

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Community-acquired pneumonia (CAP) bertanggung jawab atas 3 juta kematian setiap tahunnya di seluruh dunia (Ferreira-Coimbra et al., 2020). Kematian yang disebabkan oleh CAP pada anak dibawah usia lima tahun mencapai angka 1,8 juta anak setiap tahunnya di seluruh dunia (WHO, 2021). Sementara di Indonesia, terdapat 503.738 anak di bawah lima tahun yang mengidap pneumonia dan 16.819 diantaranya terdiagnosis pneumonia berat. Indonesia memiliki angka kematian yang tinggi pada anak usia di bawah lima tahun yakni sebanyak 32 per 1000 kelahiran yang menunjukkan 2-3 anak meninggal setiap jamnya akibat pneumonia (Yanti dan Sari, 2022).

CAP disebabkan terutama oleh bakteri gram positif seperti *Streptococcus pneumoniae* (S. pneumoniae). S. pneumoniae berkontribusi pada tingkat mortalitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan patogen lainnya dan menjadi penyebab 1.189.937 kematian di seluruh dunia (Troeger et al., 2018). Kelompok yang paling terdampak di negara berkembang ialah anak kecil dan orang tua. Sekitar satu juta anak meninggal setiap tahun akibat S. pneumonia (WHO, 2021). Prevalensi S. pneumoniae di Indonesia berada pada kisaran 4%-13% (Amanda et al., 2021). Tingginya prevalensi dan tingkat mortalitas dari S. pneumoniae menjadi salah satu penghambat tercapainya kehidupan sehat dan sejahtera yang ditargetkan pada poin ketiga Sustainable Development Goals (SDGs). Terapi farmakologis menggunakan antibiotik golongan makrolida seperti azitromisin (AZM) merupakan salah satu pilihan dalam mengatasi permasalahan tersebut. Berdasarkan Keputusan Menteri Kesehatan Republik Indonesia, AZM direkomendasikan sebagai salah satu lini pertama pengobatan pasien CAP (Kemenkes, 2023). AZM bekerja dengan menghambat sintesis protein bakteri melalui pengikatan bagian 23S dari unit ribosom bakteri 50S (Sandman dan Iqbal, 2023).

Saat ini, AZM tersedia dalam empat jenis sediaan, yaitu sirup kering, tablet salut selaput, serbuk injeksi, dan tablet (Kemenkes, 2023). Sediaan tersebut diberikan melalui rute oral dan intravena. Namun, pemberian obat secara oral melewati hepatic first pass effect di hati, mengakibatkan penurunan bioavailabilitas obat (Nainu et al., 2021). Di sisi lain, AZM memiliki tingkat bioavailabilitas yang relatif rendah, berkisar antara 17-37% (Antonucci et al., 2022). Pemberian antibiotik melalui intravena akan mengatasi masalah bioavailabilitas yang rendah, tetapi rute ini membutuhkan dosis

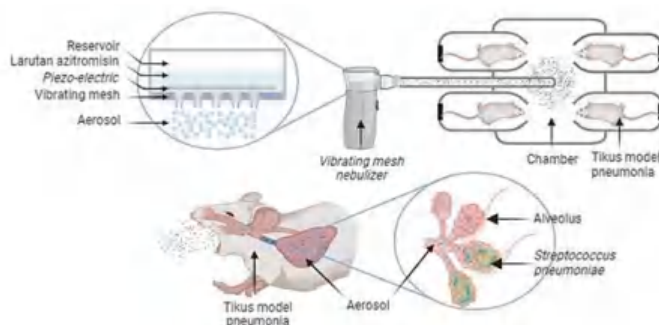
nemastikan konsentrasi yang sampai pada lokasi infeksi inhibitor concentration (Desgrouas dan Ehrmann, 2021). alui intravena dapat menimbulkan efek samping yang parah, lorus pada bayi, perkembangan infeksi *Clostridioides difficile*, hepatotoksisitas, Sindrom Stevens Johnson (SJS), reaksi ensi antibiotik (Sandman dan Iqbal, 2023). Oleh karena itu, rute



penghantaran baru sangat dibutuhkan untuk 2 meningkatkan efisiensi pengobatan dan menghindari terjadinya resistensi terhadap antibiotik.

Untuk mengatasi masalah tersebut, rute penghantaran melalui inhalasi bisa dijadikan pilihan alternatif. Karakteristik alami paru-paru, seperti luasnya area permukaan penyerapan, paparan aliran darah yang tinggi, lapisan epitel alveolus yang tipis, dan slow cell surface clearance membuat pendekatan inhalasi menjadi metode yang lebih optimal (Shen dan Minko, 2020). Terapi inhalasi yang paling umum digunakan untuk penyakit paru ialah dry powder inhalation (DPI) dan aerosol. Pada riset sebelumnya, telah dikembangkan AZM dalam sediaan DPI yang bertujuan untuk mengatasi permasalahan yang ada pada sediaan oral dan intravena (Wang et al., 2021). Namun, DPI tidak optimal digunakan pada pasien CAP dengan keluhan sesak napas atau bahkan gagal napas. DPI memerlukan high inspiratory flow untuk mendispersikan powder menjadi aerosol (Kemenkes, 2023; Ari dan Fink, 2020). Dalam mengatasi permasalahan pada sediaan DPI yang memerlukan high inspiratory flow, maka pada riset ini sistem penghantaran AZM akan dikembangkan menggunakan *Vibrating mesh nebulizer* (VMN) untuk meningkatkan efektivitas terapi CAP.

VMN bekerja berdasarkan prinsip getaran piezoelektrik yang mampu mengubah larutan menjadi aerosol dengan ukuran partikel $<4,7 \mu\text{m}$ (Moon et al., 2021; Lin et al., 2020). VMN menggunakan tenaga baterai merupakan pilihan yang tepat untuk pengobatan pasien CAP, terutama pada tempat dengan sumber listrik yang tidak stabil, seperti saat bepergian atau dalam situasi darurat medis, seperti gagal napas (Lin et al., 2020). Inovasi AZM menggunakan VMN pada riset ini diharapkan dapat meningkatkan efektivitas terapi CAP dan mendukung tercapainya poin ketiga SDGs dalam mewujudkan kehidupan sehat dan sejahtera.



Gambar 1. Ilustrasi mekanisme pemberian AZM secara inhalasi

1.2 Rumusan Masalah



erbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan
lalui pengujian *high performance liquid chromatography*
erbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan
lalui pengujian imunohistokimia
erbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan
lalui nilai *bacterial load*

4. Bagaimana perbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan intravena melalui pengujian histopatologi

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengkaji perbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan intravena melalui pengujian *high performance liquid chromatography*
2. Mengkaji perbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan intravena melalui pengujian imunohistokimia
3. Mengkaji perbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan intravena melalui nilai *bacterial load*
4. Mengkaji perbandingan efektivitas AZM sediaan inhalasi, oral, dan intravena melalui pengujian histopatologi

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari riset ini adalah untuk menciptakan rute baru dari sediaan AZM yaitu inhalasi sehingga dapat digunakan sebagai pilihan terapi CAP yang lebih baik dan lebih efektif dibanding cara pemberian antibiotik (oral dan injeksi) yang telah ada sebelumnya.



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Riset

Riset akan dilaksanakan selama 4 bulan secara luring di Laboratorium Mikrobiologi (pembuatan hewan uji model infeksi pneumonia, diagnosis infeksi pada hewan uji), Laboratorium Farmakologi (pembuatan sediaan inhalasi, intervensi obat pada hewan uji), Laboratorium Patologi Anatomi (pengukuran Histopathological Scoring (HPS) dan kadar TNF- α melalui uji Immunohistokimia), dan Hasanuddin University Medical Research Center (HUMRC) (uji high performance liquid chromatography (HPLC) dan tes Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR).

2.2 Alat dan Bahan

Alat yang akan digunakan dalam pelaksanaan riset ini antara lain JN Omron®, VMN, spoit, dan chamber. Bahan yang akan digunakan dalam pelaksanaan riset ini antara lain tikus (*Rattus norvegicus*) strain wistar, AZM 500 mg sediaan serbuk injeksi dan oral, natrium klorida (NaCl) 0,9%, formalin 10%, parafin, eter.

2.3 Variabel Riset

Variabel independen dalam riset ini terdiri atas AZM sediaan oral, intravena, dan inhalasi. Variabel dependen dalam riset ini terdiri atas konsentrasi AZM di paru-paru (uji HPLC), kadar TNF- α (tes IHC), bacterial load (tes RT PCR), dan pengukuran HPS.

2.4 Prosedur Riset

2.4.1 Pembuatan Sediaan Inhalasi

Larutan azitromisin untuk nebulisasi disiapkan dari botol intravena yang mengandung 500 mg serbuk injeksi. Pertama, setiap serbuk injeksi disiapkan dengan 5 cc larutan garam normal sesuai dengan petunjuk produsen untuk nebulisasi azitromisin, dosis 70 mg diambil dari botol yang telah disiapkan, kemudian diencerkan dalam 4 cc natrium klorida 0,9% dan diberikan dengan nebulizer jet Omron. Sediaan serbuk injeksi azitromisin yang telah disiapkan secara fisikokimia stabil selama satu minggu bila disimpan dalam lemari es (2°C - 8°C) (Andisheh et al., 2019).

2.4.2 Pembuatan Hewan Uji Model Pneumonia

Organisme uji ditumbuhkan semalaman dari stok beku pada Mc conkey agar yang dilengkapi dengan serum domba 10%. Pada pagi hari setelah kultur, suspensi akan di buat menjadi larutan Mc Farlan 1 yang kemudian akan dilarutkan hingga didapatkan suspensi untuk menginfeksi tikus dengan 103,5-104 CFU/ml *ing mesh nebulizer* (Nuermberger et al., 2020)



ervensi

agi menjadi 5 kelompok perlakuan, (n=3/kelompok). Kelompok idar, aquades sebanyak 2 mL/hari secara peroral, dan plasebo ook K+, diberikan diet standar, dan aquades sebanyak 2 mL/hari plasebo selama 3 hari. Kelompok P1, diberikan antibiotik AZM

50 mg/kgBB/hari melalui oral selama 3 hari. Kelompok P2, diberikan antibiotik AZM 10 mg/kgBB/hari secara intraperitoneal selama 3 hari. Kelompok P3, diberikan antibiotik AZM 0.2 mg/kgBB/8 jam melalui inhalasi selama 3 hari. Pada hari ke-4, tikus akan diterminasi melalui pemberian zat anestetik (eter) secara inhalasi dan selanjutnya akan dilakukan uji HPCL, RT-PCR, HPS, dan tes imunohistokimia.

2.4.4 Pengukuran dengan Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

Paru-paru tikus diberikan antibiotik AZM dihaluskan dan ditimbang seluruhnya lalu dipindahkan ke dalam tabung yang berisi 0,5 mL phosphate buffer saline (PBS). Sampel dihomogenisasi dengan kecepatan 7000 rpm selama 30 detik dalam tiga siklus. Jaringan yang telah dihomogenisasi dipindahkan ke dalam tabung Eppendorf 2 mL dan metanol ditambahkan ke setiap tabung. Supernatan diencerkan dengan metanol dan sentrifugasi. Supernatan yang dihasilkan dikumpulkan dan dilanjutkan untuk analisis HPLC (Akbal-Dagistan et al., 2022).

2.4.5 Pengujian Imunohistokimia

Sampel jaringan paru-paru direndam dan difiksasi dalam 4% paraformaldehyde selama 24 jam, diikuti dengan dehidrasi etanol gradien, xylene transparanizing, dan embedding parafin. Lalu dipotong dengan mikrotom hingga lembaran tipis (4 μ m). Langkah-langkah pewarnaan imunostaining ditunjukkan sebagai berikut. Bagian parafin dimasukkan ke dalam oven 60°C untuk proses pemanasan selama 1 jam, diikuti dengan xylene transparentizing, gradient ethanol dewaxing hingga hidrasi, dan pengambilan antigen termal. Setelah itu, antibodi TNF- α dengan konsentrasi 1:100 selama 1 jam dan antibodi ditambahkan tetes demi tetes setelah inkubasi, diikuti dengan pencucian yang cukup dengan PBS, counterstaining, pencucian dengan air dingin yang mengalir, dehidrasi, transparentizing, dan mounting. Setelah itu, sampel diamati di bawah mikroskop. Intensitas warna imunostaining dinilai dari skala 0 hingga 5 (Khan et al., 2020).

2.4.6 Bacterial load

Pengukuran bacterial load dilakukan dengan melakukan pemeriksaan Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) yang sensitif dan spesifik untuk mendeteksi dan mengukur jumlah DNA bakteri dalam sampel. Sampel diambil dari 5 spesimen darah dari tikus yang telah diberikan pengobatan. DNA bakteri diekstraksi dari sampel darah tikus yang telah dihomogenisasi menggunakan kit ekstraksi DNA (Baker et al., 2021). Hasil ekstraksi DNA kemudian dimasukkan dalam 100 μ L elution buffer untuk mengelusi protein atau DNA dari ligan atau membran dan disimpan pada suhu -20°C (Lin et al., 2021). Setelah ekstraksi DNA, dilakukan amplifikasi DNA bakteri menggunakan teknik RT-PCR untuk kuantifikasi bacterial load pada setiap



absolut dilakukan dengan membuat standard curve yang verifikasi berulang dari urutan asam nukleat spesifik hingga lipat. Amplifikasi ini dapat terdeteksi dengan pemberian label yang mengubah nilai cycle threshold menjadi kuantitas absolut dari (Baker et al., 2021).

2.4.7 Pengukuran Skoring Histopatologi

Setelah tikus diterminasi, selanjutnya akan dilakukan pengambilan spesimen dari seluruh jaringan paru-paru, lalu ditempatkan dalam larutan formalin Buffer 10%. Jaringan yang telah dipotong dimasukkan ke dalam kaset dan diproses di dalam mesin prosesing jaringan. Akan dilakukan proses Embedding dimana jaringan yang telah diproses diblok menggunakan parafin cair. Jaringan akan dipotong menjadi tipis (3-4 μ m) menggunakan mikrotom. Pita jaringan yang terbentuk dicelupkan ke dalam Waterbath. Panaskan slide diatas Hot Plate selama 20 menit. Jaringan akan di deparafinasi selama 5 menit. Lalu akan di rehidrasi selama 5 menit. Setelah itu, rendam dengan hematoxylin Meyer 6 menit dan akan dicelupkan kedalam larutan Eosin selama 10 detik. Setelah itu, akan di dehidrasi singkat (5 menit), dan Clearing selama 5 menit. Terakhir, teteskan entelan dan tutup dengan deck glass. Setiap skor penilaian dinilai berdasarkan total kumulatif dari lima kategori, yaitu jumlah infiltrat radang peribronkial/bronkial, ekstrasvasi vaskular, jumlah infiltrat radang perivaskular, dan infiltrat radang parenkimal. (Peng et al., 2024).

2.5 Pengolahan Data

Data hasil riset akan dikumpulkan, diolah, dan dianalisis menggunakan pendekatan statistik dengan menggunakan aplikasi SPSS® 26.0 (*Statistical Product and Service Solutions*). Uji t-test digunakan jika data terdistribusi secara normal, dan uji *Mann-Whitney* digunakan jika data tidak terdistribusi secara normal. Perbandingan data dianggap signifikan secara statistik jika *P value* $\leq 0,05$.

2.6 Rancangan Anggaran Penelitian

No	Jenis Pengeluaran	Sumber Dana	Besaran Dana (RP)
1	Bahan habis pakai	Belmawa	6.000.000
		Perguruan Tinggi	1.200.000
		Instansi Lain	-
2	Sewa dan Jasa	Belmawa	1.500.000
		Perguruan Tinggi	300.000
		Instansi Lain	-
3	Transpostasi Lokal	Belmawa	1.000.000
		Perguruan Tinggi	200.000
		Instansi Lain	-
4	Lain-lain	Belmawa	1.500.000
		Perguruan Tinggi	300.000
		Instansi Lain	-
Jumlah			12.000.000
		Belmawa	10.000.000
		Perguruan Tinggi	2.000.000
		Instansi Lain	-
		Jumlah	12.000.000

