telah mengkonfirmasi peranan antiinfeksius dari hCAP18 maupun hubungannya yang erat dengan metabolisme vitamin D dan mekanisme lainnya dari imunitas alamiah (45).

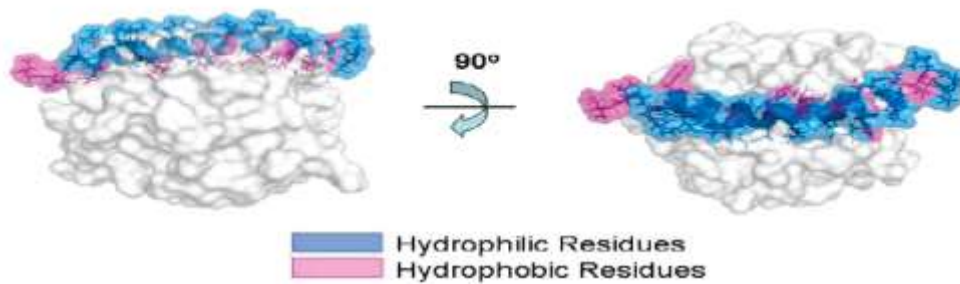
3. Struktur Molekul Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP)

Human cathelicidin anti-microbial protein mempunyai massa molekul 18 kDa sehingga disebut juga hCAP18 (44,46) dengan struktur α -helikal dengan 2 jembatan disulfida terletak di antara 2 molekul sistein (C85-C96 dan C107-C124) (46). Molekul hCAP18 berisi domain N-terminal tidak aktif (yang merupakan lokasi katelin) dan C-terminal PAM (LL-37) (14). Katelin adalah domain tidak aktif dari ketelisinidin, diaktivasi oleh kerja serin protease untuk memunculkan domain multifungsional yang sangat spesifik (38). Katelin merupakan sebuah protein dari procine neutrophils yang menghambat protease cathepsin L (karenanya disebut cath-e-L-in) (47).

Setelah aktivasi hCAP18, LL-37 dilepas ke plasma, selanjutnya aktivitas antimikroba dipertahankan oleh struktur α -helikal. Komposisi ionik, pH atau kadar garam di lingkungannya memengaruhi struktur α -helikal mengganggu aktivitas antibakterial dari LL-37. Pada pH plasma yang lebih tinggi, struktur α -helikal akan terpelihara dan menjamin aktivitas mikroba peptida. Pada keadaan dengan $\text{pH} < 7,2$, peptida sebagian besar membuka dan tidak aktif. Human cathelicidin antimicrobial protein mempunyai struktur amfifilik dengan fragmen hidrofobik dan hidrofilik yang memungkinkan interaksinya baik di lingkungan encer (aqueous) maupun membran lipid (14).

LL-37 mengadopsi struktur heliks α -amphipathic dalam larutan yang mengandung konsentrasi garam fisiologis (48). Karena muatan positif membrannya, ia memiliki afinitas yang kuat terhadap membran lipid bakteri, yang memiliki

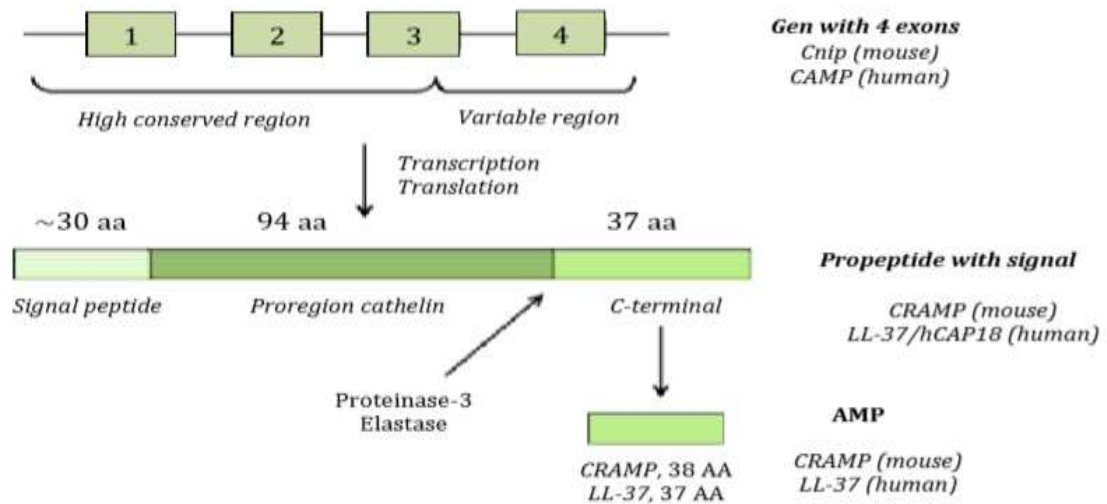
fosfolipid bermuatan negatif pada sisi luar membran. Berbagai penelitian menunjukkan, bahwa LL-37 merusak membran bakteri melalui mekanisme seperti karpet (*carpet-like mechanism*) (37,49) dan tidak membentuk pori-pori sebagai yang dilakukan oleh komplemen dan perforin.



Gambar 4. Gambar resonansi magnetik nuklear LL-37 yang terikat pada misel dodecylphosphocholine. Gambar menunjukkan struktur heliks α -amphipathic dan mendukung mekanisme *carpet-like mechanism* (50)

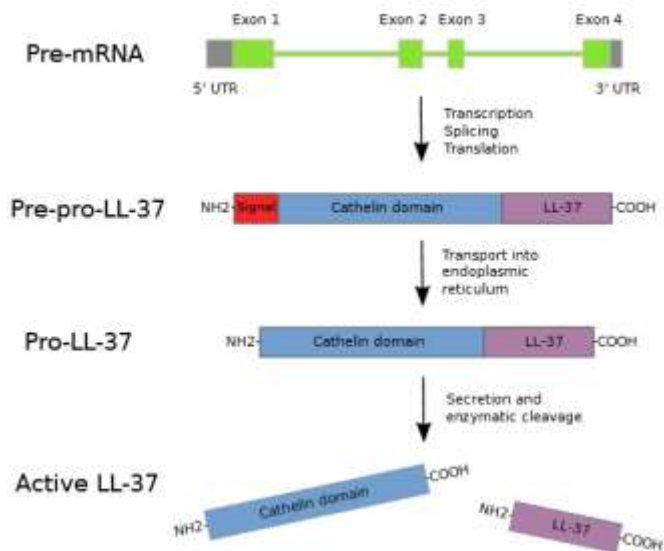
4. Struktur Genetik Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP)

Struktur genetik hCAP18 dengan panjang 2 kb terdiri dari 4 ekson dan 3 intron seperti yang terlihat pada Gambar 6 (40). Ekson 1-3 menyandi sinyal peptida dan domain katelin, sedangkan ekson ke-4 menunjukkan tempat yang dibelah dan muncul peptida aktif LL-37(40,51) Proteolitik memecah molekul prekursor tidak aktif untuk melepaskan PAM C-terminal matur dari prodomain katelin yang dikerjakan oleh elastase (Panyutich dkk., 1997) atau proteinase-3 (Sorensen dkk., 2001) pada saat degranulasi dari neutrofil yang teraktivasi (activated neutrophils).



Gambar 5. Struktur dasar cathelicidin LL-37/hCAP 18 untuk manusia dan CRAMP tikus. Manusia dan tikus mengekspresikan cathelicidin tunggal yang disandi oleh gen dan struktur alfa-heliks serupa. Cathelicidin disintesis sebagai sebuah protein prekursor tidak aktif dengan sebuah amino-terminal signal sequence, sebuah domain katelin sentral, dan sebuah domain PAM karboksi-terminal tidak aktif (40)

Gen cathelicidin anti-microbial peptide (CAMP) terletak pada kromosom 3 (3p21) dekat gen-gen lainnya yang mempunyai fungsi sama seperti gen untuk macrophage colony stimulating factor 1 (sebuah sitokin antivirus), gen untuk hepatocyte growth factor like protein (sebuah faktor multifungsional yang diperlukan dalam reparasi jaringan dan angiogenesis), gen untuk collagen VII alpha-1 polypeptide (sebuah protein yang bertanggung jawab untuk integritas jaringan), dan gen gen untuk natural killer-tumour recognition (sebuah molekul yang terlibat dalam aktivitas limfosit T-killer). Berdasarkan sebuah studi, cathelicidin up-regulates 49 gen, mengontrol ekspresi beberapa kemokin atau reseptor kemokin (CXCR-4, CCR2) dan beberapa sitokin (IL-8) (51). Transkripsi CAMP ditingkatkan selama infeksi bakteri, virus, jamur atau protozoa. Kalsitriol [1,25(OH)2D] adalah penginduksi transkripsi cathelicidin mRNA yang sangat kuat (52).



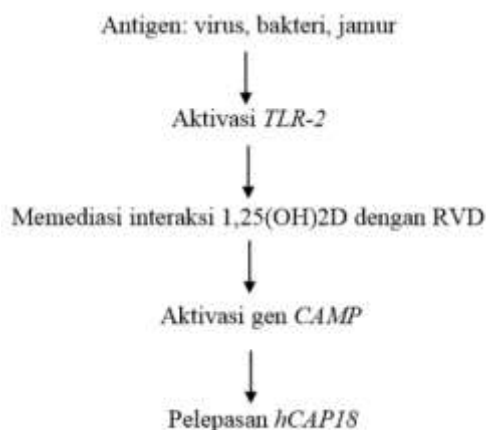
Gambar 6. Gambar skematik gen CAMP dan Proses Pembentukan Cathelicidin (LL-37) (34)

Gen CAMP tersusun dari empat ekson. Tiga ekson pertama mengkode peptida sinyal dan bagian pro cathelin, sedangkan yang ekson keempat mengkode sebuah situs pengolahan (*processing site*) dan peptida. Setelah proses transkripsi dan translasi, pre-pro-LL-37 dihantarkan ke retikulum endoplasma, sementara sinyal peptida dibelah selama proses tersebut berlangsung. Bergantung pada jenis dan keadaan sel, pro-LL-37 kemudian diangkut lebih lanjut dan disimpan dalam granula, atau langsung disekresikan. Pro-LL-37 yang disekresikan kemudian dirubah menjadi LL-37 oleh enzim proteinase 3 yang dihasilkan oleh granula azurophil neutrofil (53).

Cathelicidin anti-microbial peptide disintesis oleh sejumlah sel seperti sel-sel polimorfonuklear (PMN), monosit, limfosit, mastosit, dan sel-sel epitel seperti keratinosit atau sel-sel saluran cerna, saluran respiratori, dan endotelial genitalia. Pada orang sehat, kadar plasma hCAP18 antara 50-80ng/mL. Cathelicidin anti-microbial peptide disintesis dan disimpan sebagai sebuah preproprotein. Adanya rangsangan antigen, prekursor secara enzimatik membelah peptida terminal LL-37 yang merupakan domain aktif secara biologis, kemudian LL-37 dilepas ke plasma, ruangan ekstraselular atau ke saliva, susu, sekresi sudaripera, cairan seminal, dan amnion. Human cathelicidin anti microbial protein 18 mempunyai peran penting dalam pertahanan alamiah yang cepat melalui sintesis pada sel-sel pengawal (sentinel cells)

seperti sel-sel epitel dan endotel, maupun pelepasan yang cepat ke dalam plasma oleh sel-sel darah setelah stimulasi spesifik.

Vitamin D memediasi sintesis cathelicidin melalui ekspresi RVD. Molekul-molekul mikrobial seperti asam lipoteikoat, peptidoglikan, dan lipopolisakarida atipikal dari spesies *Leptospira* dan *Porphyromona gingivalis*, lipomanan dari famili mikobakteria, sejumlah antigen virus dan jamur, mengaktivasi toll-like receptors 2 (TLR-2), kemudian reseptor ini akan mencetuskan respon yang dimediasi oleh vitamin D berupa interaksi antara 1,25(OH)₂D dengan RVD. Interaksi ini akan mengaktivasi gen *CAMP* untuk mengekspresikan cathelicidin. Peningkatan atau penurunan ekspresi RVD akan mengubah kadar cathelicidin. Pada keadaan adanya rangsangan oleh infeksi, kadar vitamin D juga meningkatkan ekspresi TLR-2, memungkinkan peningkatan respon terhadap aktivasi TLR. Beberapa polimorfisme gen yang menyandi TLR-2 atau RVD berperan terhadap terjadinya sepsis yang serius yang disebabkan oleh bakteri Gram positif atau infeksi oleh mikobakterium. Bukti ini menempatkan vitamin D sebagai faktor terpenting dalam regulasi cathelicidin dan dapat menjelaskan kerja antimikrobia yang dihubungkan dengan vitamin D (54). Secara skematis sintesis cathelicidin terlihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Sintesis Cathelicidin/hCAP18

5. Regulasi Ekspresi Gen *CAMP*

Mekanisme terperinci terhadap regulasi gen *CAMP* (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) masih belum diketahui, dimana Cathelicidin ditemukan mengalami upregulasi jika terdapat infeksi bakteri (55). Telah ditunjukkan, bahwa produk dari bakteri akan meningkatkan ekspresi Cathelicidin pada sel manusia yang dikultur (56),

yang mengindikasikan peran Cathelicidin berperan dalam melawan infeksi. Bukti lebih lanjut memperlihatkan peran Cathelicidin dalam pertahanan bakteri, yaitu bahwa *Shigella* (57) dan *Neisseria gonorrhoeae* (58) menyebabkan downregulasi Cathelicidin sebagai bagian dari mekanisme invasi bakteri tersebut.

Penginduksi ekspresi gen CAMP yang paling ampuh adalah 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂ D₃), yang merupakan bentuk aktif dari vitamin D. 1,25(OH)₂ D₃ bekerja melalui reseptor vitamin D (VDR) yang kemudian mengikat elemen responsif vitamin D (VDRE), sekitar 500 bp hulu promotor gen CAMP (54,59) Selain itu, histone deacetylase inhibitor butirir dan trichostatin A, telah terbukti menginduksi ekspresi gen CAMP (54,60) Sebuah penelitian baru-baru ini (61) mengemukakan, zat tersebut bekerja langsung pada promotor CAMP dengan meningkatkan asetilasi histone dan dengan demikian membuka struktur kromatin untuk transkripsi. Tabel dibawah ini merangkum semua zat yang dapat meningkatkan ekspresi gen CAMP, yang telah diidentifikasi.

Tabel 3. Zat Yang Dapat Meningkatkan Ekspresi gen CAMP

Zat	Referensi
1,25-dihydroxyvitamin D ₃	(54,59)
Butyrate	(60,62)
Trichostatin A	(62)
Lithocholic acid	(63)
Lipopolysaccharide	(56)
Interleukin-6	(56)
Retinoic acid	(56)

6. Mekanisme Kerja Cathelicidin

Cathelicidin anti-microbial peptide mempunyai kerja yang multipel. Beberapa studi melaporkan kerja cathelicidin adalah sebagai berikut: aktivitas antimikrobia (64), aktivitas kemotaktik PMN, monosit, limfosit, dan mastosit (65), pelepasan histamin oleh sel mast (66), stimulasi ekspresi gen (51), aktivitas antitoksik dengan berikatan dengan lipopolisakarida yang merupakan endotoksin basil Gram negatif (51),

angiogenesis (67), aktivasi sel-sel epitel selama trauma dan reepitelisasi kulit selama infeksi kulit (68), dan regulasi diferensiasi sel dendritik (69).

7. Mekanisme Anti Mikroba Cathelicidin

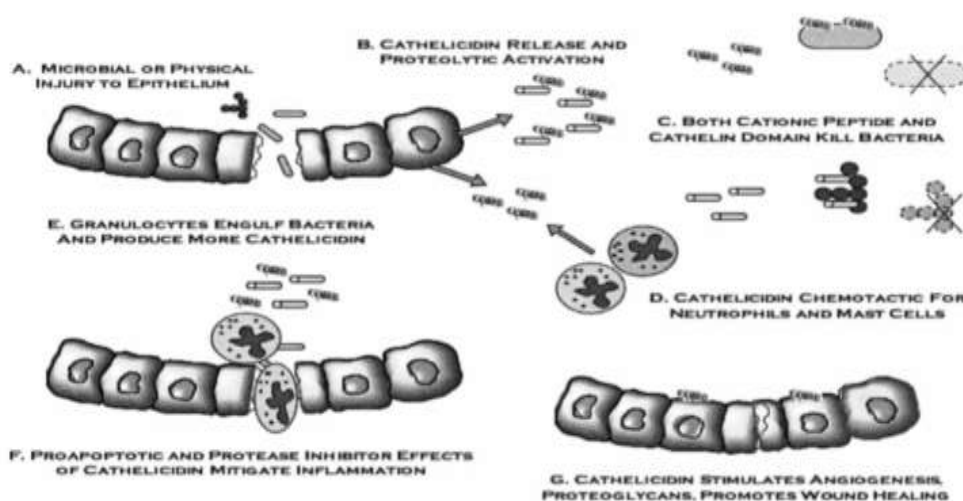
Sebagian besar efek antimikroba secara langsung dari cathelicidin dapat dikaitkan dengan struktur fisiknya serta sifat kationik dan hidrofobik yang dimilikinya (70). Heliks N-terminal berperan dalam kemotaksis dan pertahanan terhadap proteolisis, sedangkan heliks C-terminal bertanggung jawab untuk efek antimikroba. Cathelicidin menuju membran mikroba, lalu menutupi permukaan membrane mikroba tersebut, dan melubangnya, membentuk pori-pori pada membran yang akhirnya menghancurkan kuman. Cathelicidin pada dasarnya mengikat membran sel yang mengandung lipopolisakarida (Gram-negatif) atau asam teichoic (Gram-positif) dengan muatan negatif, berbeda dengan membran zwitterionik eukariota. Cathelicidin juga memiliki kemampuan sebagai antivirus juga dengan interaksi dengan selaput kapsul dan kapsid protein.

Cathelicidin dapat berikatan dengan asam lipoteikoat maupun lipoarabinomanan, mencegah aktivasi makrofag pada infeksi stafilokokus dan tuberkulosis (51). Pada kasus-kasus tertentu, beberapa enzim proteolitik dari bakteri yang resisten dapat merusak cathelicidin maupun antimicrobial peptide lainnya (71).

Induksi proses autophagy pada sel monosit atau makrofag manusia adalah mekanisme yang memperhitungkan kemampuan Cathelicidin untuk membunuh patogen intraselular. Autophagy adalah proses biologis yang sangat primitif yang berfungsi untuk memastikan homeostasis sitoplasma sel (72). Saat proses autophagy aktif, beberapa bahan sitoplasma terjebak di dalam vakuola membran ganda yang disebut autophagosome, kemudian bergabung dengan lisosom, menjadi autophagolysosome. Di dalamnya, enzim lisosom menghancurkan semua bahan yang terperangkap tadi. Autophagy pada mulanya berfungsi utama untuk mendaur ulang nutrisi dari molekul yang rusak, namun sekarang diketahui bahwa autophagy terlibat dalam berbagai macam proses, termasuk aktivitas antimikroba (73,74).

Cathelicidin adalah protein penting dalam pembentukan dan menjalankan fungsi autophagosomes dan autophagolysosomes pada sel monosit manusia (72–74), tapi bukan satu-satunya, karena banyak mekanisme lain yang menginduksi autophagy yang terlepas dari sistem calcitriol-cathelicidin yang telah ditemukan. Cathelicidin menginduksi ekspresi dua faktor kunci untuk pengembangan autophagy, beclin-1 dan

autophagin (Atg)-5 (72–75). Kedua protein, beclin-1 dan autophagin (Atg)-5, penting untuk proses pematangan autophagy dan penggabungan autophagosom dan lisosom. Autophagy yang dimediasi oleh kurkumin, puasa sel, atau rapamycin tidak diatur oleh sistem calcitriol-cathelicidin (74).



Gambar 8. Fungsi Biologik yang Multipel dari Cathelicidin yang Berfungsi Sebagai Pertahanan Alamiah pada Permukaan Epitel Inang Melawan Infeksi Bakteri (14)

Cathelicidin memiliki efek tambahan, yang dapat bervariasi tergantung pada konsentrasi local (75). Telah ditunjukkan secara in vitro, misalnya bahwa pada dosis kurang dari 1 mol, Cathelicidin membantu menginduksi kemositaksis neutrofil dan kelangsungan hidup neutrofil, dan merangsang angiogenesis dan migrasi fibroblas dan proliferasi (bermanfaat efek pada penyembuhan luka), sementara konsentrasi sangat tinggi, biasanya di luar yang dicapai dalam respons yang biasa, memiliki efek sitotoksik dan pro-inflamasi (75).

Selain efek bakterisidal dengan merusak membran bakteri, hCAP18 juga dapat menetralkan LPS yang diproduksi oleh bakteri Gram negatif, proteksi terhadap syok endotoksik melalui tiga mekanisme (76) : [a] menghambat reseptor sel-sel dendritik TLR-4, jadi mencegah aktivasinya dan respon terhadap LPS, [b] memblokir pelepasan TNF- α pada tingkat limfosit CD14, dan [c] memblokir senyawa lainnya pada proses inflamasi seperti nitric oxide, tissue factor, PGE2, kemokin, dan lain-lain.

Sebagai antimikrobal melawan virus, bakteri, dan jamur, kerja cathelicidin cepat dan tidak selektif. Cathelicidin memperlihatkan efek yang berbeda pada kadar yang berbeda. Untuk bakteri Gram positif, efek antibakterial terlihat pada kadar 0,75 μ M, sedangkan untuk Gram negatif pada kadar >5 μ M, dan untuk aktivitas

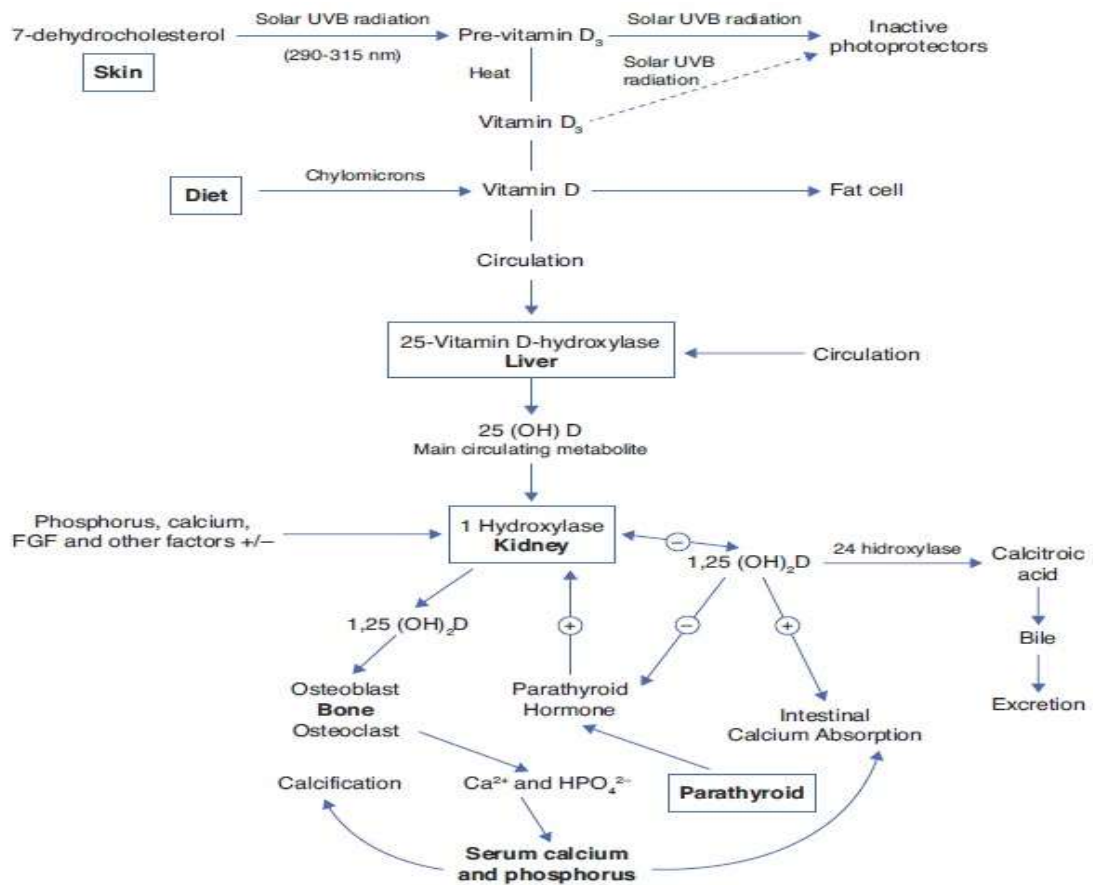
kemotaktik pada kadar $10 \mu\text{M}$. Kadar $>15 \mu\text{M}$ bersifat sitotoksik dan perlu secara cepat di-non-aktifkan dengan berikatan dengan lipoprotein plasma (apolipoprotein A). Efek antibakteri hCAP18 berhubungan dengan keadaan lingkungan fisik dan kimiawi, dan juga ditingkatkan oleh imunomodulator dan aktivitas yang berhubungan dengan kemotaktik (45).

Penelitian tentang cathelicidin pada dewasa oleh Gombart, et al. (77) melaporkan bahwa cathelicidin kadar rendah di sirkulasi berhubungan dengan lebih tingginya angka kematian akibat penyakit infeksi pada pasien yang menjalani hemodialisa [RO=3,7 (IK95% 1,2 sampai 11,2)]. Penelitian lain dengan desain kohort yang dilakukan pada orang dewasa penderita pneumonia, sampel dipilih secara convenient, dilakukan pada musim dingin, melaporkan bahwa baik cathelicidin maupun β -defensin-2 tidak bisa memprediksi kematian. Sebaliknya dengan vitamin D, kadar $25(\text{OH})\text{D} <30 \text{ nmol/L}$ meningkatkan risiko kematian dibanding kadar $25(\text{OH})\text{D} >50 \text{ nmol/L}$ dengan RO=12,7 (IK95% 2,2 sampai 73,3) (78).

C. TINJAUAN TENTANG VITAMIN D

1. Fisiologi dan Metabolisme Vitamin D

Ada dua sumber vitamin D bagi manusia, yaitu eksogen yang disediakan oleh diet dalam bentuk vitamin D_2 dan D_3 . Dalam produksi endogen, cholecalciferol (D_3) disintesis di kulit dengan bantuan radiasi sinar ultraviolet B (UV-B) melalui fotolisis 7-dehydrocholesterol dan berubah menjadi vitamin D_3 . Proses ini berlangsung dalam dua tahap, yang pertama terjadi di lapisan dalam dermis dan terdiri dalam konversi foto 7-dehydrocholesterol menjadi pra-vitamin D atau parakalsiferol. Pada tahap kedua, pra-vitamin D perlahan dan bertahap menghasilkan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dengan fungsi autokrin atau parakrin lokal. Beberapa faktor mengatur kadar $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ adalah 1-OHase, yang hidroksilasi diaktifkan oleh parathormon (PTH), dan kalsitonin, yang dihambat oleh kadar serum kalsium, fosfor dan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ sendiri (79).



Gambar 9. Sintesis dan Metabolisme Vitamin D (79)

2. Vitamin D Reseptor (VDR)

Vitamin D reseptor (VDR) adalah mediator penting dari tindakan biologis $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. VDR adalah reseptor intraseluler milik keluarga reseptor nuklir steroid/tiroid, dan dinyatakan oleh beberapa jenis sel termasuk sel-sel imun. Reseptor vitamin D juga dikenal dengan nama kalcitrol, reseptor yang dikenal sebagai NR1H1 (subfamily nuclear reseptor) yang terdapat di hampir semua sel dan jaringan tubuh manusia. Gen VDR. Terletak pada wilayah kromosom 12q13-14, terdiri dari 14 ekson (ekson 2-9) dan 6 diantaranya terletak pada region 5' yang tidak ditranslasi (ekson 1a-1f) (80).

Vitamin D reseptor (VDR) merupakan factor transkripsi ligan-diinduksi yang dimiliki oleh superfamily reseptor nuklir. Vitamin D reseptor memiliki struktur modular yang terdiri dari DNA-binding domain yang berikatan dengan C-terminal ligand-binding domain (LBD), termasuk dimerisasi RXR. Bentuk aktif dari VDR setelah berinteraksi dengan reseptor retinoid X (RXR) untuk membentuk heterodimer yang mengikat vitamin D responsive elements (VDRE), yang terletak pada promoter

gen $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Ikatan tersebut menyebabkan perekrutan protein koregulator lain yang penting untuk modifikasi kromatin dan aktivasi transkripsional (81).

Terbentuknya kompleks multiprotein yang mengandung VDR-RXR, enzim histone-modifying dan komponen regulator apparatus transkripsional basal merupakan kunci keberhasilan perubahan transkripsi gen yang dimediasi $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Vitamin D reseptor mampu meregulasi ekspresi gen tertentu, positif maupun negative melalui ikatan dengan VDRE yang terdapat di region promoter, atau menghambat ekspresi beberapa gen melalui kerja factor transkripsi antagonis, seperti nuclear factor (NF-AT dan NF- κ B) (81).

3. Vitamin D dan Sistem Imun

Pengaruh metabolit vitamin D dapat mempengaruhi dari kedua fungsi sistem kekebalan tubuh yaitu imunitas adaptif dan imunitas bawaan. Secara umum, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ mengurangi aktivitas sistem imunitas adaptif dan meningkatkan imunitas bawaan. Dalam imunitas adaptif, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ menghambat produksi IgG, proliferasi dan diferensiasi limfosit B dan menghambat proliferasi limfosit T. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ juga menghambat proliferasi sel T-helper 1 (Th-1) dan dengan demikian membatasi sitokin yang diproduksi oleh sel-sel ini. Sebaliknya, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ menginduksi sitokin T helper-2 (Th-2) dan sel T regulator (Treg). Sel Th-1 memproduksi interferon gamma (IFN- γ), interleukin-2 (IL-2) dan tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) dan sel Th-2 memproduksi IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 dan IL-13. Mungkin karena kemampuannya menghambat respon adaptif kekebalan dan peradangan, vitamin D efektif dalam menekan gangguan autoimun, seperti rheumatoid arthritis, diabetes tipe I, penyakit radang usus dan lupus eritematosus sistemik (82).

Sistem imun bawaan segera bertindak ketika dihadapkan dengan infeksi mikroba. Proses ini melibatkan vitamin D dan myeloid dan sel-sel epitel yang mengekspresikan reseptor Toll like (TLRs), CYP27B1 dan VDR. Peptida antimikroba, termasuk α dan β -defensin dan cathelicidin, membunuh organisme dalam makrofag dan disekresikan oleh sel-sel epitel. Sebuah peptide antimikroba khas disekresi oleh epitel adalah cathelicidin anti microbial peptide (CAMP), yang juga disebut LL-37/FALL-39. Aktivasi TLR dapat meningkatkan transkripsi CYP27B1, $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ dan transkripsi CAMP. Aktivasi dan kemampuan respon CAMP terbatas jika VDR diblokir, CYP27B1 dihambat, atau kekurangan 25-hydroxyvitamin D ($25(\text{OH})\text{D}$). Hal ini menunjukkan bahwa vitamin D dengan jelas dapat

mempengaruhi sistem imunitas tubuh, baik sistem imun adaptif maupun sistem imun bawaan (82).

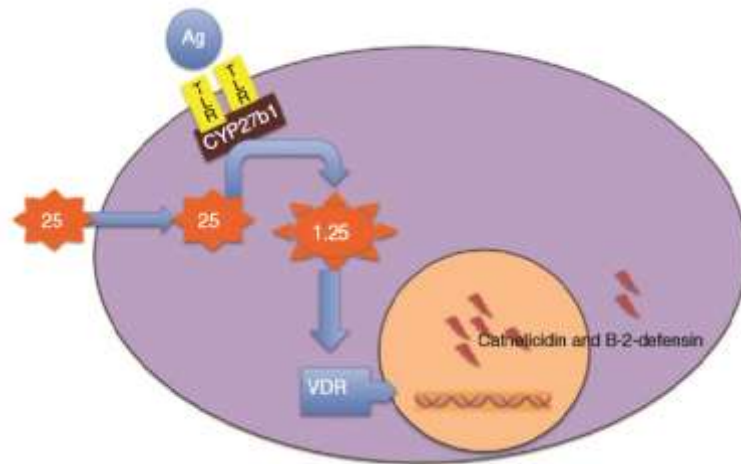
Menggunakan microarray DNA dan PCR kuantitatif analisis, Liu, et al. (83) menemukan bahwa aktivasi TLR2 dan TLR 1 oleh ligan mikrobakteri dapat meningkatkan ekspresi VDR dan CYP27B1, vitamin D 1-hidroksilase yang mengkatalis konversi vitamin D menjadi bentuk aktifnya dalam monosit dan makrofag, tetapi tidak pada sel dendritik. Cytometric aliran intraseluler dan analisis PCR kuantitatif menunjukkan bahwa perlakuan monosit dengan vitamin D meningkatkan ekspresi CYP24 (CYP24A1), vitamin D 24-hidroksilase dan cathelicidin (CAMP), sebuah peptida antimikroba, tetapi tidak pada DEF4. Stimulasi ligan TLR2 dan TLR1 meningkatkan ekspresi CYP24 dan CAMP di dalam serum manusia dan upregulation CAMP lebih efisien pada serum kaukasia dibandingkan serum Afrika-Amerika, di mana kadar vitamin D secara signifikan lebih rendah. Suplementasi vitamin D serum Afrika-Amerika membalik defek induksi CAMP. Liu mengusulkan bahwa suplementasi vitamin D pada populasi Afrika dan Asia, yang mungkin memiliki kemampuan berkurang dalam mensintesis vitamin D dari sinar ultraviolet, menjadi intervensi yang efektif dan murah untuk meningkatkan imunitas bawaan terhadap infeksi mikroba dan penyakit neoplastik.

D. HUBUNGAN CURCUMIN, VITAMIN D DAN CATHELICIDIN ANTI MICROBIAL PEPTIDE (CAMP)

Penelitian oleh Wang, et al. menunjukkan bahwa calcitriol atau 1,25-dihydroxyvitamin D menginduksi ekspresi gen dari dua peptida antimikroba pada manusia, cathelicidin dan beta-2-defensin (59). Pada tahun 2006, ditunjukkan adanya pengenalan antigen Mycobacterium tuberculosis oleh reseptor seperti Toll-like-receptors (TLRs) di membran sel monosit, atau sel yang berperan dalam imunitas alamiah (pada epitel kulit, saluran pernafasan dan genitourinaria, dll.), kemudian akan menginduksi aktivasi gen 1-hidroksilase dan Vitamin D Receptor (VDR) (83), yang diikuti oleh pengaktifan gen cathelicidin dan beta-2-defensin. Penelitian yang dilakukan oleh Liu, et al. juga menunjukkan bahwa pengaktifan tersebut memerlukan kadar 25-hydroxyvitamin D dalam batas medium (83,84) yang menunjukkan bahwa kondisi hipovitaminosis D akan membatasi produksi peptide antimikroba tersebut.

Mekanisme vitamin D memodulasi sekresi cathelicidin dan beta-2-defensin yaitu diawali oleh pengikatan beberapa antigen mikroba (Ag) ke Toll-like-reseptor

(TLRs) yang kemudian akan mengaktifasi enzim 25-hydroxyvitamin D-1-hydroxylase (CYP27B1). Enzim tersebut akan mensintesis 1,25-dihydroxyvitamin D dari 25-hydroxyvitamin D, sehingga kondisi ini sangat tergantung bergantung pada konsentrasi intraselular 25-hydroxyvitamin D. 1,25-dihydroxyvitamin D lalu berikatan pada reseptornya (VDR), dan kompleks reseptor hormon tersebut di intranuklear akan mengaktifkan transkripsi gen cathelicidin dan beta-2-defensin (84–86).



Gambar 10. Mekanisme vitamin D memodulasi sekresi cathelicidin dan beta-2-defensin (84–86)

Penelitian *in vitro* terbaru menunjukkan bahwa curcumin juga mengikat VDR dengan afinitas rendah (87). Sebagai ligand potensial untuk VDR, penelitian ini berhipotesis bahwa curcumin juga akan menginduksi ekspresi gen target VDR yang diketahui di dalam sel, yaitu gen yang menginduksi pembentukan peptida antimikroba manusia cathelicidin (CAMP). Peneliti lain mendapatkan adanya korelasi positif antara kadar cathelicidin dengan kadar vitamin D di sirkulasi pada dewasa sehat (88).

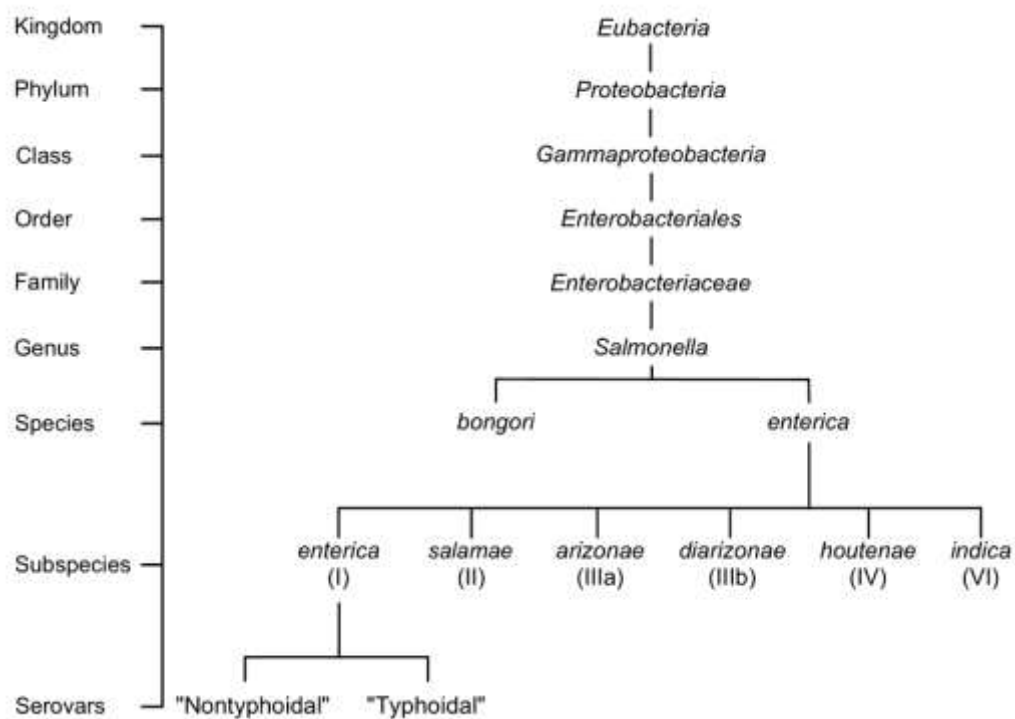
E. TINJAUAN TENTANG SALMONELLA TYPHI

1. Klasifikasi Salmonella Typhi

Klasifikasi Salmonella bersifat kompleks karena organisme ini merupakan suatu rangkaian yang berkesinambungan, dan bukan satu spesies umum. Anggota genus Salmonella awalnya diklasifikasikan berdasarkan epidemiologi, pejamu, reaksi biokimia dan struktur antigen O,H dan Vi (jika ada). Penelitian hibridasi DNA telah menunjukkan adanya tujuh kelompok evolusioner. Saat ini, genus salmonella dibagi menjadi dua spesies yang masing-masing terbagi atas banyak subspecies dan

serotype. Kedua spesies tersebut adalah *Salmonella enterica* dan *Salmonella bongori* (dahulu disebut subspecies V). *Salmonella enterica* terdiri dari lima subspecies. Subsies enterica (subsies I); subsies salamae (subsies II); subsies arizonae (subsies IIIa); subsies diarizonae (subsies IIIb); subsies houtenae (subsies IV) dan subsies indica (subsies VI) (89).

Menurut nomenklatur yang baru, *Salmonella* dibedakan menurut adanya keterkaitan DNA-nya, sehingga sekarang hanya terdapat dua spesies *Salmonella* yaitu *Salmonella bongori* dan *Salmobella enterica*. Nama semula *S.Typhi* menjadi *S. enterica serovar Typhi* yang disingkat *S.Typhi*. *Salmonella* yang menyerang manusia disebut sebagai strain dalam subsies I atau *S.enterica* (90).



Gambar 11. Klasifikasi *S.Typhi* (91)

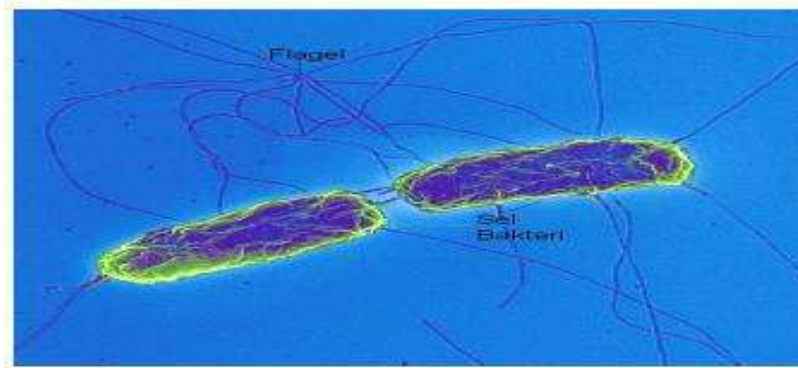
Sebagian besar penyakit pada manusia disebabkan oleh galur subspecies I. Sese kali infeksi pada manusia dapat disebabkan oleh subspecies IIIa dan IIIb atau subspecies lain yang biasanya ditemukan pada hewan berdarah-dingin, misalnya reptil. Nomenklatur klasifikasi yang mungkin akan diterima secara luas adalah sebagai berikut : *S.enterica* subspecies *enterica* serotype *Typhimurium*, yang dapat dipersingkat menjadi *Salmonella Typhimurium* dengan nama genus yang dituliskan dalam bentuk miring dan nama serotipe dituliskan dalam bentuk regular (89).

Terdapat lebih dari 2.500 serotipe salmonella, meliputi lebih dari 1.400 serotipe dalam grup I hibridisasi DNA yang dapat menginfeksi manusia. Empat serotype salmonella yang dapat menyebabkan demam enteric dapat diidentifikasi di laboratorium klinis melalui pemeriksaan serologis dan biokimia. Serotipe tersebut harus secara rutin diidentifikasi karena kepentingan klinisnya. Keempat serotype tersebut adalah *Salmonella* Paratyphi A (serogrup A), *Salmonella* Paratyphi B (serogrup B), *Salmonella* Cholerasius (serogrup C1) dan *Salmonella* Typhi (serogrup D). Lebih dari 1.400 salmonella lain yang diisolasi di laboratorium klinis dikelompokkan ke dalam serogrup berdasarkan antigen O yang dimilikinya menjadi serogrup A,B,C₁,C₂,D dan E (89).

2. Sifat Kuman

Salmonella memiliki panjang yang bervariasi. Sebagian besar isolat bersifat motil dengan flagella peritriks. *Salmonella* mudah tumbuh pada medium sederhana, tetapi hampir tidak pernah memfermentasi laktosa dan sukrosa. Bakteri ini membentuk asam dan terkadang membentuk gas dari glukosa dan manosa. Mereka umumnya menghasilkan H₂S. Organisme ini dapat bertahan hidup pada air yang beku untuk periode yang lama. *Salmonella* resisten terhadap zat kimia tertentu (misalnya *brilliant green*, natrium tetrahionat, natrium deoksikolat) yang menghambat bakteri enterik lain ; dengan demikian penambahan zat tersebut ke dalam medium bermanfaat untuk mengisolasi salmonell dari feses (89).

Etiologi demam tifoid diakibatkan oleh bakteri *Salmonella typhi* atau *Salmonella paratyphi* dari family Enterobacteriaceae. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif batang, tidak membentuk spora, motil, berkapsul dan berflagella (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup pada pH 6-8 pada suhu 15-41⁰C (suhu optimal 37 0C). Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4⁰C selama satu jam dan suhu 60⁰C selama 15 – 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan khlorinisasi. Terjadinya penularan *S. typhi* pada manusia yaitu secara jalur fekal- oral. Sebagian besar akibat kontaminasi makanan atau minuman yang tercemar (92).



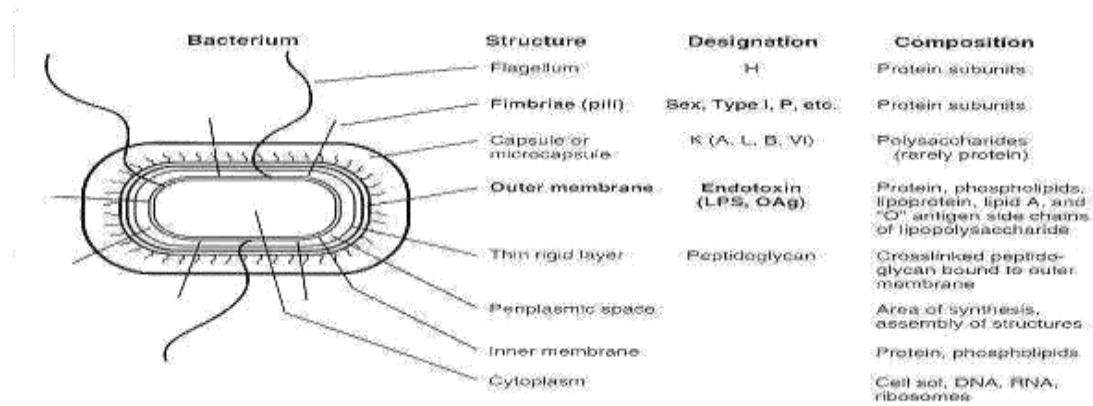
Gambar 12. Mikroskopis kuman Salmonella

3. Struktur Antigen

Struktur antigen *S. typhi* terdiri dari 3 macam antigen, yaitu:

- a) Antigen O (Antigenik somatik) merupakan bagian terpenting dalam menentukan virulensi kuman. Bagian ini mempunyai struktur kimia lipopolisakarida disebut endotoksin dan terletak pada lapisan luar dari tubuh kuman. Antigen ini bersifat hidofilik, tahan terhadap pemanasan suhu 100°C selama 2-5 jam dan tahan alkohol 96 % dan etanol 96% selama 4 jam pada suhu 37°C tetapi tidak tahan terhadap formaldehid.
- b) Antigen H (Antigen flagella) yang terletak pada flagella dan fimbria (pili) dari kuman. Flagel ini terdiri dari badan basal yang melekat pada sitoplasma dinding sel kuman, struktur kimia ini berupa protein yang tahan terhadap formaldehid tetapi tidak tahan terhadap panas dan alkohol pada suhu 60°C .. Selain itu flagel juga terdiri dari *the hook* dan filamen yang terdiri dari komponen protein polimerase yang disebut flagelin dengan BM 51-57 kDa yang dipakai dalam pemeriksaan asam nukleat kuman *S. typhi*
- c) Antigen Vi (permukaan) yang terletak pada kapsul (*envelope*) dari kuman yang dapat melindungi kuman terhadap fagositosis. Struktur kimia proteinnya dapat digunakan untuk mendeteksi adanya karier dan akan rusak jika diberi pemanasan selama 1 jam pada suhu 60°C dan pada pemberian asam serta fenol (93).

Ketiga komponen antigen tersebut di atas di dalam tubuh penderita akan menimbulkan pembentukan 3 macam antibodi yang lazim disebut agglutinin.



Gambar 13. Gambar kuman *S. typhi* secara skematik. (94)

Organisme dapat kehilangan antigen H dan menjadi nonmotil. Hilangnya antigen O berhubungan dengan perubahan bentuk koloni licin menjadi kasar. Antigen Vi dapat hilang secara parsial atau komplet. Antigen dapat diperoleh atau dihilangkan pada proses transduksi (89).

Salmonella diklasifikasikan berdasarkan Kauffman dan White berdasarkan struktur antigen somatik nya dan antigen flagellanya

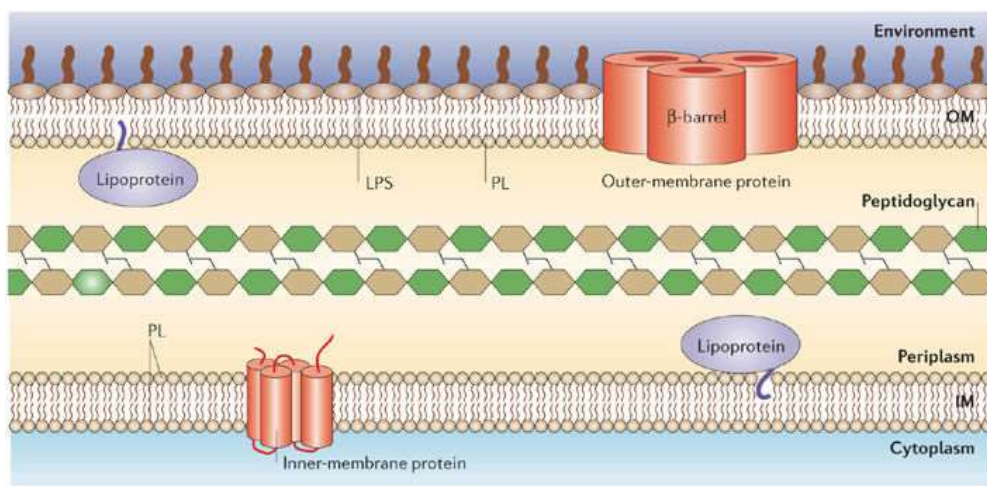
Tabel 4. Klasifikasi *Salmonella* menurut Kauffman-White (95)

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

Dinding sel *S. typhi* dibentuk 20% nya oleh lapisan lipoprotein. Sementara itu lapisan fosfolipid dan LPS membentuk 80% dinding sel kuman *S. typhi*. lipopolisakarida yang terdiri dari lipid A, oligosakarida, dan polisakarida yang merupakan bagian terpenting dan utama yang menentukan sifat antigenik dan aktivitas eksotoksin. Lipid A merupakan asam lemak jenuh yang menentukan aktivitas endotoksin dari LPS yang selanjutnya dapat mengakibatkan demam dan reaksi imunologis sang pejamu (96).

Outer Membran Protein (OMP) ialah dinding sel terluar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang berfungsi sebagai sawar untuk mengendalikan aktivitas masuknya cairan ke dalam membran sitoplasma serta berfungsi sebagai reseptor bakteriofag dan bakteriolisin (94).

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



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Microbiology

Gambar 14. Struktur dinding bakteri Sel Gram Negatif (97)

4. Demam Tifoid

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan *Salmonella typhi* (*S. typhi*). Penyakit ini masih sering dijumpai di negara berkembang yang terletak di subtropis dan daerah tropis seperti Indonesia (98). Menurut WHO, ada 3 macam klasifikasi demam tifoid dengan perbedaan gejala klinis (92):

1) Demam tifoid akut non komplikasi

Demam tifoid akut dikarakterisasi dengan adanya demam berkepanjangan abnormalis fungsi bowel (konstipasi pada pasien dewasa, dan diare pada anak-anak), sakit kepala, malaise, dan anoksia. Bentuk bronchitis biasa terjadi pada fase awal penyakit selama periode demam, sampai 25% penyakit menunjukkan adanya *rose spot* pada dada, abdomen dan punggung

2) Demam tifoid dengan komplikasi

Pada demam tifoid akut keadaan mungkin dapat berkembang menjadi komplikasi parah. Bergantung pada kualitas pengobatan dan keadaan kliniknya, hingga 10% pasien dapat mengalami komplikasi, mulai dari melena, perforasi, susu dan peningkatan ketidaknyamanan abdomen.

3) Keadaan karier

Keadaan karier tifoid terjadi pada 1- 5% pasien, tergantung umur pasien. Karier tifoid bersifat kronis dalam hal sekresi *Salmonella typhi* di feses.

Perjalanan penyakit oleh bakteri *S. Typhi* melalui beberapa proses, diawali dengan masuknya kuman melalui makanan dan minuman yang tercemar melalui jalur oral-fekal. Yang kemudian tubuh akan melakukan mekanisme pertahanan melalui beberapa proses respon imun baik lokal maupun sistemik, spesifik dan non-spesifik serta humoral dan seluler (93).

S. Typhi yang masuk ke saluran cerna tidak selalu akan menyebabkan infeksi, karena untuk menimbulkan infeksi *S. Typhi* harus dapat mencapai usus halus. Keasaman lambung ($\text{pH} \leq 3,5$) menjadi salah satu faktor penting yang menghalangi *S. Typhi* mencapai usus halus. Namun sebagian besar kuman *S. Typhi* dapat bertahan karena memiliki gen ATR (*acid tolerance response*). *Achlorhydria* akibat penuaan, gastrektomi, pompa proton inhibitor, pengobatan histamin antagonis reseptor H₂, atau pemberian antacid dapat menurunkan dosis infeksi yang mempermudah kuman untuk lolos menuju usus halus (94).

Setelah masuk ke saluran cerna dan mencapai usus halus, *S. typhi* akan menemui dua mekanisme non spesifik yaitu motilitas dan flora normal usus berupa bakteri-bakteri anaerob. Motilitas usus bersifat fisik berupa kekuatan peristaltik usus untuk menghanyutkan kuman keluar. Di usus halus kuman akan menembus mukosa usus diperantarai *microbial binding* terhadap epitel menghancurkan *Microfold cells (M cells)* sehingga sel-sel epitel mengalami deskuamasi, menembus

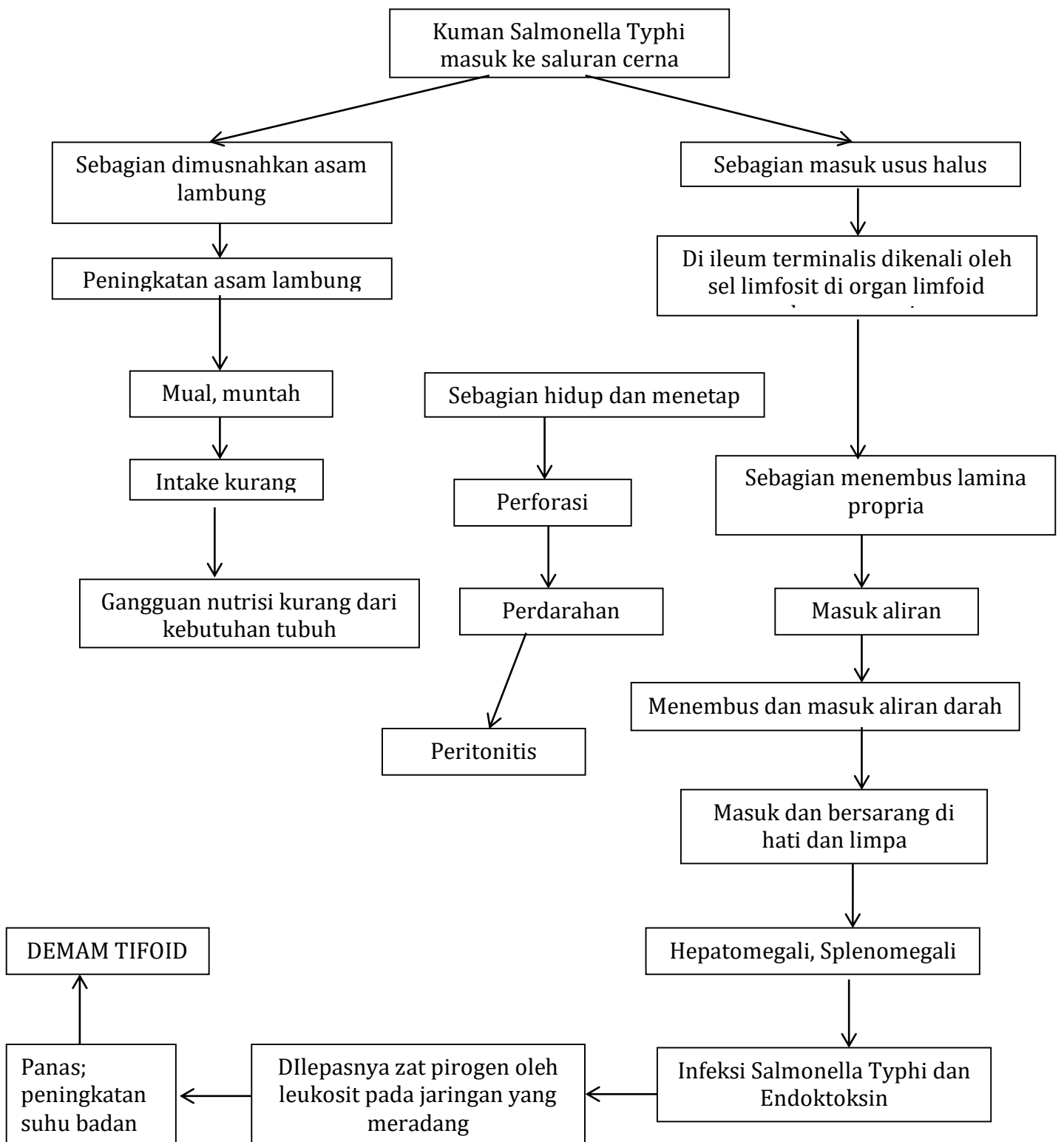
epitel mukosa usus, masuk dalam lamina propria, menetap dan berkembang biak. Kuman akan berkembang biak dalam sel mononuklear sebelum menyebar ke dalam aliran darah (99).

Di dalam sel fagosit mononuklear, kuman masuk menginfeksi *Peyer's patches*, yaitu jaringan limfoid yang terdapat di ileum terminal dan bermultiplikasi, kemudian kuman menembus kelenjar limfoid intestinal dan duktus torasikus masuk ke dalam aliran darah sistemik. Setelah 24-72 jam terjadi bakteriemia primer namun jumlah kuman belum terlalu banyak maka gejala klinis belum tampak. Bakteriemia primer berakhir setelah kuman masuk ke dalam organ *retikuloendotelial system (RES)* di hati limpa, kelenjar getah bening mesenterium dan kelenjar limfoid intestinal untuk berkembang biak. Di organ ini kuman menjalani masa inkubasi selama 10-14 hari, dalam organ RES kuman berkembang pesat dan kembali masuk ke peredaran darah dan menimbulkan bakteriemia sekunder. Pada saat terjadi bakteriemia sekunder, dapat ditemukan gejala-gejala klinis dari demam tifoid (92,94).

Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat poten untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Sebagai reseptor, Komponen CD14 akan berikatan dengan LPS. Ikatan tersebut kemudian berikatan pula dengan kelompok molekul *Toll-like receptors (TLR)*. Aktivasi yang terjadi akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivasi reseptor sitokin : reseptor sitokin tipe I (untuk IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15) ; reseptor sitokin tipe II (untuk IFN- α , IFN- β , IL-10); reseptor TNF (untuk TNF, CD40L, Fas); reseptor superfamili immunoglobulin (IL-1, M-CSF). Laju infeksi demam tifoid sangat ditentukan oleh aktivitas aktivasi reseptor tersebut. Berbagai sitokin tersebut mengikuti sirkulasi sistemik, menginduksi produksi prostaglandin, memengaruhi stabilitas pusat termoregulasi berefek terhadap pengaturan suhu tubuh dan menyebabkan demam (94).

Sitokin tersebut pula yang menimbulkan dampak pada pusat nafsu makan menyebabkan nafsu makan menurun, memengaruhi ambang nyeri, sehingga timbul nyeri pada kepala, sendi, otot-otot, dan nyeri pada daerah saluran cerna. Sitokin memengaruhi perubahan pada *plaque peyeri*, inflamasi pada mukosa saluran cerna, menyebabkan motilitas saluran cerna terganggu, sehingga muncul keluhan mual, muntah, diare, nyeri abdomen, perdarahan, perforasi, sedangkan

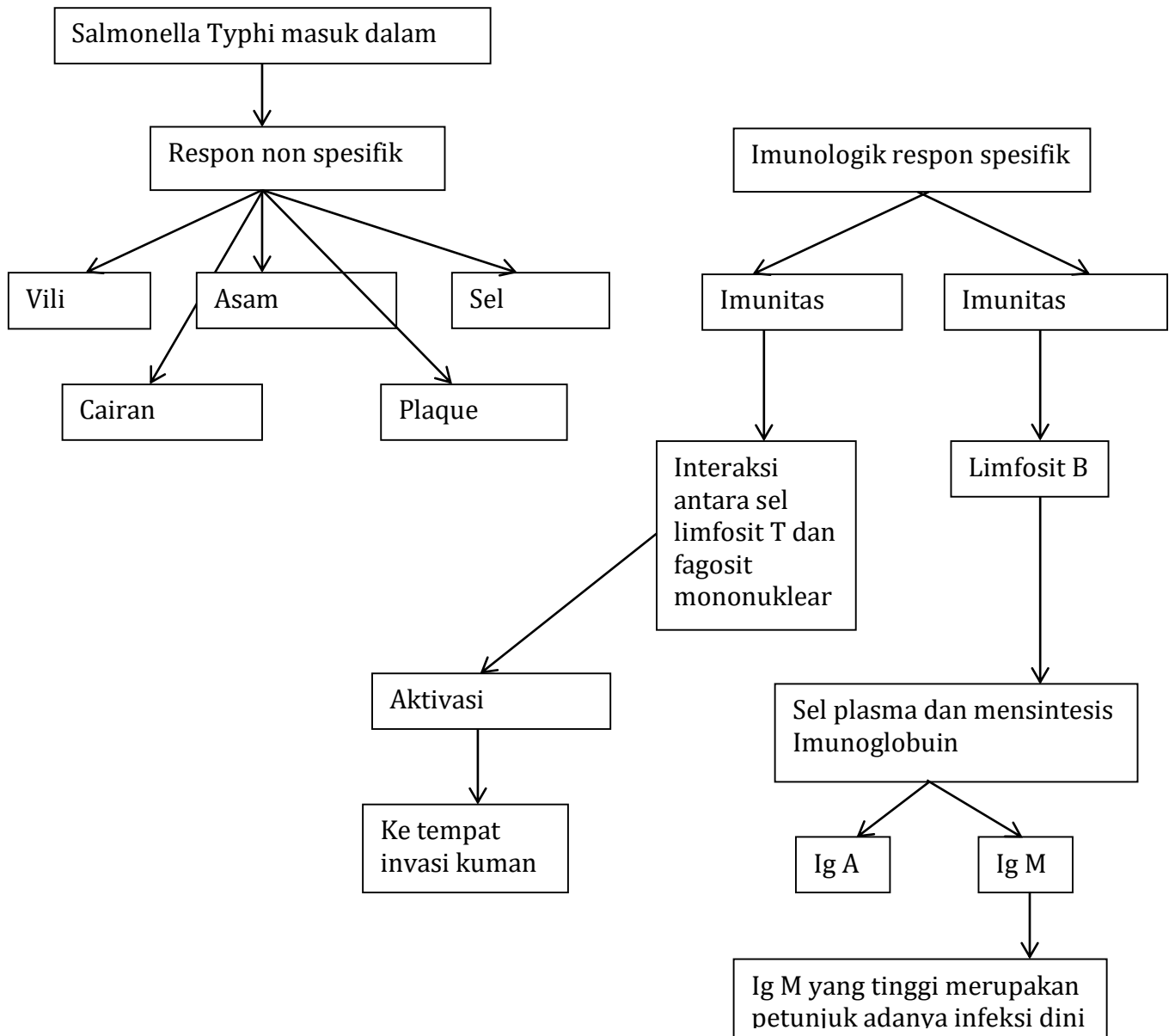
konstipasi terjadi pada tahap lanjut. Kondisi patologis akibat infeksi merangsang hiperaktivitas RES dan menimbulkan pembengkakan hati dan limpa (100).



Gambar 15.Skema Patofisiologi Infeksi Demam Tifoid

Mekanisme pertahanan imunologik spesifik biasanya menyangkut antibody, limfosit B dan T dan komplemen yang terbagi atas imunitas seluler dan imunitas humoral. Respon imunitas seluler sangat penting dalam penyembuhan penyakit demam tifoid, yang merupakan interaksi antara sel limfosit T dan fagosit mononuclear, untuk membunuh mikroorganisme yang tidak dapat diatasi oleh mekanisme mikrobisidal humoral dan fagosit polimorfonuklear. Adanya antigen kuman akan merangsang limfosit T untuk membentuk factor aktivasi makrofag, sehingga akan berkumpul pada tempat terjadinya invasi kuman.

Limfosit B sangat berperan dalam respon imunitas humoral. Akibat stimulasi antigen kuman, sel ini akan berubah menjadi sel plasma dan mensintesis immunoglobulin. Immunoglobulin G dan M adalah immunoglobulin yang dibentuk paling banyak. Peningkatan titer mulai terjadi mulai minggu pertama kemudian meningkat pada minggu-minggu berikutnya, sedangkan immunoglobulin A meningkat pada minggu kedua. Immunoglobulin M adalah immunoglobulin pertama yang dibentuk dalam respon imun. Karena itu kadar IgM yang tinggi merupakan petunjuk adanya infeksi dini. Adanya antibody humoral ini biasayna dipakai sebagai dasar berbagai pemeriksaan laboratorium, misalnya tes Widal dan pemeriksaan lainnya.



Gambar 16. Skema Patogenesis Infeksi Demam Tifoid

Pentingnya imunitas dalam penegakan diagnosis ditunjukkan dari kenaikan titer antibodi terhadap antigen *S. typhi*. Peran imunitas seluler yaitu dalam penyembuhan penyakit. Pada infeksi primer, respon humoral melalui sel limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan merangsang terbentuknya immunoglobulin (Ig). Pada infeksi akut, yang pertama terbentuk antibodi O (IgM) yang muncul pada hari ke 3-4 demam, kemudian disusul antibodi pada infeksi kronik yaitu antibodi flagela H (IgG)(101).

5. Terapi Demam Tifoid

1. Istirahat dan perawatan untuk mencegah komplikasi
2. Diet lunak dan terapi suportif (antipiretik, anti emetik, cairan yang adekuat)
3. Antibiotik dengan pilihan antara lain :
 - a. Kloramfenikol 4 x 500 mg.hari per oral/IV hingga 7 hari bebas demam
 - b. Tiamfenikol 4 x 500 mg
 - c. Cotrimoxazole 2 x 960 mg selama 2 minggu
 - d. Ampisilin dan amoksisilin 50-150 mg/KgBB selama 2 minggu
 - e. Seftriakson 3-4 gram dalam dekstrosa 100 cc selama ½ jam perinfus sekali sehari. Selama 3-5 hari
 - f. Golongan flourokuinolon:
 - Norfloxasin 2 x 400 mg/hari selama 14 hari
 - Siprpfloksasin 2 x 500 mg/hari selama 6 hari
 - Ofloksasin 2 x 400 mg/hari selama 7 hari
4. Kombinasi antibiotik diberikan pada tifoid toksik, peritonitis atau perforasi, syok septik
5. Pada kehamilan : ampisilin, amoksisilin, seftriakson (102)

Sejak diperkenalkan, kloramfenikol telah menjadi standar emas antimikroba untuk pengobatan. Tidak ada obat yang telah begitu baik menunjang reaksi klinis yang diharapkan, yang biasanya menjadi nyata dalam waktu 24-48 jam setelah dimulainya pengobatan dalam dosis yang sesuai (3 sampai 4 g/hari pada orang dewasa atau 50 sampai 75 mg/KgBB per hari pada anak yang lebih muda). Obat diberikan per os selama 2 minggu, dan dosis dapat dikurangi sampai 2 g/hari atau 30 mg/Kg per hari jika pasien tidak demam, yang biasanya terjadi setelah hari kelima pengobatan. Walaupun demikian, karena spektrum anemia aplastic yang terkait kloramfenikol, obat ini tidak banyak digunakan. Regimen oral efektif lainnya adalah amoksisilin (4 sampai 6 g/hari dalam empat dosis terbagi pada orang dewasa atau 100 mg/Kg per hari pada anak), trimetropim-sulfametoksazol (640 dan 3200 mg, berurutan, dalam dua dosis harian terbagi pada orang dewasa atau 185 mg/m² luas permukaan tubuh perhari dari komponen trimethoprim pada anak-anak), atau 4-flourokuinolon seperti siprofloksasin atau ofloksasin pada individu yang berusia lebih dari 17 tahun (103).

Berbagai obat intravena juga efektif, dan baik kloramfenikol ataupun trimethoprim-sulfametoksazol dapat diberikan secara intravena pada individu yang tidak mampu menelan obat per os. Antimikroba parenteral efektif lainnya adalah ampicilin dosis tinggi, sefotaksim, aztreonam dan 4-flourokuinolon. Walaupun demikian, tidak ada satupun yang aksinya begitu cepat atau begitu efektifnya dibandingkan dengan seftriakson, yang dapat menandingi atau lebih baik daripada kloramfenikol dalam kecepatan penurunan panas. Sejak itu, rekomendasi awal pemberian 7 hari tidak diturunkan menjadi 3 hari, 3-4 g sekali sehari pada orang dewasa atau 80 mg/Kg sekali sehari, selama 5 hari pada anak, tanpa kehilangan daya guna (efikasi) (103).

Prevalensi *S. Typhi* yang resisten terhadap obat oral garis pertahanan pertama telah meningkat pada negara sedang berkembang, karena kemahiran plasmid menyadkan β -laktamase yang tidak aktif dan enzim kloramfenikol asetil transferase. Di daerah dengan resistensi banyak obat ini merupakan masalah, seftriakson atau 4-flourokuinolon sebaiknya digunakan pada permulaan untuk orang dewasa yang berusia lebih dari 17 tahun dengan seftriakson sebagai pilihan terbaik untuk anak-anak, sekurang-kurangnya sampai kuinolon baru dibuktikan aman untuk anak-anak yang lebih muda. Biaya seftriakson yang lebih mahal sedikit menutupi kerugian karena kemanjuran jangka pendek dan pemberian dosis satu kali sehari secara ekonomis (103).

Penggunaan awal antimikroba yang efektif berhubungan dengan angka kekambuhan yang relative tinggi; angka kekambuhan 20 persen dapat diharapkan, dibandingkan dengan 5 sampai 10 persen pada pasien yang tidak diterapi. Hal ini agaknya karena terapi yang cepat menghambat perkembangan respon imun yang memadai. Kekambuhan biasanya lebih ringan daripada serangan awal dan akan beraksi terhadap antimikroba yang sama yang digunakan secara dini (103).

F. TINJAUAN TENTANG IMUNITAS

Imunitas didefinisikan sebagai pertahanan terhadap penyakit, terutama penyakit infeksi. Kumpulan sel-sel, jaringan dan molekul-molekul yang berperan dalam pertahanan infeksi disebut sistem imun, sedangkan reaksi terkoordinasi sel-sel dan molekul tersebut dalam pertahanann terhadap infeksi, disebut sebagai respon imun. Imunologi adalah ilmu yang mempelajari sistem imun, termasuk respon terhadap mikroba pathogen, dan kerusakan jaringan serta peranannya pada penyakit (104).

1. Tinjauan Tentang Imunitas Alami

Imunitas alami atau imunitas *innate* adalah garis pertahanan pertama yang dipersiapkan untuk melindungi manusia dari serangan patogen dan membersihkan jaringan tubuh dari sel-sel mati dan produknya. Imunitas ini merupakan tahap awal yang penting dalam pertahanan inang terhadap infeksi. Imunitas alami menghambat invasi mikroba melalui pertahanan epitel, menghancurkan berbagai mikroba yang masuk ke dalam tubuh serta mengontrol bahkan eradikasi infeksi (104).

Fungsi imunitas *innate* :

- 1) Respon awal terhadap mikroba untuk mencegah, mengontrol dan menghilangkan infeksi pada manusia. Keberhasilan atau kegagalan imunitas *innate* sangat dipengaruhi oleh tingkat virulensi pathogen. Kegagalan terutama disebabkan oleh adanya kemampuan pathogen untuk menghindari dari respon imun, makanya diperlukan respon imun yang lebih kuat untuk mengatasi keadaan ini yaitu imunitas adaptif.
- 2) Memicu timbulnya imunitas adaptif terhadap pathogen dan mempengaruhi penampilan imunitas adaptif agar lebih optimal mengeliminasi pathogen sesuai tipe pathogen (intraseluler atau ekstraseluler). Tidak ada imunitas adaptif tanpa imunitas *innate*. Perangkat imunitas *innate* tetap dipakai selama imunitas adaptif berlangsung, tergantung pada kebutuhan sesuai tipe pathogen yang dilawan.
- 3) Imunitas *innate* bukan hanya merespon pathogen tetapi juga mengeliminasi sel-sel mati dan produknya, berperan sebagai cleaning service sehingga proses penyembuhan (repair) jaringan dapat berlangsung. Berbagai keadaan yang mengakibatkan kematian sel (mis. Hipoksia, trauma) tanpa kehadiran mikroba dapat memicu munculnya respon imunitas *innate* yang menyebabkan inflamasi steril (104).

Imunitas *innate* tampil dalam dua bentuk respon :

- 1) Respon inflamasi

Respon ini berupa pengerahan leukosit dan protein plasma yang beredar dalam darah ke jaringan yang terinfeksi untuk mengeliminasi pathogen atau jaringan yang mengalami kerusakan (tissue damages) untuk membersihkan jaringan bersangkutan. Inflamasi pada pelajaran patologi melibatkan vasodilatasi pembuluh darah dan permeabilitas kapiler yang meninggi sehingga banyak sel-sel imun yang dapat dikerahkan ke jaringan yang memerlukan.

2) Efek anti virus

Efek ini dicapai melalui dua cara yaitu pertama menghentikan aktivitas sel yang dimasuki virus agar tidak memfasilitasi replikasi virus dan kedua mengerahkan sel NK untuk membunuh sel terinfeksi virus agar virus tidak memiliki tempat hidup (*reservoir*) dalam tubuh manusia.

Pada pathogen telah ada penanda dalam bentuk molekul yang akan dikenal oleh pertahanan tubuh manusia sehingga kedatangan ini dapat diantisipasi oleh manusia. Karakteristik molekul penanda pada patogen yaitu :

1. Penanda itu hanya milik patogen, tidak ada pada sel manusia

Penanda ini hanya pada mikroba yang membahayakan (patogen) untuk manusia sehingga disebut *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs). PAMPs ini berbeda-beda tergantung jenis patogen (virus, bakteri gram negative, bakteri gram positif, jamur), tetapi satu jenis PAMPs dapat ditemukan pada jenis patogen yang berbeda.

2. Penanda itu sangat vital untuk kehidupan patogen

Penanda-penanda itu adalah molekul yang sangat vital untuk kehidupan patogen bersangkutan sehingga sepanjang zaman tidak bias berubah (mutasi) misalnya double-stranded RNA pada virus, LPS (lipopolisakarida) pada bakteri gram negatif, lipoteichoic acid pada bakteri gram positif, dan lain-lain.

Tabel 5. PAMPs dan DAMPs pada Imunitas Innate

PAMPs		Jenis Mikroba	DAMPs	
Asam nukleik	ssRNA	Virus	Stress-induced	HSPs
	dsRNA	Virus	proteins	
	CpG			
Protein	Pilin	Bakteri	Kristal	Monosodium urat
	Flagellin	Bakteri		
Cell wall lipids	LPS	Bakteri gram negatif	Protein nuklear	HMGB1
	Lipoteichoic acid	Bakteri gram positif		
Karbohidrat	Manna	Jamur, Bakteri		
	Dectin glucans	Jamur		

Imunitas innate dapat mengenal molekul endogenous yang diproduksi atau dilepas oleh sel yang rusak atau mati disebut *Damaged-Associated Molecular Patterns* (DAMPs). Kematian atau kerusakan sel dapat terjadi akibat infeksi atau sebab lain seperti racun kimia, trauma, terbakar, atau iskemik/hipoksia (*steril injury*) (104).

Reseptor pada sistem imun innate disandi oleh gen identic pada semua sel yang diturunkan. Pola pengenalan reseptor sistem imun alami didistribusikan secara non-klonal; yaitu reseptor yang sama diekspresikan pada semua sel dari tipe tertentu, seperti makrofag. Oleh karena itu banyak sel imun alami dapat mengenali dan memberi respon terhadap mikroba yang sama. Diperkirakan terdapat 100 tipe reseptor imun alami yang dapat mengenali sekitar 1000 PAMPs dan DAMPs (105).

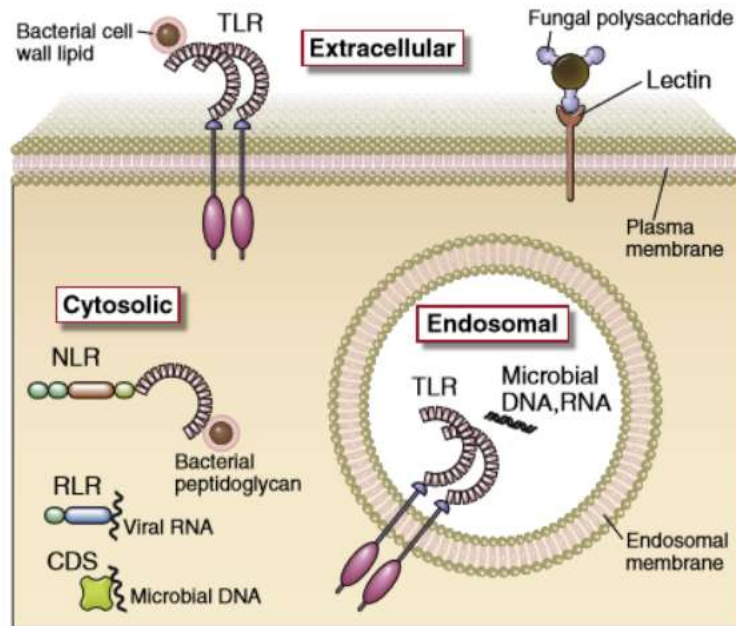
Ada dua perangkat pada imunitas *innate* untuk mengenal PAMPs atau DAMPs yaitu :

1) Pattern Recognition Receptors (PPRs)

Berbagai macam tipe reseptor seluler yang dapat mengikat PAMPs atau DAMPs disebut *Pattern Recognition Receptors* (PPRs) yang berada pada berbagai sel yang terlibat dalam imunitas innate seperti fagosit (makrofag, neutrophil dan sel dendritic) dan sel epitel yang membatasi tubuh dengan dunia luar. PPRs ini bisa berada pada membrane plasma, membrane endosomal dan dalam sitoplasma yang berarti imunitas innate bisa meresponi kehadiran mikroba di luar atau di dalam makrofag, netrofil dan sel dendritic (sebelum dan sesudah difagositosis). Patogen yang berbeda dapat memiliki PAMPs yang sama sehingga spesifisitas imunitas innate tidak spesifik terhadap antigen patogen tertentu seperti imunitas adaptif.

2) Soluble Recognition Molecules (SRMs)

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

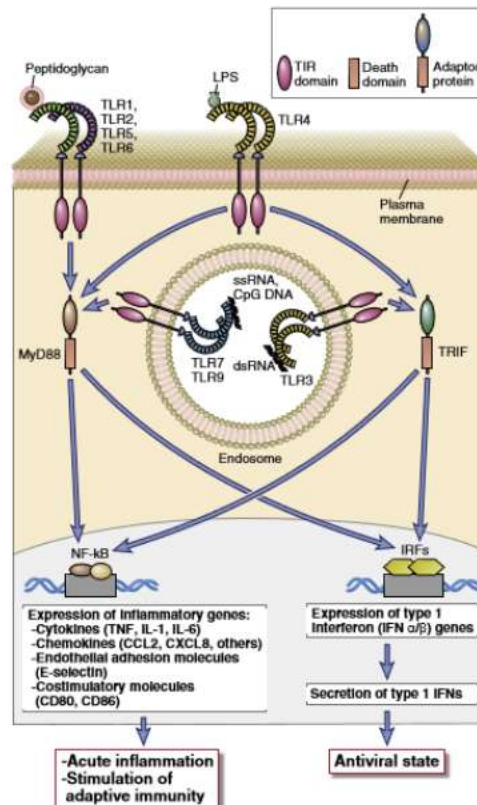


Gambar 17. Lokasi seluler dari reseptor sistem imun alami (105)

2. Toll-like Receptors

Toll-like receptors (TLRs) adalah homolog dengan suatu protein *Drosophila* yang disebut Toll. TLR yang berbeda spesifik untuk komponen mikroba yang berbeda. TLR-2 mengenali beberapa glikolipid dan peptidoglikan bakteri dan parasit, TLR-3, TLR-7, dan TLR-8 spesifik untuk asam nukleat virus (ssRNA dan dsRNA), TLR-4 spesifik untuk LPS bakteri (endotoksin), TLR-5 spesifik untuk protein flagellar bakteri yang disebut flagellin dan TLR-9 untuk mengenali unmethylated CpG DNA, yang lebih banyak pada genom bakteri daripada DNA mamalia. TLR spesifik untuk protein, lipid dan polisakarida mikroba terletak pada permukaan sel, dimana mereka mengenali produk ekstraseluler dari mikroba. TLR yang mengenali asam nukleat ada dalam endosome, di mana mikroba ditelan dan dicerna dan asam nukleat mereka dikeluarkan (105).

Sinyal yang dibangkitkan oleh penempelan TLRs mengaktifkan factor transkripsi yang merangsang ekspresi gen yang menyandi sitokin, enzim, dan protein lain yang terlibat dalam fungsi antimicrobial dari fagosit yang teraktivasi dan sel lainnya. Di antara factor transkripsi paling penting yang diaktivasi oleh sinyal TLR adalah NF- κ B (nuclear factor κ B), yang mempromosikan ekspresi berbagai sitokin dan molekul adhesi endotelial dan IRFs (interferon regulatory factors), yang merangsang produksi sitokin antivirus, interferon tipe I (105).



Gambar 18. Fungsi sinyal Toll-Like Receptor (105)

3. Stimulasi Respon Imun *Innate* melawan Mikroba

- 1) Jika mikroba hinggap di kulit maka ia akan terlempar oleh aliran udara dan keringat di permukaan kulit, atau dibunuh oleh peptide antimikroba (misalnya β -defensin) yang ada pada kulit.
- 2) Jika mikroba ingin masuk melalui saluran napas maka mikroba akan dihalangi oleh bulu hidung. Kalau berhasil masuk lebih dalam, akan bertemu musin yang akan membungkusnya, kemudian dikirim melalui eskalator silia epitel daluran napas, atau bertemu dengan antibakteri β -defensin dan cathelicidine yang akan membunuhnya, Kalau berhasil masuk lebih dalam lagi sampai alveolus, sudah menunggu makrofag alveolar yang akan menelannya.
- 3) Jika mikroba mencoba masuk melalui saluran cerna maka mikroba akan bertemu dengan saliva yang mengandung antibakteri lisozim, fosfolipase A dan histatin yang akan membunuhnya. Kalau berhasil masuk sampai lambung, mikroba akan mati oleh asam lambung. Turun lagi ke duodenum, akan bertemu berbagai antibakteri seperti enzim pencernaan, garam empedu, fatty acids, lysolipids dan cathelicidine. Jika masih berhasil turun lebih ke

bawah lagi (usus halus), akan ketemu cryptidins (α -defensin) yang mempunyai efek antibakteri dan antijamur.

- 4) Jika mikroba masuk melalui saluran urogenitalia, maka mikroba akan disambut oleh musin dan antibakteri β -defensin.
- 5) Jika mikroba masuk ke mata, akan bertemu air mata yang mengandung antibakteri (lisozim dan fosfolipase A) (104).

Kerusakan fisik epitel (misalnya luka) akan mempermudah mikroba masuk melewatinya, sesampainya di jaringan di bawah epitel (subepitelial) telah ditunggu oleh sel dendritic dermal, makrofag dan sel mast yang berjaga. Mikroba dikenal kedatangannya karena memiliki penanda PAMPs yang segera akan berikatan dengan reseptor (misalnya TLR) dari ketiga jenis penjaga subepitelial. Pada saat reseptor-reseptor itu menangkap ligannya (PAMPs) maka muncullah sinyal aktivasi yang akan mengaktifkan ketiga sel imunitas innate ini. Ketiga jenis sel tersebut kemudian melepas sejumlah sitokin proinflamasi seperti IL-1 (oleh sel dendritic dan makrofag), TNF α (oleh sel dendritic dan makrofag) dan histamine (oleh sel mast), untuk memicu respon inflamasi di jaringan subepitelial yang didatangi mikroba itu (104).

Sitokin TNF α dan IL-1 yang dilepas oleh makrofag bersama dengan histamine dan TNF α dari sel mast menuju ke endotel pembuluh darah untuk memicu peran endotel menghentikan neutrophil yang lewat. Endotel berespon dengan mengeluarkan molekul adhesi ke permukaannya (selektin dan ligan integrin) untuk menahan neutrophil. Selanjutnya neutrophil difasilitasi oleh endotel melalui peningkatan permeabilitas kapiler untuk keluar dari aliran darah menuju ke jaringan yang ada mikroba (104).

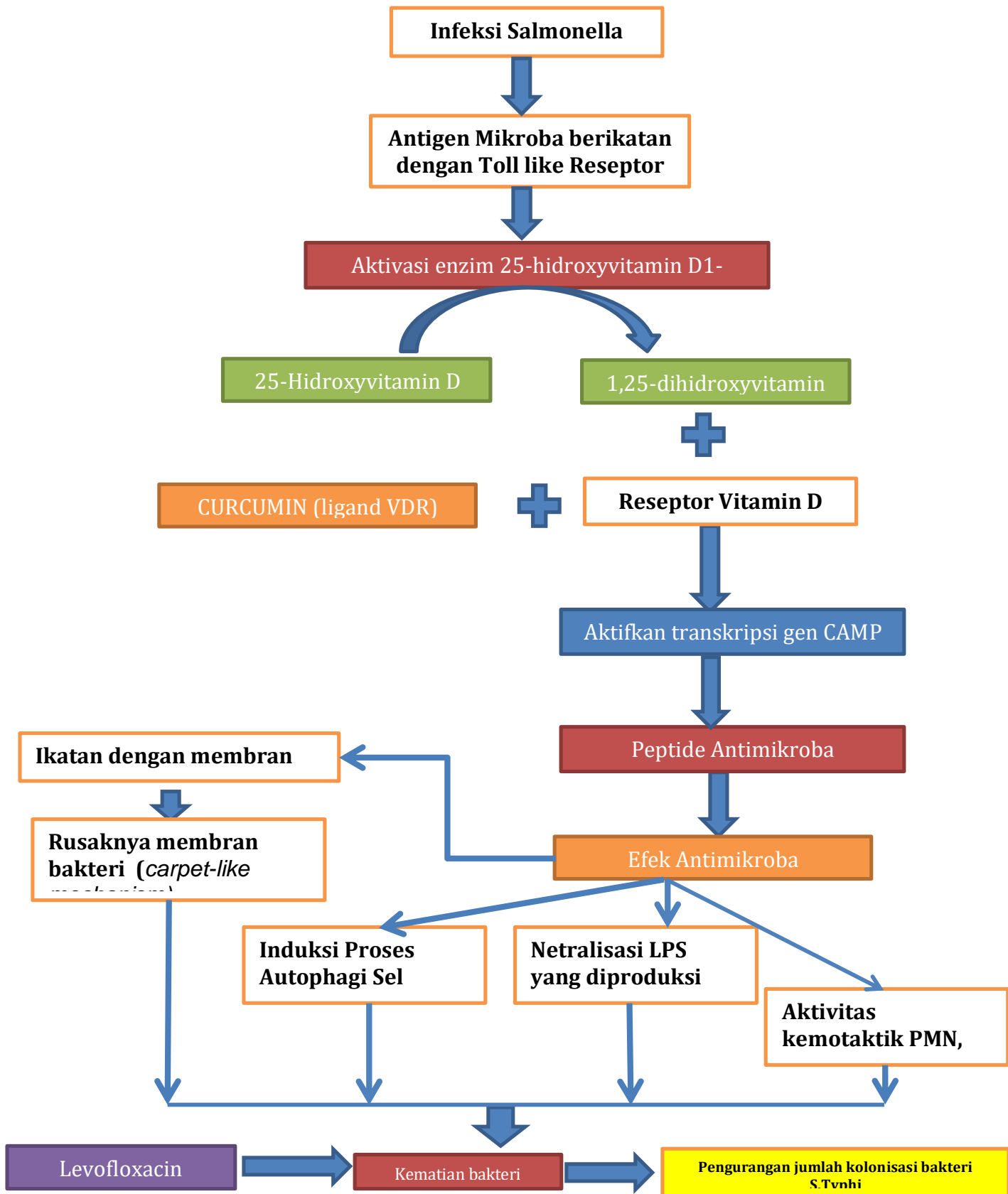
Mikroba yang lolos masuk ke jaringan dan ditangkap oleh fagosit (makrofag, neutrophil, dan sel dendritic) akan difagositosis sehingga mikroba berada dalam vakuol yang disebut fagosom (endosom). Fagosom ini segera menyatu dengan lisosom yang didalamnya ada enzim lisozim membentuk fagolisosom, maka bertemulah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

Sel dendritic yang menangkap mikroba dan menghancurkannya dalam fagolisosom, terutama bertugas memperkenalkan sejumlah antigen yang ada pada

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

Sebagian dari kuman atau bahan kuman sudah hancur akan hanyut terbawa aliran limfe menuju limfonodus. Disana sudah menunggu sel B naif dan sel dendritic folikular yang akan menangkapnya. Jika sel B naif sudah mengenal kehadiran antigen maka mulailah respon imunitas adaptif (imunitas humoral) (104).

G.KERANGKA TEORI



3) Kadar Vitamin D Reseptor (VDR)

Merupakan kadar serum VDR yang diperiksa dengan teknik Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Range normal 0.625 – 40 ng/ml, menggunakan VDR ELISA Kit (Sandwich ELISA).

Kriteria objektif :

Kadar VDR meningkat : > 40 ng / ml

Kadar VDR normal : 0.625 – 40 ng/ml

Kadar VDR menurun : < 0.625 ng/ml

4) Jumlah kolonisasi *Salmonella Typhi*

Merupakan spesimen bakteri yang diperoleh dari kultur jaringan ileum distal, limpa dan hepar setelah 7 hari intervensi. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan cara proporsional yaitu jumlah koloni (%) yang tumbuh pada medium perlakuan (jaringan tikus yang diintervensi ekstrak) dibagi dengan jumlah koloni pada kontrol dikalikan 100%.

J. HIPOTESIS

- 1) Curcumin dengan dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/BB dan vitamin D yang diberikan selama 5 hari dapat meningkatkan ekspresi gen mRNA CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) pada kelompok mencit balb/c yang telah diinduksi *Salmonella Typhi*.
- 2) Curcumin dengan dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/BB dan vitamin D yang diberikan selama 5 hari dapat meningkatkan kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada kelompok mencit yang telah diinduksi *Salmonella Typhi*.
- 3) Curcumin dengan dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/BB dan vitamin D yang diberikan selama 5 hari dapat menekan jumlah kolonisasi bakteri pada kelompok mencit balb/c yang telah diinduksi *Salmonella Typhi*.
- 4) Curcumin dengan dosis 200 mg/kg BB, curcumin 400 mg/BB dan vitamin D yang diberikan dapat menekan jumlah kolonisasi bakteri pada kelompok mencit balb/c yang telah diinduksi *Salmonella Typhi* hingga hari ke 30 setelah terinfeksi.

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. RANCANGAN PENELITIAN

Penelitian ini bersifat eksperimental murni (*True-Experimental Design*) menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dilakukan di laboratorium. Desain penelitian ini menggunakan rancangan secara acak dengan desain *Matching Pre test - Post test Comparison Group Design*. Kelompok akan dibagi menjadi kelompok kontrol dan kelompok intervensi, kemudian diberi *pre test* untuk mengetahui keadaan awal, adakah perbedaan antara kelompok intervensi dan kelompok kontrol. Hewan coba dibagi menjadi lima kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif, merupakan kelompok mencit yang terinduksi dengan *S.Typhi* tanpa diberi terapi, kelompok terapi curcumin dosis 200 mg/kg BB, kelompok terapi curcumin dosis 400 mg/kg BB, kelompok terapi curcumin dosis 200 mg/kg BB dan Vitamin D dan kelompok kontrol positif yang diterapi dengan Levofloxacin 750 mg. Setelah perlakuan, kedua kelompok diberi *post test*.

Desain penelitian dapat digambarkan sebagai berikut :

	Grup	Pres test	Variabel Terikat	Post test
(R)	Eksperimen	Y ₁	X ₁	Y ₂
(R)	Kontrol	Y ₁	X ₂	Y ₂

Rancangan penelitian ini merupakan rancangan penelitian eksperimental. Penelitian ini sudah memenuhi syarat eksperimental yang sudah menerapkan replikasi, randomisasi dan kontrol (positif dan negatif) seperti pada gambar diatas.

B. LOKASI DAN WAKTU PENELITIAN

1. Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Animal bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar. Pemeriksaan biomolekuler dilakukan di laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan September - Desember 2018

C. SUBJEK PENELITIAN

Subjek penelitian adalah mencit jantan strain balb/c yang diperoleh dari Laboratorium Hewan Fakultas Kedokteran Unhas dengan umur 10-14 minggu dan berat badan 30-40 gram. Untuk menghindari bias karena factor variasi umur dan berat badan maka pengelompokan sampel dilakukan secara acak. Uji coba penelitian ditentukan berdasarkan *Research guidelines for evaluating the savety and efficacy of herbal medicines* sesuai dengan standar WHO dengan jumlah mencit strain Balb/c pada setiap kelompok minimal 5 ekor (n=5) dan cadangan ditambah 1 ekor setiap kelompok sehingga jumlah mencit yang dibutuhkan adalah 30 ekor yang dibagi menjadi 5 kelompok.

Untuk mengantisipasi kekurangan sampel maka sebelum masa perlakuan mencit strain Balb/c disiapkan 40 ekor untuk dipelihara di laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Unhas dan diadaptasikan selama 7 hari agar kondisi fisik dan psikis mencit stabil dalam ruangan dengan sirkulasi udara yang cukup dan dipertahankan suhu ruangan pada kondisi standar (suhu $28\pm 2^{\circ}\text{C}$). Kelembapan udara 50 ± 10 10% dan lampu ruangan dengan siklus 12 jam menyala dan 12 jam dipadamkan. Mencit dikandangkan terbuat dari kawat berukuran 90 inci atau $96,8\text{ cm}^2$ dengan tinggi kandang 5 inci atau $12,7\text{ cm}^2$ kepadatan masing-masing kandang 1 ekor. Kandang dibersihkan setiap hari. Selama dalam pemeliharaan mencit diberikan makan diet standar alamiah dan diberi minum secukupnya secara ad libitum.

Kriteria Sampel

a. Kriteria Inklusi

1. Mencit Balb/c, jantan
2. Umur 10-14 minggu
3. Berat badan 30-40 gram
4. Tidak ada kecacatan

b. Kriteria Eksklusi

1. Mencit tidak mau makan
2. Sakit selama penelitian

c. Kriteria *Drop out*

Mencit mati sebelum pengambilan sampel jaringan dan sampel darah terakhir (akhir perlakuan)

D. BAHAN DAN PROTOKOL PENELITIAN

1. Bahan dan Peralatan

a) Bahan

Bahan yang dipakai adalah :

a. Curcumin for sintesis

Curcumin ini diperoleh dari Merck (Curcumin for synthesis, dengan rumus kimia $[4-(OH)-3-(CH_3O)C_6H_3CH=CHCO]_2CH_2$. Senyawa curcumin ini dikenal pula dengan 1,7-Bis (4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, turmeric yellow, diferuloylmethane.

b. Hewan uji, mencit strain Balb.c umur 10-14 minggu, berat 30-40 gram

c. Makanan hewan (pellet)

d. Bakteri *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$)

e. Vitamin D

Vitamin D ini berasal dari vitamin D (Wellness)

f. Obat levofloxacin

Obat antibiotik ini diperoleh di Apotek

b) Peralatan

a. Kandang hewan percobaan

b. Timbangan digital

c. Sonde lambung

d. Kanul mulut

e. Gelas ukur 100 cc dan pengaduk

f. Sarung tangan

g. Mikropipet dan spoit 1cc

h. Akuades

i. Alat untuk pengukuran PCR

2. Protokol Penelitian

2.1 Perhitungan Dosis Curcumin

Dosis curcumin yang digunakan adalah 200 mg dan 400 mg. Konversi dosis curcumin 70kgBB manusia untuk mencit sebagai berikut :

- Dosis I

$$0,0026 \times 200 \text{ mg} = 0,52 \text{ mg/Kg BB mencit}$$

$$\text{Dosis untuk satu ekor mencit} = 0,52 \times 1000/25 = 20,8 \text{ mg}$$

- Dosis II

$$0,0026 \times 400 \text{ mg} = 1,04 \text{ mg/Kg BB mencit}$$

$$\text{Dosis untuk satu ekor mencit} = 1,04 \times 1000/25 = 41,6 \text{ mg}$$

TABEL KONVERSI PERHITUNGAN DOSIS

(Laurence & Bacharach, 1964)

	Mencit 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64.1	124.2	387.9
Tikus 200 gr	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56.0
Marmot 400 gr	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	10.2	31.5
Kelinci 1,5 kg	0.04	0.25	0.44	1.0	1.08	2.4	4.5	14.2
Kucing 2 kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1.0	2.2	4.1	13.0
Kera 4 kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1.0	1.9	6.1
Anjing 12 kg	0.008	0.06	0.1	0.22	0.24	0.52	1.0	3.1
Manusia 70 kg	0.0026	0.018	0.031	0.07	0.076	0.16	0.32	1.0

2.2 Perhitungan Dosis Vitamin D

Konversi perhitungan dosis manusia (70 kg), dikonversikan kepada mencit (20 gr)
= 0,0026.

Dosis yang dianjurkan setiap harinya (RDA recommended) adalah 10 µg / hari
atau 0,01 mg/hari

$$0,0026 \times 0,01 \text{ mg} = 2,6 \cdot 10^{-5} \text{ mg/Kg BB mencit}$$

$$\text{Dosis untuk satu ekor mencit} = 2,6 \cdot 10^{-5} \times 1000/25 = 0,000104 \text{ mg}$$

2.3 Perlakuan Pada Subjek Penelitian

Mencit yang diperoleh dari laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Unhas. Uji Coba penelitian ditentukan berdasarkan *Research Guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines* sesuai dengan standar WHO dengan jumlah mencit strain Balb/c pada setiap kelompok minimal 5 ekor ($n=5$) dan cadangan ditambah 1 ekor setiap kelompok sehingga jumlah mencit yang dibutuhkan adalah 30 ekor yang dibagi dalam 5 kelompok. Percobaan dilakukan sesuai panduan penggunaan dan perawatan hewan laboatorium yang telah direvisi oleh Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Mencit Balb/c sebanyak 30 ekor dibagi menjadi 6 kelompok dengan random, masing-masing kelompok menjadi 5 ekor.

- a) Kelompok 1 : Kelompok kontrol negatif kelompok mencit yang terinduksi dengan *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$) tanpa diberi terapi
- b) Kelompok 2 : Kelompok intervensi diberikan curcumin dosis 200 mg/kg dan diinjeksi dengan bakteri *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$)
- c) Kelompok 3 : Kelompok intervensi diberikan curcumin dosis 400 mg/kg dan diinjeksi dengan bakteri *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$)
- d) Kelompok 4 : Kelompok intervensi diberikan curcumin dosis 200 mg/kg dan vitamin D, serta diinjeksi dengan bakteri *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$)
- e) Kelompok 5 : Kelompok kontrol positif diberikan terapi levofloxacin dengan dosis 1.95 mg per hari dan diinjeksikan bakteri *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$)

Pada hari pertama subyek diinjeksi dengan bakteri *Salmonella Typhi* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$). Pada hari ketiga, intervensi terhadap kelompok perlakuan dimulai selama 5 hari. Selama 5 hari tersebut, kelompok intervensi mendapatkan diet standar dan ekstrak kunyit dengan dosis 200 mg/kg, dosis 400 mg/kg, dosis 200 mg/kg dan vitamin D tiap hari, kelompok kontrol positif mendapatkan diet standar dengan cotrimoxazole dosis 1,95 mg per hari, sedangkan kelompok control negatif hanya mendapatkan diet standar. Setelah hari ke-5, dilakukan pengambilan sampel serum untuk memeriksa ekspresi mRNA gen CAMP, kadar Vitamin D reseptor dan pengambilan sampel cairan peritoneal untuk menghitung jumlah koloni bakteri *Salmonella Typhi*.

2.4 Ekstraksi RNA (Boom Method)

Sampel jaringan epitel usus 100 µl dicampurkan dengan 900 µl larutan buffer lisis L6 pada tube yang mempunyai penutup berupa sekrup, kemudian campuran ini disentrifus pada 12.000 rpm selama 10 menit. Sebanyak sedimen sampel yang telah dipekatkan ini dihomogenkan selama 30 menit. Sebelum ditambahkan suspensi diatom, campuran buffer L6 yang telah mengandung RNA hasil ekstraksi disentrifus selama 2-3 menit pada kecepatan 12.000 rpm, dengan tujuan agar RNA hasil ekstraksi mengendap di bagian dasar tabung., suspensi diatom harus selalu divortex dan diaduk dengan menggunakan gyratory shaker, kecepatan 100 rpm selama 10 menit. Campuran diatom dan buffer L6 divortex kembali menggunakan sentrifus dengan mikrosentrifus eppendorf pada kecepatan 12.000 rpm selama 15 detik. Supernatan yang terbentuk dari setiap vial dipisahkan dengan menggunakan pengisap yang terbuat dari pipet Pasteur plastic tanpa balon udara dan dihubungkan dengan vacuum pump, untuk mencegah hilangnya diatom dalam suspensi tadi, sekitar 10µl dari suspensi tersebut disisakan.

Supernatan sedimen mengering, TE buffer elusi ditambahkan sebanyak 60 ml, kemudian divortex secara merata sehingga sedimen dan suspensi tersebut dapat larut. Kemudian vial diinkubasi dalam oven pada suhu 56⁰C selama 10 menit. Kemudian campuran tersebut disentrifus dengan kecepatan 12.0000 rpm selama 30 detik. Supernatant diambil secara hati-hati sebanyak 40-50 µl dari supernatant dan dimasukkan ke dalam tabung vial baru. Hasil ekstraksi dapat disimpan pada suhu -20⁰C atau suhu -80⁰C (106).

2.5 Protokol Realtime PCR

Total mRNA diisolasi dari sampel jaringan epitel usus yang diperoleh dengan protocol menggunakan metode Boom. Kuantitatif real-time polymerase chain reaction menggunakan Brilliant II Sybr® dengan mengikuti instruksi produk. Primer untuk disintesis dengan menggunakan Macrogen (Korea).

Primer Mice yang diorder :

CAMP:

CAMP-Forward_Mice : 5'-GGCTGTGGCGGTCACTATC-3'

CAMP-Reverse_Mice : 5'-GTCTAGGGACTGCTGGTTGAA-3' [119]

Parameter siklus termal adalah 30 detik pada suhu 95⁰C dan 40 siklus denaturasi pada suhu 95⁰C selama 10 detik kemudian annealing 60⁰C selama 15 detik dan ekstensi

pada suhu 72^oC selama 40 detik. Semua pemeriksaan PCR diulang sebanyak 3 kali dan data dianalisis dengan system deteksi instrument Mx4000 menggunakan metode perbandingan ambang batas siklus. Kurva standar dibuat dan merupakan indikasi efisiensi amplifikasi yang baik (90-100%).

CARA KERJA REAL TIME PCR UNTUK MENENTUKAN PROFIL EKSPRESI mRNA gen CAMP

Proses gen spesifik oligonukleotida primer untuk GAPDH sebagai housekeeping gene (internal control). Mendeteksi gen mRNA CAMP dengan menggunakan primer spesifik forward dan reverse. Protokol PCR dilakukan dengan penggandaan DNA dengan siklus 94^oC selama 3 menit, siklus diulang 38 kali dengan 54^oC (30 detik). Mendeteksi gen GAPDH dengan menggunakan forward/sense primer : AGAGGGAAATCGTGCGTGAC. Protokol PCR dilakukan dengan penggandaan DNA dengan siklus 94^oC selama 10 menit, siklus diulang 32 kali dengan 54^oC (30 detik). Dan reverse/antisense primer : CAATAGTGATGACCTGGCCGT sesuai dengan protocol Tomomi Yajima.

QRT-PCR menggunakan Grean QRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrument Mx4000. Protokol disesuaikan menggunakan instrument dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrument pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR. Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam reaksi, diencerkan 1:500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya. Mengencerkan 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es. Mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 4^oC dengan catatan , menghindari siklus beku-cair yang berulang.

Reaksi percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Menyiapkan campuran reagen untuk reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah ini.

Campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 µl (termasuk RNA percobaan) 12,5 µl dari 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix ditambah x µl dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease –bebas PCR – tingkat H2 x µl primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 µl larutan pewarna refrens dari tahap 1 (opsional) serta 1,0 µl dari RT/Rnase campuran enzim blok dengan 50 µl total volume reaksi juga dapat digunakan. Reaksi dicampur secara

perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), kemudian didistribusikan campuran ke tabung reaksi percobaan dengan menambahkan x μl RNA percobaan pada setiap tabung reaksi. Reaksi disentrifuse dengan singka dan reaksi ditempatkan dalam instrument dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin Realtime PCR (CFX Connect system, Biorad laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA) [120]

2.6 Prosedur Analisis Kadar Vitamin D

Sampel serum disiapkan bersama seluruh reagen sesuai dengan VDR kit yang digunakan, kemudian diisi paknya semua reagen, dilusi standard dan sampel serum. Buka mikroplate strip dan buat layout dari sampel sesuai dengan jumlah sampel yang akan dimasukkan ke dalam well/sumur.

Tahap pertama dilakukan penambahan 100 μl cairan standar, Blank atau sampel ke dalam setiap sumur, tutup dengan plate sealer dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰C. aspirasi cairan dari setiap well/sumur dengan baik. Selanjutnya tambahkan 100 μl larutan *Biotinylated Detection Antibody* pada setiap sumur, tutup dengan plate sealer dan mengagitasi secara perlahan untuk memastikan pencampuran merata dan inkubasi selama 1 jam pada suhu 37⁰C.

Selanjutnya aspirasi cairan dari setiap sumur dan mencuci sebanyak 3 kali, cuci dengan menambahkan sekitar 350 μl 1x Wash Buffer dengan menggunakan botol semprot *multi-channel pipette*. Setelah mencuci terakhir, aspirasi untuk menghilangkan sisa Wash Buffer kemudian membalikkan plate dan tekan pada kertas penyerap yang bersih. Selanjutnya tambahkan 100 μl Streptavidin-HRP Complex pada setiap sumur, tutup dengan plate sealer dan inkubasi selama 30 menit pada suhu 37⁰C. Aspirasi cairan dari setiap sumur dan mencuci dengan Wash Buffer dengan menggunakan botol semprot *multi-channel pipette* sebanyak 5 kali kemudian membalikkan plate dan tekan pada kertas penyerap yang bersih. Tambahkan 90 μl larutan TMB susbtrate ke masing-masing sumur, tutup dengan plate sealer dan inkubasi selama 10-20 menit pada suhu 37⁰C. Setelah selesai diinkubasi reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μl cairan stop solution ke dalam setiap well/sumur dan dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) dengan panjang gelombang/wave length sebesar 450 nm dalam waktu kurang dari 30 menit.

2.7 Pemeriksaan Jumlah Koloni Bakteri

Langkah-langkah dalam pemeriksaan hitung koloni bakteri sebagai berikut

- 1) Semua alat dan bahan yang akan digunakan diletakkan di dalam Biosafety cabinet (BSC)
- 2) Siapkan media [*Hektoen Enteric Agar*](#) (HEA)
- 3) Jaringan distal ileum, limpa dan hepar mencit diambil dalam keadaan aseptik kemudian ditimbang masing-masing sebanyak 1 gram dan dihancurkan dengan mortar dan ditambahkan dengan normal saline sebanyak 0,5 ml aduk selama 2 menit dengan tujuan homogenisasi dan dekontaminasi.
- 4) Suspensi gerusan jaringan dimasukkan ke dalam tabung dan ditambahkan NaCl fisiologis sampai mencapai kekeruhan yang setara dengan 1,0 larutan Mc Farlan kemudian di vortex hingga homogeny dan didiamkan sampai mengendap.
- 5) Setelah mengendap dengan menggunakan pipet, diambil 0,1 ml suspense bagian atas dan dimasukkan ke dalam media cawan petri yang berisi media...
- 6) Semua media kultur diinkubasi dalam incubator CO₂ pada suhu 37⁰C (5%CO₂) selama 3 minggu, dan diamati pertumbuhan setiap minggu. Setelah 3 minggu dihitung jumlah koloni yang tumbuh dan dicatat.
- 7) Jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan cara proporsional yaitu jumlah koloni (%) yang tumbuh pada medium perlakuan (jaringan tikus yang diintervensi ekstrak) dibagi dengan jumlah koloni pada kontrol dikalikan 100%.

E. JENIS DAN CARA PENGUMPULAN DATA

Jenis Data	Cara Pengumpulan	Pemeriksaan
Ekspresi mRNA gen CAMP	Serum sampel	Real Time PCR
Kadar Vitamin D Reseptor (VDR)	Serum sampel	ELISA
Jumlah kolonisasi S.Typhii	Cairan peritoneal	Kultur

F. ANALISIS DATA

Analisis statistik untuk mengolah data yang diperoleh menggunakan bantuan komputer dengan analisis bivariat menggunakan SPSS versi 21. Analisis bivariat adalah analisis yang digunakan untuk mengetahui hubungan antara variabel independent dengan variabel dependent dengan menggunakan uji statistik. Hasil penelitian dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk*, untuk mengetahui kenormalan distribusi data. Kemudian dilakukan uji *Levene* untuk mengetahui varians data. Data yang berdistribusi normal dan homogen dilakukan uji parametrik. Untuk mengetahui perbedaan rerata pada dua kelompok data yang berpasangan, dilakukan uji T paired T test. Uji beda ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata koloni bakteri, kadar vitamin D Reseptor dan ekspresi gen mRNA CAMP antar kelompok, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30). Uji repeated anova juga dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata pada pada kelompok pasangan data dengan lebih dari 2 kali pengukuran. Uji ini memiliki asumsi bahwa data berdistribusi normal, data bersifat *continue* dan *sphericity*, kondisi dimana varians dari perbedaan antara semua grup terkait kombinasi (tingkat) adalah sama atau adanya homogenitas varians di antara-subjek ANOVA. Uji repeated ANOVA dilakukan untuk mengetahui perbedaan rerata kadar vitamin D Reseptor dan ekspresi gen mRNA CAMP pada masing-masing kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30). Untuk mengetahui asosiasi antar variabel, dilakukan uji korelasi Pearson. Uji ini untuk mengetahui hubungan jumlah koloni bakteri, kadar Vitamin D Reseptor dan ekspresi mRNA gen Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*.

G. ETIKA PENELITIAN

Etika penelitian dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin. Dalam pelaksanaan penelitian, peneliti harus membuat dan menyesuaikan protocol dengan standar yang berlaku secara alamiah dan etik penelitian kesehatan. Etika penelitian kesehatan secara umum tercantum dalam *World Medical Association*, yaitu:

- 1) Respect, menghormati hak dan martabat makhluk hidup, kebebasan memilih dan berkeinginan, serta bertanggung jawab terhadap dirinya termasuk didalamnya hewan coba.

- 2) Beneficiary, bermanfaat bagi manusia dan makhluk lain. Manfaat yang didapatkan harus lebih besar dibandingkan dengan resiko yang diterima
- 3) Justice, bersikap adil dalam memanfaatkan hewan percobaan. Contoh sikap yang tidak adil, antara lain: hewan disuntik/dibedah berulang untuk menghemat jumlah hewan, memakai obat *euthanasia* yang menimbulkan rasa nyeri karena harga yang lebih murah.

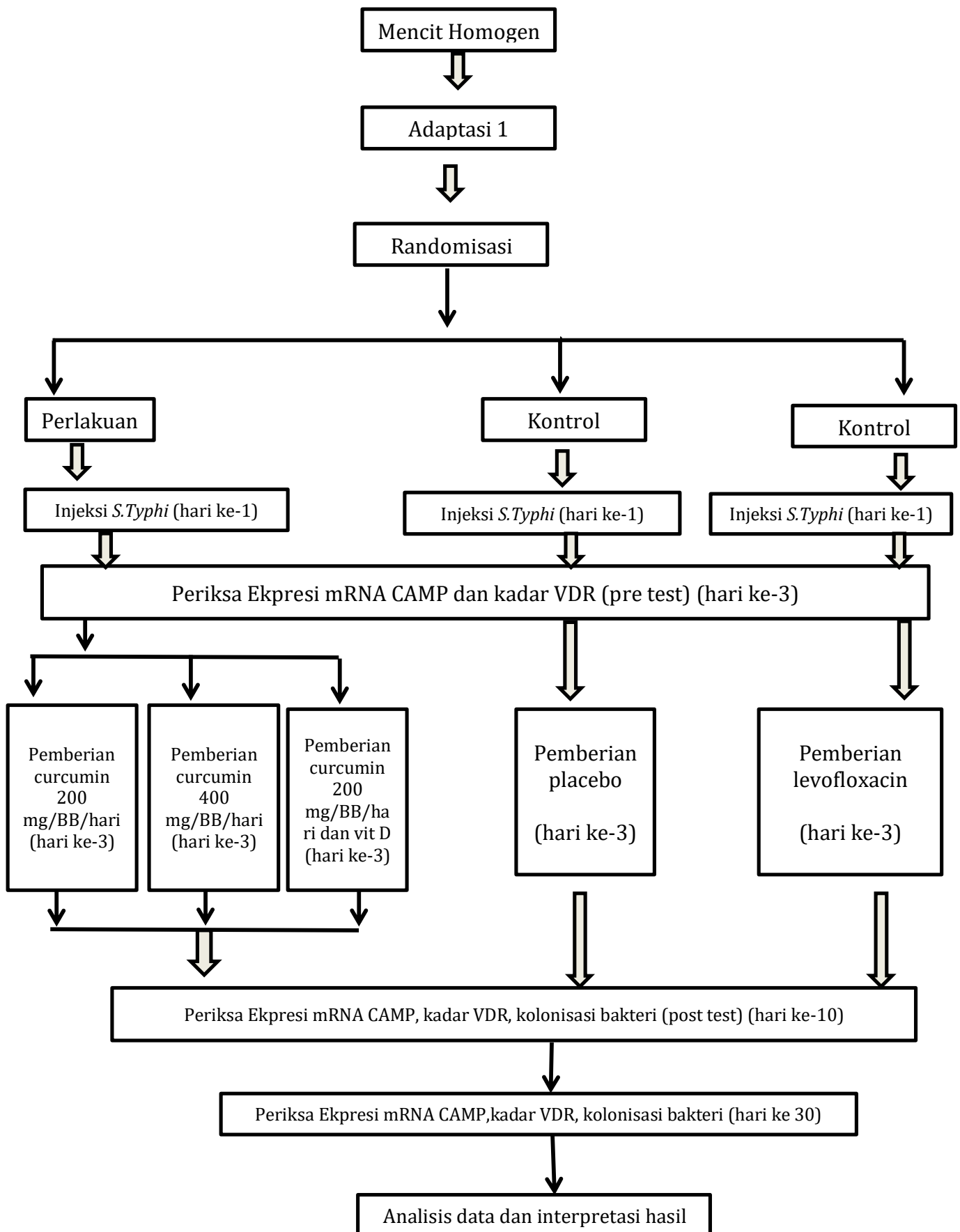
Dalam penelitian kesehatan yang memanfaatkan hewan coba, juga harus diterapkan prinsip 3 R dalam protocol penelitian, yaitu:

- 1) *Replacement* adalah keperluan memanfaatkan hewan percobaan sudah diperhitungkan dengan seksama, baik dari pengalaman terdahulu maupun literature untuk menjawab pertanyaan penelitian dan tidak dapat digantikan oleh makhluk hidup lain seperti sel atau biakan jaringan. *Replacement* terbagi menjadi dua bagian
 - a. *Relative* mengganti hewan percobaan dengan memakai organ/jaringan hewan dari rumah potong, hewan dari ordo lebih rendah.
 - b. Absolut mengganti hewan percobaan dengan kultur sel, jaringan, atau program komputer
- 2) *Reduction* adalah pemanfaatan hewan dalam penelitian sesedikit mungkin, tetapi tetap mendapatkan hasil yang optimal. Jumlah minimum biasa dihitung menggunakan rumus Freeder yaitu $(n-1)(t-1) \geq 15$, dimana n (jumlah hewan yang diperlukan) t (jumlah kelompok perlakuan). Kelemahan dari rumus itu adalah semakin sedikit jumlah kelompok penelitian, semakin banyak jumlah hewan yang diperlukan, serta sebaliknya.
- 3) *Refinement* adalah memperlakukan hewan percobaan secara manusiawi (*humane*), memelihara hewan dengan baik, tidak menyakiti hewan, serta meminimalisasi perlakuan yang menyakitkan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba sampai akhir penelitian. Pada dasarnya *Refinement* berarti membebaskan hewan coba dari beberapa kondisi, yaitu rasa lapar dan haus, bebas dari ketidaknyamanan, bebas dari nyeri dan penyakit, meminimalisir rasa nyeri saat melakukan invasive yaitu dengan menggunakan *analgesia* dan *anesthesia*, *euthanisa* dilakukan dengan metode yang manusiawi oleh orang yang terlatih untuk meminimalisasi atau bahkan

meniadakan penderitaan hewan coba. Hewan juga harus terhindar dari ketakutan dan jangka panjang.

Penelitian ini telah mendapat persetujuan komisi etik Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin dengan nomor 901/H4.8.4.5.31/PP36-KOMETIK/2018 pada tanggal 31 Oktober 2018.

H. ALUR PENELITIAN



Penjelasan Alur Penelitian

1. Persiapan hewan coba :
 - a. Seluruh mencit dikandangkan pada kondisi bebas patogen dan diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 1 minggu dengan pemberian makanan normal dan diberi siklus penerangan 12 jam gelap, 12 jam terang
 - b. Pembagian kelompok : Kelompok mencit yang mendapatkan curcumin, kelompok mencit yang mendapatkan curcumin dan vitamin D, kelompok mencit yang mendapatkan levofloxacin dan kelompok kontrol. Kelompok tersebut diinfeksi dengan bakteri *Salmonella Typhi* strain *thy1* ($3 \text{ ml} \times 10^3 \text{ ml/CFU}$)
2. Tahap pertama :
 - a. Kelompok mencit yang diberi Curcumin : Curcumin diberikan secara oral dalam tiga dosis berbeda untuk kelompok yang berbeda dan diemulsi dengan karboksimetil selulosa. Terapi dengan curcumin dimulai tiga hari setelah infeksi. Dosis yang digunakan sebagai berikut: 200 mg per berat badan per hari, 400mg per berat badan per hari, dan 200 mg per berat badan per hari serta vitamin D. Curcumin emulsi diberikan secara oral menggunakan nasogastrictube selama lima hari.
 - b. Kelompok kontrol positif atau kelompok mencit yang diberi Levofloxacin : Dosis hewan dengan menggunakan faktor konversi hewani manusia (0,0026). Dosis yang digunakan sama untuk semua kelompok terapeutik (1.95 mg per hari). Levofloxacin diberikan secara oral menggunakan nasogastrictube setiap dua puluh empat jam selama lima hari, sesuai dengan kelompok perlakuan lainnya.
 - c. Kelompok control negatif: kelompok mencit terinfeksi *Salmonella Typhi* dan yang mendapatkan placebo (aquades)
3. Tahap kedua : Pengambilan sampel cairan peritoneal.

Mencit difiksasi dalam posisi telentang, bagian perut dibersihkan dengan alkohol 70% dan disuntikkan NaCl sebanyak 0.8 - 1 mL ke rongga peritoneum. Kemudian didiamkan selama 1 menit sambil digoyang-goyang secara perlahan. Cairan peritoneal dikeluarkan dari rongga peritoneum dengan posisi mencit telentang, kemudian cairan diaspirasi dengan spoit sebanyak 0.5 mL. Pengambilan cairan peritoneal dilakukan sebanyak tiga kali, yaitu saat hari ketiga setelah mencit diinduksi kuman *Salmonella typhi*, hari terakhir pemberian intervensi dan 3 minggu setelah pemberian intervensi.

4. Tahap ketiga :
 - a. Dilakukan pemeriksaan ekspresi mRNA gen Cathelicidin dari dari serum sampel dengan Real Time PCR
 - b. Dilakukan pemeriksaan kadar Vitamin D reseptor (VDR) dari serum sampel dengan teknik ELISA
 - c. Dilakukan kultur untuk mengetahui jumlah kolonisasi bakteri Salmonella Typhi pada cairan peritoneal sampel
5. Dilakukan analisa statistik untuk data yang diperoleh dengan menggunakan SPSS

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

A. HASIL

Penelitian ini bertujuan untuk menganalisa efek curcumin pada jumlah koloni bakteri *Salmonella Typhi*, kadar vitamin D reseptor (VDR), dan ekspresi mRNA gen Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) pada mencit yang diinduksi *Salmonella Typhi* intraperitoneal. Penelitian ini dilakukan dari mulai preliminari sampai dengan tahapan penelitian, mulai september hingga Desember 2018. Pengambilan darah dilakukan pada hari 0 (baseline), sebelum perlakuan (hari ke-3), setelah perlakuan (hari ke-10) dan hari ke-30. Dua puluh lima ekor mencit balb/c yang memenuhi kriteria sampel dibagi dalam lima kelompok, masing-masing 5 ekor per kelompok intervensi. Hasil analisa hasil penelitian ditampilkan dengan sistematika sebagai berikut:

1. Efek pemberian curcumin terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

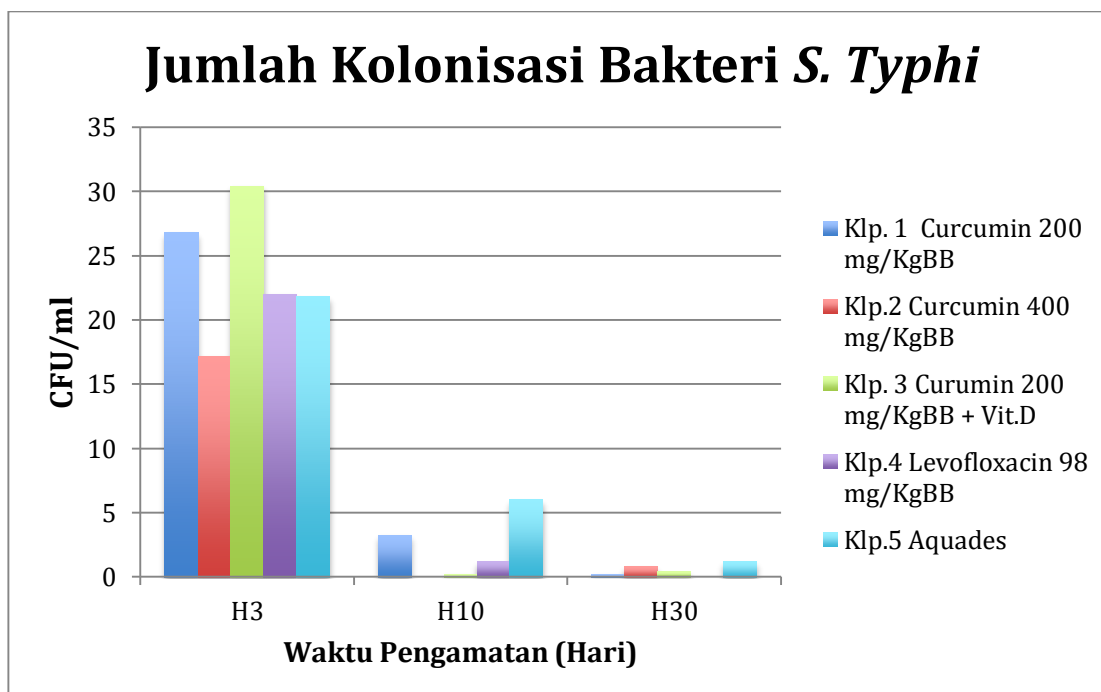
Untuk mengetahui efek curcumin terhadap jumlah kolonisasi bakteri *S.Typhi* digunakan paired T test untuk menilai dinamika perubahan jumlah koloni sehubungan perubahan waktu pengamatan pada masing-masing kelompok. Rangkuman hasilnya dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Perbedaan dinamika perhitungan koloni bakteri antar kelompok sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Kelompok	Perhitungan Kolonisasi Bakteri <i>S.Typhi</i> (CFU/ml)					
	H3	H10	<i>p</i> <i>value</i>	H10	H30	<i>p</i> <i>value</i>
CM200	26.80±3.70	3.20±3.11	0.001	3.20±3.11	0.20±0.48	0.113
CM400	17.20±2.28	0.00±0.00	0.000	0.00±0.00	0.80±1.30	0.242
CM200+Vit.D	30.40±7.40	0.20±0.447	0.001	0.20±0.447	0.40±0.548	0.374
Positive control	22.00±6.16	1.20±1.79	0.003	1.20±1.79	0.00±0.00	0.208
Negative control	21.80±6.419	6.00±2.282	0.013	6.00±2.282	1.20±0.583	0.014

*Values are mean±SD n=5, p-value < 0.05 is considered significant. CM ; curcumin. Positive control ; levofloxacin. Negative control ; aquades.

Pada tabel 1 dapat terlihat terdapat perbedaan rerata jumlah koloni bakteri yang bermakna pada seluruh kelompok antara sebelum intervensi dengan setelah intervensi. Pada kelompok yang diintervensi dengan curcumin 200 mg/kg BB, mengalami penurunan rerata jumlah koloni sebesar 23.60 CFU/ml (*p value* 0.001). Penurunan rerata jumlah koloni juga terdapat pada kelompok yang diintervensi dengan curcumin 400 mg/kg BB sebesar 17.20 CFU/ml (*p value* 0.000). Pada kelompok dengan pemberian curcumin 200 mg/kg BB dan vitamin D, juga mengalami perbedaan rerata jumlah koloni bakteri, yang ditandai penurunan rerata jumlah koloni sebesar 30.20 CFU/ml (*p value* 0.001). Namun pada hari pengamatan ke-30, kelompok curcumin tidak memberikan perbedaan rerata jumlah koloni yang bermakna.



Gambar 1. Dinamika perubahan jumlah koloni bakteri antar kelompok sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30).

Gambar 1 menunjukkan bahwa pada semua kelompok terjadi penurunan jumlah koloni bakteri setelah dilakukan intervensi selama 5 hari. Pada hari pengamatan ke-30, setiap kelompok juga menunjukkan jumlah koloni bakteri yang tetap rendah.

2. Efek pemberian curcumin terhadap kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Untuk mengetahui efek curcumin terhadap kadar serum Vitamin D Reseptor (VDR) digunakan paired T test untuk menilai dinamika perubahan kadar VDR sehubungan perubahan waktu pengamatan pada masing-masing kelompok. Rangkuman hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.1.

Tabel 2.1. Perbedaan dinamika kadar Vitamin D Reseptor antar kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Kelompok	Kadar Vitamin D Reseptor (VDR) (ng/ml)								
	Baseline	H3	<i>p</i> <i>value</i>	H3	H10	<i>p</i> <i>value</i>	H10	H30	<i>p</i> <i>value</i>
CM200	4.31±1.78	8.34±1.79	0.016	8.34±1.79	9.22±2.04	0.018	9.22±2.04	9.88±1.99	0.023
CM400	4.69±2.16	7.25±1.01	0.020	7.25±1.01	10.95±1.77	0.002	10.95±1.77	12.09±1.66	0.003
CM200+Vit.D	2.77±1.80	5.83±1.70	0.005	5.83±1.70	16.09±1.54	0.001	16.09±1.54	17.23±1.68	0.062
Positive control	2.94±1.37	6.55±1.44	0.023	6.55±1.44	15.25±1.47	0.002	15.25±1.47	16.63±1.48	0.002
Negative control	4.70±1.89	7.68±1.94	0.000	7.68±1.92	7.53±1.60	0.815	7.53±1.60	9.25±1.55	0.033

* Paired T-Test, with values are mean±SD n=5, p-value < 0.05 is considered significant. CM ; curcumin. Positive control ; levofloxacin. Negative control ; aquades.

Pada tabel 2.1 dapat terlihat terdapat perbedaan kadar serum Vitamin D Reseptor yang bermakna pada seluruh kelompok antara sebelum intervensi, setelah intervensi dan pada pengamatan hari ke-30.

Untuk mengetahui efek curcumin terhadap perbedaan kadar vitamin D pada masing-masing kelompok dari waktu ke waktu digunakan uji Repeated ANOVA. Rangkuman hasilnya dapat dilihat pada tabel 2.2.

Tabel 2.2 Perubahan rerata kadar vitamin D Reseptor pada masing-masing kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Kadar Vitamin D Reseptor (VDR) (ng/ml)					
Kelompok	Baseline	H3	H10	H30	<i>p value</i> *
CM200	4.31±1.78	8.34±1.79	9.22±2.04	9.88±1.99	0.010
CM400	4.69±2.16	7.25±1.01	10.95±1.77	12.09±1.66	0.000
CM200+Vit.D	2.77±1.80	5.83±1.70	16.09±1.54	17.23±1.68	0.000
Positive control	2.94±1.37	6.55±1.44	15.25±1.47	16.63±1.48	0.000
Negative control	4.70±1.89	7.68±1.94	7.53±1.60	9.25±1.55	0.000

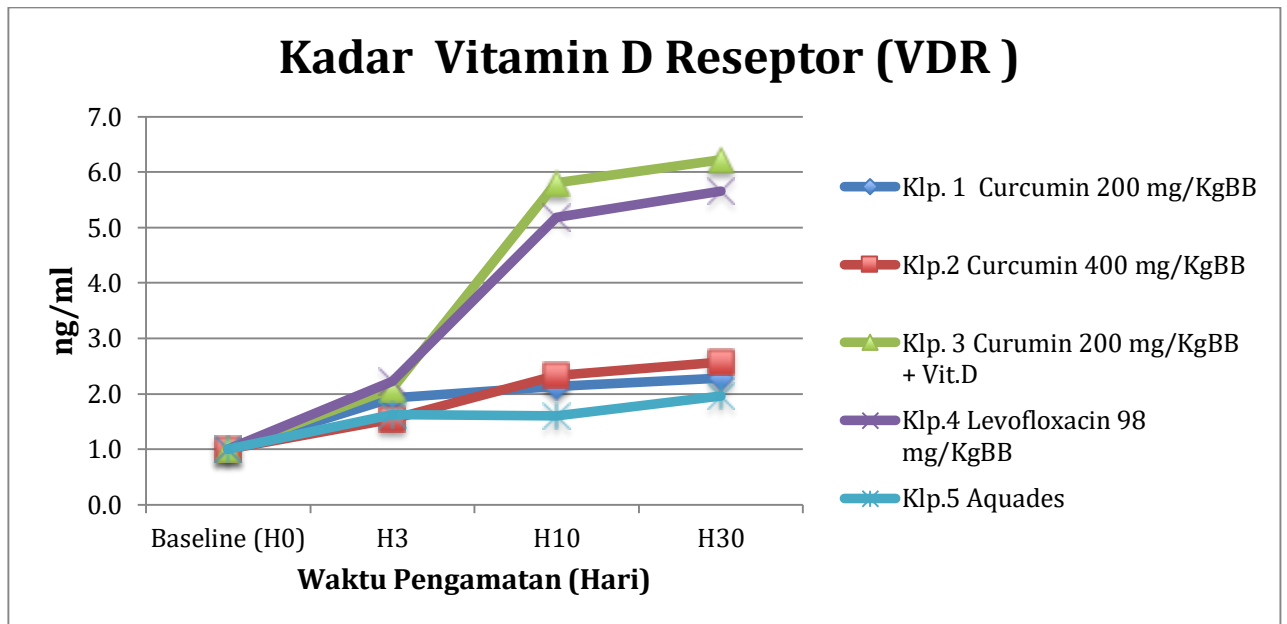
*Repeated ANOVA Test, with values are mean±SD n=5, p-value < 0.05 is considered significant. CM ; curcumin. Positive control ; levofloxacin. Negative control ; aquades.

Tabel 2.3 Pebandingan persentase kecepatan peningkatan rerata kadar vitamin D Reseptor pada kelompok pengamatan sebelum intervensi (H3), setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Kelompok	Kadar Vitamin D Reseptor (VDR) (ng/ml)	
	(H10 – H3)*	(H30 – H10)**
CM200	10.55 %	7.15%
CM400	51.03%	10.41%
CM200+Vit.D	175.9%	7.08 %
Positive control	132.82 %	9.04 %
Negative control	-1.95 %	22.84 %

*Kecepatan peningkatan rerata = mean (H10 – H3)100 / mean H3

**Kecepatan peningkatan rerata = mean (H30 – H10)100 / mean H10



Gambar 2. Dinamika perubahan kadar Vitamin D Reseptor (VDR) berdasarkan kelompok selama waktu pengamatan.

Gambar menunjukkan dinamika peningkatan kadar VDR paling tinggi pada kelompok yang diberikan curcumin 200 mg/kgBB dan vitamin D, dan lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positive yang diberikan Levofloxacin. Sedangkan peningkatan kadar VDR yang paling rendah terlihat pada kelompok kontrol negative yang diberikan aquades. Kelompok yang diberi curcumin dosis 400 mg/kg BB dan 200 mg/kg BB juga menunjukkan peningkatan kadar VDR, meskipun tidak tinggi, namun bermakna.

3. Efek pemberian curcumin terhadap perubahan trend ekspresi mRNA gen Cathelidicin Antimicrobial Peptide (CAMP) pada mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Untuk mengetahui efek curcumin terhadap ekspresi mRNA gen CAMP digunakan paired T test untuk menilai dinamika perubahan ekspresi mRNA sehubungan perubahan waktu pengamatan pada masing-masing kelompok. Rangkuman hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.

Tabel 3.1 Perbedaan dinamika ekspresi mRNA gen CAMP antar kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Kelompok	Ekspresi mRNA gen CAMP (fold change)								
	Baseline	H3	<i>p</i> value	H3	H10	<i>p</i> value	H10	H30	<i>p</i> value
CM200	7.46±0.51	8.08±0.83	0.055	8.08±0.83	10.10±0.28	0.004	10.10±0.28	10.41±0.41	0.118
CM400	7.14±0.63	7.97±0.66	0.046	7.97±0.66	12.03±0.38	0.000	12.03±0.38	12.25±0.31	0.406
CM200+Vit.D	7.46±0.54	8.05±0.47	0.020	8.05±0.47	13.53±0.22	0.000	13.53±0.22	13.84±0.28	0.125
Positive control	7.05±0.66	8,65±0.63	0.006	8,65±0.63	13.58±0.29	0.000	13.58±0.29	13.53±0.41	0.701
Negative control	7.27±0.76	8.64±0.77	0.038	8.64±0.77	9.35±0.48	0.052	9.35±0.48	9.99±0.54	0.009

*Values are mean±SD n=5, p-value < 0.05 is considered significant. CM ; curcumin. Positive control ; levofloxacin. Negative control ; aquades.

Tabel 3.1 menunjukkan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP yang bermakna pada hari sebelum intervensi (H3) dengan pada pengamatan setelah intervensi (H10) pada semua kelompok. Pada kelompok yang diintervensi dengan curcumin 200 mg/kg BB, mengalami peningkatan rerata ekspresi mRNA gen CAMP antara sebelum intervensi (H3) dengan setelah intervensi (H10) sebanyak 2.01 fold change (*p* value 0.004). Pada kelompok yang diintervensi dengan curcumin 200 mg/kg BB, mengalami peningkatan rerata ekspresi mRNA gen CAMP sebanyak 4.06 fold change (*p* value 0.000). Peningkatan rerata ekspresi mRNA gen CAMP juga ditemukan pada kelompok yang diberikan curcumin 200 mg/kgBB dan vitamin D sebanyak 5.48 (*p* value 0.000). Tidak ada perbedaan rerata ekspresi mRNA gen CAMP jika dibandingkan antara hari H10 dengan pengamatan H30 pada semua kelompok.

Untuk mengetahui efek curcumin terhadap perbedaan kadar vitamin D pada masing-masing kelompok dari waktu ke waktu digunakan uji Repeated ANOVA. Rangkuman hasilnya dapat dilihat pada tabel 3.2.

Tabel 3.2 Perubahan rerata ekspresi mRNA gen CAMP pada masing-masing kelompok pada baseline, sebelum intervensi (H3) setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Ekspresi mRNA gen CAMP (fold change)					
Kelompok	Baseline	H3	H10	H30	<i>p value</i> *
CM200	7.46±0.51	8.08±0.83	10.10±0.28	10.41±0.41	0.000
CM400	7.14±0.63	7.97±0.66	12.03±0.38	12.25±0.31	0.000
CM200+Vit.D	7.46±0.54	8.05±0.47	13.53±0.22	13.58±0.41	0.000
Positive control	7.05±0.66	8,65±0.63	13.58±0.29	13.53±0.41	0.000
Negative control	7.27±0.76	8.64±0.77	9.35±0.48	9.99±0.54	0.000

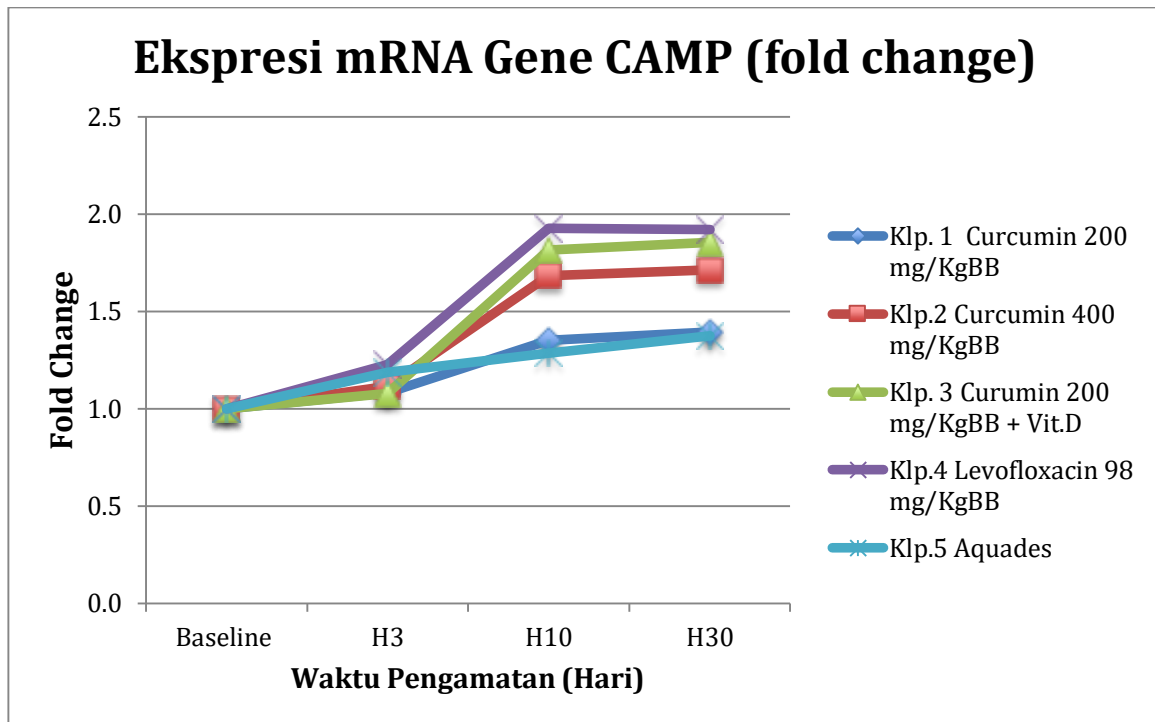
Repeated ANOVA Test, with values are mean±SD n=5, p-value < 0.05 is considered significant. CM ; curcumin. Positive control ; levofloxacin. Negative control ; aquades

Tabel 3.3 Pebandingan persentase kecepatan peningkatan rerata ekspresi mRNA gen CAMP pada kelompok pengamatan sebelum intervensi (H3), setelah intervensi (H10) dan 3 minggu setelah intervensi (H30)

Ekspresi mRNA gen CAMP (fold change)		
Kelompok	(H10 – H3)*	(H30 – H10)**
CM200	25 %	3.07%
CM400	50.94 %	1.82%
CM200+Vit.D	68.07 %	0.37 %
Positive control	56.99 %	-0.37%
Negative control	8.21 %	6.84%

*Kecepatan peningkatan rerata = mean (H10 – H3)100 / mean H3

**Kecepatan peningkatan rerata = mean (H30 – H10)100 / mean H10



Gambar 3. Dinamika perubahan ekspresi mRNA gen CAMP berdasarkan kelompok selama waktu pengamatan.

Gambar menunjukkan dinamika peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP paling tinggi pada kelompok yang diberikan kontrol positive yang diberikan Levofloxacin, dan hampir berhimpitan dengan kelompok curcumin 200 mg/kgBB dan vitamin D. Dinamika peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP juga terjadi pada kelompok dengan curcumin 400 mg/kg BB, yang peningkatannya lebih tinggi daripada kelompok curcumin 200 mg/kg BB. Hal ini membuktikan bahwa dosis curcumin 200 mg/kg BB dan 400 mg/kg BB dapat menstimulasi produksi CAMP atau cathelicidin antimicrobial peptide.

4. Hubungan jumlah koloni bakteri, kadar Vitamin D Reseptor dan ekspresi mRNA gen Cathelidicin Antimicrobial Peptide (CAMP) mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Untuk keperluan uji korelasi antar dosis Curcumin, ekspresi mRNA gen CAMP, kadar Vitamin D Reseptor dan kolonisasi bakteri kelompok yang dianalisis hanya 3 kelompok, mewakili dosis Curcumin (1=Curcumin 200mg/kg BB, 2=Curcumin 400mg/kg BB, 3=Curcumin 200 mg/kg BB dan Vitamin D), dan dari masing-masing pengamatan (baseline, hri ke-3, hari ke-10 dan hari ke-30). Pasangan data ekspresi mRNA gen CAMP, kadar Vitamin D Reseptor dan kolonisasi bakteri

digabungkan sehingga jumlah data yang diolah ada sebanyak 60 pasangan data. Data diuji dengan menggunakan uji korelasi Pearson

Tabel 4. Korelasi jumlah koloni bakteri, kadar Vitamin D dan ekspresi mRNA gen CAMP

Variabel	Korelasi Bivariat*	
	R	<i>p value</i>
	Kadar Vitamin D Reseptor (ng/ml)	-0,623
Ekspresi mRNA gen CAMP (fold change)	-0,799	0,000

* Pearson Correlation test (1-tailed); p signifikan bila $\leq 0,05$

Penelitian ini memperlihatkan hubungan yang linear antara kadar Vitamin D reseptor dengan jumlah kolonisasi bakteri *Salmonella Typhi* (p value 0,000). Kekuatan korelasi yang didapatkan kuat ($r = -0,623$). Arah korelasi negatif berarti semakin tinggi kadar Vitamin D Reseptor semakin rendah jumlah kolonisasi bakteri. Hubungan linear serupa juga ditemukan antara ekspresi mRNA gen CAMP dengan jumlah kolonisasi bakteri dengan nilai p value 0.000, kekuatan korelasi yang kuat ($r = -0,799$). Arah korelasi negatif berarti semakin tinggi ekspresi mRNA gen CAMP semakin rendah jumlah kolonisasi bakteri.

B. PEMBAHASAN

1. Efek Pemberian Curcumin terhadap terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Pemeriksaan jumlah koloni untuk menggambarkan jumlah bakteri yang terdapat pada cairan peritoneal mencit sebelum intervensi, setelah intervensi dan pada pengamatan hari ke-30. Jumlah koloni bakteri sudah mulai terlihat pada hari ke-3 atau 72 jam pada semua kelompok yang diinduksi dengan *Salmonella typhi*. Pemeriksaan jumlah koloni pada hari ke-10 atau setelah 5 hari pemberian intervensi, semua kelompok mencit memperlihatkan penurunan rerata jumlah koloni bakteri yang bermakna. Penelitian lain telah membuktikan peran curcumin sebagai antimikroba dalam membunuh bakteri, baik gram positif maupun gram negatif. Untuk bakteri

gram negatif, pemberian curcumin dosis 100 μM dilaporkan efektif menghambat pertumbuhan seluruh bakteri *E. coli* (10^6 CFU/ml) (28) serta menghambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* (107). Pemberian dosis curcumin 200 μM dapat menghambat 80% pertumbuhan bakteri *E. faecalis* dalam pemberian 4 jam (107). Peran curcumin sebagai antibakteri dibuktikan dengan pemeriksaan fluoresensi membran bakteri. Hasil fluoresensi membran memperlihatkan kerusakan pada membran bakteri (28). Curcumin dilaporkan dapat berikatan dengan protein FtsZ sehingga menghambat proliferasi sel bakteri (29). Terhadap bakteri *B. subtilis*, curcumin menghalangi stabilitas dan perakitan protein FtsZ. Protein FtsZ adalah suatu homolog prokariotik protein tubulin yang mengatur pembelahan sel (29). Jika protein FtsZ ini rusak, maka berujung pada menurunnya proliferasi sel bakteri (108). Efek fototoksik curcumin terhadap bakteri telah dilaporkan sejak tahun 1980an terhadap infeksi bakteri *S. typhi* dan *E. coli* (109). Curcumin juga cukup efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri gram positif. Penelitian membuktikan curcumin dapat menekan pertumbuhan bakteri *S. mutans* pada permukaan gigi manusia (109). Suatu penelitian membuktikan pemberian curcumin dengan radiasi LED sebagai metode terapi photodynamic, dapat menekan jumlah bakteri *S. mutans* pada kasus karies gigi (109).

2. Efek pemberian curcumin terhadap kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Vitamin D memiliki afinitas antiproliferatif dan antineoplastik, termasuk apoptosis, inhibisi proliferasi siklus sel, induksi diferensiasi, inhibisi invasi dan mortalitas serta reduksi angiogenesis. Aktivitas ini menggunakan jalur genomik dan nongenomik dan dimediasi oleh reseptor vitamin D reseptor (VDR). Vitamin D reseptor diekspresikan dalam jumlah yang besar pada jaringan tumor dan sel yang terinfeksi. Penelitian terbaru menunjukkan VDR dan enzim yang terlibat pada metabolisme vitamin D memiliki kerusakan pada jalur signaling VDR. Ekspresi VDR oleh sel imun menunjukkan bahwa vitamin D mempengaruhi fungsi sistem imun. Lebih dari 30 jaringan tubuh yang berbeda seperti otak, hati dan pancreas, limfatik, kulit, gonad dan prostat terdiri dari sel termasuk limfosit T dan B yang mengekspresikan VDR. Vitamin D Reseptor berikatan dengan 1,25-hydroxy vitamin D, bentuk aktif vitamin D dan memediasi aktivitas biologisnya (110). Sel dendritik (DC) adalah target utama untuk aktivitas imunomodulatori 1,25 (OH)₂ D₃, dengan

menghambat diferensiasi dan maturasi DC, menekan ekspresi regulasi MHC-II, kostimulasi molekul (CD40, CD80 dan CD86) dan menurunkan produksi IL-12. Selain itu, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ meningkatkan produksi IL-10 dan mempromosikan apoptosis DC. Bersama-sama, efek dari $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ini menghambat aktivasi sel T yang bergantung pada DC (111). Vitamin D tidak mempunyai efek antimikobakterial secara langsung. Efeknya adalah melalui modulasi respon imun pejamu dengan menginduksi sekresi IL-10.

Penelitian ini membuktikan peran curcumin dalam menginduksi VDR pada mencit yang terinfeksi *S. typhi*. Setelah pemberian terapi selama lima hari dengan dosis curcumin 200 mg/kg b.w (mean difference \pm SD; -0.88 ± 5.13 , *p-value* 0.018) dan 400 mg/kg b.w (mean difference \pm SD; -3.70 ± 1.07 , *p-value* 0.002), ditemukan peningkatan rerata kadar VDR serum yang bermakna (tabel 2.1). Hasil ini didukung oleh penelitian *in vitro* yang menunjukkan bahwa curcumin juga mengikat VDR dengan afinitas rendah (87). Proses aktivasi VDR kemudian akan mengaktifkan faktor transkripsi gen peptida antimikroba alami, cathelicidin dan defensin (83).

Tikus percobaan yang tidak memiliki VDR mengalami gangguan produksi faktor promotif Th1 dan IL-18, penurunan proliferasi sel Th1, dan penurunan ekspresi *signal transducer and activation of transcription 4* (STAT 4) (suatu faktor transkripsi sel Th1). Secara bersama-sama keadaan ini menunjukkan bahwa fungsi VDR sangat esensial untuk perkembangan sel Th1. Pada tikus percobaan yang tidak memiliki VDR terjadi penurunan respon proliferasi terhadap stimulasi CD3 (111–113).

3. Efek pemberian curcumin terhadap perubahan trend ekspresi mRNA gen Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) pada mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Peptida antimikroba adalah suatu grup molekul yang diproduksi oleh sel-sel dan jaringan dalam tubuh makhluk hidup yang berperan penting sebagai sistem pertahanan tubuh, mulai dari prokariot hingga manusia diketahui memproduksi peptida antimikroba di dalam tubuhnya, salah satu peptida antimikroba adalah cathelicidin (32). Mekanisme terperinci terhadap regulasi gen CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide) masih belum diketahui, dimana Cathelicidin ditemukan mengalami upregulasi jika terdapat infeksi bakteri (55). Telah ditunjukkan, bahwa produk dari bakteri akan meningkatkan ekspresi Cathelicidin pada sel manusia yang dikultur (56), yang mengindikasikan peran Cathelicidin berperan dalam melawan

infeksi. Hal ini dapat terlihat pula pada penelitian ini, bahwa pada kelompok kontrol negatif, kelompok mencit yang hanya terinfeksi *S. typhi* selama 5 hari, tanpa diberikan terapi, menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP sebesar 8.21 % (tabel 3.3).

Selain oleh infeksi, ekspresi mRNA gen CAMP juga dapat diinduksi oleh beberapa zat. Penginduksi ekspresi gen CAMP yang paling ampuh adalah 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂ D₃), yang merupakan bentuk aktif dari vitamin D. 1,25(OH)₂ D₃ bekerja melalui reseptor vitamin D (VDR) yang kemudian mengikat elemen responsif vitamin D (VDRE), sekitar 500 bp hulu promotor gen CAMP (54,60). Pada penelitian ini, kelompok mencit yang mendapatkan terapi curcumin bersama vitamin D, memperlihatkan peningkatan rerata kadar ekspresi mRNA gen CAMP setelah pemberian terapi selama 5 hari (mean ±SD; H3; 8.05±0.47, H10; 13.53±0.22, *p-value* 0.002) (tabel 3.1). Tanpa infeksi, suatu penelitian lain mendapatkan adanya korelasi positif antara kadar cathelicidin dengan kadar vitamin D di sirkulasi pada dewasa sehat (88).

Penelitian *in vitro* menunjukkan bahwa curcumin juga mengikat VDR dengan afinitas rendah (87). Hal tersebut terbukti dari penelitian ini, terdapat peningkatan rerata kadar ekspresi mRNA gen CAMP pada kelompok mencit dengan dosis curcumin 200 mg/kg b.w (*p-value* 0.000) dan dosis curcumin 400 mg/kg b.w (*p-value* 0.000) setelah pemberian selama 5 hari hingga pengamatan hari ke-30 (tabel 3.2).

4. Hubungan jumlah koloni bakteri, kadar Vitamin D Reseptor dan ekspresi mRNA gen Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) mencit Balb/c yang diinduksi *Salmonella Typhi*

Analisa korelasi dengan uji korelasi Pearson menunjukkan bahwa jumlah koloni bakteri berkorelasi bermakna dengan kadar VDR (*p-value* 0.000) dan ekspresi mRNA gen CAMP (*p-value* 0.000) dengan koefisien korelasi negatif (tabel 4). Semakin tinggi kadar Vitamin D Reseptor dan ekspresi mRNA gen CAMP, semakin rendah jumlah kolonisasi bakteri.

Suatu penelitian memperlihatkan ekspresi gen CAMP sangat kuat distimulasi oleh 1.25 D pada semua sel yang diperiksa (sel epitel, makrofag dan neutrofil). Hal ini dibuktikan bahwa ekspresi yang gen CAMP yang paling tinggi ditemukan pada beragam tipe sel, termasuk pada sel kulit biopsi yang memperoleh UVB-terapi (54,83). Cathelicidin sebagai salah satu jenis peptida antimicroba, bertanggung jawab

terhadap serangan infeksi bakteri, jamur dan virus, yang aktivitasnya dihubungkan dengan kemampuannya dalam merusak membran bakteri patogen (114,115). Cathelicidin dapat berfungsi sebagai kemotraktran untuk neutrofil, monosit dan sel imun lain (116).

Pada respon imun alamiah, aktivasi Toll-like receptor (TLR) pada makrofag manusia, menyebabkan upregulasi ekspresi gen VDR dan gen Vitamin D-1 hydroxylase, yang berujung pada terbentuknya peptida antimikroba cathelicidin dan kemudian membunuh bakteri *Mycobacterium tuberculosis* (83). Penelitian observasi yang dilakukan pada populasi Afrika-Amerika, kelompok yang rentan terinfeksi TBC, dilaporkan memiliki kadar 25-hydroxyvitamin D yang rendah, yang akibatnya tidak mampu secara efisien dalam menginduksi ekspresi gen mRNA cathelicidin (83).

Induksi ekspresi gen peptida antimikroba oleh 1.25 D memberikan bukti potensi peranan vitamin D secara molekular dalam proteksi terhadap infeksi bakteri dan virus. Salah satu contoh, ekspresi gen peptida antimikroba defensin diinduksi oleh infeksi *H. pylori* (117) pada mucosa gaster dan infeksi rhinovirus pada epitel saluran pernapasan (118). Penelitian lain membuktikan bahwa cathelicidin menghambat replikasi virus HIV (119) yang diisolasi, yang menyimpulkan kemampuan vitamin D melalui signaling VDR mampu menginduksi aktivitas antiviral.

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. KESIMPULAN

1. Curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin dosis 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kgBB dan Vitamin D, serta kelompok kontrol positif dengan Levofloxacin berhasil menekan jumlah koloni bakteri *Salmonella typhi* setelah intervensi selama 5 hari. Curcumin dosis 400 mg/kg BB dan Curcumin dosis 200 mg/KgBB dengan Vitamin D, lebih baik dari Curcumin dosis 200 mg/kgBB, serta tidak kalah efeknya dengan kelompok yang diberikan Levofloxacin. Pada 3 minggu setelah intervensi, jumlah koloni bakteri pada seluruh kelompok mengalami penurunan, meskipun tidak ada perbedaan yang bermakna.
2. Curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin dosis 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kgBB dan Vitamin D, serta kelompok kontrol positif dengan Levofloxacin, mampu meningkatkan kadar VDR, setelah intervensi selama 5 hari. peningkatan kadar VDR paling tinggi pada kelompok yang diberikan curcumin 200 mg/kgBB bersama dengan vitamin D, dan hampir berhimpitan dengan kelompok kontrol yang diberikan Levofloxacin. Pada 3 minggu setelah intervensi, kadar VDR pada seluruh kelompok tetap mengalami peningkatan, meskipun peningkatannya tidak besar dan tidak bermakna.
3. Curcumin dosis 200 mg/kg BB, curcumin dosis 400 mg/kgBB, curcumin 200 mg/kgBB dan Vitamin D, serta kelompok kontrol positif dengan Levofloxacin, mampu meningkatkan ekspresi mRNA gen CAMP, setelah intervensi selama 5 hari. peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP paling tinggi pada kelompok yang diberikan kontrol positive yang diberikan Levofloxacin, dan hampir berhimpitan dengan kelompok curcumin 200 mg/kgBB dan vitamin D. Pada 3 minggu setelah intervensi, ekspresi mRNA gen CAMP pada seluruh kelompok tetap mengalami peningkatan, meskipun peningkatannya tidak besar dan tidak bermakna.
4. Kadar VDR berhubungan dengan jumlah koloni bakteri, semakin tinggi kadar VDR, semakin rendah jumlah koloni bakteri. Ekspresi mRNA gen CAMP berhubungan dengan jumlah koloni bakteri. Semakin tinggi ekspresi mRNA gen CAMP, semakin rendah jumlah koloni bakteri.

B. SARAN

1. Berdasarkan uji khasiat menunjukkan kombinasi curcumin dan vitamin D berpotensi untuk meningkatkan imunitas alami, sehingga perlu dilakukan kajian lanjutan untuk melihat efek kombinasi tersebut pada respon imun tubuh menggunakan subjek manusia.
2. Kombinasi curcumin dan Vitamin D perlu dikembangkan sebagai salah satu suplemen dalam pengobatan infeksi, terutama dalam hal ini infeksi bakteri *Salmonella typhi*

DAFTAR PUSTAKA

1. Alena Klochko MD. Salmonella Infection (Salmonellosis) [Internet]. Vol. 2018. 2017. Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/228174-overview>
2. Nester EW, Jr DA, Roberts CE. Microbiology: a Human Perspective. 7th ed. Mc-Graw Hill, New York, NY, USA; 2012.
3. Setiabudy R. Antimikroba Lain. In: Farmakologi dan Terapi. 5th ed. Jakarta, Indonesia: Departemen Farmakologi dan Terapeutik Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia; 2007. p. 584–96.
4. Guo C, Rosoha E, Lowry MB, Borregaard N, Gombart AF. Curcumin induces human cathelicidin antimicrobial peptide gene expression through a vitamin D receptor-independent pathway. *J Nutr Biochem.* 2012/07/31 ed. 2013;24(5):754–9.
5. Tajbakhsh S, Mohammadi K, Deilami I, Zandi K, Fouladvand M, Ramedani E, et al. Antibacterial activity of indium curcumin and indium diacetylcurcumin. Vol. 7. 2008. 3832-3835 p.
6. Robertson RPL, Wahab MFA, Raasch FOC, Avery J, Anderson R, Owens C, et al. Evaluation of Chloramphenicol and Ampicillin in Salmonella Enteric Fever. *N Engl J Med* [Internet]. 1968;278(4):171–6. Available from: <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM196801252780401>
7. Butler T, Rumans L, Arnold K. Response of typhoid fever caused by chloramphenicol-susceptible and chloramphenicol-resistant strains of *Salmonella typhi* to treatment with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Rev Infect Dis.* 1982/03/01 ed. 1982;4(2):551–61.
8. Lampe RM, Duangmani C, Mansuwan P. Chloramphenicol- and ampicillin-resistant typhoid fever. *JAMA* [Internet]. 1975;233(7):768. Available from: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.1975.03260070018007>
9. Crump JA, Mintz ED. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2010;50(2):241–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2798017/>
10. Kariuki S, Revathi G, Kiiru J, Mengo DM, Mwituria J, Muyodi J, et al. Typhoid in Kenya is associated with a dominant multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhi haplotype that is also widespread in Southeast Asia. *J Clin Microbiol.* 2010/04/16 ed. 2010;48(6):2171–6.

11. Dolecek C, Tran TP, Nguyen NR, Le TP, Ha V, Phung QT, et al. A multi-center randomised controlled trial of gatifloxacin versus azithromycin for the treatment of uncomplicated typhoid fever in children and adults in Vietnam. *PLoS One*. 2008/05/22 ed. 2008;3(5):e2188.
12. Kumar Y, Sharma A, Mani K. High Level of Resistance to nalidixic acid in *Salmonella enterica* serovar Typhi in Central India. Vol. 3. 2009. 467-469 p.
13. Dong B-Q, Yang J, Wang X-Y, Gong J, von Seidlein L, Wang M-L, et al. Trends and disease burden of enteric fever in Guangxi province, China, 1994–2004. *Bull World Health Organ* [Internet]. 2010;88(9):689–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2930361/>
14. Nizet V, Gallo RL. Cathelicidins and innate defense against invasive bacterial infection. *Scand J Infect Dis*. 2003/11/19 ed. 2003;35(9):670–6.
15. Brat P, Tourniaire F, Amiot-Carlin M-J. Stability and Analysis of Phenolic Pigments. 2007. 71-86 p.
16. Achmad SA, Hakim EH, Makmur L, Syah YM, Juliawaty LD, Mujahiddin D. Ilmu kimia dan kegunaan tumbuh-tumbuhan obat Indonesia. Intitute Teknol Bandung, Indones. 2007;
17. Rustam E, Atmasari L, Yanwirasti. Efek Antiinflamasi Ekstrak Etanol Kunyit (*Curcuma domestica* Val) Pada Tikus Jantan Galur Wistar. *J Sains dan Teknol Farm*. 2007;12:112–5.
18. Jurenka JS. Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Altern Med Rev*. 2009/07/15 ed. 2009;14(2):141–53.
19. Chainani-Wu N. Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J Altern Complement Med*. 2003/04/05 ed. 2003;9(1):161–8.
20. Minghetti L. Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004/09/30 ed. 2004;63(9):901–10.
21. Ravindran J, Subbaraju G V, Ramani M V, Sung B, Aggarwal BB. Bisdemethylcurcumin and structurally related hispolon analogues of curcumin exhibit enhanced prooxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities in vitro. *Biochem Pharmacol*. 2010/02/09 ed. 2010;79(11):1658–66.
22. Jacob A, Wu R, Zhou M, Wang P. Mechanism of the Anti-inflammatory Effect of Curcumin: PPAR-gamma Activation. *PPAR Res*. 2008/02/16 ed.

- 2007;2007:89369.
23. Majeed M, Badmaev V, R n D Team S. Curcuminoids - antioxidant phytonutrients. 2003.
 24. Venkatesan P, Unnikrishnan MK, Sudheer Kumar M, Rao M. Effect of curcumin analogues on oxidation of haemoglobin and lysis of erythrocytes. Vol. 84. 2003. 74-78 p.
 25. Huang MT, Wang ZY, Georgiadis CA, Laskin JD, Conney AH. Inhibitory effects of curcumin on tumor initiation by benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis*. 1992/11/01 ed. 1992;13(11):2183–6.
 26. Ramprasad C, Sirsi M. Studies on Indian medicinal plants: *Curcuma longa* Linn. - Effect of curcumin and the essential oils of *Curcuma longa* on bile secretion. Vol. 15. 1956. 262-265 p.
 27. SHIH ANL, HARRIS ND. Antimicrobial Activity of Selected Antioxidants. *J Food Prot* [Internet]. 1977;40(8):520–2. Available from: <http://jfoodprotection.org/doi/abs/10.4315/0362-028X-40.8.520>
 28. Tyagi P, Singh M, Kumari H, Kumari A, Mukhopadhyay K. Bactericidal Activity of Curcumin Is Associated with Damaging of Bacterial Membrane. *PLoS One* [Internet]. 2015;10(3):e0121313. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4374920/>
 29. Rai D, Singh JK, Roy N, Panda D. Curcumin inhibits FtsZ assembly: an attractive mechanism for its antibacterial activity. *Biochem J*. 2007/10/24 ed. 2008;410(1):147–55.
 30. Wang J, Zhou X, Li W, Deng X, Deng Y, Niu X. Curcumin protects mice from *Staphylococcus aureus* pneumonia by interfering with the self-assembly process of alpha-hemolysin. *Sci Rep*. 2016/06/28 ed. 2016;6:28254.
 31. Siwipeni Irmawanti Rahayu, Nurdiana Nurdiana, Santoso S. The Effect of Curcumin and Cotrimoxazole in *Salmonella Typhimurium* Infection In Vivo. *ISRN Microbiol*. 2013;2013:4.
 32. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*. 2005/02/11 ed. 2005;3(3):238–50.
 33. Giuliani A, Pirri G, Nicoletto SF. Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Cent Eur J Biol* [Internet]. 2007;2(1):1–33. Available from: <https://doi.org/10.2478/s11535-007-0010-5>

34. Steinmann J. Induction and regulation of CAMP gene expression. Department of Biology. [Reykjavík, Iceland]: University of Iceland; 2008.
35. Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003/09/02 ed. 2003;3(9):710–20.
36. Pazgier M, Hoover DM, Yang D, Lu W, Lubkowski J. Human beta-defensins. *Cell Mol Life Sci.* 2006/05/20 ed. 2006;63(11):1294–313.
37. Durr UH, Sudheendra US, Ramamoorthy A. LL-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2006/05/24 ed. 2006;1758(9):1408–25.
38. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol.* 2003/09/10 ed. 2004;75(1):39–48.
39. Zaiou M, Nizet V, Gallo RL. Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence. *J Invest Dermatol.* 2003/04/26 ed. 2003;120(5):810–6.
40. Zanetti M, Gennaro R. Cathelicidins : a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain Margherita Zanetti a¹, b^{1*}, Renato Gennaro b², D o m e n i c o. 1995;374:1–5.
41. Ramanathan B, Davis EG, Ross CR, Blecha F. Cathelicidins: microbicidal activity, mechanisms of action, and roles in innate immunity. *Microbes Infect.* 2002/03/23 ed. 2002;4(3):361–72.
42. Pestonjamas VK, Huttner KH, Gallo RL. Processing site and gene structure for the murine antimicrobial peptide CRAMP. *Peptides.* 2001/10/06 ed. 2001;22(10):1643–50.
43. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem.* 1996/06/01 ed. 1996;238(2):325–32.
44. Larrick JW, Hirata M, Balint RF, Lee J, Zhong J, Wright SC. Human CAP18: a novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect Immun* [Internet]. 1995;63(4):1291–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC173149/>
45. Zaiou M, Gallo RL. Cathelicidins, essential gene-encoded mammalian antibiotics. *J Mol Med.* 2002/09/13 ed. 2002;80(9):549–61.
46. Tomasinsig L, Zanetti M. The cathelicidins--structure, function and evolution.

- Curr Protein Pept Sci. 2005/01/11 ed. 2005;6(1):23–34.
47. Gennaro R, Zanetti M. Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*. 2000/08/10 ed. 2000;55(1):31–49.
 48. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B. Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem*. 1998/03/07 ed. 1998;273(6):3718–24.
 49. Oren Z, Lerman JC, Gudmundsson GH, Agerberth B, Shai Y. Structure and organization of the human antimicrobial peptide LL-37 in phospholipid membranes: relevance to the molecular basis for its non-cell-selective activity. *Biochem J* [Internet]. 1999;341(Pt 3):501–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1220385/>
 50. Porcelli F, Verardi R, Shi L, Henzler-Wildman KA, Ramamoorthy A, Veglia G. NMR structure of the cathelicidin-derived human antimicrobial peptide LL-37 in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry*. 2008/04/29 ed. 2008;47(20):5565–72.
 51. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol*. 2002/09/24 ed. 2002;169(7):3883–91.
 52. Jeng L, Yamshchikov A V, Judd SE, Blumberg HM, Martin GS, Ziegler TR, et al. Alterations in vitamin D status and anti-microbial peptide levels in patients in the intensive care unit with sepsis. *J Transl Med*. 2009/04/25 ed. 2009;7:28.
 53. Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS, et al. Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood*. 2001/06/05 ed. 2001;97(12):3951–9.
 54. Gombart AF, Borregaard N, Koeffler HP. Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J*. 2005/06/30 ed. 2005;19(9):1067–77.
 55. Hase K, Murakami M, Iimura M, Cole SP, Horibe Y, Ohtake T, et al. Expression of LL-37 by human gastric epithelial cells as a potential host defense mechanism against *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology*. 2004/01/16 ed. 2003;125(6):1613–25.

56. Wu H, Zhang G, Minton JE, Ross CR, Blecha F. Regulation of cathelicidin gene expression: induction by lipopolysaccharide, interleukin-6, retinoic acid, and *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Infect Immun.* 2000/09/19 ed. 2000;68(10):5552–8.
57. Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B, et al. Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med.* 2001/02/15 ed. 2001;7(2):180–5.
58. Bergman P, Johansson L, Asp V, Plant L, Gudmundsson GH, Jonsson AB, et al. *Neisseria gonorrhoeae* downregulates expression of the human antimicrobial peptide LL-37. *Cell Microbiol.* 2005/06/15 ed. 2005;7(7):1009–17.
59. Wang TT, Nestel FP, Bourdeau V, Nagai Y, Wang Q, Liao J, et al. Cutting edge: 1,25-dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression. *J Immunol.* 2004/08/24 ed. 2004;173(5):2909–12.
60. Hase K, Eckmann L, Leopard JD, Varki N, Kagnoff MF. Cell differentiation is a key determinant of cathelicidin LL-37/human cationic antimicrobial protein 18 expression by human colon epithelium. *Infect Immun.* 2002/01/18 ed. 2002;70(2):953–63.
61. Schaubert J, Oda Y, Buchau AS, Yun QC, Steinmeyer A, Zugel U, et al. Histone acetylation in keratinocytes enables control of the expression of cathelicidin and CD14 by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Invest Dermatol.* 2007/10/19 ed. 2008;128(4):816–24.
62. Schaubert J, Svanholm C, Termen S, Iffland K, Menzel T, Scheppach W, et al. Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut.* 2003/04/15 ed. 2003;52(5):735–41.
63. Termen S, Tollin M, Rodriguez E, Sveinsdottir SH, Johannesson B, Cederlund A, et al. PU.1 and bacterial metabolites regulate the human gene CAMP encoding antimicrobial peptide LL-37 in colon epithelial cells. *Mol Immunol.* 2008/07/29 ed. 2008;45(15):3947–55.
64. Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, Greenberg EP, et al. Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun.* 2000/04/18 ed. 2000;68(5):2748–55.
65. De Y, Chen Q, Schmidt AP, Anderson GM, Wang JM, Wooters J, et al. LL-37,

- the Neutrophil Granule–And Epithelial Cell–Derived Cathelicidin, Utilizes Formyl Peptide Receptor–Like 1 (Fpr1) as a Receptor to Chemoattract Human Peripheral Blood Neutrophils, Monocytes, and T Cells. *J Exp Med* [Internet]. 2000;192(7):1069–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2193321/>
66. Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H, et al. A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology*. 2002/04/26 ed. 2002;106(1):20–6.
 67. Koczulla R, von Degenfeld G, Kupatt C, Krotz F, Zahler S, Gloe T, et al. An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J Clin Invest*. 2003/06/05 ed. 2003;111(11):1665–72.
 68. Heilborn JD, Nilsson MF, Kratz G, Weber G, Sorensen O, Borregaard N, et al. The cathelicidin anti-microbial peptide LL-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol*. 2003/02/27 ed. 2003;120(3):379–89.
 69. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*. 2004/01/07 ed. 2004;172(2):1146–56.
 70. Burton MF, Steel PG. The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep*. 2009/11/26 ed. 2009;26(12):1572–84.
 71. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol*. 2002/10/09 ed. 2002;46(1):157–68.
 72. Deretic V, Kimura T, Timmins G, Moseley P, Chauhan S, Mandell M. Immunologic manifestations of autophagy. *J Clin Invest*. 2015/02/06 ed. 2015;125(1):75–84.
 73. Yuk JM, Shin DM, Lee HM, Yang CS, Jin HS, Kim KK, et al. Vitamin D3 induces autophagy in human monocytes/macrophages via cathelicidin. *Cell Host Microbe*. 2009/09/15 ed. 2009;6(3):231–43.
 74. Songane M, Kleinnijenhuis J, Netea MG, van Crevel R. The role of autophagy in host defence against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Tuberc*. 2012/06/12 ed. 2012;92(5):388–96.
 75. Duplantier AJ, van Hoek ML. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide

- LL-37 as a Potential Treatment for Polymicrobial Infected Wounds. *Front Immunol.* 2013/07/11 ed. 2013;4:143.
76. Golec M. Cathelicidin LL-37: LPS-neutralizing, pleiotropic peptide. *Ann Agric Env Med.* 2007/07/28 ed. 2007;14(1):1–4.
 77. Gombart AF, Bhan I, Borregaard N, Tamez H, Camargo Jr. CA, Koeffler HP, et al. Low plasma level of cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18) predicts increased infectious disease mortality in patients undergoing hemodialysis. *Clin Infect Dis.* 2009/01/13 ed. 2009;48(4):418–24.
 78. Leow L, Simpson T, Cursons R, Karalus N, Hancox RJ. Vitamin D, innate immunity and outcomes in community acquired pneumonia. *Respirology.* 2011/01/20 ed. 2011;16(4):611–6.
 79. Urrutia-Pereira M, Sole D. [Vitamin D deficiency in pregnancy and its impact on the fetus, the newborn and in childhood]. *Rev Paul Pediatr.* 2015/02/11 ed. 2015;33(1):104–13.
 80. Uitterlinden AG, Fang Y, Van Meurs JB, Pols HA, Van Leeuwen JP. Genetics and biology of vitamin D receptor polymorphisms. *Gene.* 2004/08/19 ed. 2004;338(2):143–56.
 81. Sidhu PS, Nassif N, McCallum MM, Teske K, Feleke B, Yuan NY, et al. Development of novel Vitamin D Receptor-Coactivator Inhibitors. *ACS Med Chem Lett.* 2014/05/07 ed. 2014;5(2):199–204.
 82. Shin JS, Choi MY, Longtine MS, Nelson DM. Vitamin D Effects on Pregnancy and the Placenta. *Placenta* [Internet]. 2010;31(12):1027–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2993775/>
 83. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* (80-). 2006/02/25 ed. 2006;311(5768):1770–3.
 84. Vandamme D, Landuyt B, Luyten W, Schoofs L. A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol.* 2012/12/19 ed. 2012;280(1):22–35.
 85. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K. Vitamin D and immune function. *Nutrients.* 2013/07/17 ed. 2013;5(7):2502–21.
 86. Pinheiro da Silva F, Machado MC. Antimicrobial peptides: clinical relevance and therapeutic implications. *Peptides.* 2012/06/05 ed. 2012;36(2):308–14.
 87. Bartik L, Whitfield GK, Kaczmarek M, Lowmiller CL, Moffet EW, Furnick

- JK, et al. Curcumin: A Novel Nutritionally-Derived Ligand of the Vitamin D Receptor with Implications for Colon Cancer Chemoprevention. *J Nutr Biochem* [Internet]. 2010;21(12):1153–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2891903/>
88. Dixon BM, Barker T, McKinnon T, Cuomo J, Frei B, Borregaard N, et al. Positive correlation between circulating cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18/LL-37) and 25-hydroxyvitamin D levels in healthy adults. *BMC Res Notes* [Internet]. 2012;5:575. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3532295/>
 89. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. Vol. 25th editi. McGraw-Hill Companies, Inc; 2010.
 90. Widoyono. Penyakit Tropis : Epidemiologi, Penularan, Pencegahan, dan Pemberantasannya. Jakarta, Indonesia: Erlangga; 2011.
 91. MacKenzie K, Palmer M, Köster W, White A. Examining the Link between Biofilm Formation and the Ability of Pathogenic Salmonella Strains to Colonize Multiple Host Species. Vol. 4. 2017. 1-19 p.
 92. (WHO) WHO. Typhoid [Internet]. Vol. 2017. WHO; 2015. Available from: <http://www.who.int/immunization/diseases/typhoid/en/>
 93. Tumbelaka. Tata Laksana Demam Tifoid Pada Anak. Pediatrics Update. Naskah lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan. Ilmu Kesehat Anak IDAI Jaya. 2003;
 94. Mimi Marleni, Yulia Iriani, Wisman Tjuandra, Theodorus. Ketepatan Uji Tubex TF® dalam Mendiagnosis Demam Tifoid Anakpada Demam Hari ke-4. *J Kedokt DAN Kesehat*. 2012;1:7–11.
 95. Tam FCH, Wang M, Dong B, Leung DTM, Ma CH, Lim PL. New rapid test for paratyphoid a fever: usefulness, cross-detection, and solution. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 2008;62(2):142–50. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S073288930800309X>
 96. J Olsen S, Pruckler J, Bibb W, My Thanh Nguyen T, Trinh Tran M, Minh Nguyen T, et al. Evaluation of Rapid Diagnostic Test for Typhoid Fever. Vol. 42. 2004. 1885-1889 p.
 97. Ruiz N, Kahne D, Silhavy TJ. Advances in understanding bacterial outer-membrane biogenesis. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2006;4:57. Available

- from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1322>
98. Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ. Typhoid fever. *N Engl J Med*. 2002/11/29 ed. 2002;347(22):1770–82.
 99. Nasronudin. *Immunopatogenesis molekuler, Diagnosis dan Penatalaksanaan Demam Tifoid Masa Kini. Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini & Mendatang*. 2007;
 100. Pastoor R, Hatta M, Abdoel TH, Smits HL. Simple, rapid, and affordable point-of-care test for the serodiagnosis of typhoid fever. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008/02/16 ed. 2008;61(2):129–34.
 101. Sudoyo AW. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam*. Indonesia: Jakarta: Interna Publishing ; 2009.
 102. Tanto C, Liwang F, Hanifati S, Pradipta EA. *Kapita Selekta Kedokteran Jilid II*. In Jakarta: Media Aesculapius; 2016. p. 721–3.
 103. Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. *Harrison's Principles of Internal Medicine*. In Singapore: McGraw-Hill Inc.; 2013.
 104. Prof. dr. Syarifuddin Wahid Sp.PA (K), Sp.F P., dr. Upik A. Miskad Sp.PA (K) P., Wijaya A. *IMUNOLOGI Lebih Mudah Dipahami*. Brillian Internasional; 2016.
 105. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Basic Immunology*. Vol. 5th editio. Elsevier; 2016.
 106. HATTA M, SMITS HL. DETECTION OF SALMONELLA TYPHI BY NESTED POLYMERASE CHAIN REACTION IN BLOOD, URINE, AND STOOL SAMPLES. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2007;76(1):139–43. Available from: <http://www.ajtmh.org/content/journals/10.4269/ajtmh.2007.76.139>
 107. Luer S, Troller R, Aebi C. Antibacterial and antiinflammatory kinetics of curcumin as a potential antimucositis agent in cancer patients. *Nutr Cancer*. 2012;64(7):975–81.
 108. Stokes NR, Sievers J, Barker S, Bennett JM, Brown DR, Collins I, et al. Novel inhibitors of bacterial cytokinesis identified by a cell-based antibiotic screening assay. *J Biol Chem*. 2005 Dec;280(48):39709–15.
 109. Hjorth Tønnesen H, de Vries HJ, Karlsen J, Beijersbergen Van Henegouwen G. *Studies on curcumin and curcuminoids IX: Investigation of the photobiological*

- activity of curcumin using bacterial indicator systems. *J Pharm Sci.* 1987 May 1;76:371–3.
110. Yesil S, Tanyildiz HG, Tekgunduz SA, Toprak S, Fettah A, Dikmen AU, et al. Vitamin D receptor polymorphisms in immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Int* [Internet]. 2017 Jun 1;59(6):682–5. Available from: <https://doi.org/10.1111/ped.13273>
 111. Hayes CE, Nashold FE, Spach KM, Pedersen LB. The immunological functions of the vitamin D endocrine system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* [Internet]. 2003;49(2):277–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12887108>
 112. Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 Jul;289(1):F8–28.
 113. Dini C, Bianchi A. The potential role of vitamin D for prevention and treatment of tuberculosis and infectious diseases. *Ann Ist Super Sanita.* 2012;48(3):319–27.
 114. Hancock REW, Sahl H-G. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol.* 2006 Dec;24(12):1551–7.
 115. Jenssen H, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jul;19(3):491–511.
 116. Liu PT, Krutzik SR, Modlin RL. Therapeutic implications of the TLR and VDR partnership. *Trends Mol Med.* 2007 Mar;13(3):117–24.
 117. Wehkamp J, Schaubert J, Stange EF. Defensins and cathelicidins in gastrointestinal infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007 Jan;23(1):32–8.
 118. Proud D, Sanders SP, Wiehler S. Human rhinovirus infection induces airway epithelial cell production of human beta-defensin 2 both in vitro and in vivo. *J Immunol.* 2004 Apr;172(7):4637–45.
 119. Bergman P, Walter-Jallow L, Broliden K, Agerberth B, Soderlund J. The antimicrobial peptide LL-37 inhibits HIV-1 replication. *Curr HIV Res.* 2007 Jul;5(4):410–5.

LAMPIRAN : SURAT PERSETUJUAN ETIKA PENELITIAN



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
RSPTN UNIVERSITAS HASANUDDIN
RSUP Dr. WAHIDIN SUDIROHUSODO MAKASSAR
KOMITE ETIK PENELITIAN KESEHATAN**



Sekretariat : Lantai 3 Gedung Laboratorium Terpadu
JL.PERINTIS KEMERDEKAAN KAMPUS TAMALANREA KM.10 MAKASSAR 90245.
Contact Person: dr. Agussalim Bukhari, MMed, PhD, SpGK TELP. 081225704670 e-mail : agussalimbukhari@yahoo.com

REKOMENDASI PERSETUJUAN ETIK

Nomor : 901 / H4.8.4.5.31 / PP36-KOMETIK / 2018

Tanggal: 31 Oktober 2018

Dengan ini Menyatakan bahwa Protokol dan Dokumen yang Berhubungan Dengan Protokol berikut ini telah mendapatkan Persetujuan Etik :

No Protokol	UH18090580		No Sponsor	
Peneliti Utama	dr. Ami Febriza Achmad, M.Kes		Protokol	
Judul Peneliti	Efek Curcumin Terhadap Ekspresi Gen mRNA Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) DAN Kadar Vitamin D Reseptor (VDR) pada Mencit Yang Telah Diinduksi Dengan Salmonella Thypi			
No Versi Protokol	2		Tanggal Versi	16 Oktober 2018
No Versi PSP			Tanggal Versi	
Tempat Penelitian	Laboratorium Biologi Molekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar			
Jenis Review	<input type="checkbox"/> Exempted		Masa Berlaku	Frekuensi review lanjutan
	<input checked="" type="checkbox"/> Expedited		31 Oktober 2018	
	<input type="checkbox"/> Fullboard Tanggal		sampai	
			31 Oktober 2019	
Ketua Komisi Etik Penelitian	Nama	Prof.Dr.dr. Suryani As'ad, M.Sc.,Sp.GK (K)	Tanda tangan	
Sekretaris Komisi Etik Penelitian	Nama	dr. Agussalim Bukhari, M.Med.,Ph.D.,Sp.GK (K)	Tanda tangan	

Kewajiban Peneliti Utama:

- Menyerahkan Amandemen Protokol untuk persetujuan sebelum di implementasikan
- Menyerahkan Laporan SAE ke Komisi Etik dalam 24 Jam dan dilengkapi dalam 7 hari dan Laporan SUSAR dalam 72 Jam setelah Peneliti Utama menerima laporan
- Menyerahkan Laporan Kemajuan (progress report) setiap 6 bulan untuk penelitian resiko tinggi dan setiap setahun untuk penelitian resiko rendah
- Menyerahkan laporan akhir setelah Penelitian berakhir
- Melaporkan penyimpangan dari protokol yang disetujui (protocol deviation / violation)
- Mematuhi semua peraturan yang ditentukan

LAMPIRAN HASIL PEMERIKSAAN LABORATORIUM



MACROGEN
Advancing through Genomics

Mochammad Hatta
BTN ANTARA B6/6,
Perintis Kemerdekaan, Km.9
90245

MH030119-001

Order date : 2019/01/03
Packing date : 2019/01/07

Page : 2 / 1/2

Oligo	CAMP_Forward							
SEQ	GCCGCTGATTCTTTGACAT							
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm [⊙]		
	calculated	measured	OD	nmol				
45.9	8.003,2	8.000,1	5,7	20,5	0,2	66,3		
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification				
705		MOPC						
Oligo	CAMP_Reverse							
SEQ	GCCAAGGCAGGCCTACTACT							
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm [⊙]		
	calculated	measured	OD	nmol				
45.8	8.003,4	8.003,4	6,3	20,4	0,2	56,7		
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification				
705		MOPC						
Oligo	GAPDH_Forward							
SEQ	GACCACAGTCCATGCCATCA							
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm [⊙]		
	calculated	measured	OD	nmol				
49.2	8.011,2	8.005,9	6,8	23,5	0,2	64,7		
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification				
708		MOPC						
Oligo	GAPDH_Reverse							
SEQ	CATCACGCCACAGTTTCC							
GC%	MW		Yield		scale (umoles)	Tm [⊙]		
	calculated	measured	OD	nmol				
51.4	8.011,7	8.023,5	6,4	21,2	0,2	64,9		
vol. for 100pmol/ul		Purification		Modification				
711		MOPC						

Username: 1st bioMerieux service engineer

Measurement parameters

Reader: 270

Instrument serial number: 1211006960

Measurement mode: Absorbance

Measurement wavelength: 450 nm

Read mode: Normal

Unit: OD

Date: 03/16/19, Time: 4:37:12 PM

Raw data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.212	1.878	0.175	0.231	0.202	0.112	0.147	0.199	0.223	0.155	0.131	0.195
B	1.288	1.556	0.226	0.132	0.242	0.18	0.209	0.181	0.19	0.146	0.177	0.127
C	0.908	0.734	0.246	0.172	0.156	0.228	0.245	0.209	0.223	0.255	0.246	0.218
D	0.482	0.354	0.218	0.182	0.251	0.195	0.192	0.238	0.222	0.172	0.225	0.187
E	0.224	0.31	0.24	0.194	0.222	0.174	0.268	0.202	0.275	0.215	0.279	0.223
F	0.119	0.185	0.23	0.256	0.282	0.24	0.283	0.261	0.213	0.237	0.274	0.2
G	0.121	0.089	0.244	0.194	0.223	0.193	0.211	0.283	0.281	0.225	0.276	0.232
H	0.058	0.048	0.26	0.238	0.288	0.284	0.311	0.253	0.278	0.204	0.276	0.228

Username: 1st bioMerieux service engineer

Measurement parameters

Reader: 270
Instrument serial number: 1211006860
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 03/17/19, Time: 3:29:25 PM

Raw data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.858	2.186	0.164	0.106	0.123	0.167	0.211	0.155	0.153	0.183	0.178	0.128
B	1.531	1.263	0.132	0.216	0.189	0.129	0.159	0.121	0.194	0.148	0.17	0.128
C	0.921	0.713	0.21	0.146	0.153	0.223	0.232	0.188	0.216	0.19	0.149	0.183
D	0.395	0.409	0.209	0.175	0.156	0.206	0.231	0.205	0.225	0.187	0.206	0.166
E	0.223	0.295	0.313	0.261	0.333	0.301	0.304	0.25	0.321	0.269	0.333	0.285
F	0.172	0.124	0.248	0.314	0.322	0.304	0.266	0.302	0.301	0.243	0.264	0.318
G	0.112	0.084	0.283	0.315	0.345	0.299	0.315	0.251	0.343	0.307	0.348	0.284
H	0.058	0.052	0.297	0.281	0.342	0.314	0.312	0.262	0.327	0.259	0.322	0.29

VDR Plate 3

Username: 1st bioMerieux service engineer

Measurement parameters

Reader: 270
Instrument serial number: 1211005880
Measurement mode: Absorbance
Measurement wavelength: 450 nm
Read mode: Normal
Unit: OD
Date: 03/17/19, Time: 3:41:09 PM

Raw data

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2.191	1.875	0.21	0.154	0.186	0.146	0.128	0.184	0.219	0.171	0.194	0.216
B	1.534	1.284	0.227	0.191	0.231	0.167	0.224	0.152	0.197	0.259	0.261	0.215
C	0.706	0.932	0.222	0.172	0.199	0.231	0.213	0.169	0.216	0.25	0.237	0.199
D	0.479	0.333	0.25	0.176	0.24	0.194	0.236	0.208	0.27	0.218	0.282	0.216
E	0.22	0.306	0.058	0.06	0.062	0.061	0.058	0.058	0.056	0.057	0.062	0.058
F	0.187	0.119	0.061	0.058	0.058	0.057	0.061	0.062	0.058	0.062	0.06	0.056
G	0.115	0.087	0.057	0.058	0.057	0.058	0.059	0.058	0.061	0.059	0.058	0.062
H	0.082	0.056	0.059	0.061	0.061	0.06	0.057	0.059	0.059	0.061	0.057	0.057

Name : dr. Ami Febriza Achmad
 Date : 16-3-2019
 Plate : 1
 Assay : Gen CAMP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	A01 ✓	A01 ✓	A01 ✓	A02 ✓	A02 ✓	A02 ✓	A03 ✓	A03 ✓	A03 ✓
B	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	A04 ✓	A04 ✓	A04 ✓	A05 ✓	A05 ✓	A05 ✓	B01 ✓	B01 ✓	B01 ✓
C	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	B02 ✓	B02 ✓	B02 ✓	B03 ✓	B04 ✓	B05 ✓	B04 ✓	B04 ✓	B04 ✓
D	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	B05 ✓	B05 ✓	B05 ✓	C01 ✓	C01 ✓	C01 ✓	C02 ✓	C02 ✓	C02 ✓
E	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	C03 ✓	C04 ✓	C05 ✓	C04 ✓	C04 ✓	C04 ✓	C05 ✓	C05 ✓	C05 ✓
F	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	D01 ✓	D01 ✓	D01 ✓	D02 ✓	D02 ✓	D02 ✓	D03 ✓	D03 ✓	D03 ✓
G	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	D04 ✓	D04 ✓	D04 ✓	D05 ✓	D05 ✓	D05 ✓			
H												

Remarks : 40 Cycle ; 94 C - 10 s and 56 C - 30 s

Name : dr. Ani Febriza Achmad

Date : 17-3-2019

Plate : 5

Assay : Gen CAMP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	A21 ✓	A21 ✓	A21 ✓	A22 ✓	A22 ✓	A22 ✓	A23 ✓	A23 ✓	A23 ✓
B	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	A24 ✓	A24 ✓	A24 ✓	A25 ✓	A25 ✓	A25 ✓	B21 ✓	B21 ✓	B21 ✓
C	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	B22 ✓	B22 ✓	B22 ✓	B23 ✓	B24 ✓	B25 ✓	B24 ✓	B24 ✓	B24 ✓
D	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	B25 ✓	B25 ✓	B25 ✓	C21 ✓	C21 ✓	C21 ✓	C22 ✓	C22 ✓	C22 ✓
E	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	C23 ✓	C24 ✓	C25 ✓	C24 ✓	C24 ✓	C24 ✓	C25 ✓	C25 ✓	C25 ✓
F	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	D21 ✓	D21 ✓	D21 ✓	D22 ✓	D22 ✓	D22 ✓	D23 ✓	D23 ✓	D23 ✓
G	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	D24 ✓	D24 ✓	D24 ✓	D25 ✓	D25 ✓	D25 ✓			
H												

Remarks : 40 Cycle ; 94 C - 10 s and 56 C - 30 s

Name : dr. Amri Febriza Achmad

Date : 17-3-2019

Plate : 4

Assay : Gen CAMP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	A16 ✓	A16 ✓	A16 ✓	A17 ✓	A17 ✓	A17 ✓	A18 ✓	A18 ✓	A18 ✓
B	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	A19 ✓	A19 ✓	A19 ✓	A20 ✓	A20 ✓	A20 ✓	B16 ✓	B16 ✓	B16 ✓
C	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	B17 ✓	B17 ✓	B17 ✓	B18 ✓	B18 ✓	B18 ✓	B19 ✓	B19 ✓	B19 ✓
D	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	B20 ✓	B20 ✓	B20 ✓	C16 ✓	C16 ✓	C16 ✓	C17 ✓	C17 ✓	C17 ✓
E	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	C18 ✓	C19 ✓	C11 ✓	C19 ✓	C19 ✓	C19 ✓	C20 ✓	C20 ✓	C20 ✓
F	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	D16 ✓	D16 ✓	D16 ✓	D17 ✓	D17 ✓	D17 ✓	D18 ✓	D18 ✓	D18 ✓
G	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	D19 ✓	D19 ✓	D19 ✓	D20 ✓	D20 ✓	D20 ✓			
H												

Remarks : 40 Cycle ; 94 C - 10 s and 56 C - 30 s

Name : dr. Anil Febriza Achmad

Date : 17-3-2019

Plate : 3

Assay : Geni CAMP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	A11 ✓	A11 ✓	A11 ✓	A12 ✓	A12 ✓	A12 ✓	A13 ✓	A13 ✓	A13 ✓
B	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	A14 ✓	A14 ✓	A14 ✓	A15 ✓	A15 ✓	A15 ✓	B11 ✓	B11 ✓	B11 ✓
C	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	B12 ✓	B12 ✓	B12 ✓	B13 ✓	B14 ✓	B15 ✓	B14 ✓	B14 ✓	B14 ✓
D	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	B15 ✓	B15 ✓	B15 ✓	C11 ✓	C11 ✓	C11 ✓	C12 ✓	C12 ✓	C12 ✓
E	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	C13 ✓	C14 ✓	C15 ✓	C14 ✓	C14 ✓	C14 ✓	C15 ✓	C15 ✓	C15 ✓
F	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	D11 ✓	D11 ✓	D11 ✓	D12 ✓	D12 ✓	D12 ✓	D13 ✓	D13 ✓	D13 ✓
G	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	D14 ✓	D14 ✓	D14 ✓	D15 ✓	D15 ✓	D15 ✓			
H												

Remarks : 40 Cycle : 94 C - 10 s and 56 C - 30 s

Name : dr. Anil Febrita Achmad

Date : 16-3-2019

Plate : 2

Assay : Gen CAMP

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	GAPDH-1 ✓	A06 ✓	A06 ✓	A06 ✓	A07 ✓	A07 ✓	A07 ✓	A08 ✓	A08 ✓	A08 ✓
B	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	GAPDH-2 ✓	A09 ✓	A09 ✓	A09 ✓	A10 ✓	A10 ✓	A10 ✓	B06 ✓	B06 ✓	B06 ✓
C	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	GAPDH-3 ✓	B07 ✓	B07 ✓	B07 ✓	B08 ✓	B09 ✓	B10 ✓	B09 ✓	B09 ✓	B09 ✓
D	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	GAPDH-4 ✓	B10 ✓	B10 ✓	B10 ✓	C06 ✓	C06 ✓	C06 ✓	C07 ✓	C07 ✓	C07 ✓
E	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	GAPDH-5 ✓	C08 ✓	C09 ✓	C10 ✓	C09 ✓	C09 ✓	C09 ✓	C10 ✓	C10 ✓	C10 ✓
F	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	GAPDH-6 ✓	D06 ✓	D06 ✓	D06 ✓	D07 ✓	D07 ✓	D07 ✓	D08 ✓	D08 ✓	D08 ✓
G	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	GAPDH-7 ✓	D09 ✓	D09 ✓	D09 ✓	D10 ✓	D10 ✓	D10 ✓			
H												

Remarks : 40 Cycle ; 94 C - 10 s and 56 C - 30 s

do Ami
List Berat Badan dan Dosis Pengobatan

NO	KIP	Kode Mersit	BB Awal	Berat Badan dan Dosis Pengobatan												BB 2 minggu setelah pengobatan
				Hari 1		Hari 2		Hari 3		Hari 4		Hari 5		Hari 6		
				BB	Dosis	BB	Dosis	BB	Dosis	BB	Dosis	BB	Dosis		BB	
1	Ag BB Mersit	Kepala	35.0	30.1	6.0	31.2	6.3	32.5	6.3	33.5	6.3	33.0	6.4	33.0	31.2	
2		Punggung	33.1	32.5	6.5	33.0	6.6	34.2	6.8	35.1	7.0	35.0	7.1	35.3	32.6	
3		Ekor	31.7	30.8	6.3	31.2	6.2	32.7	6.5	33.5	6.1	33.1	6.0	33.2	30.6	
4		K. Depan KA	40.8	38.9	7.8	40.5	8.1	41.8	8.4	42.4	8.5	42.4	8.3	44.5	40.6	
5		K. Depan KI	34.1	33.8	6.8	34.2	6.8	35.4	6.7	35.7	6.5	35.8	6.7	36.1	34.0	
6	K. Belakang	35.3	33.8	6.6	33.5	6.7	35.2	6.8	35.5	6.7	35.8	6.8	35.8	34.0		
7	Ag BB Mersit	Kepala	33.5	32.5	25.8	33.7	33.5	34.5	33.7	34.7	33.8	34.8	33.8	35.1	33.3	
8		Punggung	34.1	31.2	17.4	32.8	18.8	32.3	32.8	32.8	33.0	32.8	32.3	33.3	31.8	
9		Ekor	35.4	34.0	13.4	35.1	12.5	32.3	32.8	33.0	33.2	33.1	33.3	34.1	32.2	
10		K. Depan KA	51.3	50.2	12.0	51.4	13.6	51.3	12.6	52.6	12.6	52.6	12.8	53.5	51.5	
11		K. Depan KI	34.2	32.8	18.1	33.7	13.5	35.6	13.4	35.9	13.8	36.2	13.7	36.2	34.2	
12	K. Belakang	30.0	28.7	13.3	30.1	12.8	30.7	12.3	30.5	13.0	31.0	13.2	34.3	30.0		
13	Ag BB Mersit	Kepala	30.4	30.0	6.8	30.2	6.8	30.4	29.8	6.0	30.4	6.1	30.8	6.3	30.5	30.0
14		Punggung	31.1	30.1	9.8	30.7	9.9	30.1	30.8	9.4	30.7	10.7	9.5	30.5	30.8	30.1
15		Ekor	31.6	30.2	6.8	30.82	6.3	30.4	42.2	4.2	30.5	32.0	6.4	30.8	30.6	30.1
16		K. Depan KA	39.4	37.2	9.4	38.87	9.7	39.8	9.6	40.1	10.1	39.2	9.2	39.5	39.4	38.5
17		K. Depan KI	31.7	29.5	9.8	30.18	10.0	30.2	30.4	6.5	31.1	33.7	6.7	33.8	30.4	30.8
18	K. Belakang	25.8	25.0	9.8	25.8	11.1	26.0	12.5	26.0	6.3	26.0	11.8	8.8	22.0	25.8	

NO	KIP	Kode Mersit	BB Awal	Berat Badan dan Dosis Pengobatan												BB 2 minggu setelah pengobatan
				Hari 1		Hari 2		Hari 3		Hari 4		Hari 5		Hari 6		
				BB	Dosis	BB	Dosis	BB	Dosis	BB	Dosis	BB	Dosis		BB	
19	Ag BB Mersit	Kepala	38.0	35.4	3.5	36.0	3.5	37.5	3.7	37.3	3.7	36.4	3.6	37.1	38.0	
20		Punggung	36.5	35.0	1.4	37.0	3.6	37.4	3.7	38.2	3.7	38.0	3.7	38.8	36.8	
21		Ekor	32.8	30.1	2.8	33.4	3.3	34.2	3.8	34.5	3.4	34.2	3.4	34.2	35.2	
22		K. Depan KA	40.5	37.2	3.6	40.8	4.0	41.0	4.0	42.4	4.2	42.2	4.1	44.1	40.2	
23		K. Depan KI	32.3	30.3	1.0	33.5	1.8	34.0	2.8	34.1	3.3	34.3	3.4	35.8	32.0	
24	K. Belakang	39.5	38.0	1.7	39.2	1.8	40.4	4.0	39.8	3.9	39.9	3.9	39.7	40.8		
25	Ag BB Mersit	Kepala	33.5	27.3		25.1		23.8		24.8		25.4		26.8	23.8	
26		Punggung	38.7	36.8		33.8		33.3		35.2		36.0		37.1	36.1	
27		Ekor	34.8	30.1		31.0		32.4		32.7		33.1		34.0	34.0	
28		K. Depan KA	33.5	32.5		32.0		31.8		31.8		32.0		32.8	32.8	
29		K. Depan KI	36.8	34.8		34.0		34.6		35.1		36.0		36.3	36.3	
30	K. Belakang	40.6	38.2		37.6		38.7		38.7		37.5		38.3	38.3		

LAMPIRAN FOTO PENELITIAN





