

DISERTASI

**MENGETAHUI EFEK EKSTRAK DAUN MIANA
TERHADAP PERTUMBUHAN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
MELALUI EKSPRESI NRAMP-1**

**THE EFFECTS OF MIANA LEAF EXTRACT
ON THE GROWTH OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
THROUGH NRAMP-1 EXPRESSION**



Titis Dewi Wahyuni

NIM: C013172020

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

2021

DISERTASI

**MENGETAHUI EFEK EKSTRAK DAUN MIANA TERHADAP PERTUMBUHAN
KLEBISSELLA PNEUMONIAE MELALUI EKSPRESI NRAMP-1**

Disusun dan diajukan oleh

TITIS DEWI WAHYUNI
C013172020

*Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian yang dibentuk dalam rangka
Penyelesaian Studi Program Studi Doktor Ilmu Kedokteran
Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin
pada tanggal, 20 Juli 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan*

Menyetujui
Promotor,

Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K)
Nip. 19570416198503 1 001

Co. Promotor

Co. Promotor

dr. Arif Santoso, Sp.P(K), Ph.D, FAPSR
Nip. 19770715-200604 1 012

dr. Agussalim Buhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
Nip. 19700821-199903 1 001

Ketua Program Studi S3
Ilmu Kedokteran,

Dekan Fakultas Kedokteran
Universitas Hasanuddin,

dr. Agussalim Buhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK(K)
Nip. 19700821-199903 1 001

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

ABSTRAK

TITIS DEWI WAHYUNI. Mengetahui Efek Ekstrak Daun Miana terhadap Pertumbuhan *Klebsiella Pneumoniae* Melalui Ekspresi (dibimbing oleh Mochammad Hatta, Arif Santoso, dan Agussalim Bukhari).

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak miana pada mencit BALB/c terhadap pertumbuhan *klebsiella pneumonia* melalui ekspresi dan kadar protein natural *Resistance Associated Macrophage Protein 1* (NRAMP1).

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimen menggunakan model hewan dengan rancangan *posttest only controlled group design*. Dua puluh ekor mencit BALB/c jantan dewasa sehat secara acak dibagi menjadi empat kelompok yaitu: kelompok kontrol negatif (air suling), levofloxacin 100 mg/kg, injeksi intraperitoneal, kelompok perlakuan pertama (ekstrak daun miana/MLE 510 mg/kg), dan kelompok perlakuan kedua (miana + levofloxacin). MLE diberikan melalui gavage lambung selama sepuluh hari berturut-turut. Darah diambil dari tiap-tiap mencit pada hari ke-1, pada hari ke-8 percobaan (2 jam setelah perlakuan), dan pada hari ke-10. Sampel darah diperiksa dengan Elisa untuk mengetahui kadar protein NRAMP1. Analisis jumlah bakteri jaringan paru menggunakan *plate count* untuk melihat pertumbuhan *klebsiella pneumonia*.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa pemberian ekstrak daun miana pada mencit BALB/c menunjukkan efek menekan pertumbuhan *klebsiella* sebesar 40%. Adapun, levofloxacin menekan pertumbuhan *klebsiella* sebesar 100%. Ada peningkatan ekspresi mRNA gen NRAMP-1, tetapi tidak tinggi. Perbandingan ekspresi mRNA gen NRAMP-1 setelah perlakuan (hari ke-10) menunjukkan perbedaan yang bermakna dengan p value $r < 0,001$

Kata kunci: *klebsiella pneumonia*, BALB/c, NRAMP-1



ABSTRACT

TITIS DEWI WAHYUNI. *Knowing the Effect of Miana Leaf Extract on the Growth of Klebsiella Pneumoniae through NRAMP-1 Expression* (Supervised by **Mochammad Hatta, Arif Santoso, and Agussalim Buhkari**)

The aim of this study is to determine the effect of administration of Miana extracts in BALB/c mice on the growth of *Klebsiella pneumoniae* through the expressions and protein level of Natural Resistance Associated Macrophage Protein 1 (NRAMP 1). Medicinal plants have attracted attention as sources of antimicrobial substances. Medicinal plants are now used as primary or complementary therapies to increase immunity or maintain health and fitness. One of medicinal plants used in the Toraja ethnic community (in the province of South Sulawesi, Indonesia) is miana (*Coleus scutellarioides*, [L] Benth). A preliminary study in 2013 in Tana Toraja conducted finds that people have used miana leaves for the treatment of tuberculosis. Therefore, the use of miana has the potential to be researched and developed. Miana (*Coleus scutellarioides* [L] Benth) inhibits growth of bacterial pathogen inside macrophage.

The research used experimental study using animal model with post test-only controlled group design. Twenty healthy adult male BALB/c mice were randomly divided into four groups namely: negative control group (distilled water), Levofloxacin 100 mg/kg, injection intraperitoneal, first treatment group (Miana leaves extract/MLE 510 mg/kg) and second treatment group (Miana + Levofloxacin). MLE was administered via gastric gavage for ten consecutive days. The blood was drawn from each mice on the first day, on the eight day of experiment (2 h after treatment) and at 10 days. The blood sample was examined by ELISA to determine the NRAMP 1 protein level. Analysis of the number of lung tissue bacteria used Plate count to see the growth of *Klebsiella pneumoniae*.

The result show that the administration of miana leaf extract in BALB/c mice is shown the effect of suppressing the growth of *Klebsiella* by 40 %. While levofloxacin suppresses *Klebsiella* growth by 100%. There is an increase in NRAMP-1 gene mRNA expression but not high. The comparison of NRAMP-1 gene mRNA expression after treatment (Day 10) shows a significant difference with p value $p < 0.001$.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, BALB/c, NRAMP-1





KEMENTERIAN PENDIDIKAN, KEBUDAYAAN, RISET DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
FAKULTAS KEDOKTERAN
PROGRAM STUDI DOKTOR ILMU KEDOKTERAN
Jl. Perintis Kemerdekaan Km. 10 Makassar 90245 Telp.(0411)586010,(0411)586297
EMAIL : s3kedokteranunhas@gmail.com

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Titis Dewi Wahyuni
NIM : C013172020
Program Studi : Doktor Ilmu Kedokteran
Jenjang : S3

Menyatakan dengan ini bahwa karya tulisan saya berjudul :

Analisis Ekspresi NRAMP-1 Setelah Pemberian Ekstrak Daun Miana pada Mencit yang terinfeksi *Klebsiella Pneumoniae*.

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

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

Makassar, 19 Juli 2021

Yang menyatakan,



Titis Dewi Wahyuni

PRAKATA

Puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT dan sholawat tercurah kepada baginda Rasul Muhammad SAW bahwa atas restu dan karunia-Nya sehingga penyusunan disertasi dengan judul “Mengetahui efek Ekstrak Daun Miana terhadap Pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* melalui ekspresi NRAMP-1” dapat terselesaikan dengan baik dan lancar. Penulis menyadari sepenuhnya disertasi ini dapat diselesaikan berkat bantuan, bimbingan, arahan, saran, koreksi dan dukungan dari berbagai pihak. Oleh karena itu dalam kesempatan ini penulis ingin menghanturkan terima kasih yang sebesar-besarnya dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

1. Prof. dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK(K), selaku promotor yang dengan penuh perhatian dan kearifan senantiasa memotivasi, membuka wawasan, membimbing, mendorong dan meluangkan waktu di tengah kesibukan bagi penulis sejak awal penelitian ini hingga pada akhir penulisan disertasi ini.
2. dr. Agussalim Bukhari, M.Med, Ph.D, Sp.GK (K), selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.
3. dr. Arif Santoso, Ph.D, Sp.P(K), selaku ko-promotor dengan penuh perhatian dan penuh kesabaran memberi semangat, motivasi, ide-ide, merangkul dan membantu sejak awal penelitian hingga selesainya disertasi ini.
4. Dr. dr. Agus Dwi Susanto, Sp.P(K), selaku penguji yang sangat berkompeten dibidangnya yang telah memberikan dukungan sejak awal penelitian dan mendukung sebagai ketua PDPI Pusat untuk terlaksananya penelitian ini.
5. Prof. dr. Andi Asadul Islam, Sp.BS-FISC , Prof. dr. Muh. Nasrum Massi, PhD, SpMK(K), Dr. dr. Ilhamjaya Patelloji, M.kes, Dr. dr. Irawaty Djaharuddin, Sp.P(K), Dr. dr. Nur Ahmad Tabri, Sp.PD(K). Sp.P selaku penguji yang berkompeten dibidangnya yang tidak lelah memberikan masukan, saran-saran dan nasehat yang sangat berguna bagi penyempurnaan disertasi ini.
6. Prof. Dr. Dr. dr. Eka Julianta Wahjoepramono, SpBS, PhD sebagai Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Pelita Harapan dan selaku pendukung utama yang selalu mendorong semangat untuk maju dan berprestasi baik di tingkat Nasional maupun Internasional.

7. dr. Grace Frelita, MM selaku pimpinan Siloam Hospital yang telah memberikan dukungan kepada penulis dalam masa pendidikan ini.

8. Prof. Dr. dr. F.X. Budhianto Suhadi, Sp.PK(K), M.M. Dr. dr. Allen Widysanto, Sp.P, Dr. dr. Jacobus Jeno Wibisono, Sp. OG di Rumah Sakit Siloam Hospital Lippo Village maupun Fakultas Kedokteran Universitas Pelita Harapan, selaku motivator dan pendukung utama terselesaikannya proses pendidikan ini.

9. Khusus untuk suami tercinta drg. Edy Taher dan anakku, Muhammad Alvin Firdaus yang selalu memberikan dukungan, semangat, dan doa serta pengorbanan yang sangat besar dengan penuh keseriusan dan pengertiannya mendampingi penulis menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

10. Mama dan papa tercinta, H. Bagindo Sudirman dan Hj, Jurmadara yang terus memberikan dukungan moril, doa dan semangat untuk penulis unruk menyelesaikan penelitian dan pendidikan ini.

11. Almarhum angku H. Muhammad Taher dan almarhumah Umi Kasiah, Rahimahullah

12. Seluruh saudara kandung dan kak ipar, tante dan om, sepupu serta ponakan yang telah mendukung saya untuk menyelesaikan pendidikan ini.

14. Ucapan terimakasih dan penghargaan juga disampaikan kepada semua pihak yang tidak dapat saya sampaikan satu demi satu yang telah dengan tulus serta segenap hati membantu saya sejak awal hingga akhir terselesaikannya proses pendidikan dan penelitian ini.

Saya juga menghanturkan maaf sebesar-besarnya apabila terdapat kesalahan dalam penyusunan disertasi ini. Semoga Disertasi ini dapat dijadikan panduan dan bermafaat bagi banyak orang.

Makassar, 19 Juli 2021

Titis Dewi Wahyuni

DAFTAR ISI

PRAKATA

LEMBAR PENGESAHAN

ABSTRAK

ABSTRACT

SURAT PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

DAFTAR ISI	2
DAFTAR TABEL	5
DAFTAR ILUSTRASI	6
BAB I. PENDAHULUAN.....	7
I.1 Latar Belakang.....	7
I.2 Rumusan Masalah.....	10
I.3 Tujuan Penelitian.....	11
I.4 Manfaat Penelitian.....	11
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	13
II.1 Pneumonia	13
II.1.1. Definisi.....	13
II.1.2 Penyebab pneumonia	13
II.1.3 Gejala pneumonia	15
II.1.4 Komplikasi pneumonia	18
II.1.5 Diagnosis pneumonia.....	18
II.1.6 Tatalaksana pneumonia	18
II.2 Klebsiella pneumoniae.....	22
II.2.1 Epidemiologi Klebsiella.....	23
II.2.2 Struktur <i>Klebsiella pneumoniae</i>	26
II.3 Makrofag	27
II.3.1 Perkembangan Makrofag	28
II.3.2. Mekanisme kerja makrofag	28

II.3.3. Fungsi makrofag	29
II.3.4. Aktivasi makrofag	29
II.4 Natural Resistance Associate Macrophage Protein-1 (NRAMP-1)....	30
II.5 Miana (<i>Coleus Scutellariodes [L] Benth</i>)	39
II.6 Penelitian pneumonia pada mencit	43
II.7 Levofloksasin	45
BAB III KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN	
HIPOTESIS.....	55
III.1 Kerangka Teori.....	56
III.2 Kerangka Konsep.....	56
III.3 Variabel Penelitian.....	56
III.4 Definisi Operasional.....	57
BAB IV METODE PENELITIAN.....	59
IV.1 Desain Penelitian.....	59
IV.2 Populasi dan Subjek Penelitian.....	59
IV.3 Tempat dan Waktu Penelitian.....	59
IV.4 Bahan Penelitian.....	59
IV.5 Protokol Penelitian	63
IV.5.1 Prosedur ELISA	64
IV.5.2. Perhitungan Hasil ELISA	66
IV.5.3. Prosedur Ekstraksi Asam Nukleat RNA dan DNA	67
IV.5.4. Prosedur Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR) untuk menentukan profil ekspresi mRNA gen target.....	68
IV.5.5. Prosedur Perhitungan Kurva Kalibrasi dengan Ct (cycle threshold)	68
IV.6 Cara perhitungan sampel	69
IV.7 Kriteria inklusi dan eksklusi	69
IV.8 Analisa Statistik.....	70
IV.9 Alur penelitian	71
IV.10 Pengolahan Data	72
IV.11 Uji Statistik	72
IV.12 Etika Penelitian	72

BAB V HASIL PENELITIAN	73
V.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian.....	73
V.2 Gambaran Karakteristik Variabel Terkait	74
BAB VI PEMBAHASAN.....	83
VI.1 Gambaran Karakteristik Sampel Penelitian	84
VI.2 Ekspresi mRNA gen NRAMP-1 dan Pertumbuhan <i>Klebsiella pneumoniae</i>	84
VI.3. Pengaruh Ekstrak Daun Miana Terhadap Kadar Protein NRAMP-1	87
VI.4. Efek Pemberian Ekstrak Daun Miana terhadap Pertumbuhan <i>Klebsiella</i>	88
VI.4 Ringkasan Hasil Penelitian	91
VI.5 Keterbatasan Penelitian	91
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	93
VI.1 Kesimpulan.....	93
VI.2 Saran.....	93
Daftar	94
pustaka.....	

DAFTAR TABEL

Tabel 1.1	Penyebab pneumonia komunitas menurut ATS/IDSA 2007.....	14
Tabel 1.2	Sistem skor berdasarkan <i>Pneumonia Severity Index</i>	17
Tabel 1.3	Terapi antibiotik empiris pada HAP atau VAP yang direkomendasikan sesuai jenis kuman.....	20
Tabel 1.4.	Dosis antibiotika empiris intravena pada pasien VAP, HAP dan HCAP dewasa onset lambat atau memiliki faktor risiko kuman MDR	21
Tabel 1.5	Karakteristik <i>Klebsiella pneumoniae</i> strains klasik dan Hipervirulen	22
Tabel 1.6	Karakteristik infeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i> nosokomial dan community.....	25
Tabel 1.7.	Penelitian Ekstrak Daun miana Invitro dan Animal model	43
Tabel 5.1	Perbandingan Berat Mencit BALB/c Pada Pengamatan Selama Sembilan Hari.....	73
Tabel 5.2	Perbandingan Dosis Ekstrak Daun Miana Pada Pengamatan.....	73
Tabel 5.3	Data Ekspresi mRNA nRAMP-1 Hari 0, 8 dan 10	74
Tabel 5.4	Data Kadar Protein nRAMP-1 Hari 0, 8, dan 10	74
Tabel 5.5	Perbedaan mean nilai kultur jaringan paru pada mencit yang terinfeksi <i>Klebsiella pneumoniae</i>	75
Tabel 5.6	Perbedaan efek pertumbuhan <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Antara empat kelompok intervensi.	75
Tabel 5.7	Deskripsi Ekspresi Nramp-1 pada berbagai waktu observasi dan pertumbuhan <i>Klebsiella pneumoniae</i> . masing masing kelompok intervensi.....	76
Tabel 5.8	Perbandingan Antara Ekspresi mRNA gen nRAMP-1 Sebelum dan Sesudah Perlakuan Pada Keempat Kelompok.....	76
Tabel 5.9	Perbedaan Ekspresi nRAMP-1 Sesudah pemberian ekstrak daun miana Pada kedua Kelompok pengamatan hari 1-8	77
Tabel 5.10	Perubahan Ekspresi Gen NRAMP-1 setelah pemberian ekstrak daun mianapada kedua kelompok pada pengamatan hari 8-10	77
Tabel 5.11	Perubahan Protein Nramp setelah pemberian ekstrak daun Miana pada kedua kelompok pada pengamatan hari 1-8	77
Tabel 5.12	Perubahan Protein Nramp setelah pemberian ekstrak daun Miana pada kedua kelompok pada pengamatan hari 8-10	78

.....		
Tabel 5.13	Hubungan antara ekspresi Nramp, Protein Nramp dan Pertumbuhan Klebsiella	78

DAFTAR ILUSTRASI

Gambar 1.1	Penilaian berat pneumonia dengan menggunakan sistem skor CURB-65.....	16
Gambar 1.2	Empat faktor virulensi Strain <i>K. pneumoniae</i> (Kp) klasik dan hipervirulen.....	26
Gambar 1.3	Mekanisme innate immunity pada infeksi <i>K. pneumoniae</i>	27
Gambar 1.4	Makrofag (A) berusaha menjangkau bakteri (C) dan menangkapnya dengan perpanjangan membran yang disebut pseudopodia (B).....	29
Gambar 1.5	Regulasi zat besi	33
Gambar 1.6	Skema interaksi antara bakteri <i>Burkholderia</i> dan aktivitas NRAMP-1 di makrofag.	34
Gambar 1.7	Transport NRAMP Divalent-metal interaksi dengan pathogen	35
Gambar 1.8	Model fungsi NRAMP-1 dan Nramp2 dan contractile vacuole (CV) pada homeostasis zat besi.	36
Gambar 1.9	Regulasi metabolisme Fe terhadap patogen intraseluler	37
Gambar 1.10	Metabolism heme terhadap infeksi	38
Gambar 5.1	Gambaran Protein Nramp-1 pada masing-masing kelompok intervensi	79
Gambar 5.2	Deskripsi Ekspresi Nramp-1 pada berbagai Waktu Observasi masing-masing kelompok intervensi	80
Gambar 5.3	Deskripsi Protein Nramp-1 pada berbagai Waktu Observasi masing-masing kelompok intervensi	81

BAB I

PENDAHULUAN

I.1. Latar Belakang

Dalam beberapa tahun terakhir, tanaman obat telah menarik perhatian sebagai sumber zat antimikroba. (Romulo, Zuhud and Rondevaldova, 2018) Tanaman obat sekarang digunakan sebagai terapi primer atau komplementer untuk meningkatkan imunitas atau menjaga kesehatan dan kebugaran. Salah satu tanaman obat yang digunakan dalam komunitas etnis Toraja (di provinsi Sulawesi Selatan, Indonesia) adalah Miana (*Coleus scutellarioides*, (L) Benth) terkenal dengan nama Bulunangko atau bisa juga disebut Sare'hangko merupakan tanaman dari famili Labbiatae atau bayam-bayaman. Tanaman ini berasal dari daratan Afrika. Disetiap acara-acara yang diadakan penduduk setempat tanaman ini menjadi menu makanan yang wajib dihidangkan. Studi pendahuluan pada 2013 di Tana Toraja, menyimpulkan bahwa masyarakat telah menggunakan daun miana untuk pengobatan Tuberkulosis. Oleh karena itu, penggunaan miana menjadi potensi untuk diteliti dan dikembangkan. (Pakadang *et al.*, 2015)

Miana memiliki potensi dalam memodulasi sistem kekebalan melalui peningkatan sel CD 4, meningkatkan produksi IL 37 dan IL10 sebagai sitokin anti inflamasi. Selanjutnya, Miana mengubah ekspresi TLR 4 sebagai respons terhadap Lipopolisakarida pada bakteri gram negatif. Karena itu, Miana punya peran potensial yang signifikan dalam manajemen penyakit menular, baik sebagai alternatif atau adjuvant antibiotik. (Yanto *et al.*, 2020) Penggunaan ekstrak daun miana juga terbukti efeknya sebagai terapi patogen *A.actinomycescomitans* dari peningkatan ekspresi mRNA IL-10. (Amsyah *et al*, 2019) Pemberian ekstrak daun miana pada Balb/c yang terinfeksi *Salmonella typhi* juga menunjukkan respon penurunan ekspresi TLR-4 mRNA sehingga dapat dijadikan obat alternatif pada infeksi *Salmonella typhi*. (Syamsuri *et al*, 2018) Pada tikus Balb/c yang terinfeksi *Candida albicans* setelah diberikan ekstrak daun miana juga terjadi peningkatan ekspresi mRNA IL-37. (Karo *et al*, 2018)

Penelitian ekstrak daun miana juga terbukti memiliki efek antimikroba, anti-inflamasi yang memodulasi respon imun, meningkatkan proliferasi limfosit-T sebagai imunomodulator, meningkatkan imunitas, meningkatkan jumlah sel-T CD4, IFN- γ dan TNF- α dan menurunkan jumlah koloni *M. tuberculosis* pada paru-paru Wistar yang terinfeksi. Identifikasi faktor-faktor genetik yang mempengaruhi penyakit infeksi dapat memberikan wawasan baru mengenai mekanisme pertahanan terhadap infeksi. (Rante Pakadang *et al.*, 2015)

Resistensi atau kerentanan terhadap infeksi intraseluler patogen dikendalikan oleh *Natural resistance associated macrophage protein* (NRAMP-1) pada kromosom 1, dalam makrofag. (Govoni and Gros, 1998) Gen NRAMP-1 mempengaruhi fungsi makrofag dan berperan penting sebagai respon imun terhadap bakteri intraseluler. Selain itu NRAMP-1 kemungkinan mempunyai efek langsung pada kuman patogen dalam makrofag, tetapi bisa pula mempunyai pengaruh pleotropik termasuk pengaturan keseimbangan antara Th1 dan Th2 pada infeksi terhadap respon imun adaptif. (Ding *et al.*, 2014) NRAMP-1 memberikan efek immunomodulator yang mengaktifkan monosit dan membatasi pertumbuhan bakteri di makrofag. (Varahram *et al.*, 2009) Identifikasi kation divalen yang diangkut oleh protein NRAMP-1 di makrofag merupakan suatu potensi baru untuk terapi intervensi pada infeksi intraseluler. (Gruenheid and Gros, 2000) NRAMP-1 mempengaruhi pertumbuhan dan perkembangan infeksi paru, dan juga fungsi fagolisosom makrofag paru. (Diane E. Handy, Rita Castro, 2011) Nramp-1 mengatur aktivasi makrofag pada infeksi dan autoimun. Nramp-2 mengontrol anemia. Keduanya adalah transporter kation divalen (Fe²⁺, Zn²⁺ dan Mn²⁺). Nramp-2 berlokasi pada endosom, menghantarkan ke ekstraselular kation divalen dari cytosol ke fagolisosom. Fe²⁺ menyebabkan *antimicrobial hydroxyl radicals* via Fenton *reaction*. Zn²⁺ dan Mn²⁺ juga menyebabkan aktivitas fusi endosomal metalloprotease dan phagolysosome. Banyak studi tentang hubungan antara gen NRAMP-1 dan berbagai penyakit yang terkait dengan kekebalan seperti Mycobacteriosis, Salmonellosis dan Leshmaniasis. (Jabado *et al.*, 2000)(Blackwell *et al.*, 2000) Gen NRAMP1 juga diketahui membuat resistensi terhadap infeksi patogen seperti Salmonella, Leishmania, dan Mycobacterium pada tikus. (Cannone-Hegaux *et al.*, 1999)

Menurut *World Health Organization* (WHO), infeksi saluran napas bawah merupakan penyebab kematian infeksi paling sering di dunia dengan hampir 3,5 juta kematian per tahun dengan pneumonia sebagai salah satu penyakit penyebabnya. (Armstrong, Conn and Pinner, 1999). Angka kejadian pneumonia lebih sering terjadi negara berkembang seperti Indonesia. Pada tahun 2010, pneumonia termasuk dalam 10 besar penyakit rawat inap di rumah sakit dengan proporsi kasus 53.95% untuk laki-laki dan 46.05% untuk perempuan, dengan *crude fatality rate* (CFR) 7.6%, paling tinggi bila dibandingkan penyakit lainnya. Berdasarkan data RISKESDAS 2018 prevalensi pneumonia berdasarkan diagnosis tenaga kesehatan adalah sekitar 2,0% sedangkan pada tahun 2013 adalah 1.8%. (Kementerian Kesehatan RI Badan Penelitian dan Pengembangan, 2018). Penyebab pneumonia komunitas terbanyak di Indonesia adalah kuman Gram negatif yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* sedangkan penyebab pneumonia komunitas di negara lainnya adalah Gram positif yaitu *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, dll. (Profil Kesehatan Indonesia, 2016)

Secara historis, *K. pneumoniae* telah menyebabkan penyakit infeksi serius terutama pada orang yang mengalami gangguan imunitas, tetapi kemunculan dan penyebaran baru-baru ini dari varian yang hipervirulen memperluas jumlah orang yang rentan terhadap infeksi termasuk mereka yang sehat dan imunokompeten. Munculnya hipervirulen dan resistensi antibiotik telah mendorong sejumlah penelitian terbaru. Kemunculan varian *K. pneumoniae* yang sulit diterapi menantang dokter untuk mengevaluasi faktor inang dan bakteri selama infeksi. (Paczosa, 2016)

Pemberian Levofloksasin pada kasus pneumonia dilakukan karena dapat bekerja aktif melawan patogen seperti *Streptococcus pneumoniae*. (Fish and Chow, 1997; Kitzis *et al.*, 1999; Soussy *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 1999) Di Indonesia, penelitian mengenai penggunaan Levofloksasin terbukti menghasilkan bioavailabilitas sebesar 99% pada kasus pneumonia komunitas dibandingkan dengan obat lain seperti Siprofloksasin. (Fish and Chow, 1997; Depkes RI, 2005) Levofloksasin juga diketahui bersifat lebih bakterisidal dibandingkan Siprofloksasin. (Podschun and Ullmann, 1998; Schentag, 2000) Levofloksasin dapat menembus ke dalam sel fagosit secara *in vitro* yang signifikan dalam

melawan patogen intraseluler. Ketika berinteraksi dengan patogen, levofloksasin dapat merusak untai DNA yang kemudian akan mengganggu replikasi bakteri. (Hurst *et al.*, 2002)

Levofloksasin adalah golongan antibiotik bakterisidal yang dapat secara langsung menghambat sintesis DNA dari bakteri. (Tania, Sitepu and Harahap, 2016) Pertama, ketika levofloksasin berhasil masuk ke dalam sistem vaskular, levofloksasin akan bertemu dengan misel dan asam hialuronat. (Lu *et al.*, 2020) Misel adalah suatu partikel koloid yang memiliki inti hidrofobik dan lapisan luar hidrofilik yang dapat meningkatkan solubilitas dari obat. Misel dan asam hialuronat berfungsi sebagai karier dari agen antibiotik. Dari hal tersebut, kompleks dari misel, asam hialuronik, dan levofloksasin akan bertemu dengan leukosit polimorfonukleat (PMN) dan juga makrofag. Pada permukaan dari makrofag terdapat reseptor CD44 yang dapat berikatan dengan asam hialuronik. (Lu *et al.*, 2020) Dalam keadaan normal, CD44 ini tidak akan berikatan dengan asam hialuronik. Namun, jika terjadi inflamasi, asam hialuronik dapat berikatan dengan CD44. Sehingga, levofloksasin dapat masuk ke dalam makrofag melalui proses endositosis. (Lee-Sayer *et al.*, 2015)

Efek dari ekstrak daun miana sebagai anti-inflamatori pada patogen lain, fungsi NRAMP-1 dalam membuat resistensi terhadap patogen seperti Salmonella, Leishmania, dan Mycobacterium, dan pengetahuan tentang NRAMP-1 dalam memodulasi sistem kekebalan, penulis ingin meneliti lebih lanjut mengenai efek pemberian ekstrak daun miana terhadap ekspresi gen NRAMP-1 pada mencit yang terinfeksi patogen *Klebsiella pneumoniae*.

I.2. Rumusan Masalah

Apakah ada hubungan Pemberian Ekstrak daun miana terhadap ekspresi gen NRAMP-1 dan pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*.

Hipotesis

Terjadi peningkatan ekspresi gen NRAMP-1 dan penekanan pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* Setelah Pemberian Ekstrak daun Miana.

I.3. Tujuan Penelitian

Tujuan Umum

Untuk mengetahui efek Ekstrak daun miana terhadap ekspresi dan protein gen NRAMP-1 serta pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*.

Tujuan Khusus

1. Mengetahui efek pemberian ekstrak daun miana terhadap ekspresi dan protein gen NRAMP-1
2. Mengetahui efek pemberian ekstrak daun miana terhadap pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae*.
3. Mengetahui perbedaan efek antara ekstrak daun miana dan Levofloksasin terhadap ekspresi dan protein gen NRAMP-1

I.4. Manfaat Penelitian

Manfaat dari segi keilmuan

Dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan dapat menambah pengetahuan tentang peran ekstrak daun miana pada pertumbuhan *Klebsiella pneumoniae* serta perubahan ekspresi dan protein gen NRAMP-1

Manfaat bagi pelayanan

- Dari hasil penelitian ini peneliti berharap agar dengan adanya ekspresi dan protein gen NRAMP-1 dapat dihubungkan dengan keberhasilan terapi.
- Pemberian ekstrak daun miana dapat digunakan sebagai terapi komplement pada infeksi karena *Klebsiella pneumoniae*.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1. PNEUMONIA

Pneumonia adalah infeksi akut parenkim paru yang ditandai dengan sedikitnya dua dari gejala : demam, batuk yang baru muncul dengan atau tanpa produksi sputum atau batuk kronik disertai perubahan pada warna sputum, nyeri dada dan sesak napas. Pemeriksaan auskultasi sesuai dengan pneumonia (ronki basah kasar, suara napas bronkial) dan terdapat infiltrat baru pada foto toraks. Peradangan paru yang disebabkan oleh nonmikroorganisme (bahan kimia, radiasi, aspirasi bahan toksik, obat-obatan dan lain-lain) disebut pneumonitis. (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2003) Berdasarkan klinis dan epidemiologis, pneumonia dibedakan atas pneumonia komunitas (*Community-Acquired Pneumonia = CAP*), Pneumonia didapat di rumah sakit (*Hospital-Acquired Pneumonia = HAP, Health Care Associated Pneumonia = HCAP*) dan pneumonia akibat pemakaian ventilator (*Ventilator Associated Pneumonia = VAP*). (Mandell *et al.*, 2007) Pneumonia komunitas adalah peradangan akut pada parenkim paru yang didapat di masyarakat. (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2003)

II.1.1. PENYEBAB PNEUMONIA

Pneumonia dapat disebabkan oleh berbagai macam kuman, yaitu bakteri, virus, jamur dan protozoa. (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2003) Penelitian di berbagai negara melaporkan bahwa patogen yang biasa ditemukan pada pneumonia komunitas adalah gram positif seperti *Streptococcus pneumoniae* dan *Haemophilus influenzae* dan kuman atipik *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* dan *Legionella pneumophila*. Pneumonia komunitas yang berat biasanya berhubungan

dengan *Streptococcus pneumoniae* and *Legionella pneumophila*. Patogen yang jarang ditemukan adalah *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Menurut ATS/IDSA 2007 penyebab pneumonia komunitas dibagi berdasarkan tipe pasien yang dapat dilihat pada tabel 1 (Mandell *et al.*, 2007)

Tabel 1.1. Penyebab pneumonia komunitas menurut ATS/IDSA 2007

Tipe pasien	Etiologi
Rawat jalan	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Chlamidophila pneumoniae</i> <i>Virus respirasi</i>
Rawat inap (non ICU)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamidophila pneumoniae</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Legionella spp</i> <i>Aspirasi</i> <i>Virus respirasi</i>
Rawat ICU	<i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Legionella spp</i> Basil gram negatif <i>Haemophilus influenzae</i>

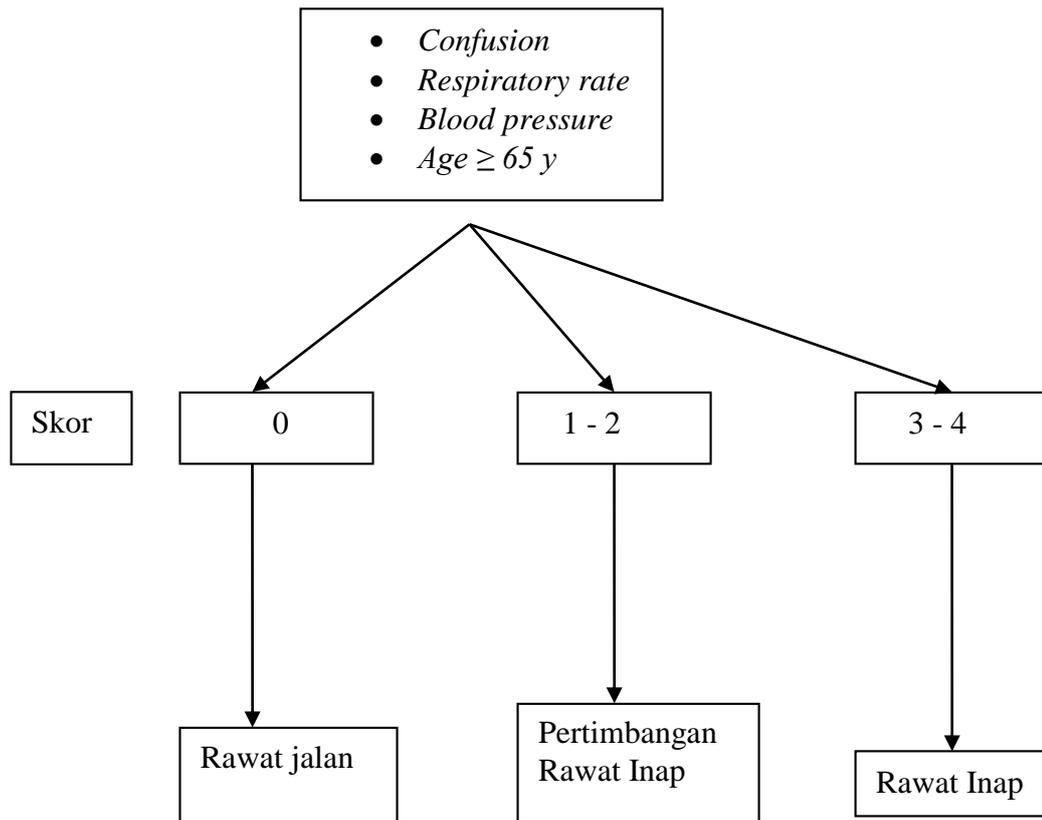
Dikutip dari (Mandell *et al.*, 2007)

Hasil tersebut berbeda dengan penelitian di Indonesia yang melaporkan penyebab terbanyak pneumonia komunitas pada pasien rawat inap adalah kuman gram negatif seperti *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* sedangkan gram positif seperti *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus viridans* dan *Staphylococcus aureus* ditemukan dalam jumlah sedikit. Berdasarkan data tahun 2012 di beberapa RS di Indonesia, kuman gram negatif merupakan penyebab pneumonia komunitas tersering, antara lain *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter pneumoniae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Data Surveilans Sentinel SARI (*Severe Acute Respiratory Infection*) tahun 2010 oleh Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Republik Indonesia (RI) mendapatkan *Klebsiella pneumoniae* (29%) sebagai penyebab terbanyak pneumonia

diikuti *Acinetobacter baumannii* (27%), *Staphylococcus aureus* (16%), *Streptococcus pneumoniae* (12%), *Acinetobacter calcoaticus* (8%), *Pseudomonas aeruginosa* (6%) dan *Escherichia coli* (2%). Tahun 2013 Faisal dkk melakukan penelitian pada pasien rawat inap dengan pneumonia komunitas di RSUP Persahabatan. Dari biakan sputum sebagian besar ditemukan kuman gram negatif yaitu *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*. Selain gram negatif, ditemukan juga gram positif yaitu *Streptococcus viridans* namun dalam jumlah sedikit.(Faisal *et al.*, 2014)

II.1.3. GEJALA PNEUMONIA

Penatalaksanaan yang optimal memerlukan pengenalan yang tepat akan derajat berat penyakit pada pasien untuk menghindari terjadi kesalahan dalam penentuan perlu tidaknya perawatan rumah sakit atau rawat jalan sehingga angka kematian karena pneumonia dan biaya perawatan rumah sakit dapat ditekan. Sistem skoring prognosis digunakan tidak hanya untuk menentukan prediksi kematian melainkan juga untuk menentukan tempat perawatan pada pasien pneumonia. Sistem skor yang digunakan untuk hal ini antara lain *pneumonia severity index* (PSI) yang dipakai oleh ATS/IDSA dan CRB-65 (confusion, respiratory rate, blood pressure and age > 65 years) yang dipakai oleh *British Thoracic Society* (BTS). *Pneumonia severity index* sangat baik untuk mengidentifikasi pasien dengan tingkat mortalitas yang rendah akan tetapi kurang baik dalam mendeteksi penyakit dengan tingkat mortalitas yang lebih berat terutama pada pasien usia muda tanpa penyakit penyerta. Sistem CRB-65 lebih ideal digunakan untuk mengidentifikasi pasien dengan tingkat mortalitas yang tinggi pada pneumonia komunitas.(Faisal *et al.*, 2014):(Niederman, 2007) Sistem skoring berdasarkan CRB-65 dan PSI dapat dilihat pada gambar 1 dan tabel 4.



Gambar 1.1. Penilaian berat pneumonia menggunakan sistem skor CURB-65

Dikutip dari (Armitage and Woodhead, 2007)

Tabel 1.2. Sistem skor berdasarkan *Pneumonia Severity Index*

Karakteristik pasien	Jumlah Poin
Faktor demografi	
Usia : laki-laki	Usia (tahun)
Perempuan	Usia (tahun) - 10
Perawatan di rumah	+10
Penyakit penyerta	
Keganasan	+30
Penyakit hati	+20
Gagal jantung kongestif	+10
Penyakit serebrovaskular	+10
Penyakit ginjal	+10
Pemeriksaan fisis	
Perubahan status mental	+20
Pernapasan > 30 kali/menit	+20
Tekanan darah sistolik < 90 mmHg	+20
Suhu tubuh < 35°C atau > 40°C	+15
Nadi > 125 kali/menit	+10
Hasil laboratorium / Radiologi	
Analisis gas darah arteri pH < 7,35	+30
BUN > 64 mg/dL	+20
Natrium < 130 mEq/liter	+20
Glukosa > 250 mg/dL	+10
Hematokrit < 30%	+10
PO ₂ < 60 mmHg atau sat. O ₂ < 90%	+10
Efusi pleura	+10

Total poin	Risiko	kelas Risiko	Mortalitas	Perawatan
Tidak diprediksi	Rendah	I	0,1%	Rawat jalan
≤70		II	0,6%	Rawat jalan
71 – 90		III	2,8%	Rawat inap/ jalan
91 – 130	Sedang	IV	8,2%	Rawat inap
> 130	Berat	V	29,2%	Rawat inap

Dikutip dari (Lim *et al.*, 2009)

II.1.4. KOMPLIKASI PNEUMONIA

Komplikasi yang paling banyak pada kasus CAP adalah parapneumonic efusi, kadangkala dengan empyema yang membutuhkan drainase cairan pleura. Abses paru adalah komplikasi yang bisa terjadi juga yang disebabkan kuman anaerob, *S aureus*, Gram negatif dan *S milleri*. Pemberian antibiotik jangka lama bisa mencapai 6 minggu tergantung respons klinis. (Kollef, 2005)

II.1.5. DIAGNOSIS PNEUMONIA

Diagnosis pneumonia adalah berdasarkan gambaran klinis batuk, demam. Produksi sputum dan nyeri dada dan didukung dengan gambaran ronsen toraks. Pemeriksaan fisik ditemukan suara napas bronkial dan ronki. CT scan lebih sensitif untuk diagnosis pneumonia. Pemeriksaan mikrobiologi juga penting untuk diagnosis pneumonia. Patogen yang spesifik harus dicari untuk memutuskan terapi antibiotik secara individual. Kualitas sputum yang buruk untuk pemeriksaan mikrobiologi mempengaruhi hasil. Sehingga dibutuhkan metodologi molekular dibanding kultur. (Society., 1995)

Tes diagnostik rutin untuk identifikasi etiologi pada pasien rawat jalan adalah optional. Kultur darah dan sputum harus diambil pada kasus rawat inap. Pewarnaan Gram dan kultur sputum harus dilakukan jika spesimen kualitas bagus dan tersedia fasilitas pemeriksaan yang bagus. Pada pneumonia berat, minimal harus diperiksa kultur darah dan urin dan sputum. Untuk pasien yang diintubasi diperiksa aspirasi endotrakeal. Kultur lain bisa diambil dari cairan pleura, cairan BAL, aspirasi trakeal (Society., 1995)

II.1.6. Tatalaksana Pneumonia

Kesembuhan pasien HAP dapat dicapai dengan pemberian antibiotik kombinasi yang tepat dan kuman penyebabnya masih sensitif dengan antibiotik tersebut serta pemberian terapi antibiotik yang adekuat. Terapi antibiotik yang tepat dan adekuat dalam arti tepat dosis (dosis optimal), obat dapat mencapai ke lokasi

infeksi/penetrasi ke jaringan untuk menyembuhkan infeksi, cara pemberian antibiotik yang benar baik secara intravena atau oral serta terapi antibiotik secara kombinasi jika memungkinkan. Pemberian riwayat terapi antibiotik yang tepat merupakan salah satu syarat keberhasilan penatalaksanaan pneumonia berat. Penentuan antibiotik tersebut harus didasarkan atas pengetahuan tentang mikroorganisme yang ada, pola resistensi kuman di lokasi setempat, pemilihan jenis obat berdasarkan pertimbangan rasional.(Lutfiyya *et al.*, 2006):(Pneumonia, 2005) Pemberian antibiotik adekuat sejak awal dapat meningkatkan angka ketahanan hidup pasien tersebut pada saat data mikrobiologi belum tersedia dan sebaliknya pemberian antibiotik yang tidak adekuat dapat menyebabkan kegagalan terapi akibat timbulnya resistensi kuman terhadap obat. Terapi empiris yang adekuat adalah jika satu atau lebih antibiotik yang digunakan masih sensitif terhadap kuman penyebab dan jika pemberian obat berdasarkan pola kuman setempat.(Lutfiyya *et al.*, 2006):(Pneumonia, 2005)

Penanganan VAP, HAP dan HCAP diperlukan dosis antibiotik yang mempunyai efikasi yang tinggi dan dosis tersebut diberikan pada pasien dengan fungsi ginjal yang masih baik, dosis antibiotik pada pasien HAP, VAP dan HCAP dapat dilihat pada tabel 2.(Chastre and Fagon, 2001) Konsep terapi deeskalasi telah muncul sebagai strategi untuk menangani infeksi bakteri yang serius seperti HAP dan VAP. Terapi antibiotik awal yang tidak adekuat dan lambat dalam memberikan terapi merupakan faktor risiko kematian pada HAP dan VAP. Pilihan memulai pengobatan dini harus berdasarkan faktor risiko kuman yang spesifik. Terapi antibiotik dapat diganti berdasarkan respons klinis pasien dalam 2 sampai 3 hari dan ditemukan hasil kultur semikuantitatif dari sekret saluran napas bawah. Terapi yang tepat dan adekuat sejak awal merupakan faktor penting pada kesembuhan pasien.(Chastre and Fagon, 2001)

Tabel 1.3. Terapi antibiotik empiris pada HAP atau VAP yang direkomendasikan sesuai jenis kuman

Mikroba	Antibiotika
Onset dini tanpa faktor risiko spesifik	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Seftriakson atau
<i>Haemophilus influenza</i>	atau
Methicillin-sensitive staphylococcus aureus	Levofloksasin
Bakteri gram negatif sensitif antibiotik	atau
<i>Enterobacter spp</i>	Moxifloksasin
<i>Eschericia coli</i>	atau
<i>Klebsiella pneumonia</i>	ciprofloksasin
<i>Proteus spp</i>	Ampisilin/Sulbaktam
<i>Serratia marcescens</i>	Ertapenem
Onset lambat dengan faktor risiko kuman MDR	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sephalosporin atau
<i>Acinetobacter spp</i>	Antipseudomonas
<i>Methicillin-resistant staphylococcus aureus</i>	(Cefepim, Ceftazidim)
<i>Klebsiella pneumonia</i> (ESBL)	Karbapenem antipseudomonas
	(Imipenem atau Meropenem) atau
	β -laktam/ penghambat β -laktamase
	(Piperacillin-Tazobactam) ditambah
	Antipseudomonas flurokuinolon
	(Ciprofloksasin atau Levofloksasin) atau
	Aminoglikosida
	(Amikasin, Gentamisin atau Tobramisin)
	ditambah
	Linezolid atau
	Vancomisin
	(MRSA)

Dikutip dari (Chastre and Fagon, 2001)

Tabel 1.4. Dosis antibiotika empiris intravena pada pasien VAP, HAP dan HCAP dewasa onset lambat atau memiliki faktor risiko kuman MDR

Antibiotik	Dosis
Sefalosporin antipseudomonas	
Cefepim	1 – 2 g tiap 8 – 12 jam
Ceftazidim	2 g tiap 8 jam
Karbapenem	
Imipenem	500mg tiap 6 jam/1g tiap 8 jam
Meropenem	1 g tiap 8 jam
Kombinasi β laktam - penghambat β laktamase	
Piperasilin-Tazobaktam	4,5 g tiap 6 jam
Aminoglikosida	
Gentamisin	7 mg/kg/hari
Tobramisin	7 mg/kg/hari
Amikasin	20 mg/kg/hari
Kuinolon antipseudomonas	
Levofloksasin	750 mg tiap hari
Ciprofloksasin	400 mg tiap 8 jam
Vankomisin	15 mg/kg tiap 12 jam
Linezolid	600 mg tiap 12 jam

Dikutip dari (Chastre and Fagon, 2001)

Farmakodinamik antibiotik spesifik harus dipertimbangkan untuk menyeleksi dosis obat yang adekuat. Hal ini disebabkan ada beberapa antibiotik yang tidak dapat bekerja baik ke lokasi infeksi dan tidak mencapai konsentrasi tinggi. Hampir semua antibiotik β -laktam mempunyai konsentrasi serum di paru hanya mencapai kurang dari 50% sedangkan fluorokuinolon dan linezolid dapat melampaui konsentrasi serum di sekret bronkial. Mekanisme aksi obat tertentu dapat mempengaruhi dosis obat, efikasi dan toksisiti. Beberapa antibiotik adalah bakterisid dan ada juga bakteriostatik. Antibiotik yang bekerja secara bakterisid adalah golongan aminoglikosida dan golongan kuinolon yang dapat membunuh kuman lebih cepat pada *consentration-dependent killing* yang tinggi. Konsentrasi antibiotik yang subletal dapat mencetuskan terjadinya resistensi obat. Optimalisasi terapi antibiotik berdasarkan prinsip farmakokinetik dan farmakodinamik berperan dalam mengurangi kejadian resistensi antibiotik. Durasi pemberian obat tergantung pada konsentrasi obat antibiotik yang tetap berada di atas garis *minimal inhibitor concentration* (MIC) ($T > MIC$) yang bisa membunuh kuman seperti pada antibiotik β -laktam, karbapenem, monobaktam, glikopeptida dan linezolid. Obat ini disebut *time dependent killing*, efek maksimal berada diantara 2-4 MIC dan aktivitas

membunuh kuman terjadi jika $T > MIC$ lebih dari atau sama dengan 40%. (Pneumonia, 2005); (J.E. *et al.*, 2002)

II.2. KLEBSIELLA PNEUMONIAE

Genus *Klebsiella* adalah termasuk suku *Klebsiellae*, famili *Enterobacteriaceae*. Organisma ini dinamakan sesuai dengan Edwin Klebs, seorang mikrobiologit German pada abad 19. *Klebsiellae* nonmotile, rod-shaped, gram-negative bacteria dengan prominent polysaccharide capsule. Genus *Klebsiella* mengekspresikan 2 type antigens pada permukaan sel. Yang pertama lipopolysaccharide (O antigen); yang lain capsular polysaccharide (K antigen). Kedua antigen berkontribusi terhadap pathogenicity. Terdapat sekitar 77 K antigens dan 9 O antigens. Variabilitas struktural antigen membentuk dasar klasifikasi berbagai serotype. Tiga spesies pada genus *Klebsiella* yang menyebabkan penyakit pada manusia : *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella granulomatis*. (Lim *et al.*, 2009)

Klebsiella pneumoniae pertama kali dijelaskan oleh Carl Friedlander pada tahun 1882 sebagai bakteri yang diisolasi dari paru-paru pasien yang meninggal karena pneumonia. (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019) *Klebsiella pneumoniae* terkenal infeksius karena peningkatan jumlah infeksi dan perawatan. Munculnya *K. pneumoniae* strain hipervirulen (HV) atau resisten antibiotik. *K. pneumoniae* pertama kali diisolasi pada akhir abad ke - 19 dan pada awalnya dikenal sebagai Bakteri Friedlander. perbedaan antara strain klasik dan HV *K. pneumoniae* bisa ditemukan pada Tabel 1.5 (Paczosa, 2016).

Tabel 1.5. Karakteristik *Klebsiella pneumoniae* strains klasik dan Hipervirulen

Parameter	Characteristic(s) for strain type		References
	Classical	Hypervirulent	
Common types of infection	Pneumonia, UTI, bacteremia	Pyogenic liver abscess; bacteremia; lung, neck, and kidney abscesses; pneumonia; cellulitis; necrotizing fasciitis; myositis, meningitis; endophthalmitis	37, 42
Susceptible population(s)	Immunosuppressed (diabetics, patients with malignancies)	Diabetics, healthy people	32, 34, 35, 43, 44
Capsule type(s)	Capsule serotypes K1–K78	Hypercapsule serotype K1 (93%) or K2	38, 79, 226, 227, 235
Siderophores (% of strains expressing siderophore)	Enterobactin (100), yersiniabactin (17–46), salmochelin (2–4), aerobactin (6)	Enterobactin (100), yersiniabactin (90), salmochelin (>90), aerobactin (93–100)	227, 318, 319, 321, 329, 335
Geographical concentration	Worldwide	Primarily Taiwan and Southeast Asia	38–41
Primarily acquired infection type	Nosocomial	Community acquired	41, 48, 49
Frequency of reports of antibiotic resistance	Frequent (ESBL and carbapenemase producing)	Infrequent	45, 324, 325

Dikutip dari (Paczosa, 2016)

Patofisiologi

Host bertahan terhadap bakteri tergantung terhadap fagositosis dari polymorphonuclear granulocytes dan efek bakterisidal. Data terbaru menunjukkan neutrophil myeloperoxidase dan lipopolysaccharide-binding protein pada host melawan infeksi *K pneumoniae*. Neutrophil myeloperoxidase menginaktivasi oksidasi elastase, suatu enzim dalam patogenesis berbagai penyakit yang merusak jaringan. Lipopolysaccharide-binding protein memfasilitasi pindahnya komponen cell wall bakteri menuju sel inflamasi. Penelitian pada mencit menunjukkan tingginya infeksi pada gen yang defisiensi dua agen ini. (Lim *et al.*, 2009)

Bakteri melewati innate host immunity melalui beberapa cara. Melewati kapsul polisakarida yang merupakan patogenesis utama. Kapsul terdiri dari acid polisakarida kompleks. Lapisannya melindungi bakteri terhadap fagositosis polimorfonuklear granulosit. Kapsul juga mencegah kematian bakteri karena faktor serum bakterisid. Hal ini diikuti juga dengan menghambat aktivasi komponen komplemen khususnya C3b. Bakteri juga memproduksi adhesin multiple. (Lim *et al.*, 2009)

Lipopolisakarida (LPS) adalah faktor patogen bakteri juga. Yang mampu mengaktifkan komplemen, yang menyebabkan deposisi C3b pada molekul LPS pada membran sel bakteri. Hal ini menghambat pembentukan membrane attack complex (C5b-C9) yang mencegah kerusakan membran dan kematian sel bakteri. Keberadaan zat besi meningkatkan kerentanan host terhadap infeksi *K pneumoniae*. Bakteri berkompetisi dengan ikatan zat besi pada protein host karena sekresi afinitas yang tinggi, low molecular weight iron chelators dikenal sebagai siderophores. Hal ini penting karena kebanyakan zat besi host berikatan dengan intracellular dan extracellular protein. Untuk menghilangkan bakteri, host juga mensekresi iron-binding proteins. (Lim *et al.*, 2009)

II.2.1. Epidemiologi Klebsiella

Klebsiella berada di alam. Pada manusia berkoloni di kulit, faring, gastrointestinal, luka yang steril, dan urin. Klebsiella dianggap flora normal pada colon dan traktus intestinal dan traktus biliar. Pada orofaring dihubungkan dengan

intubasi endotrakeal, gangguan pertahanan host dan penggunaan antibiotik. *K pneumoniae* dan *K oxytoca* menyebabkan infeksi pada manusia. Infeksi pada paru menyebabkan destruksi. Nekrosis, inflamasi dan perdarahan terjadi pada jaringan paru, sputum kental, dan berdarah digambarkan seperti sputum seperti jelly. Penyakit ini sering terdapat pada usia pertengahan dan laki laki usia lanjut dengan kelemahan seperti alkoholisme, diabetes, dan penyakit bronkopulmoner kronik. (Lim *et al.*, 2009)

Klebsiellae menyebabkan infeksi nosokomial. Infeksi terjadi pada traktus urinarius, saluran napas, saluran bilier, luka operasi. Secara klinis ditemukan pneumonia, bacterimia, tromboflebitis, infeksi saluran kencing, cholecystitis, diare, infeksi saluran napas atas, infeksi luka, osteomilitis dan meningitis. Alat alat invasif, alat respirasi yang terkontaminasi, penggunaan kateter urin dan penggunaan antibiotik meningkatkan infeksi nosokomial karena spesies Klebsiellae. Sepsis dan shock sepsis terjadi saat organisme masuk ke dalam darah dari sumber infeksi. (Lim *et al.*, 2009)

Di beberapa negara, *K pneumoniae* penyebab CAP pada usia lanjut. Studi di Malaysia dan Jepang menemukan insiden rate pada usia lanjut 15-40%. Di US ditemukan pada orang dengan alkoholisme populasi paling beresiko sekitar 66%, mortaliti tinggi 50% sampai 100% pada orang dengan alkoholisme dan bacterimia. (Lim *et al.*, 2009) *Klebsiella pneumoniae* adalah bakteri penyebab serius pada kasus hospital-acquired and community infeksi pada manusia. β -lactam antibiotik adalah antibiotik utama pada terapi hospital-acquired infections. Resistensi terhadap antibiotik ini merupakan tantangan pada rumah sakit. Pemakaian carbapenem menyebabkan meluasnya acquired metallo- β -lactamases [MBLs]. (Bachman *et al.*, 2011)

Resistensi terhadap carbapenem pada *K.pneumoniae* terdapat dua mekanisme utama : produksi extended-spectrum β -lactamase (cephalosporinase atau ESBL) yang dihubungkan dengan porin loss dan production of carbapenemhydrolyzing β -lactamase yaitu Ambler's class A carbapenemases (KPC-type), class B metallo- β -lactamase (VIM-, NDM- atau IMP-type) atau class D carbapenemase OXA-48. Karena meningkatnya MBL-producing *K.pneumoniae* secara global, perlu mengevaluasi regimen dalam terapi infeksi karena strain ini. (Bachman *et al.*, 2011)

Klebsiella pneumoniae adalah patogen yang multi drug resistance, khususnya *K. pneumoniae* carbapenemases (KPCs). *K. pneumoniae* membutuhkan zat besi untuk replikasi dan dia menggunakan ironscavenging siderophores, seperti enterobactin (Ent). Untuk meniadakan Ent, netrofil dan permukaan mukosa memproduksi innate immune protein lipocalin 2 (Lcn2, atau neutrophil gelatinase-associated lipocalin [NGAL], siderocalin, 24p3, atau uterocalin). Lcn2 mengikat Ent pada cup-shaped ligand site, kompetisi dengan reseptor bakteri Ent, dan menjadi bacteriostatik. Lcn2 juga menstimulasi respon inflamasi akut saat berikatan dengan aferric Ent, yang menginduksi chemokine interleukin 8 (IL-8) dan promotes neutrophil influx sebagai respon terhadap *K. pneumoniae* nasal colonization. (Bachman *et al.*, 2011)

Pneumonia dapat dibagi menjadi dua kategori besar: pneumonia yang didapat masyarakat (CAP) dan pneumonia yang didapat di rumah sakit (HAP). Tinjauan umum tentang dua kategori infeksi *K. pneumoniae* disajikan pada Tabel . (Paczosa, 2016)

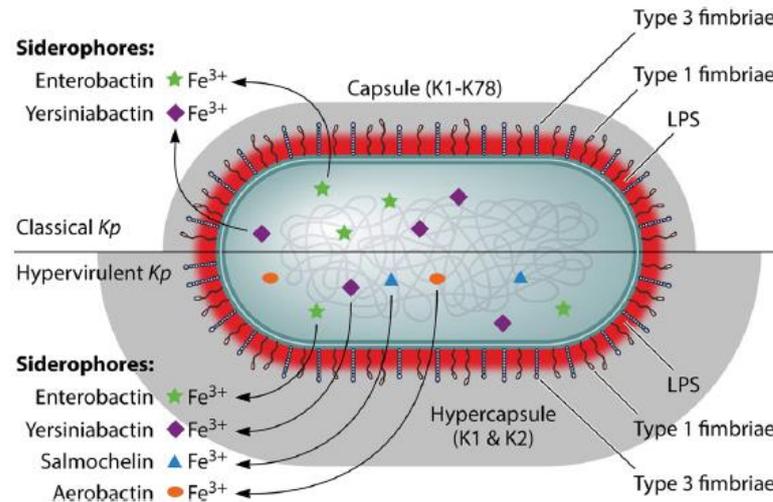
Tabel 1.6. Karakteristik infeksi *Klebsiella pneumoniae* nosokomial dan community

Parameter	Characteristic(s) for infection type	
	Nosocomial	Community acquired
Types of infection	Pneumonia, UTI, bacteremia	Pyogenic liver abscess, UTI, meningitis
Frequency as etiological agent of pneumonia (%)	11.8	3–5 in North America, Europe, and Australia; 15 in Asia and Africa
Frequency as etiological agent of UTIs (%)	2–6	4.3–7
Common underlying conditions	Diabetes, malignancies	Malignancies, diabetes, chronic obstructive pulmonary disease, chronic alcoholism
Antibiotic resistance rate (%)	23 for ESBL-producing strains, 11 for carbapenemase-producing strains	
Primary strain type(s)	Classical	Classical and HV

Dikutip dari (Paczosa, 2016)

Sampai saat ini, ada empat kelas utama virulensi faktor pada *K. pneumoniae*, dan dibahas secara rinci di gambar (Gbr.2). Virulensi ini terdiri dari kapsul, termasuk produksi hiperkapsul dalam strain HV; lipopolysaccharide (LPS); siderophores; dan fimbriae, juga dikenal sebagai pili. (Paczosa, 2016)

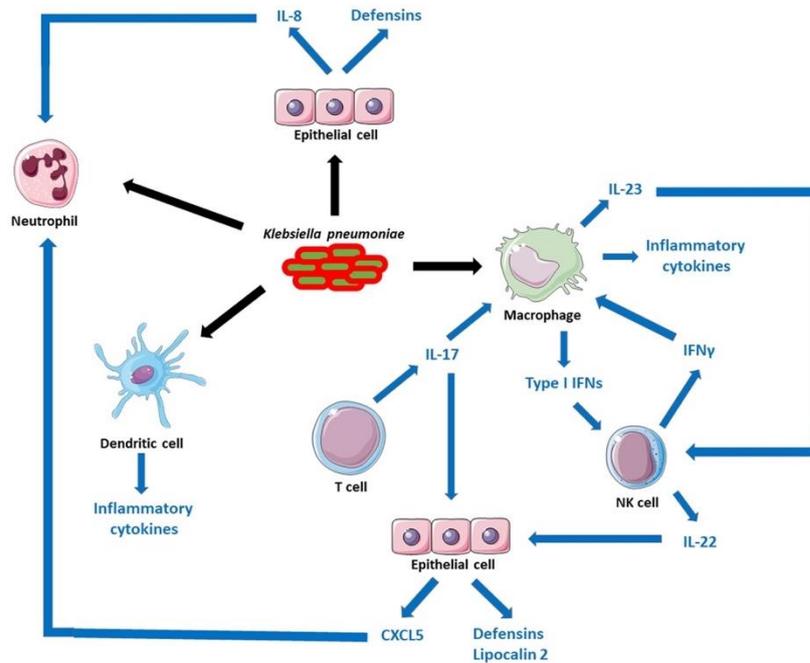
II.2.2. Struktur *Klebsiella pneumoniae*



Gambar 1.2. Empat faktor virulensi Strain *K. pneumoniae* (Kp) klasik dan hipervirulen .

(Paczosa, 2016)

Ada empat faktor virulensi untuk *K. pneumoniae* patogen: kapsul, LPS, fimbriae (tipe 1 dan tipe 3) dan siderophores. Kapsul adalah matriks polisakarida ekstraseluler yang membungkus bakteri. Strain *K. pneumoniae* klasik menghasilkan kapsul salah satu serotipe K1 hingga K78; K1 dan K2 dikaitkan dengan peningkatan patogenisitas. Strain HV membuat hypercapsule, yang memperkuat produksi bahan kapsuler, menghasilkan kapsul yang relatif lebih besar dan lebih dominan dari serotipe K1, sedangkan strain yang tersisa adalah serotipe K2. LPS, bagian membran luar, diproduksi oleh *K. pneumoniae* klasik dan HV dan dapat berupa serotipe O-antigen 1 sampai 9 (O1 hingga 9). Kedua jenis *K. pneumoniae* membuat membrane-bound adhesive structures, fimbriae tipe 1 dan tipe 3, dan mensekresikan siderofor pemulung zat besi. Dari siderophores, enterobactin dibuat oleh hampir semua strain, dan yersiniabactin dibuat oleh sekitar setengah dari strain klasik dan hampir semua HV. Salmochelin dan aerobaktin jarang diproduksi oleh strain klasik tetapi biasanya disekresikan oleh strain HV, dengan aerobaktin menjadi yang paling tinggi diexpresikan oleh siderophores. (Paczosa, 2016)



Gambar 1.3. Mekanisme innate immunity pada infeksi *K. pneumoniae* (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019)

Sel-sel yang terlibat pada infeksi *K. pneumoniae* adalah neutrofil, makrofag (dan monosit), sel dendritik, dan sel epitel. Interaksi ini ditandai dengan panah hitam. Peran sitokin yang mengaktifkan respons inang digambarkan dengan panah biru. TLR4 berperan penting dalam pertahanan terhadap infeksi *Klebsiella*. TLR4 menurun, menunjukkan penurunan kelangsungan hidup setelah infeksi dengan peningkatan bakteri load di paru-paru. Kurangnya signalling TLR4 dikaitkan dengan penurunan tingkat IL17 dan IL23 di paru tikus yang mungkin menjelaskan kerentanan tikus-tikus ini terhadap infeksi *Klebsiella*. (Bengoechea and Sa Pessoa, 2019)

II.3. MAKROFAG

Makrofag adalah sel darah putih yang berukuran besar. Fungsi makrofag adalah mencerna mikroba, antigen dan zat-zat lainnya. Sitoplasma makrofag mengandung beberapa granula dan melepaskan berbagai bahan, antara lain enzim lisosom, komplemen, interferon dan sitokin yang menghancurkan mikroba.

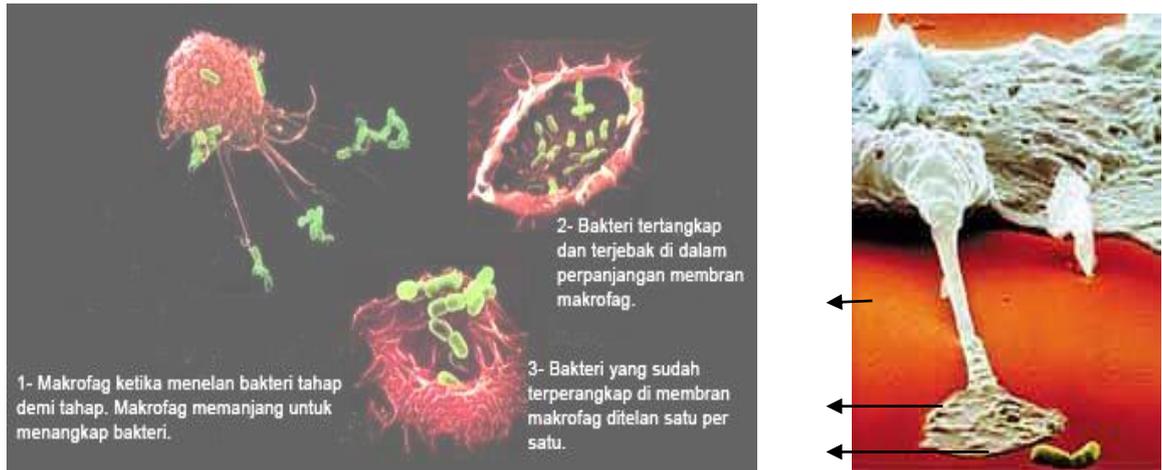
Makrofag ditemukan di tempat-tempat strategis, dimana organ tubuh berhubungan dengan aliran darah atau organ luar. Makrofag ditemukan di paru-paru dan sel-sel hati. Makrofag ini termasuk sistem fagosit mononuklear, makrofag dulu disebut dengan *Retikulo Endotelial System (RES)*, untuk sel-sel yang sangat fagositik yang tersebar luas di seluruh tubuh terutama pada daerah yang kaya akan pembuluh darah (KG, 2002)

II.3.1. Perkembangan Makrofag

Makrofag terutama berasal dari sel prekursor sum-sum tulang dari promonosit yang akan membelah menghasilkan monosit yang beredar dalam darah. Pada tahap kedua monosit bermigrasi ke dalam jaringan ikat tempat mereka menjadi matang disebut makrofag. Di dalam jaringan, makrofag dapat berproliferasi secara lokal menghasilkan sel sejenis lebih banyak. Keberadaan sel-sel sistem makrofag terdapat pada jaringan ikat longgar berupa makrofag atau histiosit, di dalam darah berupa monosit, dalam hati melapisi sinusoid dikenal sebagai sel kupffer, makrofag perivaskular sinusoid limfa, limfonodus dan sum-sum tulang dan pada susunan syaraf pusat berupa microglia berasal dari mesoderm. (Kresno, 2001)

II.3.2. Mekanisme Kerja Makrofag

Fagositosis merupakan suatu proses atau cara untuk memakan mikroorganisme atau benda asing yang dilakukan dimana setelah benda asing melekat pada permukaan makrofag sehingga makrofag membentuk sitoplasma dan melekok ke dalam membungkus bakteri atau benda tersebut. Tonjolan sitoplasma (pseudopodia) yang saling bertemu itu akan melebur menjadi satu sehingga benda asing atau bakteri akan tertangkap di dalam sebuah vakuola fagositik intrasel. Enzim lisosom merupakan sistem pencernaan intrasel makrofag dengan kemampuan memecah materi yang berasal dari luar maupun dari dalam. Jadi lisosom akan menyatu dengan vakuola akan memusnahkan bakteri atau benda asing tersebut (Efendi, 2003)



Gambar 1.4. Makrofag (A) berusaha menjangkau bakteri (C) dan menangkapnya dengan perpanjangan membran yang disebut pseudopodia (B).

Dikutip dari (Efendi, 2003)

II.3.3. Fungsi makrofag

Sifat fagositik atau gerakan amuboidnya aktif dalam pertahanan tubuh terhadap mikroorganisme, memiliki reseptor untuk immunoglobulin pada membran selnya. Makrofag mempunyai fungsi utama memakan partikel (fagositosis) dan dicerna oleh lisosom dan berperan dalam fungsi pertahanan dan perbaikan. Dalam sistem imun tubuh, sel ini berperan serta dalam mempengaruhi aktivitas dari respon imun, memproses dan menyimpan antigen dan menyampaikan informasi pada sel-sel berdekatan secara imunologis kompeten (limfosit dan sel plasma). Makrofag yang aktif merupakan sel sekretori yang dapat mengeluarkan beberapa substansi penting termasuk enzim lisozim, elastase, kolagenase, dua protein dari sistem komplemen dan agen anti virus yaitu interferon (Kresno, 2001):(Efendi, 2003)

II.3.4. Aktivasi Makrofag

Pada hakekatnya makrofag terlibat dalam semua stadium respon imun, dimulai dengan makrofag menangkap antigen kemudian memprosesnya lalu

menyajikan antigen yang telah diproses dan diikat pada MHC kelas II kepada sel T-helper (Th). Dengan demikian makrofag berfungsi mengaktifkan limfosit. Sel Th teraktivasi memproduksi berbagai faktor kemotaktik yang menarik lebih banyak makrofag, granulosit dan limfosit. Setelah mengaktifkan limfosit, peran makrofag selanjutnya adalah meningkatkan proses inflamasi, tumorisidal dan mikrosidal. Aktivitas makrofag dipengaruhi oleh *Macrophage Activating Factor* (MAF), IFN-gamma (Interferon gamma) dan IL-3 (Interleukin 3) yang disekresikan oleh sel T. (Kresno, 2001)

Fagosit sangat penting untuk pertahanan terhadap bakteri, seperti yang pertama kali ditunjukkan oleh Metchnikoff peran neutrofil dan mononuklear fagosit terhadap mikroba. Neutrofil fokus pada fagosit ekstraseluler, sedangkan mononuklear pada patogen intraseluler. Patogen ekstraseluler sering menghindari fagositosis, sedangkan bakteri intraseluler sering membiarkan proses menelannya dan kemudian memblokir secara intraseluler. Selanjutnya, fagosit terlibat aktif dengan parenkim dan sel imun untuk reaksi selanjutnya, termasuk inflamasi, penyembuhan jaringan, dan remodeling. Hal ini memungkinkan host untuk mengatasi berbagai jenis mikroba. (Kaufmann and Dorhoi, 2016)

II.4. Natural Resistance Associate Macrophage Protein-1 (NRAMP-1)

Gen Natural Resistance Associate Macrophage Protein-1 (NRAMP-1) dikenal dengan nama Solute Carrier Family 11 (SLC11A1) merupakan gen spesifik yang dapat menyandi proton yang bergabung dengan pengangkut ion logam dan mengaktifkan kerja makrofag. Gen ini memiliki beberapa region antara lain: D543N (1703 G/A), 3' untranslated region (3'UTR, 1729+55 del 4 TGTG/del) yang berada pada daerah 55 nukleotida downstream dari kodon terakhir pada exon 15, nukleotida tunggal pada Intron 4 (469+14 G/C) yang dapat memodulasi fungsi makrofag dan mempunyai hubungan dengan penyakit yang terkait dengan imunitas tubuh. (FINE *et al.*, 2018)

Gen NRAMP-1 mempengaruhi banyak fungsi yang penting dalam pengaktifan makrofag meliputi up-regulasi, kemokin (KC), sitokin, histokompatibel kompleks utama (MHC) kelas II, aktivasi respirasi, apoptosis dan ekspresi sitokin lainnya. (Stober *et al.*, 2007). Gen NRAMP-1 berfungsi sebagai

pengangkut ion logam yang mengatur tingkat seluler yang membatasi replikasi patogen intraseluler dengan mengubah lingkungan fagolisosomal. (Dunstan *et al.*, 2002) Transpor kation divalen NRAMP-1 menyebabkan penghambatan protein-tyrosine phosphatases (PTP) melalui interaksi langsung logam-PTP dan / atau oleh oksidasi PTP untuk menginduksi fungsi fagosit proinflamasi. (Gomez *et al.*, 2007)

Nramp-1 mengatur aktivasi makrofag pada infeksi dan autoimun. Nramp-2 mengontrol anemia. Keduanya adalah transporter kation divalen (Fe^{2+} , Zn^{2+} dan Mn^{2+}). Nramp-2 berlokasi pada endosom, menghantarkan ke ekstraselular kation divalen dari cytosol ke fagolisosom. Fe^{2+} menyebabkan antimicrobial hydroxyl radicals via Fenton reaction. Zn^{2+} dan Mn^{2+} juga menyebabkan aktivitas fusi endosomal metalloprotease dan phagolysosome. Banyak studi tentang hubungan antara gen NRAMP-1 dan berbagai penyakit yang terkait dengan kekebalan seperti Mycobacteriosis, Salmonellosis dan Leshmaniasis. (Jabado *et al.*, 2000)(Blackwell *et al.*, 2000)

Perbandingan urutan protein tikus dan protein NRAMP-1/NRAMP-1 manusia menunjukkan tingkat kesamaan yang tinggi antara kedua spesies (85% identik, 92% kesamaan). Pada manusia, tempat ekspresi NRAMP-1 tertinggi adalah darah tepi dan paru-paru. Protein NRAMP-1 memberikan peran yang serupa secara in vivo pada tikus dan manusia. Satu studi di Vietnam Selatan menunjukkan bahwa NRAMP-1 mempengaruhi predisposisi kusta. Studi besar lainnya mengukur hubungan NRAMP-1 dengan tuberkulosis di Gambia (Afrika Barat) menunjukkan bahwa variasi polimorfik dalam gen NRAMP-1 manusia mempengaruhi kerentanan terhadap penyakit.(TABUCHI *et al.*, 2015)(Mackintosh *et al.*, 2000)(Qureshi, Skamene and Malo, 1999) (Gruenheid *et al.*, 2002)

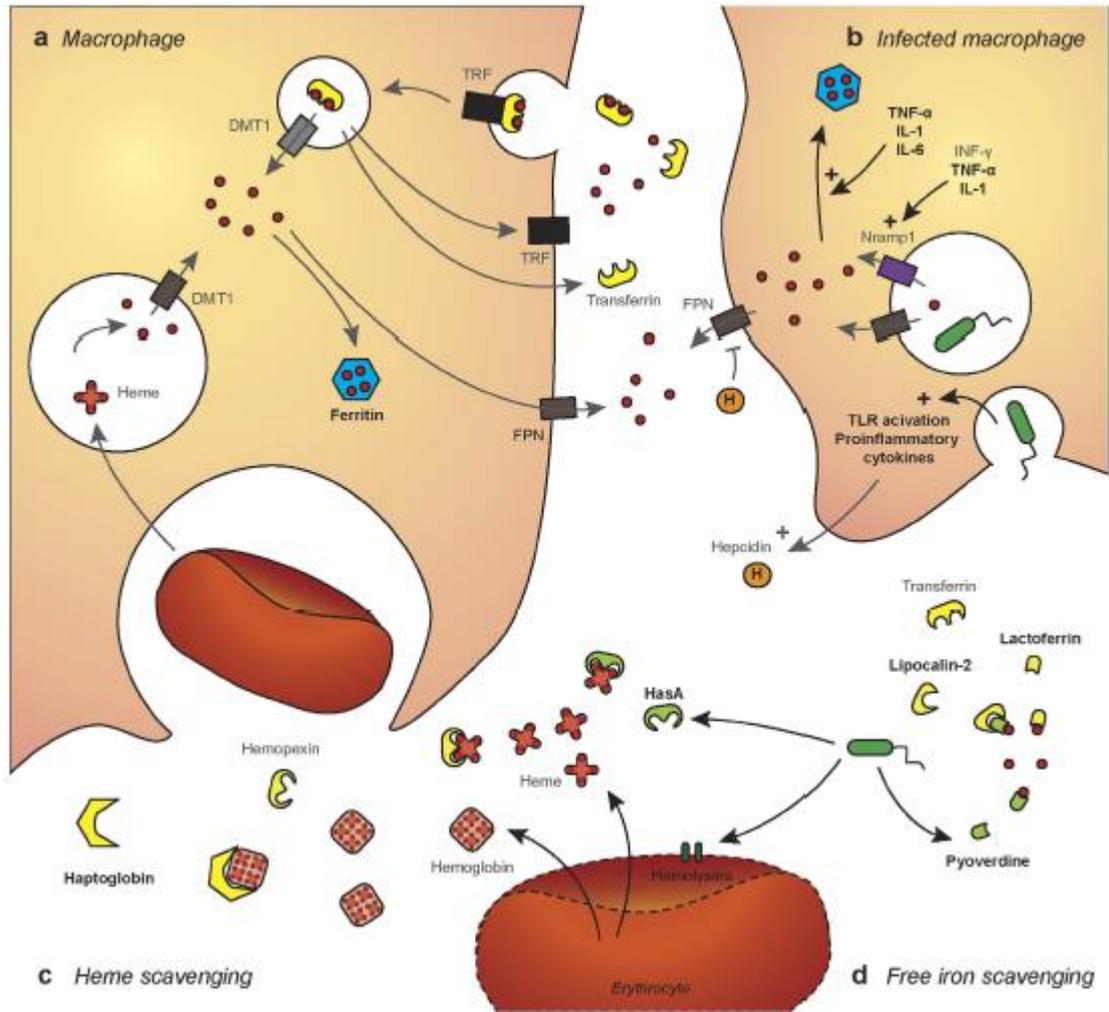
Gen NRAMP-1 berfungsi sebagai pengangkut pH-dependen dan mempunyai efek pleiotropik terhadap berbagai efektor terkait sistem kekebalan untuk memudahkan penghancuran atau pembunuhan bakteri. (Techau *et al.*, 2007) Mutasi pada gen NRAMP-1 menyebabkan seseorang lebih rentan terhadap infeksi patogen intraseluler.(Canonne-Hergaux *et al.*, 2002)

Nramp juga ditemukan pada organisme seperti serangga, tanaman, ragi, dan bakteri, menunjukkan bahwa protein ini memainkan fungsi fisiologis yang sangat mendasar selama evolusi. Pengurangan konsentrasi kation divalen yang dimediasi

NRAMP-1 dalam vakuola ini dapat mempengaruhi 1) metabolisme dan aktivitas replikasi mikroorganisme, termasuk ekspresi patogenisitas mikroba untuk kelangsungan hidup intraseluler, 2) atau dapat mempengaruhi secara langsung (misalnya, peraturan pH intravacuolar) atau tidak langsung (misalnya, fusogenik sifat fagosom). (Govoni and Gros, 1998)

Analisis urutan polipeptida manusia yaitu 550 asam amino membran protein mengkode NRAMP manusia yang ukurannya 2,245-bp dengan bobot molekularnya 52.8 kD. Dalam hal ini urutan asam amino adalah 89% homolog dengan mencit. (Liu *et al.*, 1995) Perubahan asam amino dari asam glisin menjadi asam aspartat di dalam NRAMP-1, dihubungkan dengan kepekaan fenotipe. Jumlahnya mengendalikan infeksi pada mikroba. (Dunstan *et al.*, 2002)

Pada penelitian Cellier MF menyebutkan gen NRAMP berisi sedikitnya 15 exon dan 1 exon disandikan oleh asam amino Ala (Cellier, 2012) Liu J dkk mengidentifikasi 9 urutan varian exon yang dihubungkan dengan gen NRAMP. 2 marker yakni D2S104 dan D2S173 berubah menjadi NRAMP-1 pada 1.5-MB YAC. Marker molekular ini berperan pada NRAMP-1 di dalam kepekaan terhadap penyakit tuberkulosis dan makrofag lain. (Liu *et al.*, 1995)



Gambar 1.5 . Regulasi zat besi

Dikutip dari (Muangsombut *et al.*, 2017)

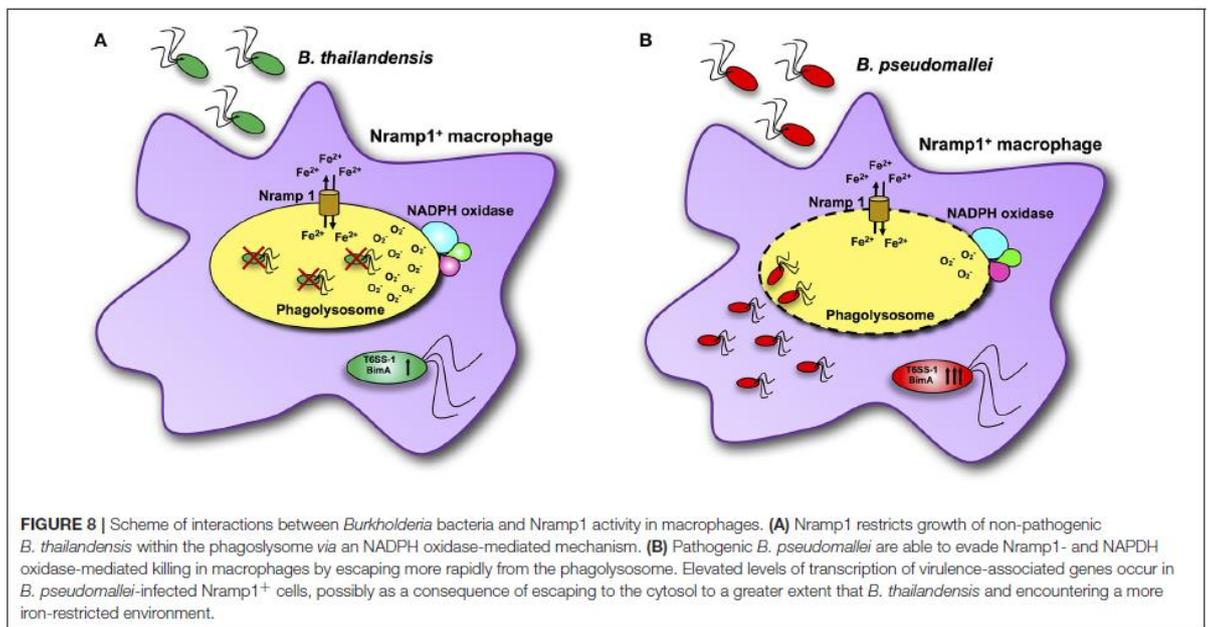
(a) makrofag memperoleh zat besi melalui transferrin reseptor (TRF) melalui endositosis transferrin atau melalui recycling eritrosit. Makrofag mendegradasi heme menggunakan heme oxygenase untuk menghasilkan zat besi, biliverdin dan karbon monoksida. Zat besi kemudian ditransfer ke sitoplasma oleh DMT1 dan disimpan menggunakan ferritin atau dilepas menggunakan ferroportin (FPN).

(b) selama infeksi, bakteri dikenal dengan pola pengenalan reseptor yang memicu aktivasi toll like reseptor (TLR) dan sekresi sitokin proinflamasi. Hasilnya, sel melepas hepcidin untuk mengontrol pelepasan zat besi oleh FPN. Sitokin proinflamasi juga terlibat dalam regulasi NRAMP-1, bersama dengan FPN menghalangi internalisasi bakteri dari zat besi. TNF- α , IL-1 dan IL-6 juga menstimulasi storage zat besi menggunakan ferritin.

(c) Selama infeksi, bakteri dapat melisis eritrosit menggunakan hemolysin dan toxin untuk melepas heme dan hemoglobin. Host mengambil ulang zat besi yang kaya protein menggunakan haptoglobin dan hemopexin, sementara *P. aeruginosa* mensekresi siderophores seperti HasA untuk memakan heme.

(d) host menggunakan lactoferrin dan transferrin untuk membatasi ketersediaan zat besi selama infeksi. *P. aeruginosa* mensekresi siderophores dengan afinitas zat besi tinggi seperti pyoverdine untuk menghindari penyerapan zat besi. Sebagai respons, host melepas siderocalin/lipocalin-2 untuk menetralkan siderophores bakteri. (Muangsombut *et al.*, 2017)

Survival bakteri dalam makrofag dapat dipengaruhi oleh NRAMP-1 yang berlokasi di membran fagosom berfungsi dalam transpor kation divalen, termasuk zat besi. Pengaruh NRAMP-1 pada infeksi *Burkholderia*. (Muangsombut *et al.*, 2017)

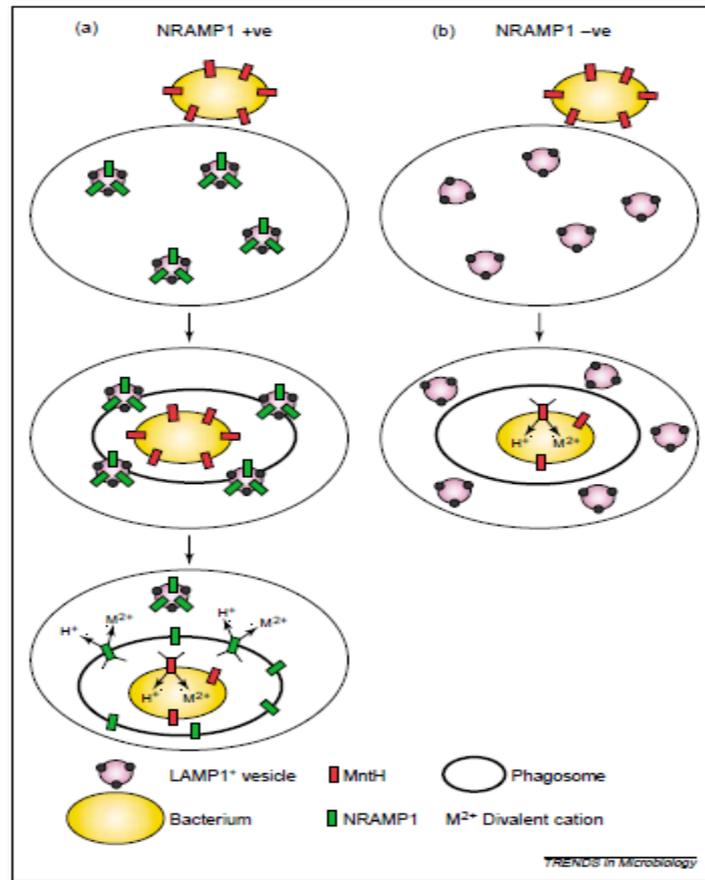


Gambar 1.6. Skema interaksi antara bakteri *Burkholderia* dan aktivitas NRAMP-1 di makrofag.

Dikutip dari (Muangsombut *et al.*, 2017)

(A) NRAMP-1 membatasi pertumbuhan non-patogenik *B. thailandensis* dalam phagoslysosome melalui mekanisme NADPH oksidase.

(B) Patogen *B. pseudomallei* mampu menghindari phagolysosome NRAMP-1- dan NAPDH di makrofag.



Gambar 7. Transport NRAMP Divalent-metal interaksi dengan patogen

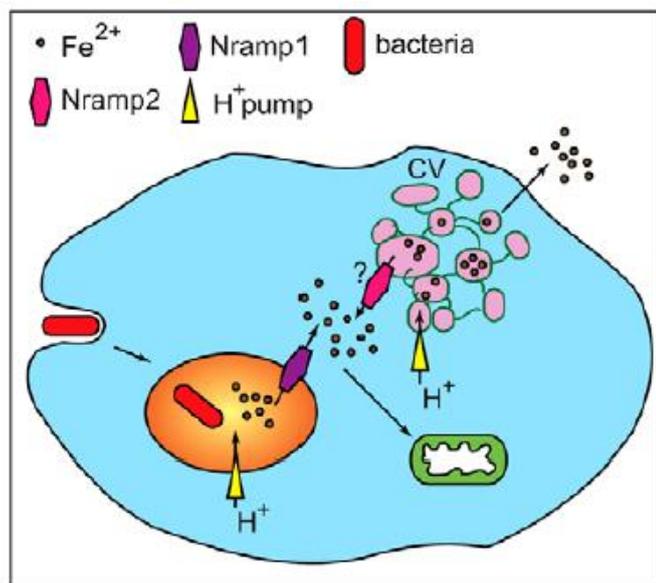
Dikutip dari (Forbes and Gros, 2001)

Transportasi logam-divalen oleh protein NRAMP pada interaksi host-patogen.

(a) Pada makrofag NRAMP-1+, bakteri yang menginvasi difagositosis dalam fagosom membran plasma. LAMP-1-lysosomal + / late endosomal vesikel + untuk NRAMP-1 bergabung dengan fagosom bakteri, menuju phagolysosome bersifat bakterisidal/ bakteriostatik. Dalam phagolysosome, NRAMP dan bakteri berfungsi berlawanan, bersaing untuk logam divalen esensial. NRAMP-1 membatasi jumlah divalen logam yang tersedia untuk bakteri, membatasi kemampuan patogen untuk bereplikasi.

(B) Dengan tidak adanya NRAMP-1, bakteri dalam fagosom mampu menghambat.(Forbes and Gros, 2001)

NRAMP-1 adalah antiporter, diekspresikan dalam phagosomes yang mentranspor zat besi ke dalam phagosome, yang dikatalisasi reaksi Haber-Weiss. (Dar *et al.*, 2018) Zat besi sangat penting untuk banyak aspek fungsi seluler, tetapi juga dapat menghasilkan reactive oxygen species yang bisa merusak makromolekul biologis. Paru yang terus menerus terpapar ke atmosfer, beresiko kerusakan oksidatif karena konsentrasi oksigen yang tinggi dan adanya sejumlah besar zat besi aktif secara katalitik di atmosfer. Sistem detoksifikasi logam yang efektif harus ada untuk meminimalkan stres oksidatif di paru-paru. Protein spesifik yang mengendalikan penyerapan zat besi di saluran pencernaan juga digunakan di paru-paru untuk mengangkut zat besi ke sel epitel untuk mengendalikan stres oksidatif oleh zat besi di saluran pernapasan. (Turi *et al.*, 2004) Suplemen zat besi dan penyakit ditandai dengan overload zat besi seperti hemochromatosis meningkatkan kerentanan host terhadap infeksi. (Diaz-Ochoa *et al.*, 2014)



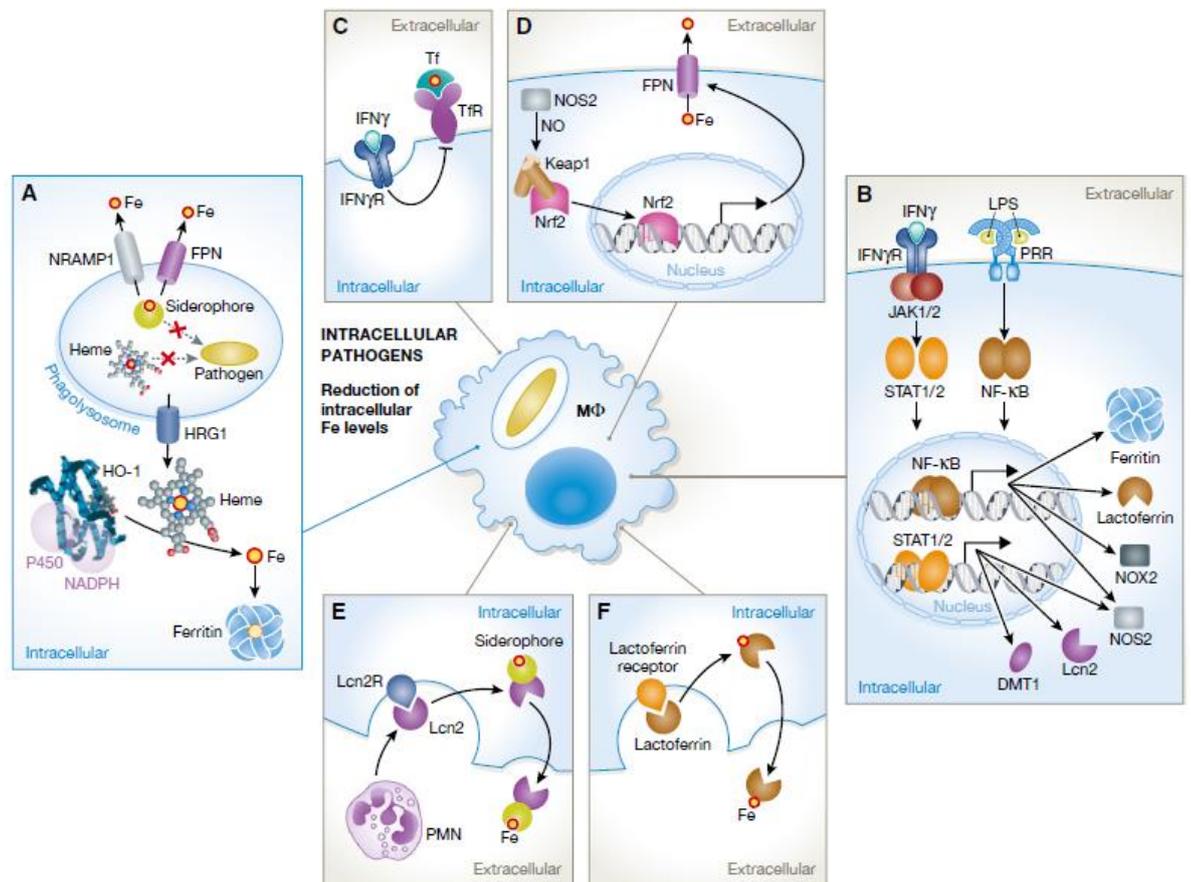
Gambar 8. Model fungsi NRAMP-1 dan Nramp2 dan contractile vacuole (CV) pada homeostasis zat besi.

Dikutip dari (Peracino dkk., 2013)

NRAMP-1 ditarik ke phagosomes, sedangkan Nramp2 dan H⁺-ATPase adalah protein tetap pada CV network. Zat besi dibutuhkan untuk fungsi sel, khususnya pada mitokondria. Zat besi dapat ditranspor melewati membran CV

melalui Nramp2, transpor ini diregulasi oleh H⁺-ATPase. (Peracino, Buracco and Bozzaro, 2013)

Kunci pertahanan host terhadap infeksi bakteri disebut “nutritional immunity,” termasuk menghilangkan nutrisi metal. Bakteri pada host, membutuhkan zat besi (Fe), zinc (Zn²⁺, Zn) dan manganese (Mn²⁺, Mn) serta S100 protein calprotectin. Calprotektin mengikat Zn, Mn, dan Fe²⁺ ions. Calprotektin penting untuk pertahanan host terhadap *A. Baumannii* di paru. *A. baumannii* membutuhkan Mn untuk hidup. (Juttukonda, Chazin and Skaar, 2016) Aktivitas NRAMP-1 menurun menunjukkan kandungan Fe intraseluler yang lebih tinggi, dan terjadi peningkatan patogen di endosom. (Núñez, Sakamoto and Soares, 2019) (Forbes and Gros, 2001).

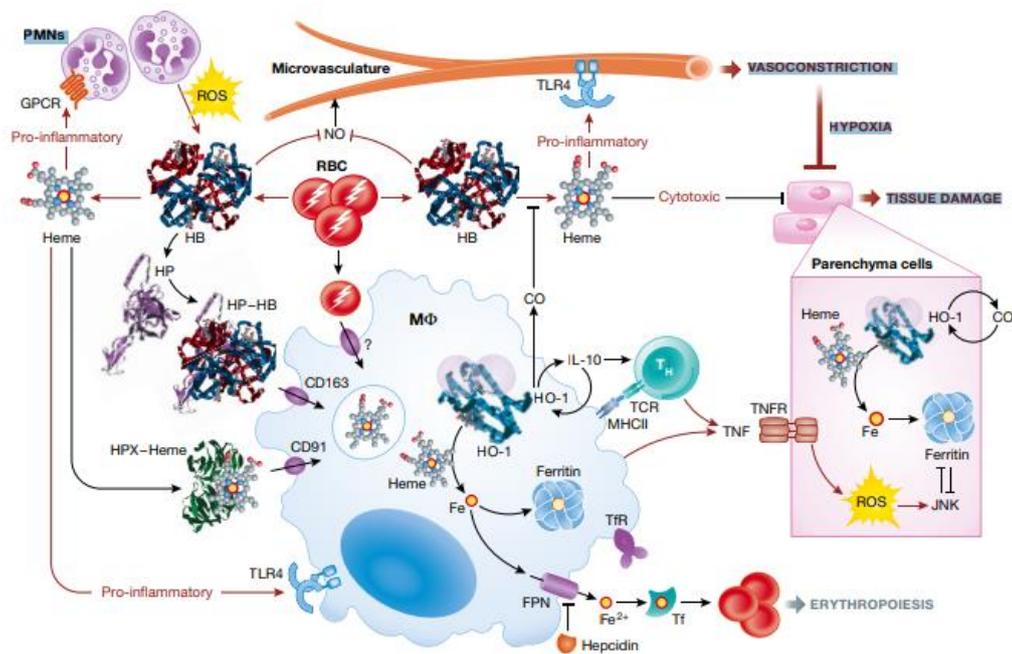


Gambar 1.9. Regulasi metabolisme Fe terhadap patogen intraseluler

Dikutip dari (Soares and Weiss, 2015)

Terdapat mekanisme yang berbeda-beda pada makrofag sebagai respon patogen intraseluler. (A) Fe atau heme diekspor dari fagolisosom oleh NRAMP-1 dan FPN atau HRG1, sehingga ketersediaan Fe dan heme untuk patogen menurun.

Heme menginduksi ekspresi Fe-scavenging protein ferritin yang menyimpan Fe intracellular dalam makrofag, menghindari patogen intraceluler. (B) aktivasi makrofag response terhadap PRR dan/atau IFN α R signaling activates the transcription factors NF- κ B and STAT1/2, yang menginduksi ekspresi Fe-binding proteins ferritin, lactoferrin, Lcn2, dan Fe transporter DMT1, NOX2/gp91phox dan iNOS/NOS2. (C) IFN α R signaling juga menghambat Fe extracellular uptake via TfR. (D) produksi NO dengan menginduksi iNOS/NOS2, via Keap1, aktivasi faktor transkripsi Nrf2, yang menginduksi ekspresi FPN and ekspor Fe from phagolysosomes dan dari cytoplasm. (E) Lcn2 menetralkan aksi sidophore bakteri. (F) Lactoferrin mengikat Fe dan membatasi ketersediaannya terhadap bakteri. (Soares and Weiss, 2015)



Gambar 10. Metabolism heme terhadap infeksi

Dikutip dari (Soares and Weiss, 2015)

Produk sitotoksik yang dihasilkan oleh patogen dapat merusak sel darah merah, yang dengan cepat dibersihkan oleh Makrofag. Sebagai alternatif, sel darah merah yang rusak melepaskan hemoglobin (HB) ke dalam plasma, yang dapat memberikan efek merusak. Hemoglobin ekstraseluler mengambil NO, memicu vasokonstriksi dan mempengaruhi sirkulasi mikrovaskular. Hemoglobin

ekstraseluler teroksidasi juga dapat melepaskan heme, yang bertindak sebagai agonis pro-inflamasi dalam sel endotel dan Makrofag melalui TLR4, atau melalui GPCR dalam sel PMN. Aktivitas enzim HO-1 menghasilkan CO, yang mendorong sekresi IL-10 dalam Makrofag yang diaktifkan, berdampak pada aktivasi sel TH yang digerakkan oleh MHC kelas II/TCR dan dengan demikian berkontribusi pada pengendalian kerusakan jaringan dan akhirnya pada toleransi penyakit. CO juga mengikat kelompok heme dari hemoglobin ekstraseluler dan mencegah pelepasan heme, sehingga melindungi jaringan dari efek vasoaktif, pro-inflamasi, dan sitotoksik dari heme labil. CO adalah molekul sitoprotektif kuat yang mencegah kerusakan jaringan dan dengan demikian mencegah penyakit infeksi. (Soares and Weiss, 2015)

IFN- γ memberikan kekuatan kepada makrofag untuk meningkatkan anti-mikroba. Efek pelindung dimulai pada pengikatan IFN- γ pada reseptor di permukaan makrofag. Protein yang diregulasi oleh IFN adalah Spesies Oksigen Reaktif, Perantara Nitrogen Reaktif, protein autophagy, mediator antivirus. Selain mengendalikan infeksi, IFN- γ dapat berfungsi sebagai pedang bermata dua dalam keadaan disfungsi imun, seperti autoimun, di mana ia dapat memperburuk gejala penyakit karena efek proinflamasi yang berkepanjangan. (Kak, Raza and Tiwari, 2018)

II.5. Miana atau (*Coleus Scutellariodes [L] Benth*)

Miana atau (*Coleus Scutellariodes [L] Benth*), umumnya dikenal sebagai coleus, adalah spesies tanaman berbunga dalam famili Lamiaceae (mint atau famili deadnettle), yang berasal dari Asia Tenggara hingga Australia. Biasanya tumbuh hingga 60–75 cm (24–30 in) tinggi dan lebar, pohon ini merupakan tanaman keras yang selalu hijau, berbahan dasar kayu, ditanam secara luas untuk daun beraneka ragam sangat dekoratif yang ditemukan dalam varietas budidaya. Sinonim *Coleus blumei* dan *Solenostemon scutellarioides* juga banyak digunakan untuk spesies ini. (Lukhoba CW, Simmonds MSJ, 2006)

Penelitian Wakhidah dkk mengungkapkan tumbuhan Miana digunakan untuk 9 macam penyakit, yaitu sakit pinggang karena haid, obat batuk, obat bisul, meredakan nyeri haid, membantu menghentikan pendarahan setelah melahirkan,

penambah nafsu makan, obat bibir pecah-pecah, obat ambeyen, dan meningkatkan kesuburan. Penelitian fitokimia yang terkandung dalam Miana antara lain, minyak atsiri, tanin, flavonoid, eugenol, steroid, tannin, saponin, fitol, asam rosmarik, streptozocin, dan quersetin. Zat fitokimia tersebut memiliki aktivitas farmakologis yang mengobati penyakit berdasarkan kepercayaan masyarakat Halmahera Barat. (Wakhidah and Silalahi)

Buah-buahan dan sayuran merupakan sumber makanan utama flavonoid bagi manusia, bersama dengan teh dan anggur. Flavonoid terbukti memiliki aktivitas antioksidan, pembasmi radikal bebas, pencegahan penyakit jantung koroner, aktivitas hepatoprotektif, anti inflamasi, dan antikanker, beberapa flavonoid menunjukkan aktivitas antivirus yang potensial. Cara kerja antimikrobanya menonaktifkan adhesins mikroba, enzim, protein transpor, dan sebagainya. Lipofilik flavonoid mengganggu membran mikroba. Katekin menonaktifkan racun kolera menghambat sintesis DNA dan RNA bakteri. Aktivitas ini serupa dengan cara kerja antibiotik menghambat rantai pernapasan bakteri. (Kumar and Pandey, 2013)

Dalam beberapa kasus, flavonoid sifat antibakteri enam kali lipat lebih kuat daripada obat standar di pasaran. Beberapa turunan sintesis flavonoid aktivitas 20 hingga 80 kali lipat lebih kuat daripada obat standar terhadap bakteri Gram-negatif dan Gram-positif yang resisten multidrug (termasuk *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, dan *Staphylococcus aureus*). (Farhadi *et al.*, 2019) Podungge dkk melakukan penelitian pada daun miana menemukan aktivitas antioksidan sebesar 98,53 mg AEAC/g (Podungge, Salimi and Duengo, 2017)

Flavonoid pada homeostasis zat besi mempunyai banyak manfaat kesehatan. Gangguan homeostasis zat besi terkait dengan banyak penyakit. Saat ini, flavonoid, di antaranya quercetin, dianggap sebagai salah satu penghambat penyerapan zat besi di duodenum. Quercetin mampu menurunkan zat besi intraseluler. Quercetin meningkatkan ekspresi hepcidin, hormon pengatur zat besi utama, dan membantu sel bertahan melawan stres oksidatif. Manfaat kesehatannya adalah kemampuannya

untuk menangkal radikal bebas. Potensi antioksidan flavonoid adalah dengan chelating zat besi. (Lesjak and Srail, 2019)

Penelitian Amsyah UK dari Soping Sulawesi Selatan terjadi peningkatan signifikan ekspresi IL-10 mRNA pada periodontitis tikus wistar yang diinjeksi *actinomycetemcomitans* dengan pemberian ekstrak daun miana. Efeknya sama seperti kontrol, dengan pemberian antibiotik levofloksasin. (Amsyah *et al.*, 2019) Penelitian menggunakan ekstrak daun miana sebagai antiseptik pada kondisi luka perineum post partum efektif pada penyembuhan luka dan menekan pertumbuhan bakteri dibandingkan dengan povidone iodine 10%. (Ningsih *et al.*, 2018)

Penelitian Romulo dkk tentang aktivitas antimikroba in vitro dari 49 ekstrak etanol dari 37 spesies tanaman digunakan dalam pengobatan tradisional Indonesia untuk pengobatan terhadap *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Staphylococcus aureus*. *Rotheca serrata* (L.) Steane & Mabb. Ekstrak daun (Lamiaceae) menghambat pertumbuhan *S. aureus* (MIC 256 mg / mL) dan *C. albicans* (MIC 256 mg / mL). (Romulo, Zuhud and Rondevaldova, 2018)

Anita dkk melakukan penelitian untuk mengetahui jenis flavonoid daun miana. Berdasarkan hasil pengujian kuantitatif pada miana daun (*Coleus atropurpureus*) yang dilakukan dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis menunjukkan rata-rata flavonoid 8,59 ekstrak mg / gram. Flavonoidnya memiliki aktivitas antioksidan yang relatif tinggi yaitu IC50 dalam ekstrak etanol daun miana 48,04 ppm. Sebuah studi yang dilakukan oleh Khotimah et al. menemukan bahwa IC50 diperoleh dari pengukuran antioksidan aktivitas pada hari ke 0, 1, 3, 7, dan 14 sebesar 70,13 ppm, 57,91 ppm, 50,91 ppm, 48,43 ppm, dan 56,10 ppm masing-masing yang dianggap sangat kuat aktivitas antioksidan. Flavonoid juga memiliki mekanisme antibakteri dengan menghambat sintesis asam nukleat dan menyebabkan kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom. (Yanto *et al.*, 2020)

Penelitian Pakadang dkk untuk mengetahui efek imunomodulator ekstrak daun miana terhadap pencegahan tuberkulosis pada tikus wistar, mengukur tingkat parameter imunomodulator; jumlah limfosit T dan sel T CD4, kadar IFN- γ dan TNF- α dan jumlah koloni *M. Tuberculosis*. Hasil menunjukkan peningkatan limfosit T, Sel T CD4, kadar IFN- γ , TNF- α dan penurunan jumlah koloni *M.*

tuberculosis setelah pengobatan Ekstrak Daun Miana.(Pakadang *et al.*, 2015)
Ekstrak daun *O. aristatus* dan *W. floribunda* menunjukkan efek antimikroba.(Rahmatullah *et al.*, 2012)

Penelitian Ridwan dkk dosis miana mengevaluasi toksisitas akut ekstrak etanol daun miana pada mencit. Gejala klinis yang terlihat pada mencit sebelum mati adalah tidak aktif, lemah, ritme pernapasan menurun dan bulu berdiri. Pemeriksaan patologi anatomi menunjukkan perdarahan pada rongga perut ditemukan pada dosis 10000 mg/kg bb ekstrak etanol. Toksik ringan, akan tetapi mulai pada dosis 4000 mg/kg bb ekstrak daun miana menyebabkan degenerasi dan nekrosa sel pada organ usus, hati, dan ginjal ekstrak etanol mengandung senyawa golongan tanin, steroid, flavonoid, dan saponin. Salah satu golongan senyawa yang berpotensi sebagai bahan toksik adalah tanin. (Ridwan, Satrija and Handharyani, 2020)

Penelitian Mbaveng dkk menilai antimikroba 19 produk alami termasuk terpenoid, alkaloid, tiofen dan fenolat terhadap 14 bakteri Gram-negatif multidrug-resistant (MDR). Hasil penelitian menunjukkan bahwa, alkaloid dan terpenoid kurang aktif dibandingkan dengan flavonoid. Aktivitas flavonoid lebih baik atau sama dengan kloramfenikol pada semua strain *K. pneumoniae*, *Providencia stuartii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Studi ini menunjukkan bahwa produk dapat dieksplorasi untuk mengembangkan obat antimikroba melawan infeksi bakteri MDR. (Mbveng *et al.*, 2015)

Penelitian Karo dkk menganalisis ekspresi IL-37 setelah pemberian ekstrak daun miana pada hewan model kandidiasis vulvovaginal. Hasil menunjukkan peningkatan ekspresi mRNA IL-37 pada tikus yang diinokulasi dengan *C. albicans*. Ekstrak daun miana dapat berperan sebagai anti inflamasi sebagai antioksidan sehingga berpotensi digunakan sebagai alternatif pengobatan pada manusia khususnya penderita kandidiasis vulvovaginal.(M. Karo *et al.*, 2018)

Faktor virulensi berperan besar dalam merangsang sistem kekebalan alami. Faktor virulensi termasuk eksotoksin, modulin seperti lipopolisakarida bakteri dapat merusak inang dengan menimbulkan peradangan, enzim seperti protease, neuraminidase, dan fosfolipase. Pathogen dapat dideteksi oleh TLR dan NLR. . NF-

κ B mendorong gen pro-inflamasi yang mengkode TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 p40, dan siklooksigenase-2. NF- κ B melakukan itu dengan bantuan TLR4 untuk menengahi diferensiasi makrofag menuju M1 fenotipe. M1 meningkatkan produksi sitokin pro inflamasi dan diferensiasi dari sel T inflamasi yang menyebabkan keduanya peradangan. Berbeda dengan makrofag M1, fenotipe M2 menghasilkan anti-inflamasi sitokin seperti IL-10 dan IL-13, yaitu penting untuk menghambat peradangan dan membantu penyembuhan luka lebih cepat. Struktur seperti TLR2, TLR4, dan TLR9 mengenali struktur bakteri dan HMGB1, termasuk reseptor untuk ujung glikasi lanjutan (RAGE) sehingga bakteri dapat mengaktifkan adaptif sistem kekebalan. Juga, TLR4 dan HMGB1 berinteraksi untuk mengaktifkan faktor inti kappa-light-chain enhancer dari sel B yang diaktifkan (NF κ B) dan kemudian faktor yang diinduksi hipoksia (HIF) -1 α . NF- κ B adalah sangat penting dalam mendorong pro-inflamasi gen yang mengkode TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p40, dan cyclooxygenase-2.⁶⁴ NF- κ B bersama TLR4 membantu diferensiasi makrofag menuju M1 fenotipe.⁶ (Yanto *et al.*, 2020)

Tabel.1.7 Penelitian Ekstrak Daun Miana invitro dan Animal model

Study	Animal used and exposure	Outcome	Results
Tari et al. 2013 ⁶²	Rabbit incised on the right and left back	Wound healing	On the day 14, the wound that were given Miana leaves showed faster healing process and shorter wound lengths when compared with control group with difference in the wound lengths varied between 0.5 - 1.1 cm favoring miana leaves.
Marpaung et al. 2014 ⁵¹	Rabbit incised 1,5 cm on the back until subcutaneous tissue and then Staphylococcus aureus bacterial suspension 0.2 mL were given to each location.	Wound healing	On day 8, the wound that were given MLE (SEDM) 20%, 40% and 80% were all already perfectly closed/healed while the wound on gentamycin ointment still have 0.2 - 0.3 cm wound length.
Pakadang et al. 2015 ³⁴	Adult male Wistar rats infected with Mycobacterium tuberculosis	Number of T-lymphocytes, CD4 T-Cells, IFN- γ and TNF- γ levels	Administration of 510mg/kg BW of EDM to male rats caused a significant increase in T-lymphocyte, CD4 T-Cells proliferation and IFN- γ
Palette et al. 2017 ⁸⁴	Mice model infected with Mycobacterium tuberculosis	IL-10 mRNA expression	MLE was able to decrease IL-10 mRNA expression with mean difference (MD) of 0.951 and was statistically significant (P = 0.001)
Karo, 2018 ⁷⁷	BALB/c mice Infected with Candida albicans	Fungi load and IL37	Administration of 750 mg/kg BW of EDM to BALB/c mice show similar fungi load suppression and elevation of IL 37 as it compares to Ketoconazole group
Karo, 2018 ⁸⁵	BALB/c mice infected with Candida albicans	IgM antibody	IgM antibody is decreased in MLE compared to the control group
Syamsuri, 2018 ¹⁴	BALB/c mice infected with Salmonella typhi	mRNA TLR4	Administration of 510 mg/kg BW of Miana to BALB/c suppression of mRNA TLR4 expression
Amsyah, 2018 ⁸³	Adult Wistar rats infected with A. actinomycetemcomitans	mRNA IL 10	Administration of 510 mg/kg BW of Miana to rats elevate the expression mRNA IL 10

Dikutip dari (Yanto *et al.*, 2020)

II.6. Penelitian Pneumonia pada mencit

Beberapa penelitian pada model hewan percobaan telah menggunakan klebsiella untuk menginduksi pneumonia. Model pada mencit dengan menggunakan pemberian Klebsiella melalui intranasal dan langsung pada trakea. Intranasal lebih sulit, dengan hasil yg tidak konsisten dan membutuhkan lebih banyak bakteri namun dosis tiap hewan tidak terkontrol. Pemberian langsung kedalam trakea melalui cannulasi atau menggunakan needle dapat mengontrol dosis, namun trakea mencit sangat kecil dan harus terlihat. Hal ini membutuhkan insisi pada leher menggunakan anestesi. Prosedur ini membutuhkan teknik dan operator yang terlatih. Kemungkinan terjadi aspirasi pada mencit yang poorly reproduced.

Glen dkk melakukan penelitian pneumonia pada model mencit yang reproducedicible dengan injeksi intraperitoneal. Tidak ditemukan kejadian peritonitis pada mencit ini, tapi semua mencit secara klinis menjadi pneumonia pada autopsi. Sebaliknya injeksi Klebsiella intravena tidak menimbulkan pneumonia. Injeksi intraperitoneal klebsiella reliable dan reproducible dan tidak membutuhkan insisi bedah atau anestesi dan mudah dilakukan. Pemberian 10^3 CFU klebsiella, semua mencit mati pada hari ke 5, dengan 50% survival pada hari ke 3. Pada model IP kematian terjadi antara hari ke 4 dan 5 dengan dosis yang sama. (Franklin *et al.*, 2003)

Penelitian Rukavina dkk menggunakan Klebsiella pneumonia, bakteri diinjeksi IP ke dalam tikus BALB / c , suspensi bakteri diatur secara densitometri pada 365 nm ke konsentrasi yang diinginkan, yang dikonfirmasi oleh jumlah koloni setelah pengenceran 10 kali lipat. Hasilnya menunjukkan bahwa dua kelompok hewan yang diuji menunjukkan konsentrasi sitokin plasma yang berbeda. Perbedaan terbesar terdeteksi 24 jam setelah infeksi, dengan produksi yang lebih tinggi pada kelompok yang tidak dilindungi. Produksi sitokin berkurang menunjukkan kelangsungan hidup hewan yang dilindungi. (Rukavina, Vasiljev and Ticac, 2005)

Penelitian observasional dilakukan di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo, Jakarta, Indonesia, 2015. Spesimen diambil dari darah, dahak, aspirasi endotrakeal, lavage bronchoalveolar (BAL), urin, nanah dan cairan drainase / spesimen jaringan bedah pada 5-7 hari rawat inap. Klebsiella pneumonia adalah bakteri gram negatif

yang paling banyak ditemukan, sedangkan *Enterococcus faecalis* untuk bakteri gram positif. (Gurmeet Singh, 2018)

Oktober 2007 hingga April 2009, pasien dewasa dirawat dengan CAP di rumah sakit Semarang, Indonesia, Secara total, 148 pasien berturut-turut dengan CAP dimasukkan. Virus influenza (18%), *Klebsiella pneumoniae* (14%), dan *Streptococcus pneumoniae* (13%) paling banyak diidentifikasi. Basil Gram-negatif, *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia pneumoniae* masing-masing 5%. Virus dan basil Gram-negatif adalah penyebab dominan CAP di wilayah ini. (Farida *et al.*, 2015)

Data kematian Purworejo Health and Demographic Surveillance System yang dikumpulkan antara 2000 dan 2002. Pneumonia penyebab paling umum kematian di antara anak-anak berusia 0-14 tahun dan orang tua. (Wahab, Choiriyah and Wilopo, 2017).

Tiga negara-negara Asia: Malaysia, Indonesia, dan Filipina. mengidentifikasi pneumonia Untuk setiap 100.000, insiden CAP dan HAP adalah 14 245 dan 5615 kasus, di Filipina, 4205 dan 2187, di Malaysia, dan 988 dan 538, di Indonesia. Dampaknya paling besar pada orang muda dan orang tua. LOS rata-rata adalah 6,1-8,6 hari untuk CAP dan 6,9-10,2 hari untuk HAP. Biaya rawat inap adalah antara USD 254 dan USD 1208 untuk CAP dan antara USD 275 dan USD 1482 untuk HAP. Hal ini menunjukkan beban CAP dan HAP tinggi. (Wahab, Choiriyah and Wilopo, 2017)

II.7. Levofloksasin

Levofloksasin adalah obat antibiotik golongan fluorokuinolon. Antibiotik ini memiliki sifat spektrum yang luas dan bisa digunakan untuk bakteri gram negatif (-), dan gram positif (+). (Chen *et al.*, 2016) Levofloksasin adalah bentuk aktif L-isomer dari ofloksasin dengan perannya sebagai antibakteri. Absorpsi dari levofloksasin per oral berlangsung dengan cepat dan hampir sempurna, dengan bioavailabilitas absolut dari pemberian tablet levofloksasin 500 mg dan 750 mg sebesar 99%. Bioavailabilitas adalah presentase dari dosis obat yang dapat mencapai sirkulasi sistemik sesudah pemberian obat dalam sediaan tertentu. Levofloksasin dapat diserap secara cepat pada sistem pencernaan dengan waktu

untuk mencapai konsentrasi maksimum (t_{max}) berkisar antara 1 sampai 2 jam setelah pemberian levofloksasin dengan dosis 500 mg sampai 750 mg. Berdasarkan penelitian, waktu penyerapan dari levofloksasin ini menunjukkan hanya sedikit dipengaruhi oleh penyerapan dari makanan. Pemberian obat levofloksasin setelah mengkonsumsi makanan tinggi lemak hanya menunjukkan perpanjangan Tmax kurang lebih 1 jam dan sedikit menurunkan konsentrasi maksimum obat (C_{max}) sebesar 14%. (Tania, Sitepu and Harahap, 2016)

Levofloksasin sifatnya dapat menyebar ke seluruh jaringan tubuh dengan baik. Pada pemberian levofloksasin dengan dosis 500 mg, memiliki volume distribusi rerata berkisar antara 1,09 sampai 1,26 L/kg. Levofloksasin dapat penetrasi ke dalam jaringan tubuh dan cairan dengan baik, oleh karena itu konsentrasinya pun lebih besar dibandingkan pada plasma darah. 24 sampai 38% levofloksasin akan berikatan dengan protein plasma. Levofloksasin sifatnya secara aktif menembus ke dalam sel fagosit secara *in vitro*, yang memiliki implikasi signifikan untuk aktivitas melawan patogen intraseluler. Akumulasi levofloksasin yang signifikan dalam sel fagositik serta jaringan lain berkontribusi pada pengamatan volume distribusi yang besar. Rasio konsentrasi rerata intraselular / ekstraselular levofloksasin dalam neutrofil berkisar antara 8,8 hingga 9,8 mg/L setelah terpapar dengan konsentrasi obat 5 dan 50 mg / L. Penyerapan levofloksasin ke dalam sel fagosit dapat dikatakan untuk meningkatkan konsentrasi obat di lokasi infeksi melalui mekanisme pengiriman fagositik yang melibatkan kemotaksis dan migrasi fagosit. (Tania, Sitepu and Harahap, 2016)

Levofloksasin adalah golongan antibiotik bakterisidal yang dapat secara langsung menghambat sintesis DNA dari bakteri. (Tania, Sitepu and Harahap, 2016) Pertama, ketika levofloksasin berhasil masuk ke dalam sistem vaskular, levofloksasin akan bertemu dengan misel dan asam hialuronat. (Lu *et al.*, 2020) Misel adalah suatu partikel koloid yang memiliki inti hidrofobik dan lapisan luar hidrofilik yang dapat meningkatkan solubilitas dari obat. Misel dan asam hialuronat berfungsi sebagai karier dari agen antibiotik. Dari hal tersebut, kompleks dari misel, asam hialuronik, dan levofloksasin akan bertemu dengan leukosit polimorfonukleat (PMN) dan juga makrofag. Pada permukaan dari makrofag terdapat reseptor CD44 yang dapat berikatan dengan asam hialuronik. (Lu *et al.*, 2020) Dalam keadaan normal, CD44 ini tidak akan berikatan dengan asam

hialuronik. Namun, jika terjadi inflamasi, asam hialuronik dapat berikatan dengan CD44. Sehingga, levofloksasin dapat masuk ke dalam makrofag melalui proses endositosis. (Lee-Sayer *et al.*, 2015)

Ketika sudah bertemu dengan patogennya, levofloksasin dapat meningkatkan kerusakan untai DNA dengan menghambat enzim DNA-girase dan topoisomerase IV pada patogen, yang akibatnya dapat mengganggu proses replikasi dari bakteri sendiri. Berdasarkan penelitian, dari antibiotik golongan fluorokuinolon, levofloksasin memiliki efek yang paling baik terhadap bakteri-bakteri gram positif seperti *Streptococcus pneumoniae*. Levofloksasin juga memiliki efektivitas terhadap organisme pernapasan lainnya; *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Legionella spp*, *Mycoplasma spp*, dan *Chlamydia pneumoniae*. Levofloksasin juga memiliki aktivitas in-vitro yang tinggi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* sehingga dapat dijadikan sebagai terapi anti-tuberkulosis lini kedua. Berdasarkan penelitian, ditemukan bahwa levofloksasin memiliki efek bakterisidal yang cepat dan kuat. Dalam 6 jam inkubasi, levofloksasin beserta PMN dapat membunuh 5.2 log bakteri *Streptococcus pneumoniae*. (Hurst *et al.*, 2002)

Penggunaan Levofloksasin pada pneumonia

Pada dasarnya antibiotik bekerja dengan mekanisme kerja yang bervariasi seperti (Katzung, 2004):

1. Menghambat sintesis atau merusak dinding sel bakteri, antara lain beta-laktam (penisilin, sefalosporin, monobaktam, karbapenem, inhibitor beta-laktamase), basitrasin, dan vankomisin.
2. Memodifikasi atau menghambat sintesis protein antara lain, aminoglikosid, kloramfenikol, tetrasiklin, makrolida (eritromisin, azitromisin, klaritromisin), klindamisin, mupirosin, dan spektinomisin.
3. Menghambat enzim-enzim esensial dalam metabolisme folat antara lain, trimetoprim dan sulfonamid.
4. Mempengaruhi sintesis atau metabolisme asam nukleat antara lain, kuinolon, nitrofurantoin

Farmakodinamik Levofloksasin

Pemecahan bentuk *double helix* DNA harus dipisahkan menjadi dua rantai DNA pada saat akan berlangsungnya replikasi dan transkripsi. Pemisahan ini selalu akan mengakibatkan terjadinya puntiran berlebihan (*overwinding*) pada *double helix* DNA sebelum titik pisah.

Mekanisme kerja dari levofloksasin sendiri adalah dengan menghambat enzim DNA-*gyrase*, yang akan mengakibatkan kerusakan pada rantai DNA. DNA-*gyrase* (topoisomerase II) merupakan suatu enzim yang sangat diperlukan oleh bakteri untuk memelihara struktur superheliks DNA, juga diperlukan untuk replikasi, transkripsi dan perbaikan DNA. Golongan kuinolon menghambat kerja enzim DNA *gyrase* pada kuman dan bersifat bakterisidal. Enzim topoisomerase II berfungsi menimbulkan relaksasi pada DNA yang mengalami *positive supercoiling* (pilinan positif yang berlebihan) pada waktu transkripsi dalam proses replikasi DNA. Topoisomerase IV berfungsi dalam pemisahan DNA baru yang terbentuk setelah proses replikasi DNA kuman selesai. (Gunawan and Sulistia, 2009; Wells *et al.*, 2009)

Levofloksasin merupakan salah satu antibiotik yang bekerja dengan mempengaruhi sintesis atau metabolisme asam nukleat atau DNA pada suatu bakteri. Levofloksasin merupakan antibiotik golongan fluorokuinolon yang dapat digunakan untuk melawan infeksi yang disebabkan oleh *Gonococcal spp*, *Shigella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Haemophilus*, *Moraxella catarrhalis*, *Enterobacteriaceae*, dan *Pseudomona aeruginosa*. (Yamane *et al.*, 1994; Katzung, 2004)

Farmakokinetik

Levofloksasin mengalami absorpsi yang cepat dan hampir sempurna setelah pemberian secara oral, dimana konsentrasi maksimum dalam plasma dicapai dalam waktu 1 sampai 2 jam. Bioavailabilitas absolut dari tablet levofloksasin 500 mg dan 750 mg adalah sebesar 99% atau lebih besar hampir mencapai 100%. Konsumsi levofloksasin bersamaan dengan makanan akan memperpanjang waktu untuk mencapai konsentrasi maksimum hampir 1 jam dan akan mengurangi konsentrasi plasma maksimum hampir 14%. (Wells *et al.*, 2009)

Volume distribusi levofloksasin secara umum berkisar antara 74 sampai 112 L setelah pemberian dosis 500 atau 750 mg. Hal ini mengindikasikan bahwa levofloksasin didistribusikan secara luas ke seluruh jaringan tubuh, termasuk jaringan mukosa bronkial dan paru-paru. Levofloksasin berpenetrasi ke dalam jaringan paru-paru dengan baik, dimana konsentrasi dalam jaringan paru-paru biasanya lebih besar 2-5 kali daripada konsentrasi dalam plasma. Ikatan antara levofloksasin dengan protein plasma adalah hampir sebesar 30-40%. Pada manusia, levofloksasin terutama terikat oleh protein albumin. (Gunawan and Sulistia, 2009)

Metabolisme levofloksasin sendiri terbatas dan diekskresikan terutama melalui urin dalam bentuk tidak berubah. Setelah pemberian secara oral, hampir 87% dari dosis yang diberikan, ditemukan dalam bentuk tidak berubah di urin dalam waktu 48 jam, kurang dari 4% ditemukan di feses dalam waktu 72 jam. (Katzung, 2004)

Setelah itu levofloksasin diekskresikan melalui ginjal dalam bentuk tidak berubah. Waktu paruh eliminasi rata-rata levofloksasin yaitu 6-8 jam setelah pemberian oral atau intravena pada individu dengan fungsi ginjal yang normal. *Renal clearance* levofloksasin tercatat adalah sebesar 96-142 mL/menit. (Gunawan and Sulistia, 2009)

Efek Samping Levofloksasin

Efek samping antibiotik golongan kuinolon ini setara dengan antibiotik lainnya. Efek samping yang paling sering terjadi yaitu pada saluran cerna, biasanya akan menimbulkan mual, muntah, dan rasa tidak nyaman pada perut. Pada sistem tubuh lainnya paling sering memberikan efek samping pada susunan saraf pusat (SSP) dengan memberikan efek samping seperti sakit kepala dan pusing, jarang sekali terjadi yaitu halusinasi, kejang, dan delirium. (Katzung, 2004; Wells *et al.*, 2009)

Obat ini mempunyai sediaan tablet 250 mg dan 500 mg dengan dosis perhari secara oral sebanyak 1 kali sehari 250 mg dan 500 mg serta sediaan infus 500 mg/100 mL dengan dosis perhari secara parenteral sebanyak 1 kali 500 mg IV tiap 24 jam. (Gunawan and Sulistia, 2009)

Levofloksasin pada Pneumonia

Pada kasus pneumonia komunitas (CAP), patogen penyebab terseringnya adalah *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, dan *Haemophilus influenzae*. Tidak jarang juga yang menjadi penyebab infeksi adalah *Staphylococcus aureus*, diikuti oleh bakteri gram negative yang belakangan menjadi penyebab infeksi seperti *Chlamydia pneumoniae* dan *Mycoplasma pneumoniae* yang dapat meningkatkan tingkat keparahan pada pneumonia komunitas. Levofloksasin dipakai karena dapat bekerja dengan aktif melawan patogen-patogen penyebab pneumonia terutama *Streptococcus pneumoniae*. (Fish and Chow, 1997; Kitzis *et al.*, 1999; Soussy *et al.*, 1999; Thomson *et al.*, 1999)

Bakteri ini menjadi penyebab infeksi pada saluran nafas bawah dan memiliki sifat sebagai *penicillin-resistant*. Biasanya pada kasus infeksi dengan *Streptococcus pneumoniae* diberikan antibiotik spektrum luas oleh golongan makrolid, sefalosporin, ataupun trimethoprim-sulfametoksazol. Pengobatan menggunakan antibiotik spektrum luas ini tidak berhasil dengan baik untuk menangani infeksi. (Thomson *et al.*, 1999)

Pada 1996-1997, terdapat tiga pasien di *Spartanburg Regional Medical Center* dengan kasus pneumonia komunitas bakterial dan pneumonia nosokomial pada saluran nafas bawah diberikan pengobatan dengan Levofloksasin 500 mg per oral mengalami perbaikan dari gejala dan juga perbaikan dari foto toraks setelah 14 hari terapi menggunakan Levofloksasin per oral. Di Indonesia sendiri, penggunaan Levofloksasin sebagai terapi untuk infeksi telah diteliti dan memberikan hasil bioavalibilitas sebesar 99% pada kasus pneumonia komunitas. Jika dibandingkan dengan penggunaan Siprofloksasin, antibiotik ini hanya memiliki bioavalibilitas sebesar 70-80% diikuti dengan penggunaan antibiotik golongan beta-laktam seperti ampicillin (30-55%), Seftriakson (37-52%). (Fish and Chow, 1997; Depkes RI, 2005) Selain itu, penggunaan levofloksasin dipilih berdasarkan farmakokinetik levofloksasin sendiri sebagai kuinolon respirasi, levofloksasin didistribusikan secara luas ke jaringan tubuh termasuk mukosa bronkial dan paru-paru. Hal ini menyebabkan penetrasi levofloksasin ke jaringan paru sangat baik karena konsentrasi dalam jaringan paru dapat mencapai 2-5 kali konsentrasi jaringan plasma. (Gunawan and Sulistia, 2009)

Dalam beberapa penelitian pun ditemukan penyebab terbesar dari pneumonia menurut Badan Pusat Pendidikan Pulmologi di Indonesia, patogen penyebab infeksi tersering adalah *Streptococcus pneumoniae* dari hasil aspirasi transtorakal diikuti dengan *Staphylococcus sp* dari hasil kultur dahak. Beberapa data juga menunjukkan hasil dimana penyebab infeksi saluran nafas bawah terbanyak adalah *Pseudomonas aeruginosa* dan diikuti oleh *Streptococcus pneumoniae*, dan *Klebsiella pneumoniae*. (Perhimpunan Dokter Paru Indonesia, 2003)

Pada kasus infeksi di rumah sakit, seperti infeksi paru atau pneumonia juga infeksi nosocomial di ICU ataupun sepsis pada neonatal sering disebabkan oleh *Klebsiella sp* dan *Enterobacteriaceae*. Menurut penelitian dari *University Hospital of Strasbourg* terdapat 40 rantai dari *Klebsiella pneumoniae* dan 40 rantai dari *Pseudomonas aeruginosa* didapati hasil MIC (*Minimum Inhibitory Concentrations*), 75% dari kumpulan rantai bakteri *Klebsiella pneumoniae* sensitive terhadap penggunaan Siprofloksasin dan Levofloksasin, serta 67,5% sisanya sensitive terhadap Moksifloksasin. Pada penelitian ini Levofloksasin memiliki sifat bakterostatik untuk melawan kuman *Klebsiella pneumoniae*. Penggunaan Levofloksasin lebih sering digunakan pada kasus infeksi oleh *Klebsiella pneumoniae* karena diduga memiliki sifat lebih bakterisidal jika dibandingkan Siprofloksasin. (Podschun and Ullmann, 1998; Schentag, 2000)

Karena patogen penyebab infeksi paru ini paling banyak disebabkan oleh *Streptococcus pneumoniae* dan juga dapat disebabkan oleh infeksi akibat *Pseudomonas aeruginosa*, maka pilihan antibiotik terbaik yang dapat digunakan adalah golongan Fluorokuinolon yaitu Levofloksasin²³. Untuk beberapa kasus yang membutuhkan perawatan hingga ICU pada kasus pneumonia komunitas, pemberian terapi antibiotik empiris dapat diberikan dengan kombinasi terapi dengan Amoksisilin atau Cefotaksim atau Ceftriakson ditambah dengan golongan makrolid atau fluorokuinolon. (Doern *et al.*, 1998)

Neutrofil infiltrasi ditentukan melalui aktivitas enzim myeloper oksidase jaringan paru. Aktivitas enzim MPO, yang merupakan indikator infiltrasi neutrofil, ditemukan paling tinggi di paru-paru hewan yang terinfeksi pada 10 jam pascaterapi. Ketika Levofloksasin diberikan sendiri atau dalam kombinasi, itu menyebabkan pengurangan signifikan dibandingkan dengan tikus yang terinfeksi

yang tidak diobati. Terapi kombinasi mampu menurunkan aktivitas secara signifikan setelah 8 jam setelah pemberian antibiotik dibandingkan dengan yang dicapai oleh monoterapi. Jumlah NO yang dilepaskan ke dalam jaringan paru-paru bertindak sebagai molekul sinyal biologis yang mengatur pelepasan mediator pro inflamasi lainnya. Terapi kombinasi dengan obat-obatan ini menghasilkan penurunan yang signifikan dalam tingkat NO pada 8 jam pasca inisiasi terapi antibiotik dan berhasil menekan pelepasan molekul ini sampai akhir pada 24 jam pasca terapi dibandingkan dengan tingkat NO pada kontrol atau monoterapi dengan salah satu obat (P 0,05).

Permeabilitas pembuluh darah paru menunjukkan nilai yang lebih tinggi (P 0,05) pada tikus yang tidak diobati yang terinfeksi *S. pneumoniae* (kontrol), yang menurun secara bertahap setelah pengobatan dengan Levofloksasin pada 8, 10, dan 24 jam setelah pengobatan antibiotik.

Kadar IL-6 dan IFN- serum menurun secara signifikan, sedangkan tingkat IL-10 meningkat secara signifikan 4 jam setelah terapi antibiotik pada tikus yang terinfeksi *pneumoniae* dibandingkan dengan tingkat IL-10 pada kelompok yang tidak diobati (P 0,05). Kadar TNF- serum tetap stabil sampai 10 jam pasca terapi dan kemudian menurun tajam pada kelompok perlakuan kombinasi dibandingkan dengan tingkat TNF- dikontrol yang tidak diobati atau kelompok monoterapi. tingkat IL-10 meningkat secara signifikan setelah 4 jam terapi antibiotik dan tetap secara substansial tinggi sampai akhir percobaan pada 24 jam (P 0,05).

Terapi kombinasi mampu mengurangi pelepasan IL-6, TNF-, IFN-, IL-8, dan protein kemotaktik monosit 1(MCP-1) di paru-paru 4 hingga 8 jam setelah inisiasi terapi dibandingkan dengan tingkat pada kontrol yang tidak diobati atau kelompok yang diobati dengan antibiotik tunggal (P 0,05). Level IL-10 juga signifikan meningkat pada kelompok yang diobati dengan antibiotik kombinasi 4 jam setelah inisiasi pengobatan dibandingkan dengan tingkat IL-10 pada kelompok yang tidak diobati dan yang diobati dengan antibiotik tunggal, dan tingkatnya dipertahankan pada tingkat tinggi sampai akhir periode pengamatan (P 0,05).

CRP serum meningkat pada kelompok yang terinfeksi yang tidak diobati 18 jam setelah infeksi dan tetap meningkat pada akhir 24 jam pengamatan. Terapi kombinasi mampu secara signifikan mengurangi tingkat protein inflamasi fase akut

ini 8 jam setelahnya terapi antibiotik dibandingkan dengan tingkat pada kontrol yang tidak diobati dan kelompok monoterapi ($P < 0,05$) Studi saat ini menunjukkan tingkat ply mRNA yang lebih tinggi di paru hewan yang terinfeksi 18 jam pasca infeksi. Terapi kombinasi dengan Levofloksasin dan Ceftriaxon menghasilkan penurunan ekspresi ply dan lytA

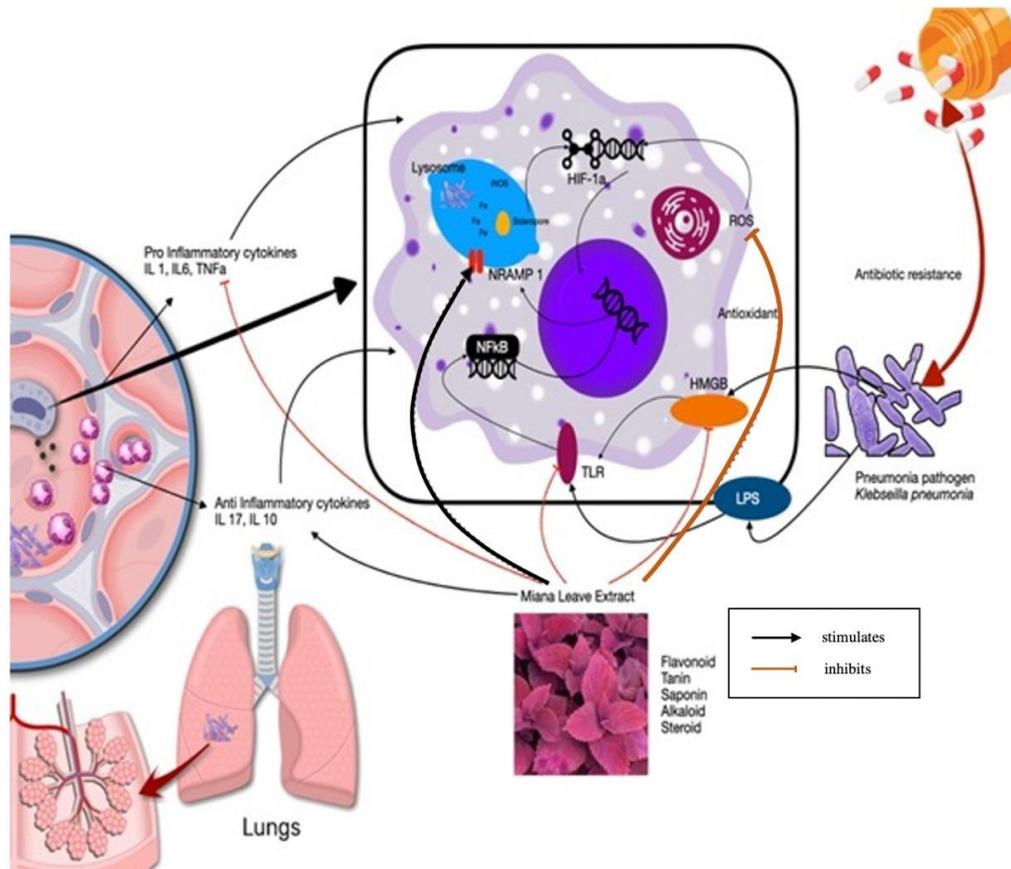
Ceftriaxone, melisis dinding sel bakteri dan pelepasan produk dinding sel tersebut untuk meningkatkan peradangan pada tempat infeksi. Kedua, levofloxacin yang memiliki beberapa sifat anti-inflamasi sekunder, meskipun makrolid memiliki sifat anti-inflamasi yang lebih besar daripada fluorokuinolon. Jadi, caranya di mana terapi kombinasi menurunkan peradangan diparu-paru dan terbukti bakterisida, sehingga meningkatkan tingkat kelangsungan hidup sebesar 90%. Hewan yang diobati dengan Levofloksasin menunjukkan penurunan aktivitas MPO dan kadar CRP serum, yang menunjukkan penurunan infiltrasi PMN ke paru-paru bersamaan dengan respons fase akut yang lebih rendah. Untuk mempelajari mekanisme yang disebutkan di atas, kami memperkirakan adanya protein COX-2 dan isoform yang dapat diinduksi darinitric oxide synthase (iNOS) di tempat infeksi dan tempat peradangan (yaitu, paru-paru). Telah dilaporkan bahwa ekspresi mRNA COX-2 secara signifikan ditekan oleh amino guanidine, inhibitor iNOS selektif, pada tikus yang terinfeksi dengan kelompok B peradangan jaringan paru-paru yang diinduksi streptokokus. Infeksi *S.pneumoniae* AMRI-SP1 melebihi-lebihkan ekspresi iNOS dan COX-2 pada 18 jam pascainfeksi di paru-paru. Terapi kombinasi dengan levofloxacin dan ceftriaxone menurunkan regulasi ekspresi protein ini di paru-paru, sementara monoterapi dengan antibiotik ini gagal melakukannya. Ekspresi COX-2 juga sebagian diatur oleh jalur oksida nitrat (NO), karena telah melaporkan bahwa infeksi *S. pneumoniae* memperburuk respon inflamasi, menyebabkan produksi beberapa mediator inflamasi, seperti TNF, interleukin, prostaglandin dan NO di paru-paru tikus. Penurunan produksi NO di paru-paru tikus menambah bukti fakta bahwa terapi kombinasi itu berkhasiat untuk pengobatan infeksi pneumokokus karena multidrug-resistant regangan. Dengan demikian, menjelaskan interaksi kompleks ini memungkinkan untuk pengembangan pendekatan farmakologis yang lebih rasional untuk pengobatan dan pencegahan penyakit di mana mereka berperan wewenang.

Karena biasanya direkomendasikan bahwa terapi kombinasi dilanjutkan selama 3 hari, meskipun telah dilaporkan bahwa potensi manfaat terapi kombinasi hadir untuk 1 dan 3 hari, mengubah waktu infeksi atau durasi pemberian obat dengan pertimbangan parameter PK/PD masih masih harus dijelaskan sebelum mempertimbangkan rejimen ini untuk penggunaan apeutik.(Majhi *et al.*, 2014)

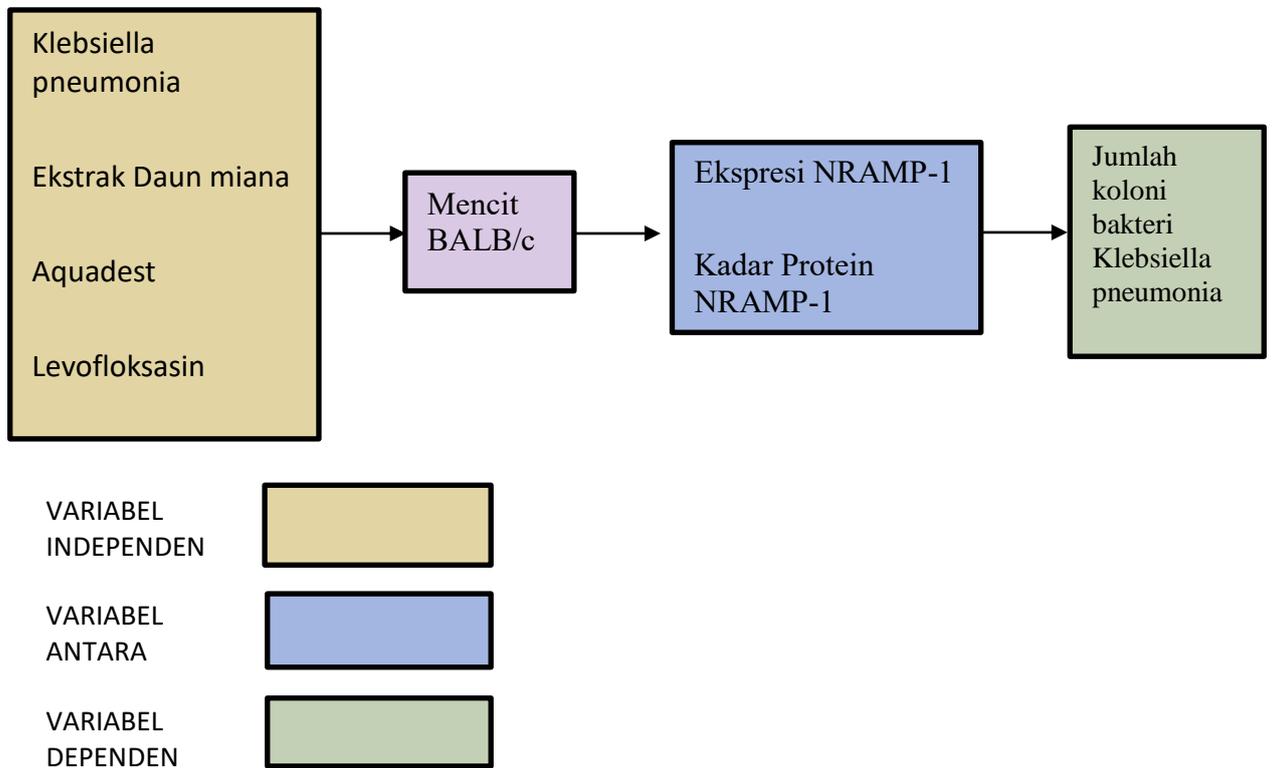
BAB III

KERANGKA TEORI, KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

III.1 Kerangka Teori



III. 2. Kerangka Konsep



III.3. Variabel Penelitian

III.3.1 Variabel independen

1. Klebsiella pneumoniae
2. Ekstrak daun miana
3. Aquadest
4. Levofloksasin

III.3.2 Variabel dependen

Variabel dependen dalam penelitian ini adalah : kultur bakteri

III.3.3. Variabel antara

1. Ekspresi NRAMP-1
2. Kadar protein NRAMP-1

III.4 Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi	Indikator	Skala
1	Ekstrak daun miana	Daun miana ungu yang telah diekstraksi secara maserasi.	Berat obat mg/kg BB	Nominal
2	Levofloksasin	kelompok antibiotik. Obat diberikan secara intraperiotenal	Berat obat mg/kgBB	Nominal
3	Aquadest	Air yang dimurnikan dengan destilasi	Volume cairan	Nominal
4	Ekspresi NRAMP-1	Gen spesifik yang dapat pengangkut ion logam dan mengaktifkan kerja makrofag meliputi up-regulasi, kemokin, sitokinin, histokompatibel kompleks utama (MHC) kelas II, aktivasi respirasi, apoptosis dan ekspresi sitokin lainnya. Dan diperiksa menggunakan pemeriksaan RT-PCR. (Realtime Polymerase Chain Reaction)	Foldchange	Nominal
5	Kadar Protein NRAMP-1	Gen spesifik yang dapat pengangkut ion logam dan mengaktifkan kerja makrofag meliputi up-regulasi, kemokin, sitokinin, histokompatibel kompleks utama (MHC) kelas II, aktivasi respirasi, apoptosis dan ekspresi sitokin lainnya. Dan diperiksa menggunakan pemeriksaan ELISA kit katalog No MBS 7223262	pg/ml	Nominal

6	Kultur Klebsiella pneumonia	Klebsiella pneumoniae, mikroorganisme diambil dari unit koleksi kultur lemari es -80 ° C di Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin, Makassar, Sulawesi Selatan. Bakteri kemudian diencerkan memperoleh jumlah bakteri 10 ² colony-forming units (CFU) dengan volume akhir 0,2 mL. Jumlah koloni dihitung setelah inkubasi 2-3 hari di plate count agar pada 37 ° C.	CFU	Nominal
---	-----------------------------	--	-----	---------