

Jafriati

Monograf
**Ekstraksi
Senyawa**

Thalassia hemprichii
pada *Salmonella typhi*

MONOGRAF EKSTRAKSI SENYAWA
Thalassia hemprichii pada *Salmonella typhi*

Penulis : Jafriati

ISBN : 978-623-329-788-2

Copyright © Maret 2022

Ukuran: 15,5 cm x 23 cm; Hal: x + 108

Isi merupakan tanggung jawab penulis.

Hak cipta dilindungi oleh undang-undang. Dilarang mengutip atau memperbanyak baik sebagian ataupun keseluruhan isi buku dengan cara apa pun tanpa izin tertulis dari penerbit.

Desainer sampul : Fahrul Andriansyah

Penata isi : TimyHea

Cetakan 1, Maret 2022

Diterbitkan, dicetak, dan didistribusikan oleh

CV. Literasi Nusantara Abadi

Perumahan Puncak Joyo Agung Residence Kav. B11 Merjosari

Kecamatan Lowokwaru Kota Malang

Telp : +6285887254603, +6285841411519

Email: penerbitlitnus@gmail.com

Web: www.penerbitlitnus.co.id

Anggota IKAPI No. 209/JTI/2018

Prakata

PUJI SYUKUR KEPADA TUHAN YANG MAHA ESA, yang telah memberikan nikmat sehat dan pikiran sehingga buku ini selesai sesuai dengan harapan penulis. Shalawat serta salam tetap tercurah limpahkan kepada Nabi Muhammad Saw. Tidak ada kapasitas menjabarkan secara kompleks mengenai pemahaman mengenai “**Ektrasi Senyawa *Thalassia himprichii* Pada .**” Dalam hal ini, menjadi pandangan baru jika ingin memperdalam memahami senyawa thalassia himprichii serta beberapa jenis dan perkembangan yang ada di Indonesia.

Dalam pandangan sederhana seorang akan memahami senyawa (tentang unsur kimia) yang sering kali didengar. Pandangan tersebut akan selaras jika seorang mampu mendalami dari beberapa istilah bahasa tersebut bisa dikembangkan secara baik dan benar akan memahami hidup sehat. Karena buku di tangan Anda ini merupakan buku sederhana memahmai transmisi penyakit ke dalam konsumsi (makanan) tanpa disadari. Penyakit yang akan menjadikan kita Demam Filoid (DF) yang disebabkan adanya *Salmonella etric sorovar typhi* (S.typhi).

Penulis berusaha secara kompleks pada intinya ingin sekali memberikan sebuah pandangan sederhana memahami sesuatu yang begitu dekat dalam kehidupan kita. Khusus dalam konteks

bahan-bahan kimia yang akan bekerja dalam tubuh yang baik dan buruk. Bagaimana mungkin senyawa pasif akan menjadi aktif ketika bertemu dengan berbeda jenis. Buku ini memberikan pandangan paling sederhana dalam hal tersebut dengan menggunakan bahasa paling sederhana.

Salah satu contoh paling sederhana memahami isi buku ini. Bagaimana potensi dan tingginya kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak *thalassia hemperinchii*, maka sangat perlu dikaji untuk mengembangkan ekstrak *thalassia hemperinchii* menjadi herbal bersetandart yang berefek sebagai antioksidan dan antibakteri, yang dikaji berdasarkan ekspresi mRNA gen TLR4 pada macit BALB/c yang diinjeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan metode RT-PCR.

Sederhanya kalau di Indonesia, perlu adanya pengangan khusus mengenai tifoid, mendapat perhatian serius dari berbagai pihak, karena penyakit ini bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Belajar pada tahun 2008 angka kesakitan tifoid (tipes) di Indonesia dilaporkan sebesar 81.7 per 100.000 penduduk, dengan menurut kelompok umur 0,0/100.00 penduduk (0-1 tahun). Apa yang kita ketahui tidak akan lepas dari apa yang terjadi mengenai masalah kompleks. Sehingga bagaimana masyarakat menyadari akan hal-hal kecil tapi memiliki pengaruh besar dalam hidup.

Buku di tangan Anda merupakan buku yang tidak terlalu tebal. Namun tidak boleh diragukan mengenai isi dan manfaat jika bisa diterapkan dalam kehidupan sehari-hari. Walaupun kesempurnaan sebuah buku hasil kajian dan riset perlu dilengkapi dengan banyaknya pandangan lagi, perlu sumbangsinh lebih banyak lagi. Buku ini salah satu referensi yang perlu diambil. Selamat membaca.

Daftar Isi

Prakata — iii

Daftar Isi — v

Daftar Singkatan — vii

BAB I — 1

Pendahuluan — 1

BAGIAN II — 7

Konsep Dasar — 7

Infeksi — 7

Respon Imun terhadap — 19

BAGIAN III — 21

Sistem Imun dan *Toll Like Receptor* (TLR) — 21

Definisi Sistem Imun — 21

Tinjauan tentang *Toll Like Receptor* (TLR) — 33

Bagian IV — 47

Telaah *Thalassia hemprichii* — 47

Menelaah Lamun *Thalassia hemprichii* — 47

Metode Ekstraksi & Pemeriksaan Ekspresi mRNA Gen — 56

Hubungan , Ekstrak *Thalassia hemprichii*

dan Gen TLR 4 — 66

BAGIAN V – 71
Analisis Ekstraksi Senyawa <i>Thalassia hemprichii</i> pada – 71
BAGIAN VI – 89
Konklusi Kajian – 89
DAFTAR PUSTAKA – 93

Daftar Singkatan

μl	<i>Mikroliter</i>
TLR4	<i>Toll Like Reseptor 4</i>
AMP	<i>Adenosina monofosfat siklik</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	<i>Adenosina trifosfat</i>
BB	<i>Berat Badan</i>
<i>S. thypi</i>	<i>Salmonella thypi</i>
CFM	<i>Colony Forming Unit</i>
ConA	<i>Concanavalin A</i>
ConA	<i>Concanavalin A</i>
DC	<i>Dendritic cell</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EGCG	<i>Epigallocatechin gallate</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERG	<i>ETS-related gen</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FA	<i>Flour Albus</i>
G-SCF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>

HCs	<i>Healthy controls</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HT	<i>Hijau Terang</i>
IFN- γ	<i>Interferon gamma</i>
Ig E	<i>Immunoglobulin E</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i>
IgG	<i>Immunoglobulin G</i>
IgM	<i>Immunoglobulin M</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IL-1Ra	<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>
IL-1 α	<i>Interleukin-1 alpha</i>
IL-1 β	<i>Interleukin-1 Beta</i>
ITS 1	<i>Internal transcribed spacer 1</i>
ITS 2	<i>Internal transcribed spacer 2</i>
KOH	<i>Kalium Hidroksida</i>
KVV	<i>Kandidiasis Vulvovaginalis</i>
L6	<i>Lysis buffer</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LPS	<i>Lipoprotein sakarida</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	<i>Mililiter</i>
	<i>Mesenteric Lymph Node</i>
	<i>messenger-RNA</i>
MS	<i>Millisecond</i>
NaCl	<i>Natrium Clorida</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
P.aerogionosis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBMC	<i>mononucleated perifer</i>

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
pH	<i>Potensial Hidrogen</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear neutrophilic</i>
RA	<i>Rheumatoid Arthritis</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNS	<i>Runny Nose Syndrome</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
rRNA	<i>Ribosome-Ribonucleic Acid</i>
S.ureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
Sel NK	<i>Natural Killer Cell</i>
Sel T	<i>Limfosit T</i>
TGF	<i>Transforming growth</i>
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidine</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TOP2	<i>Topoisomerase II</i>
WBC	<i>White blood cells</i>

Bab I

PENDAHULUAN

Pada dasarnya tubuh manusia dapat terpajan dengan mikroorganisme, sehingga menyebabkan penyakit infeksi dari ringan hingga sepsis dan kematian. *Salmonella enteric serovar typhi* (*S. typhi*), merupakan mikroorganisme kelompok bakteri gram negatif berbentuk batang, masuk dalam kelompok family *Enterobacteriaceae*, yang menyebabkan penyakit Demam Tifoid (DT), transmisi penyakit ini terjadi melalui makanan dan air yang terkontaminasi. Sanitasi dan Higienitas yang baik menurunkan insiden penyakit. Akan tetapi di negara berkembang dan negara maju masih menjadi masalah kesehatan yang serius (Crump and Mintz, 2010).

Demam tifoid adalah salah satu penyebab utama mortalitas dan morbiditas kematian di seluruh dunia, sekitar 21 juta infeksi terjadi setiap tahun dengan mayoritas kematian terjadi pada anak-anak. Data menunjukkan bahwa di Amerika Utara ranking *relative*



years of life lost karena demam tifoid hampir sama dengan kanker payudara, prostat dan leukimia, sementara di Asia dan Afrika penyakit ini endemisitasnya relative tinggi (Gunn *et al.*, 2014). Surveillans insiden demam tifoid di lima Negara di Asia menunjukkan bahwa untuk daerah kumuh dan miskin di Indonesia terdapat 81-87 kasus per 100.000 penduduk per tahun untuk semua kalangan umur. Insiden di Indonesia berada di bawah India dan Pakistan namun jauh di atas China dan Vietnam (Wain *et al.*, 2014).

Di Indonesia, tifoid harus mendapat perhatian serius dari berbagai pihak, karena penyakit ini bersifat endemis dan mengancam kesehatan masyarakat. Permasalahannya semakin kompleks dengan meningkatnya kasus-kasus karier (Carrier) atau relaps dan resistensi terhadap obat-obat yang dipakai, sehingga menyulitkan upaya pengobatan dan pencegahan. Pada tahun 2008, angka kesakitan tifoid di Indonesia dilaporkan sebesar 81,7 per 100.000 penduduk, dengan sebaran menurut kelompok umur 0,0/100.000 penduduk (0-1 tahun), 148,7/100.000 penduduk (2-4 tahun), 180,3/100.000 penduduk (5-15 tahun), dan 51,2/100.000 penduduk (≥ 16 tahun). Angka ini menunjukkan bahwa penderita terbanyak adalah pada kelompok usia 2-15 tahun. Hasil telaah kasus di rumah sakit di Indonesia menunjukkan adanya kecenderungan peningkatan jumlah kasus tifoid dari tahun ke tahun dengan rata-rata kesakitan 500/100.000 penduduk dan kematian diperkirakan sekitar 0,6-5 % (Elisabeth Purba *dkk.*, 2016).

Tubuh manusia memiliki berbagai mekanisme pertahanan tubuh untuk mengendalikan kolonisasi mikroflora residen, yang cukup efektif mencegah perkembangan penyakit akibat mikroorganisme. Mekanisme pertahanan tersebut terdiri atas pertahanan fisis atau anatomis (kulit, mukosa), mekanis (sel silia pada traktus respiratorius), dan sawar biokimia (air mata atau saliva), yang selanjutnya dapat menginduksi sistem imun, alami dan adaptif (Modlin R *et al.*, 2008; Albiger B *et al.*, 2007; Emertcan A *et al.*, 2011; Terhorst D *et al.*, 2010).

Pemahaman mengenai respon imun tubuh terhadap *Salmonella* dan intervensi yang bisa diharapkan memberikan kontribusi dalam pemecahan masalah morbiditas dan mortalitas tifoid. Respon inflamasi yang lemah segera setelah infeksi strain *Salmonella* bisa menyebabkan infeksi yang persisten dan memfasilitasi survival pathogen yang lama (Marrel and Falkow., 2004), namun disisi yang lain respon inflamasi yang tidak berlebihan terhadap infeksi *Salmonella* yang sistemik juga meminimalisir kerusakan jaringan karena dimediasi oleh immune (Humayoon Shafiq Satti., 2013). Species *Salmonella*, khususnya *S. Enteric serovar typhi* (*S. typhi*) bisa persisten menetap di dalam tubuh hingga bertahun-tahun dan mengalami reaktivasi kembali. Setelah menginvasi sel M intestinal pada plak Payer, *Salmonella* bisa difagositosis oleh makrofag dan menuju ke limfonodus mesenterika, limpa, sumsum tulang dan kandung empedu dimana mereka bisa menjadi persisten (Humayoon Shafiq Satti, 2013).

Sistem imunitas alami dapat mengenali patogen melalui *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Molekul yang dikenali berupa molekul bakteri positif-Gram dan negatif-Gram, DNA dan RNA virus, jamur dan protozoa. Setiap molekul tersebut memiliki target yang spesifik. Salah satu reseptor pengenal utama pola molekul sistem imunitas alami adalah *Toll-like receptors* (TLRs) (Emertcan A *et al.*, 2011; Sato M *et al.*, 2011; Damgaard R *et al.*, 2011). *Toll Like Receptor* (TLR) termasuk kelompok glikoprotein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan transmembran dan terlibat dalam respons imun alami terhadap mikroorganisme patogen. TLR merupakan komponen kunci pada respons imun alami yang dapat mengenali komponen mikroorganisme. Selanjutnya TLR memulai jalur yang memberi sinyal untuk mengaktifkan sitokin, kemokin, dan peptida antimikroba. TLR dapat meningkatkan perlekatan dan pengaturan kostimulasi molekul yang terlibat dalam respons imun alami dan bawaan (Petry V *et al.*, 2006; Kang S *et al.*, 2006).

Saat ini telah diketahui 11 macam TLR, yang dibagi menjadi dua tipe yaitu: *surface-expressed TLRs*, yang aktif terhadap komponen dinding sel bakteri; dan reseptor intraselular, yang mengenali pola molekul virus. Seluruh TLR memiliki kemiripan struktur dan fungsi, namun memberikan respons yang berbeda terhadap komponen mikroorganisme (Terhorst D *et al.*, 2010). TLR berperan penting dalam berbagai patofisiologi penyakit autoimun, di sistem saraf pusat, paru, traktus gastrointestinal, ginjal, dan kanker, (Emertcan A *et al.*, 2011).

Gen TLR4 berperan dalam mengaktivasi respon imun *non*-spesifik. Gen TLR4 mentranskripsi protein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan sel fagosit. Protein reseptor ini mampu mengenali lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella*, dengan demikian gen TLR4 ini dapat diaktivasi oleh LPS. (Emertcan *et al.*, 2011; Animura *et al.*, 2008; Akira dan Takeda., 2004; Palsson dan O'Neill., 2004; Akashi *et al.*, 2001). Pada manusia dan tikus, telah dibuktikan bahwa terjadinya mutasi pada gen TLR4, berdampak terhadap penurunan kemampuan individu dalam mengenali LPS dari bakteri *Salmonella sp.* Individu tersebut menjadi peka dan mudah terinfeksi *Salmonella* (Lorenz *et al.*, 2002). Adanya mutasi menyebabkan gen TLR4 membentuk beberapa genotipe.

Lipopolisakarida yang terkandung dalam mampu menyebabkan demam pada manusia dengan menginjeksi produksi pirogen endogen (*in vitro*). Pirogen endogen adalah polipeptida yang dihasilkan oleh jenis sel penjamu, terutama monosit/makrofag. Pirogen endogen yang dihasilkan baik secara sistemis atau local, berhasil memasuki sirkulasi dan menyebabkan demam pada tingkat pusat termoregulasi di hypothalamus. Sitokin pirogenik utama adalah IL-1, TNF α dan IL-6. Kadar IL-6 berhubungan lebih besar dengan kejadian demam dan penemuan patologik lainnya dalam berbagai penyakit infeksi dari pada IL-1 atau TNF α , karena menetapnya IL-6 dalam sirkulasi. (Harrison., 1999).

Pengobatan demam tifoid di negara berkembang sejak tahun 1948 menggunakan antibiotik Kloramfenicol yang merupakan *drug of choice* untuk infeksi . Keampuhan kloramfenikol untuk pengobatan demam tifoid telah diakui berdasarkan efektivitasnya dan harganya yang relatif murah. Namun setelah bertahan sekitar 25 tahun dilaporkan beberapa peneliti adanya strain resisten terhadap kloramfenikol (Bhutta ZA, 2006). Seiring dengan meningkatnya resistensi bakteri di dunia kesehatan, maka perlu adanya penemuan obat baru. Sumber antibakteri baru dapat diperoleh dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam suatu tumbuhan, salah satunya dari lamun (Seagrass). Lamun hijau, merah ataupun coklat merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang sangat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi seperti sebagai anti bakteri, anti tumor, anti kanker atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antifeedant, fungisida dan herbisida (Bachtiar, 2007). Menurut Kordi (2010) bahwa lamun banyak dimanfaatkan oleh masyarakat pesisir sebagai obat luar, salah satunya sebagai bahan antiseptik alami. Hasil penelitian Pringgenies *et al.*, (2011) menunjukkan potensi lamun sebagai antibakteri patogen yang dapat menyebabkan penyakit infeksi. Salah satu penyakit infeksi yang sering terjadi adalah infeksi pada kulit. Bakteri *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa* merupakan kuman patogen yang sering menyebabkan infeksi kulit pada manusia, sedangkan *Micrococcus luteus* merupakan bakteri yang sering ditemukan menginfeksi kulit ikan (Refdanita *et al*, 2004).

Lamun dugong (*Thalassia hemprichii*) memiliki jumlah yang cukup berlimpah dan sering dominan pada padang lamun campuran. *Thalassia hemprichii* mengandung senyawa bioaktif yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif (Jafriati., 2005, Jafriati., 2014). *Thalassia hemprichii* diketahui mengandung senyawa bioaktif potensial sebagai antibakteri, antifungi, antiprotozoa, antiviral, antifertility, dan bahan obat-obatan yang berpengaruh pada sistem

kardiovaskular (Laksmi, *et al.*, 2006). Raja-Kannan, *et al.* (2010) memaparkan *Thalassia hemprichii* juga memiliki potensi bioaktif sebagai antioksidan dan mengandung senyawa golongan fenolik. Hasil penelitian Ravikumar *et al.* (2008) menunjukkan bahwa kandungan senyawa bioaktif pada lamun yang berasal dari perairan selatan India memiliki kemampuan potensi sebagai antibakteri.

Mengingat potensi dan tingginya kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak *Thalassia hemprichii*, maka sangat perlu dikaji untuk mengembangkan ekstrak *Thalassia hemprichii* menjadi herbal terstandar yang berefek sebagai antioksidan dan antibakteri, yang dikaji berdasarkan ekspresi mRNA gen TLR4 pada mencit BALB/c yang diinjeksi bakteri dengan menggunakan metode RT-PCR.

Bagian II

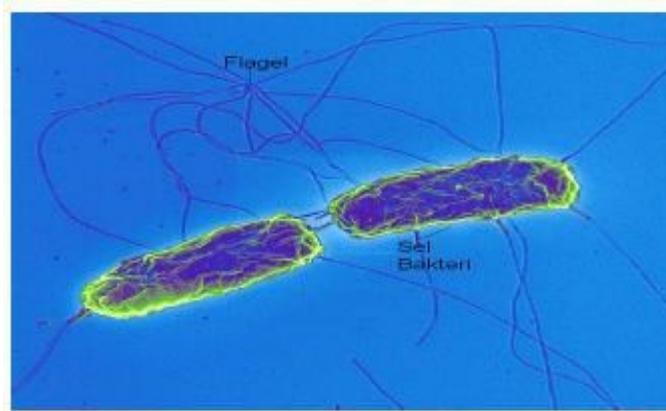
Konsep Dasar



Infeksi

A. Sifat kuman

Etiologi demam tifoid diakibatkan oleh bakteri atau *Salmonella paratyphi* dari family *Enterobacteriaceae*. Bakteri ini merupakan bakteri gram negatif batang, tidak membentuk spora, motil, berkapsul, dan berflagella (bergerak dengan rambut getar). Bakteri ini dapat hidup pada pH 6-8 pada suhu 15-41^oC (suhu optimal 37^oC). Bakteri ini dapat mati dengan pemanasan 54,4^oC selama satu jam dan suhu 60^oC selama 15 - 20 menit, pasteurisasi, pendidihan dan khlorinisasi. Terjadinya penularan *S. typhi* pada manusia yaitu secara jalur fekal-oral. Sebagian besar akibat kontaminasi makanan atau minuman yang tercemar (Tumbelaka, 2003; WHO, 2003).



Gambar 1. Mikroskopis kuman *Salmonella*

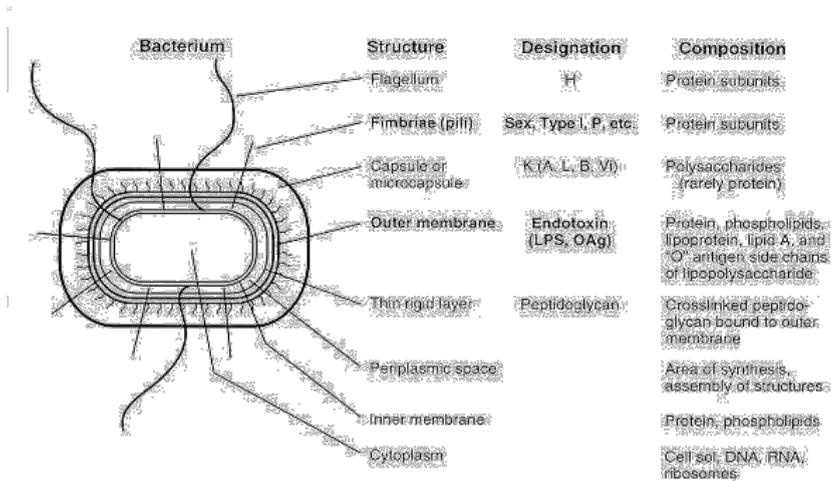
B. Struktur antigen

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

1. Antigen O (Antigenik somatik) merupakan bagian terpenting dalam menentukan virulensi kuman. Bagian ini mempunyai struktur kimia lipopolisakarida disebut endotoksin dan terletak pada lapisan luar dari tubuh kuman. Antigen ini bersifat hidofilik, tahan terhadap pemanasan suhu 100°C selama 2-5 jam dan tahan alkohol 96 % dan etanol 96% selama 4 jam pada suhu 37°C tetapi tidak tahan terhadap formaldehid.
2. Antigen H (Antigen fl agella) yang terletak pada flagella dan fimbria (pili) dari kuman. Flagel ini terdiri dari badan basal yang melekat pada sitoplasma dinding sel kuman, struktur kimia ini berupa protein yang tahan terhadap formaldehid tetapi tidak tahan terhadap panas dan alkohol pada suhu 60°C. Selain itu flagel juga terdiri dari *the hook* dan filamen yang terdiri dari komponen protein polimerase yang disebut flagelin dengan BM 51-57 kDa yang dipakai dalam pemeriksaan asam nukleat kuman *S. typhi* (WHO, 2003).
3. Antigen Vi (permukaan) yang terletak pada kapsul (*envelope*) dari kuman yang dapat melindungi kuman terhadap

fagositosis. Struktur kimia proteinnya dapat digunakan untuk mendeteksi adanya karier dan akan rusak jika diberi pemanasan selama 1 jam pada suhu 60 °C dan pada pemberian asam serta fenol (WHO, 2003).

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



Gambar 2. Gambar kuman secara skematik (Marleni, 2012)

Salmonella diklasifikasikan berdasarkan Kauffman dan White berdasarkan struktur antigen somatiknya dan antigen flagellanya (WHO, 2003).

Tabel 1. Klasifikasi *Salmonella* menurut Kauffman-White (Tam, 2008)

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

Membran luar terdiri atas lipoprotein, fosfolipid, protein, membrane, dan lipopolisakarida (LPS), (Olsen, 2004).

Dinding sel *S. typhi* dibentuk 20% nya oleh lapisan lipoprotein. Sementara itu lapisan fosfolipid dan LPS membentuk 80% dinding sel kuman *S. typhi*. lipopolisakarida yang terdiri dari lipid A, oligosakarida, dan polisakarida yang merupakan bagian terpenting dan utama yang menentukan sifat antigenik dan aktivitas eksotoksin. Lipid A merupakan asam lemak jenuh yang menentukan aktivitas endotoksin dari LPS yang selanjutnya dapat mengakibatkan demam dan reaksi imunologis sang pejamu (Marleni, 2012; Olsen, 2004). *Outer Membran Protein* (OMP) ialah dinding sel terluar membran sitoplasma dan lapisan peptidoglikan yang berfungsi sebagai sawar untuk mengendalikan aktivitas masuknya cairan ke dalam membran sitoplasma serta berfungsi sebagai reseptor bakteriofag dan bakteriolisin (Marleni, 2012).

C. Demam Tifoid

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan (*S. typhi*). Penyakit ini masih sering dijumpai di negara berkembang yang terletak di subtropis dan daerah tropis seperti Indonesia (Parry, 2004).

Sampai saat ini demam tifoid masih menjadi masalah kesehatan utama di dunia karena terkait dengan penyebarannya melalui kesehatan lingkungan, sanitasi dan sumber air yang tidak higienis diperparah dengan meningkatnya permasalahan kepadatan penduduk dan penyebaran yang begitu mudah melalui urbanisasi. Demam tifoid termasuk penyakit menular yang tercantum dalam Undang-undang nomor 6 Tahun 1962 tentang wabah. Kelompok penyakit menular ini merupakan penyakit yang mudah menular dan dapat menyerang banyak orang sehingga dapat menimbulkan wabah (Sudoyo, 2009).

D. Patogenesis demam tifoid

Perjalanan penyakit *S. typhi* melalui beberapa proses, diawali dengan masuknya kuman melalui makanan dan minuman yang tercemar melalui jalur oral-fekal. Yang kemudian tubuh akan melakukan mekanisme pertahanan melalui beberapa proses respon imun baik lokal maupun sistemik, spesifik dan non-spesifik serta humoral dan seluler (Tumbelaka, 2003). *S. typhi* yang masuk ke saluran cerna tidak selalu akan menyebabkan infeksi, karena untuk menimbulkan infeksi *S. typhi* harus dapat mencapai usus halus. Keasaman lambung ($\text{pH} \leq 3,5$) menjadi salah satu faktor penting yang menghalangi *S. typhi* mencapai usus halus. Namun sebagian besar kuman *S. typhi* dapat bertahan karena memiliki gen ATR (*acid tolerance response*). *Achlorhydria* akibat penuaan, gastrektomi, pompa proton inhibitor, pengobatan histamin antagonis reseptor H₂, atau pemberian antacid dapat

menurunkan dosis infeksi yang mempermudah kuman untuk lolos menuju usus halus (Marleni, 2012).

Setelah masuk ke saluran cerna dan mencapai usus halus, *S. typhi* akan menemui dua mekanisme *non*-spesifik yaitu motilitas dan flora normal usus berupa bakteri-bakteri anaerob. Motilitas usus bersifat fisik berupa kekuatan peristaltik usus untuk menghanyutkan kuman keluar. Di usus halus kuman akan menembus mukosa usus diperantarai *microbial binding* terhadap epitel menghancurkan *Microfold cells (M cells)* sehingga sel-sel epitel mengalami deskuamasi, menembus epitel mukosa usus, masuk dalam lamina propria, menetap dan berkembang biak. Kuman akan berkembang biak dalam sel mononuklear sebelum menyebar ke dalam aliran darah (Nasronudin, 2007).

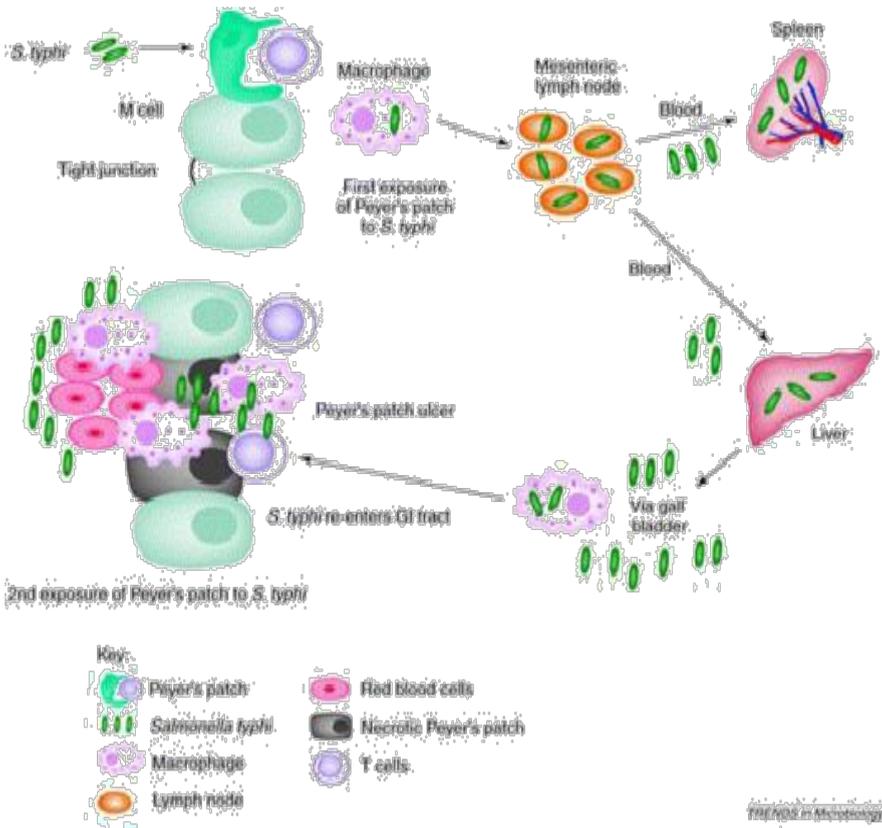
Di dalam sel fagosit mononuklear, kuman masuk menginfeksi *Peyer's patches*, yaitu jaringan limfoid yang terdapat di ileum terminal dan bermultiplikasi, kemudian kuman menembus kelenjar limfoid intestinal dan duktus torasikus masuk ke dalam aliran darah sistemik. Setelah 24-72 jam terjadi bakteriemia primer namun jumlah kuman belum terlalu banyak maka gejala klinis belum tampak. Bakteriemia primer berakhir setelah kuman masuk ke dalam organ *retikuloendotelial system (RES)* di hati limpa, kelenjar getah bening mesenterium dan kelenjar limfoid intestinal untuk berkembang biak. Di organ ini kuman menjalani masa inkubasi selama 10-14 hari, di organ RES kuman berkembang pesat dan kembali masuk ke peredaran darah dan menimbulkan bakteriemia sekunder. Pada saat terjadi bakteriemia sekunder, dapat ditemukan gejala-gejala klinis dari demam tifoid (Marleni, 2012; WHO, 2003).

Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat poten untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Sebagai reseptor, Komponen CD14 akan berikatan dengan LPS. Ikatan tersebut kemudian berikatan pula dengan kelompok molekul *Toll Like*

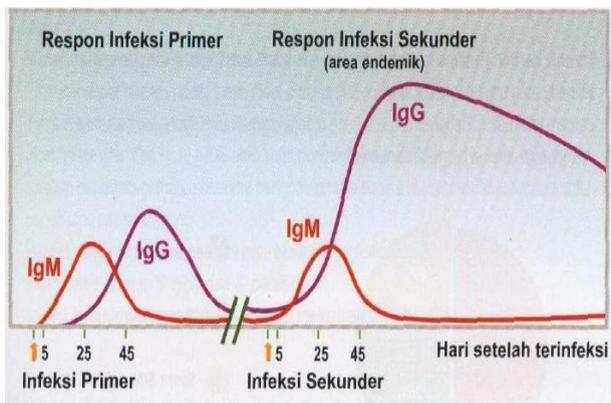
Receptors (TLR). Aktivasi yang terjadi akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivasi reseptor sitokin : reseptor sitokin tipe I (untuk IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15); reseptor sitokin tipe II (untuk 1FN- α/β , IFN- γ , IL-10); reseptor TNF (untuk TNF, CD4OL, Fas); reseptor superfamili immunoglobulin (IL-1, M-CSF). Laju infeksi demam tifoid sangat ditentukan oleh aktivitas aktivasi reseptor tersebut. Berbagai sitokin tersebut; mengikuti, sirkulasi, sistemik, menginduksi, produksi, prostaglandin, memengaruhi stabilitas pusat termoregulasi berefek terhadap pengaturan suhu tubuh dan menyebabkan demam (Marleni, 2012).

Sitokin tersebut pula yang menimbulkan dampak pada pusat nafsu makan menyebabkan nafsu makan menurun, memengaruhi ambang nyeri, sehingga timbul nyeri pada kepala, sendi, otot-otot, dan nyeri pada daerah saluran cerna. Sitokin memengaruhi perubahan pada *plaque peyeri*, inflamasi pada mukosa saluran cerna, menyebabkan motilitas saluran cerna terganggu, sehingga muncul keluhan mual, muntah, diare, nyeri abdomen, perdarahan, perdarahan, perforasi, sedangkan konstipasi terjadi pada tahap lanjut. Kondisi patologis akibat infeksi merangsang hiperaktivitas RES dan menimbulkan pembengkakan hati dan limpa (Pastoor, 2007).

Pentingnya imunitas dalam penegakan diagnosis ditunjukkan dari kenaikan titer antibodi terhadap antigen *S. typhi*. Peran imunitas seluler yaitu dalam penyembuhan penyakit. Pada infeksi primer, respon humoral melalui sel limfosit B akan berdiferensiasi menjadi sel plasma yang akan merangsang terbentuknya immunoglobulin (Ig). Pada infeksi akut, yang pertama terbentuk antibodi O (IgM) yang muncul pada hari ke 3-4 demam, kemudian disusul antibodi pada infeksi kronik yaitu antibodi flagela H (IgG) (Sudoyo, 2009).



Gambar 3. Patofisiologi demam tifoid (Marleni, 2012)



Gambar 4. Respon Imun terhadap bakteri (Marleni, 2012).

1. Manifestasi Klinis Demam Tifoid

Manifestasi klinis demam tifoid seringkali tidak khas dan sangat bervariasi dari gejala ringan seperti demam yang tidak terlalu tinggi, malaise dan batuk kering. Sesuai dengan patogenesis demam tifoid sampai dengan bentuk klinis yang berat baik berupa gejala sistemik panas tinggi, gejala septik yang lain, ensefalopati atau timbul komplikasi gastrointestinal berupa perforasi usus atau perdarahan. Hal ini menyebabkan sulit untuk melakukan penegakan diagnosis berdasarkan gambaran klinisnya saja (Darmowandoyo, 2003; Tumbelaka, 2003).

Keluhan demam merupakan gejala klinis terpenting yang muncul pada semua penderita demam tifoid. Demam muncul secara tiba-tiba kemudian dalam 1-2 hari menjadi parah dengan tipe demam *step ladder temperature chart* yang ditandai dengan demam timbul kemudian naik secara bertahap tiap harinya dan mencapai titik tertinggi pada akhir minggu pertama, setelah itu demam akan bertahan tinggi dan pada minggu keempat demam akan turun perlahan. Bersamaan dengan munculnya gejala demam sering ditemukan pula keluhan gastrointestinal seperti muntah, mual, diare, dan pada tahap lanjut terjadi konstipasi, serta dapat muncul gambaran peritonitis akibat perforasi usus. Manifestasi gejala mental kadang-kadang mendominasi gambaran klinis, seperti; konfusi, stupor, psikotik atau koma. Gejala lain yang tidak spesifik seperti batuk, malaise, sakit kepala, menggigil sering muncul pada awal perjalanan penyakit (Pastoor, 2007).

Pada pemeriksaan fisik penderita tampak sakit sedang hingga berat. Apatis dan delirium terjadi pada 10-45%, bradikardi relatif 15-10% penderita, *rose spot* (bercak makulopapular) ukuran 1-6 mm dapat timbul pada dada dan abdomen (40-80%) dan dalam waktu relatif singkat (2-3 hari). Pada awal minggu kedua, dapat timbul hepatomegali. Pemeriksaan abdomen didapatkan nyeri lokal, terkadang

disertai penurunan bising usus atau terjadi distensi abdomen (Choo,1999).

2. Pemeriksaan Penunjang Diagnosis Demam Tifoid

Menurut WHO (2003), seseorang dikatakan mengalami demam tifoid bila disertai demam ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) yang berlangsung selama tiga hari dengan konfirmasi laboratorium kultur *S. typhi* positif (darah, tulang sumsum, usus, dan cairan). Seseorang mungkin mengalami demam tifoid bila disertai demam ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) selama tiga hari dengan serodiagnosis positif atau tes deteksi antigen *S. typhi* tetapi tanpa isolasi. Sedangkan seseorang dikatakan karier kronis bila terdapat *S. typhi* dalam feses selama lebih dari satu tahun setelah onset akut tifoid (WHO, 2003).

a. Pemeriksaan Darah Tepi

Anemia dapat ditemukan pada penderita demam tifoid, jumlah leukosit normal, bisa menurun atau meningkat, anemia sering terjadi adalah anemia normokrom normositik yang terjadi diakibatkan asupan yang terbatas karena terganggunya absorpsi, hambatan pembentukan darah di sum-sum tulang dan penghancuran sel darah merah.

Diduga akibat infeksi *S. typhi* terjadi perpindahan leukosit dari sirkulasi ke dinding pembuluh darah sehingga leukosit dalam sirkulasi berkurang sehingga penderita mengalami leukopenia (20-25%). Leukopenia dengan jumlah $3000-4000/\text{mm}^3$ dapat ditemukan pada fase demam. Jumlah leukosit $< 2000 /\text{mm}^3$ merupakan tanda prognosis buruk (House, 2001).

Penelitian beberapa ilmuwan mendapatkan bahwa hitung jumlah dan jenis leukosit serta laju endap darah tidak mempunyai nilai sensitivitas, spesifisitas, dan prediksi. Yang cukup tinggi untuk dipakai dalam membedakan antara penderita demam tifoid atau bukan,

tapi adanya leukopenia dan limfositosis relatif menjadi dugaan kuat diagnosis demam tifoid (Marleni 2012).

3. Biakan

Penegakan diagnosis pasti demam tifoid dapat ditegakkan bila ditemukan bakteri *S. typhi* terdapat pada biakan darah, urine, feses, sumsum tulang, cairan duodenum dan *rose spot* (Tumbelaka, 2003). Hasil biakan darah yang positif memastikan demam tifoid akan tetapi hasil negatif tidak menyingkirkan demam tifoid, Kegagalan untuk mengisolasi organisme dapat disebabkan oleh beberapa faktor :

- a. Keterbatasan media laboratorium, (2) penggunaan antibiotik, (3) volume spesimen, jumlah yang dianjurkan 10-15 ml, atau (4) waktu pengumpulan, pasien dengan riwayat demam selama 7 sampai 10 hari menjadi lebih mungkin memiliki kultur darah positif (Tumbelaka, 2003; WHO, 2003).

Aspirasi sum-sum tulang adalah *gold standard* untuk diagnosis demam tifoid karena bakteri dalam sumsum tulang ini lebih sedikit dipengaruhi oleh antibiotika daripada dalam darah. Namun prosedur yang digunakan sangat invasif dan tidak digunakan dalam praktik sehari-hari. Aspirasi duodenum juga telah terbukti sangat memuaskan sebagai tes diagnostik tetapi belum diterima secara luas karena toleransi yang kurang baik pada aspirasi duodenum, terutama pada anak-anak (WHO, 2003).

- b. Identifikasi Kuman Secara Molekuler

Metode serologi lainnya adalah identifikasi bakteri *S. typhi* dengan mendeteksi DNA (asam nukleat) gen flagelin bakteri *S. typhi* dalam darah dengan teknik hibridisasi asam nukleat atau amplifikasi DNA dengan cara *Polymerase Chain Reaction* (PCR) melalui identifikasi

antigen Vi yang spesifik untuk *S. typhi*. Penelitian oleh Haque, dkk (1999) mendapatkan spesifisitas PCR sebesar 100% dengan sensitivitas yang 10 kali lebih baik daripada penelitian sebelumnya dimana mampu mendeteksi 1-5 bakteri/mL darah. Penelitian lain oleh Massi dkk (2003) mendapatkan sensitivitas sebesar 63% bila dibandingkan dengan kultur darah (13.7%), dan pemeriksaan Widal (35.6%), (Massi et al., 2003).

Kelemahan yang sering dihadapi pada penggunaan metode PCR adalah risiko kontaminasi yang menyebabkan hasil positif palsu yang terjadi bila prosedur teknis tidak dilakukan secara teliti dan adanya bahan-bahan dalam spesimen yang bisa menghambat proses PCR (hemoglobin dan heparin dalam spesimen darah serta bilirubin dan garam empedu dalam spesimen feses), biaya mahal dan prosedur rumit. Usaha untuk melacak DNA dari spesimen klinis masih belum memberikan hasil yang memuaskan sehingga saat ini penggunaannya masih terbatas dalam laboratorium penelitian (Bourbeau, 2001).

4. Pengobatan

Obat-obat anti mikroba yang sering digunakan untuk demam tifoid adalah klomfenikol, tiamfenikol, kotrimosazol, ampicilin, amoksisilin, sefalosporin generasi ke-tiga, golongan Fluorokuinolon dan Azitromisin. Kloramfenikol adalah yang paling sering digunakan (Widodo, 2009)

Kloramfenikol bekerja dengan menghambat sintesis protein kuman. Obat ini terikat pada ribosom dan menghambat enzim peptidiltransferase sehingga ikatan peptide tidak terbentuk pada proses sintesis protein kuman. Setelah pemberian oral, kloramfenikol bisa diserap dengan cepat. Kadar puncak dalam darah bisa tercapai dalam waktu 2 jam. Di dalam hati, kloramfenikol mengalami konjugasi dengan asam glukoronat oleh enzim glukoronil transferase.

Oleh karena itu, pemakaian dalam jangka waktu panjang bisa menyebabkan gangguan faal hati (Setiabudy, 2007).

Ampisilin bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel sementara golongan fluorokuinolon bekerja dengan menghambat sintesis asam nukleat.

Respon Imun terhadap

Bakteri merupakan bakteri intraseluler dan cirri khas dari bakteri intraseluler adalah kemampuannya untuk hidup bahkan berkembang biak dalam fagosit. Mikroba tersebut mendapat tempat tersembunyi yang tidak dapat ditemukan oleh antibody dalam sirkulasi sehingga untuk eliminasinya memerlukan mekanisme immune selular (Baratawidjaja, 2006). Bakteri *Salmonella enteric* adalah bakteri gram negatif yang bisa menginvasi secara luas dan menyebabkan infeksi kronik dan akut. Hal ini, karena kemampuannya bereplikasi dan bertahan dari fagosit sel epithelial sel, sel dendritik dan makrofag pada *system immune* (Gunn, et al., 2014).

Spesies *Salmonella*, khususnya *Salmonella enteric serovar typhi* bisa persisten/menetap di dalam tubuh hingga bertahun-tahun dan mengalami reaktivasi kembali. Setelah menginvasi sel M intestinal pada *plak peyer*. *Salmonella* bisa difagositosis oleh makrofag dan menuju ke limfonodus mesenterika, limpa, sumsum tulang dan kandung empedu dimana mereka bisa menetap disana (Humayoon Shafiq Satti, 2013). Bakteri yang persisten bisa melepaskan diri dari surveillans imun dan beresiko terhadap komplikasi.

Pada saat infeksi *Salmonella* terjadi, sitokin proinflamasi interleukin (IL-1 β dan interleukin6, IFN- γ , TNF- α disintesis dan terjadi inflamasi sitemik. IFN- γ juga dikenal sebagai *macrophage activating factor* (MAF) berperan penting dalam infeksi persisten yang dipengaruhi oleh durasi aktivasi makrofag juga sangat

penting terhadap resisten host terhadap infeksi. Sekresi IFN- γ tergantung pada IL-18.

Setelah sitokin diekskresi maka aktivasi Th1 dan Th2 dimulai. Aktivasi klasik bakteri atau IFN- γ akan mengantarkan perubahan profil sekresi sel melalui produksi organik nitrat seperti *nitric oxide* (NO). Keberadaan *Salmonella* pada sel menyebabkan sekresi sitokin dan reaksi inflamasi atau program kematian sel melalui apoptosis. Sinyal dari sitokin yang diinjeksi oleh interaksi sel host dan bakteri adalah hal yang krusial dalam perkembangan *Salmonellosis*. Keseimbangan antara sitokin proinflamasi dan anti inflamasi akan mengontrol pencegahan kerusakan host karena inflamasi yang berlebihan (Hurley, et al., 2014)

Makrofag merupakan hal yang esensial untuk mekanisme pertahanan melawan berbagai infeksi. Beberapa jenis sitokin yang mempengaruhi fungsi makrofag. IFN- γ diproduksi oleh antigen spesifik sel T helper yang mengaktivasi makrofag. Aktivasi ini merupakan hal yang penting dalam melawan pathogen intraseluler yang bisa survive dalam makrofag. Fungsi makrofag bisa terhalang oleh IL-4, IL-10 dan TGF- β . Secara khusus, IL-10 adalah sitokin anti inflamasi yang bisa menghambat produksi *reactive oxygen intermediate* dan aktivasi makrofag. Makrofag adalah sumber utama produksi IL-10. Beberapa bakteri pathogen intraseluler termasuk *Salmonella* menjadikan makrofag sebagai target infeksi sehingga IL-10 berperan penting dalam adaptasi bakteri pathogen intraseluler untuk survive dalam makrofag dan mencegah pertahanan host dengan deaktivasi makrofag (Uchiya, et al., 2004).



Bagian III

Sistem Imun dan *Toll Like Receptor* (TLR)

Definisi Sistem Imun

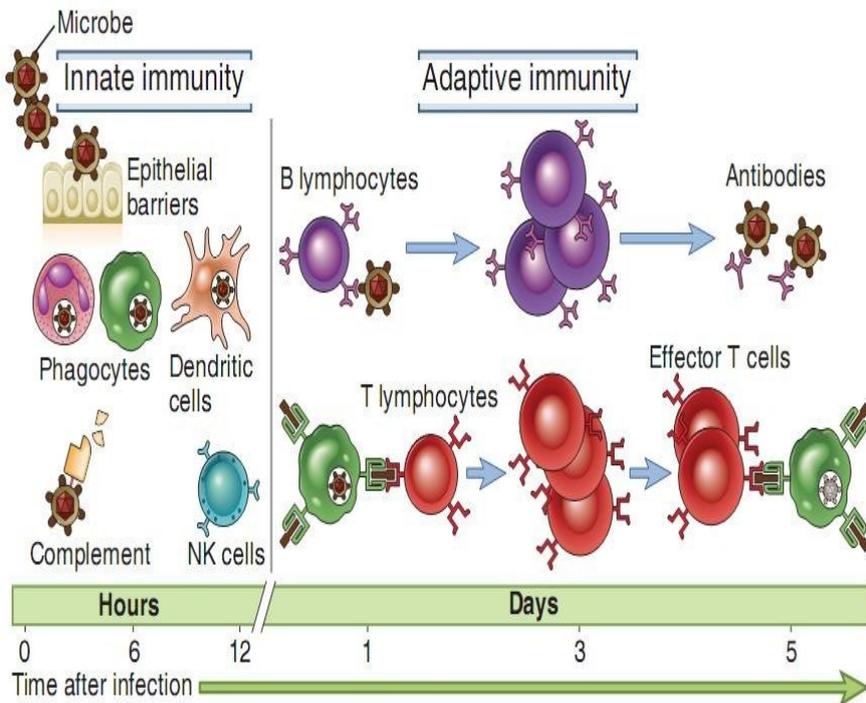
Imunitas didefinisikan sebagai pertahanan terhadap penyakit, terutama penyakit infeksi. Kumpulan sel-sel, jaringan, dan molekul-molekul yang berperan dalam pertahanan infeksi disebut sistem imun, sedangkan reaksi terkoordinasi sel-sel dan molekul tersebut dalam pertahanan terhadap infeksi, disebut sebagai respon imun. Immunologi adalah ilmu yang mempelajari sistem imun, termasuk respon terhadap mikroba patogen, dan kerusakan jaringan serta peranannya pada penyakit (Abbas, Lichtman, and Pillai 2014).

Fungsi fisiologi system imun yang paling penting adalah mencegah serta membasmi penyakit. Pentingnya system imun dalam kesehatan secara dramatis digambarkan melalui pengamatan yang sering yang menunjukkan bahwa seseorang

dengan kelainan respon imun akan rentan terhadap infeksi berat dan seringkali mengancam nyawa. Sebaliknya, merangsang respon imun terhadap mikroba melalui vaksinasi adalah metode paling efektif untuk melindungi seseorang dari infeksi (Abbast, et al., 2014).

A. Imunitas Alami dan Adaptif

Mekanisme pertahanan inang terdiri dari imunitas alami, yang memberikan perlindungan segera terhadap infeksi, imunitas, dan adaptif yang berkembang lebih lambat. Namun memberikan perlindungan yang lebih spesialistik terhadap infeksi (**Gambar 5**).



Gambar 5. Mekanisme imunitas bawaan dan imunitas adaptif (Abbas *et al.*, 2014). Mekanisme imunitas bawaan merupakan pertahanan awal melawan infeksi. Sedangkan respon imun adaptif timbul setelahnya dan dimediasi oleh limfosit dan

produknya. Antibodi mengblokir infeksi dan mengeliminasi mikroba, eradikasi mikroba ekstrasel dilakukan oleh sel T. Kinetika respon imun bawaan dan adaptif berbeda tergantung dari jenis infeksi.

Imunitas alami (natural immunity dan native immunity) selalu ada pada individu-individu sehat, dan disiapkan untuk menghambat masuknya mikroba dan untuk mengeliminasi mikroba yang berhasil memasuki jaringan inang (host) secara cepat. Imunitas adaptif (disebut juga imunitas spesifik atau imunitas dapatan) memerlukan ekspansi dan diferensiasi limfosit sebagai respon terhadap mikroba sebelum memberikan pertahanan yang efektif. Imunitas ini beradaptasi terhadap adanya infeksi mikroba.

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

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

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

(limfosit), mengekspresikan reseptor yang secara spesifik mengenali berbagai molekul yang diproduksi oleh mikroba serta molekul-molekul non infeksius.

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

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

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

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

1. Antibodi yang disekresi akan mengikat mikroba ekstraseluler, menghambat kemampuan mereka untuk menginfeksi sel inang dan merangsang penelanan serta penghancuran oleh fagosit.
2. Fagosit menelan mikroba dan membunuh mereka, dan sel T helper memperkuat kemampuan mikrobisidal fagosit.

3. Sel T helper mengerahkan leukosit untuk menghancurkan mikroba dan meningkatkan fungsi pertahanan epitel untuk mencegah masuknya mikroba.
4. Limfosit T sitotoksik membunuh sel yang terinfeksi mikroba.

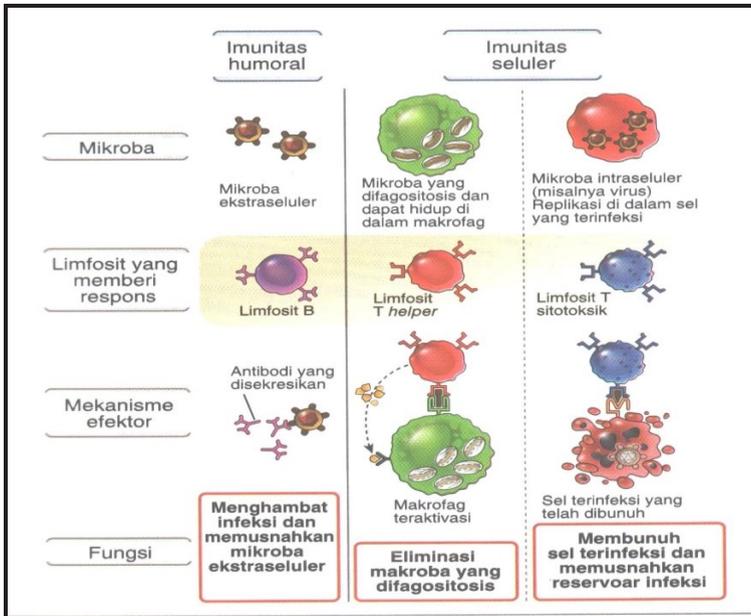
Respon imun adaptif berkembang dalam tahapan-tahapan, yang masing-masing sesuai dengan reaksi tertentu limfosit (Abbas., et al. 2014).

B. Imunitas Humoral dan Imunitas Seluler

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

1. Imunitas Humoral

Imunitas humoral diperantarai oleh protein yang dinamakan antibodi, yang diproduksi oleh sel-sel yang disebut limfosit B. Antibodi masuk ke dalam sirkulasi dan cairan mukosa, lalu menetralsisir dan mengeliminasi mikroba serta toksin mikroba yang berada diluar sel-sel inang, dalam darah, cairan ekstraseluler yang berasal dari plasma dan di dalam lumen dari organ-organ mukosa, seperti traktus gastrointestinalis dan traktus respiratorius (**Gambar 6**).



Gambar 6. Imunitas humoral dan seluler
(Abbas *et al.* 2014)

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

2. Imunitas Seluler

Pertahanan terhadap mikroba intraseluler tersebut dinamakan imunitas seluler karena prosesnya diperantarai oleh sel-sel yang disebut sel limfosit T. Beberapa limfosit T mengaktifasi fagosit untuk menghancurkan mikroba yang telah dimakan oleh sel fagosit ke dalam fagosit intraseluler. Limfosit T lainnya membunuh berbagai jenis sel inang yang terinfeksi

mikroba infeksius di dalam sitoplasmanya. Dalam kedua kasus tersebut, sel T mengenali antigen yang ditampilkan pada permukaan sel, yang menunjukkan adanya mikroba di dalam sel tersebut.

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

Imunitas pada seseorang dapat diinduksi oleh infeksi atau vaksinasi (imunitas aktif) atau diberikan pada seseorang melalui transfer antibody atau limfosit dari seseorang yang terimunisasi aktif (imunitas pasif) (Abbas AK, Lichtman AH, 2014; Abbas, et al.. 2014).

C. Pengenalan Mikroba oleh Imunitas Alami

Kemampuan pathogen memasuki tubuh manusia (untuk mencari kehidupan) dan kemampuan tubuh manusia untuk mendeteksi kedatangannya (sebagai musuh manusia) adalah bentuk keadilan Tuhan terhadap semua makhluknya (manusia dan pathogen sama-sama makhluk Tuhan). Pada pathogen telah ada penanda dalam bentuk molekul yang akan dikenal oleh pertahanan manusia (sistem imunitas *innate*) sehingga kedatangan musuh ini dapat diantisipasi manusia dan makhluk Tuhan lainnya. Karakteristik molekul penanda pada pathogen yaitu :

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

Penanda ini hanya ada pada mikroba yang membahayakan manusia, tidak ada pada sel manusia (mamalia). PAMPs ini berbeda-beda tergantung jenis pathogen (virus, bakteri gram negative, bakteri gram positif, dan jamur), tetapi satu jenis PAMPs dapat ditemukan pada jenis pathogen yang berbeda (**Tabel 2**). Penanda ini hanya ada pada mikroba pathogen sehingga menjadi pembeda yang membuat imunitas alami

hanya berespon terhadap mikroba pathogen dan tidak terhadap sel sendiri.

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

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

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

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

a. *Pattern Recognition Receptors (PRRs)*

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

Patogen yang berbeda dapat memiliki PAMPs yang sama sehingga spesifisitas imunitas innate tidak spesifik terhadap antigen pathogen tertentu seperti imunitas adaptif, tetapi spesifik PAMPs. Oleh karena itu mikroba yang berbeda tetapi memiliki PAMPs yang sama dapat

dikenal oleh reseptor yang sama seperti terlihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Cell-associated PRRs pada imunitas innate

PRRs	Lokasi	Contoh	PAMP / DAMP ligands
<i>Toll-like receptors</i> (TLRs)	Membran plasma dan membrane endosomal sel dendritic, fagosit, sel B, sel endotel, dll	TLR 1-9	LPS, peptidoglikan, produk sel rusak
<i>NOD-like receptors</i> (NLRs)	Sitoplasma fagosit, sel epitel dan sel lain	NOD1/2 NLRP <i>family</i> (<i>inflammasome</i>)	Flagelin, LPS, Kristal urat, produk sel rusak
<i>RIG-like receptors</i> (RLRs)	Sitoplasma fagosit dan sel lain	RIG-1, MDA-5	RNA virus
<i>C-type lectin like receptors</i>	Membrane plasma fagosit	Reseptor mannose Dektin	Karbohidrat pada permukaan mikroba dengan terminal

mannose dan fructose, Glukan pada dinding sel jamur

<i>Scavenger receptor</i>	Membran plasma fagosit	CD36	<i>Microbial diacylglycerides</i>
<i>N-formyl met-leu-phe receptors</i>	Membran plasma fagosit	FPR dan FPRL 1	Peptida mengandung residu N-formylmethionyl

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

b. *Soluble Recognition Molecules (SRMs)*

Berbagai protein dalam darah dan cairan ekstraseluler yang dapat mengenal PAMPs. Protein-protein ini berperan memfasilitasi pembersihan mikroba dari darah atau cairan ekstraseluler dengan cara meningkatkan penangkapan mikroba oleh sel-sel imunitas innate dan mengaktifkan pembunuhan kuman ekstraseluler (Tabel 3).

Tabel 3. SRMs pada Imunitas Innate

SRMs	Lokasi	Contoh	PAMP ligands
<i>Pentraxins</i>	Plasma	<i>C-reactive protein</i>	<i>Microbial phosphorylcholine dan phosphotidylethanolami</i>

			<i>ne</i>
<i>Collectins</i>	Plasma	<i>Mannose-binding lectin</i>	Karbohidrat pada permukaan mikroba dengan terminal mannose dan fructose. Berbagai struktur mikroba
	Alveoli	Surfactant proteins (SP-A dan SP-B)	
<i>Ficolins</i>	Plasma	<i>Ficolin</i>	<i>N-Acetylglucosamine</i> dan <i>lipoteichoic acid</i> yang ada pada dinding sel bakteri gram positif
<i>Complement</i>	Plasma	C3	Permukaan mikroba misalnya LPS
<i>Natural antibodies</i>	Plasma	IgM	<i>Phosphorylcholine</i> pada membrane bakteri dan membrane sel apoptotic

D. Stimulasi Respon Imunitas Alami Melawan Mikroba

Jika mikroba hinggap dikulit maka ia akan terlempar oleh aliran udara dan keringat dipermukaan kulit, atau dibunuh oleh peptide antimikroba (misal β defensin) yang ada pada kulit. Jika mikroba

ingin masuk melalui saluran napas maka mikroba akan dihalangi oleh bulu hidung. Kalau berhasil masuk lebih dalam, akan bertemu musin yang akan membungkusnya, kemudian dikirim keluar melalui “escalator” silia epitel saluran napas, atau bertemu dengan antibakteri β -defensin dan cathelicidins yang akan membunuhnya. Kalau berhasil masuk lebih dalam lagi sampai alveolus, sudah menunggu makrofag alveolar yang akan menelannya. Demikian adalah contoh simulasi “pergulatan” mikroba sebagai penyerang dengan sistem pertahanan imunitas alami manusia.

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

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

Mikroba yang lolos masuk ke jaringan dan ditangkap oleh fagosit (makrofag, neutrophil, dan sel dendritic), akan

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

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

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

Tinjauan tentang *Toll Like Receptor* (TLR)

A. Sejarah dan definisi

Penamaan *Toll Like Receptors* (TLRs) berasal dari kemiripan struktur dan fungsi pada reseptor trans-membran yang ditemukan pada lalat *Drosophila melano-gaster*. Dinamai *Toll*, yang dalam bahasa Jerman berarti “fantastis” atau “aneh”. Analisis rangkaian

gen memperlihatkan adanya *encoded* protein transmembran dengan domain intrasitoplasmik baru yang mirip dengan reseptor interleukin- 1 (IL-1) pada tikus. Selain mengatur perkembangan tahap embrionik, bentuk mutan *Toll* juga mengganggu pertahanan anti jamur dari lalat. Selanjutnya diketahui bahwa defek pada jalur *Toll* menyebabkan gangguan respons imun terhadap penyebab infeksi lainnya. Janeway dkk. Pada tahun 1997, menemukan homolog reseptor *Toll* *Drosophila* pada manusia. Saat ini dikenal sebagai TLR4, yang terdiri atas domain intra-sitoplasmik *Toll-like receptors/ IL-1 receptors*, namun domain ekstraselular imunoglobulin (Ig) mirip dengan reseptor IL-1. Terlihat kemiripan struktur pada reseptor lalat, yang terdiri atas *leucine -rich repeats*. Kemiripan ini menunjukkan suatu metode lama reseptor pengenalan yang dipertahankan melalui evolusi dan digunakan oleh manusia dan serangga. Saat TLR pertama kali ditemukan untuk mengenal *pathogen-associated molecular patterns*, TLR merupakan reseptor terpenting dalam pengenalan pola mikroorganisme pada sistem imunitas alami (Petry V, et al., 2006, Kang S, et al., 2006).

TLR merupakan reseptor transmembran yang dikodekan oleh *germline* dengan karakteristik berupa *leucin-rich domain* (LRR) ekstraselular dan domain intraseluler atau sitoplasmik yang homolog dengan *interleukin-1 receptor* (TIR) (Albiger B., et al, 2007, Carpenter S., et al, 2007, Zoste M., et al, 2011). LRR ditemukan pada sejumlah protein dan terlibat dalam pengenalan ligan dan trans-duksi sinyal. Domain LRR dipisahkan dari region transmembran oleh domain LRR *carboxy-terminal*. Domain TIR dibutuhkan untuk *intracellular signaling*. TLR diekspresikan oleh berbagai sel misalnya makrofag dan sel dendritik (Carpenter S, et al., 2007). TLR berfungsi sebagai *Pathogen Recognition Receptors* (PRRs), mengenali *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) yang unik pada mikroba dan penting dalam pertahanan diri mikroba. Ligasi PAMPs pada TLR akan menginduksi sel imun dan mengaktifkan sejumlah jalur dalam imunitas alami yaitu

inflamasi, koagulasi dan kematian sel (Elson G, et al., 2006). Pengenalan PAMPs ini menyebabkan sistem imunitas alami mampu membedakan antara bahan *self* dan *non-self* (Valins W, et al., 2010)

B. Klasifikasi TLR

Sebagian besar spesies mamalia diperkirakan memiliki 10 hingga 15 tipe TLR. Tiga belas TLR ditemukan pada manusia dan tikus (Emertcan A., et al, 2011, Elson G., et al, 2006). Tabel 1 memperlihatkan 11 TLR yang telah diketahui, dengan ligan dan spesiesnya.

Tabel 4. Klasifikasi TLR, ligan, dan spesies yang dikenali (Emertcan A, et al., 2011).

TLR <i>subfamily</i>	Ligan	Spesies
TLR1 + TLR2	<i>Triacyl lipopeptides</i>	Bakteri
TLR2	Zymosan	Jamur
TLR3	dsDNA	Virus
TLR4	<i>Lipopolysaccharide</i>	Bakteri negatif-Gram
TLR5	Flagellin	Bakteri
TLR6+ TLR2	<i>Diacyl lipopeptides</i>	Mikoplasma
TLR7	ssRNA	Virus, pejamu
TLR8	ssRNA	Virus, pejamu
TLR9	DNA, hemozin	Bakteri, virus, Plasmodium
TLR 10	Tidak diketahui	Bakteri
TLR11	<i>Profilin-like protein</i>	Toksoplasma, bakteri

TLR mengenali dan merespons molekul mikroba yang berbeda, sehingga sistem imun alami dapat membedakan patogen dan menginduksi respons kaskade yang sesuai. Masing-masing

TLR mengenali berbagai pengulangan produk mikroba, contohnya pasangan ligan-reseptor seperti TLR4 dan lipopolisakarida (LPS), TLR5 dan flagelin, TLR1/TLR2/TLR6 dan lipoprotein, serta TLR3/TLR7/TLR8/TLR9 dan asam nukleat tertentu (Petry V, et al., 2006, Ehrentraut H, et al., 2011).

Sel imun yang mengekspresikan TLR antara lain monosit, makrofag, granulosit, sel natural killer, dan sel B, sel T. Sel non-imun juga mengekspresikan TLR misalnya keratinosit, fibroblast, dan sel epitel. TLR terutama ditemukan pada sel yang memulai respons imun primer, yaitu di permukaan sel, membran plasma sel, serta kompartemen intrasel, berupa retikulum endoplasmik dan endosom (Emertcan A, et al., 2011, Elson G, et al., 2006)

C. TLR pada epidemis, dermis dan subkutan

Tiga populasi sel utama yaitu keratinosit, *antigen presenting cells* (APC), dan melanosit berperan dalam mengenali mikroba di epidermis. Dermis didominasi oleh fibroblast dan *dermal dendritic cells*. Ekspresi TLR setiap sel tersebut bervariasi. Keratinosit, mengekspresikan TLR1, TLR2, TLR3, dan TLR 5; sel Langerhans mengekspresikan TLR2 dengan kadar yang tinggi, TLR3, TLR4, TLR8; dengan kadar sedang dan TLR10; serta sedikit dari TLR1, TLR5, TLR6, TLR7 dan TLR9. Melanosit mengekspresikan TLR4 dan terlihat memberikan respons terhadap induksi matriks metalloproteinase yang berhubungan dengan ligan. Fibroblas manusia yang berasal dari kulit yang terkelupas terlihat mengekspresikan TLR3 dan TLR4, tapi tidak mengekspresikan TLR2 dan TLR9 (Terhorst, et al., 2010; Valians W, et al., 2010; Sandor F, et al., 2005).

Sel lain yang mengekspresikan TLR misalnya monosit/makrofag, sel dendritik, sel limfosit B dan T, sel mast, sel endotel, dan jaringan adipose (Valians W, et al., 2010). Adapala dkk. melakukan penelitian pada tikus percobaan yang mengalami obesitas dan mendapatkan makanan tinggi lemak dibandingkan

dengan tikus berat badan normal serta mendapatkan diet normal. Hasilnya ekspresi TLR2 dan TLR4 meningkat pada jaringan adiposa tikus yang obesitas (Adapala V, et al., 2011).

Tabel 5. Ekspresi TLR pada berbagai sel

	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10	TLR11
KC	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	NK
LC	+/-	+	+	+	+/-		+/-	+	+/-	+	NK
MC	NK	NK	NK	+	NK	NK	NK	NK	NK	NK	NK
DC	+	+	-	+	+	+	-	+	+	NK	NK
Fb	NK	+	+	+	+	NK	-	-	-	NK	NK

DC : *dendritic cell*; Fb : *fibroblast*; KC:*keratinocyte*;

LC :*Langerhans cell*; MC: *melanocyte*; NK: *not known*;

+: *normal expression*; -: *no expression*; +/-: *low expression*.

D. Spesifik Ligan TLR

Pengenalan komponen dinding sel bakteri merupakan peran dari 5 jenis TLR yaitu TLR 1,2,4,5, dan 6, yang disebut juga sebagai TLR ekstraselular karena ekspresinya pada permukaan sel dan domain ekstraselular (Terhorst D, et al., 2010). TLR4 merupakan reseptor yang pertama kali ditemukan pada manusia (Albiger B, et al., 2007; Terhorst, et al., 2010) dan dapat mengenali lipopolisakarida bakteri negative Gram. TLR4 juga dapat mengenali protein yang

dikode oleh virus pada traktus respiratorius, dan *self-protein* seperti protein *heat-shock* dan β -defensin. Selain itu, protein matriks yaitu fibronektin dan fibrinogen protein plasma juga dikenali melalui TLR4 (Albiger B, et al., 2007; Terhorst, et al., 2010).

TLR2 dapat mengenali banyak ligan, misalnya lipopeptida bakteri, zimosan jamur, protein parasit dan virus serta *Lipo Teichoic Acid* (LTA) bakteri positif-Gram. TLR 2 dan TLR4 terdapat pada permukaan sel dan dapat mengenali bakteri (Liadaki K, et al., 2011). Banyaknya pengenalan ligan ini terjadi karena pembentukan heterodimer TLR2 dengan dua TLR lain, yakni TLR1 atau TLR6, yang dapat mendis-kriminasikan sedikit perubahan struktur ligan. Heterodimer TLR1/TLR2 dapat mengenali *triacylated lipoprotein*, sedangkan TLR2/TLR6 dapat mengenali *diacylated lipoprotein*. TLR5 dapat mendeteksi domain terbatas pada monomer flagelin, protein struktur utama, yang membentuk flagella pada bakteri Gram-negatif. Flagela merupakan organel penggerak yang berperan pada virulensi, kemo-taksis, adhesi, dan invasi permukaan pejamu.

TLR9 mengenali asam nukleat yaitu hipometilasi CpG, yang umumnya terdapat pada DNA prokariotik dan tidak terdapat pada genom eukariotik. TLR9 juga diaktivasi oleh hemozoin, hem yang terdiri dari produk degradasi hemoglobin eritrosit yang terinfeksi oleh parasit malaria. TLR3, TLR7, dan TLR8, dapat mengenali asam nukleat misalnya TLR9, tapi lebih baik dalam pengenalan RNA *Single-Stranded* (SS) dan *Double-Stranded* (DS) dibandingkan DNA (Albiger B, et al., 2007; Petry V, et al., 2006).

E. Penandaan TLR

Jalur penandaan TLR terdiri atas, jalur yang tergantung pada *Myeloid Differentiation Factor 88* (MDF88) yang umum terhadap semua TLR, dan jalur yang tidak tergantung pada *Myeloid Differentiation Factor 88* (MDF88) yang selektif terhadap TLR3 dan

TLR4 (Albiger B, et al., 2007; Terhorst, et al., 2010). Jalur yang tergantung pada *Myeloid Differentiation Factor 88* (MDF88) akan menginduksi sitokin inflamasi atau TRIF (*Toll-IL-1R domain containing adaptor-inducing interferon β*) yang akan menginduksi produksi interferon tipe 1 yang juga merupakan sitokin inflamasi (Emertcan A, et al., 2011). TLR 3 dan TLR 4 akan mengaktifkan jalur yang tidak bergantung pada MDF88, yang akan menyebabkan produksi IFN- β (McIntrurff J, et al., 2005). Aktivasi MDF88 memulai kaskade penandaan, yang menyebabkan aktivasi berkesinambungan kinasi dan translokasi faktor transkripsi sentral dari *Nuclear Factor* (NF)- κ B dan *Interferon Regulatory Factor* (IRF)-3. Akhirnya MDF88 berhubungan dengan *Toll Interleukin* (IL)-1 receptor (*TIR*) adaptor-containing adapter protein terhadap kompleks yang akan menarik *IL-1 receptor-associated kinase* dan *Tumor Necrosing Factor* (TNF)-6, yang selanjutnya akan mengaktifasi Ikb Kompleks Kinase (IKK) (Albiger B., et al, 2007; Terhorst, et al., 2010).

Pada penandaan MDF88, molekul adaptor *TIR domain-containing adaptor, Inducing Interferon* (IF)- β (TRIF) ditarik ke bagian intrasel TLR3 secara langsung atau ke TLR4 melalui *TRIF Related Adaptor Moleculc* (TRAM), yang selanjutnya menyebabkan aktivasi *Tank Binding Kinase 1* (TBK-1) dan TRAF-6. Keduanya merupakan tempat terjadinya induksi respons imun yang didominasi oleh (NF)- κ B atau respons imun yang didominasi oleh IRF-3 dengan pola aktivasi IFN tipe 1 (Albiger B, et al., 2007; Terhorst., et al, 2010).

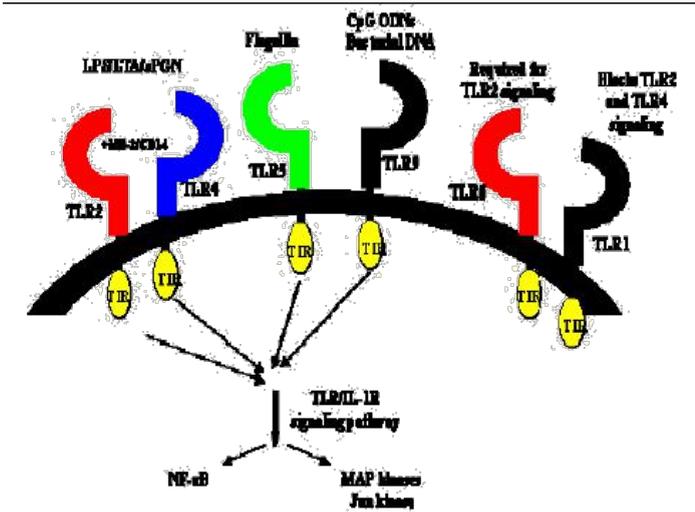
F. Konsekuensi Aktivasi TLR

Aktivasi ligan TLR akan mengaktifasi fagositosis patogen dan respons inflamasi terhadap kandungan fagosom. Beberapa TLR, yaitu TLR2 dan TLR4, mampu membantu penempatan fagosom, yang merupakan kontak paling dini sistem imun terhadap antigen mikroba yang berpotensi merusak. Karakteristik terpenting

aktivasi TLR adalah terbentuknya kondisi proinflamasi yang disajikan oleh sitokin dan kemokin tertentu, didomimasi oleh TNF α dan IL-12 pada (NF)- κ B dan IFN α/β pada IRF-3 penanda ligan TLR (Terhorst, et al., 2010).

G. Pengenalan TLR Terhadap Bakteri

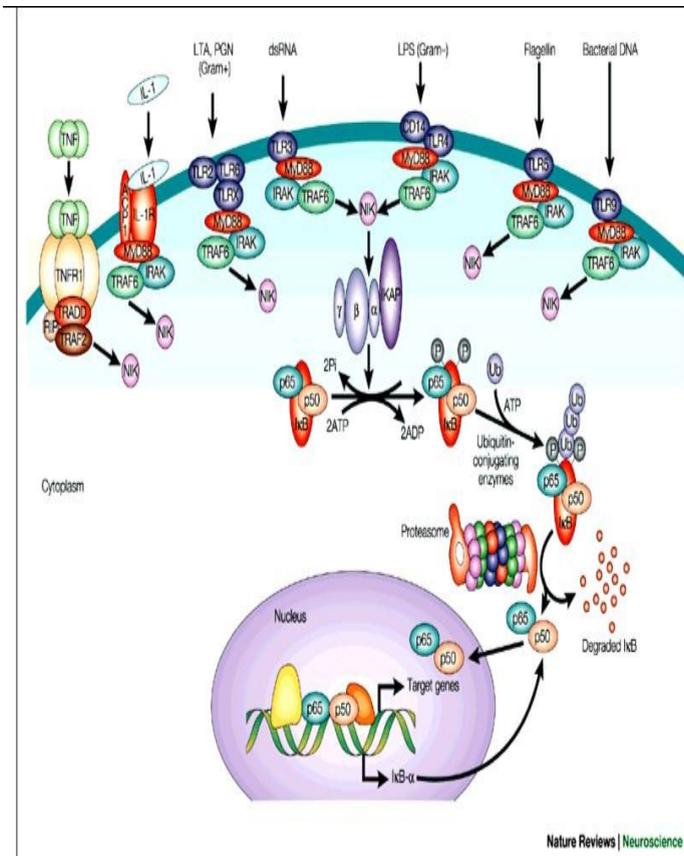
Pemahaman tentang peranan reseptor dan protein tambahan yang terlibat dalam imunitas terhadap bakteri merupakan hal penting terhadap intervensi pengobatan infeksi bakteri. Identifikasi TLR merupakan langkah maju memahami mikroorganisme, terutama bakteri. Ekspresi TLR berbeda tergantung atas tipe sel. Fungsi TLR yang telah diketahui berupa pengenalan PAMPs eksogen dan ligan endogen, dengan tambahan protein intraseluler yang termasuk dalam kelompok *Nucleotide-binding Oligo-merization Domain* (NOD) serta diidentifikasi sebagai PRR untuk produk degradasi peptidoglikan (Elson G, et al., 2006). Berikut adalah gambar pengenalan TLR terhadap bakteri (Gambar. 7).



Gambar 7. Pengenalan TLR terhadap bakteri (Netea G, et al., 2004)

Keterangan :

Komponen mikroba yang telah dikenali dan terikat pada CD14, TLR melalui MD-2, TIR/IL-1R akan mengaktifkan NF- κ B MAP kinases melalui Jun kinases. TLR2 mengenali mikroba melalui lipopeptida, TLR1, TLR6 bekerjasama dengan TLR2 untuk membedakan *triacyl* dan *diacyl* lipopeptida. TLR4 merupakan reseptor terhadap LPS, mannan. TLR9 spesifik pada pengenalan CpG DNA. TLR3 untuk pengenalan dsRNA virus, sedangkan TLR7 dan TLR8 dikhususkan pada pengenalan flagela.



Gambar 8. Signal-transduction pathways melalui NF κ B (Dang Minh Nguyen, *et al.*, 2002)

Keterangan :

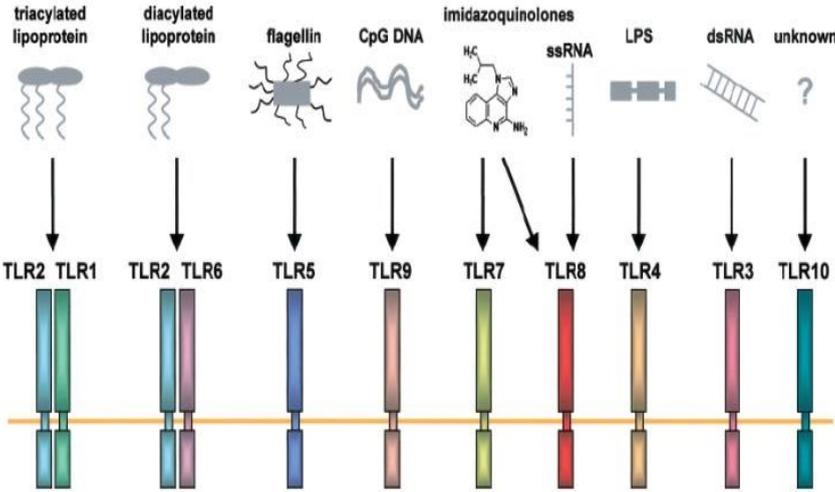
Komponen mikroba dikenali dan diikat reseptor CD14, TLR yang mengaktifkan MyD88, TRAF6, IRAK, faktor transkripsi seperti NF- κ B yang translokasi dalam inti sel dan mempengaruhi ekspresi gen

Selama pengenalan dari struktur mikroba, signal TLRs akan menyebabkan perlekatan ligan pada permukaan sel yang menimbulkan reaksi cytoplasmic signaling molecules, dimana pertama kali adalah protein adapter MD88 (Myeloid Differentiation Factor 88) dan mengaktifasi molekul signaling seperti IRAK (IL-1 Receptor Associated Kinase) dan TRAF6 (TNF Receptor Associated Factor). Kinase yang disebut sebagai reseptor IL-1 dihubungkan dengan kinase (IRAK) termasuk dalam signaling kompleks ini. IRAK menyebabkan terjadinya autophosphorilasi, aktivasi signal molekul yang lain seperti reseptor TNF- α (TNF-R). Gen yang diekspresikan dalam respons oleh TLR penting dalam menimbulkan komponen yang berbedabeda dalam respons imun innate, di sini termasuk sitokin inflamatori (TNF, IL-1, IL-8 dan IL-12), endothelial adhesion molecules (E -selection), dan protein yang berperan dalam mekanisme pembunuhan mikroba (termasuk iNOS). Gen yang secara khusus diekspresikan tergantung tipe sel. Faktor transkripsi, seperti AP-1 (Activating Protein-1) melalui jun kinase dan NF- κ B (Nuclear Factor κ B) yang diaktivasi dan ditranslokasi di nukleus, akan menstimulasi produksi sitokin dan aktivitas fagositosis (**Gambar 8**) (Abbas AK, et al., 2000; Akira Shizuo, 2000).

Bakteri negatif-Gram dapat dikenali dan mengaktifkan RPR TLR4, sedangkan bakteri positif-Gram dikenali dan mengaktifkan TLR2. TLR2 membentuk heterodimer dengan TLR1 dan TLR6. Terdapat perbedaan jalur pengaktifan sinyal TLR oleh MyD88 (bersama MAL) dan *TRIF adapter protein* (bersamaan dengan TRAM). Aktivasi TLR4 menyebabkan penarikan MyD88 dan TRIF, tetapi pengaktifan TLR2 hanya menyebabkan penarikan MDF88.

Aktivasi TLR4 menyebabkan koinduksi *Nitric Oxide Synthesis* (NOSII) dan TNF- α , sedangkan aktivasi TLR2 hanya mengaktifkan TNF- α . NOSII dan TNF- α merupakan gen kunci pada imunitas alami dan inflamasi (Paul-Clark M, et al., 2006).

TLR4 menjadi mediator respons *host* terhadap *lipopolysaccharide* (LPS) bakteri negative Gram. TLR2 menjadi mediator respons terhadap peptidoglikan bakteri gram-positif. Heterodimer TLR2/1 selanjutnya akan menjadi mediator respons terhadap lipoprotein *tri-acylated* dan heterodimer TLR2/6 merupakan mediator terhadap lipoprotein *di-acylated*. Tidak semua TLR menjadi respons alami terhadap komponen dinding sel bakteri. Contohnya adalah TLR9 yang memediasi respons terhadap *unmethylated* CpG DNA yang terdapat pada genom bakteri sedangkan TLR5 menjadi mediator respons *host* terhadap flagellin bakteri (**Gambar 9**) (McIntrurff J, et al., 2005).



Gambar 9. TLR secara spesifik mengenali *pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)* dan/atau komponen sintetis (McIntrurff J, et al., 2005)

Keterangan:

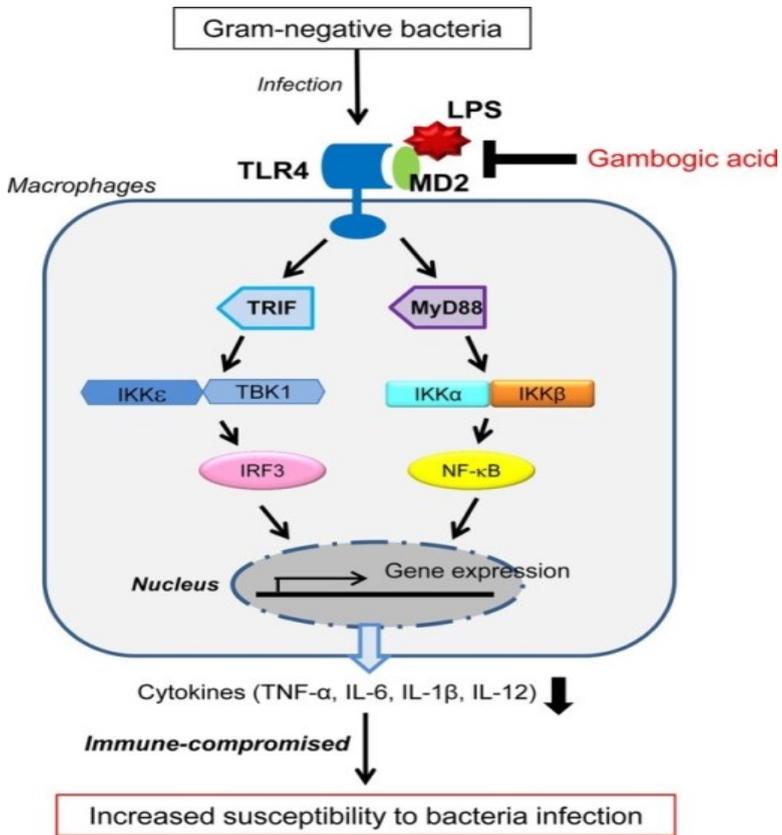
Terdapat 10 TLR yang diekspresikan pada manusia dan berbagai ligan terhadap mikroba yang dikenalnya yaitu:

1. TLR2 dan TLR1 mengenali *triacylated protein* bakteri.
2. TLR2 dan TLR6 mengenali *diacylated protein* bakteri.
3. TLR5 mengenali flagellin bakteri.
4. TLR7 mengenali ssRNA virus.
5. TLR8 mengenali ssRNA virus.
6. TLR9 mengenali CpGDNA virus.
7. TLR10 belum diketahui.

H. Toll Like Receptor 4 (TLR4)

Gen TLR4 berperan dalam mengaktivasi respon imun non spesifik. Gen TLR4 mentranskripsi protein yang berfungsi sebagai reseptor permukaan sel fagosit. Protein reseptor ini mampu mengenali lipopolisakarida (LPS) dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella*, dengan demikian gen TLR4 ini dapat diaktivasi oleh LPS. (Emertcan, *et al.*, 2011; Animura, *et al.*, 2008; Akira dan Takeda, 2004; Palsson dan O'Neill, 2004; Akashi, *et al.*, 2001). Mekanisme kerja TLR4 terlihat pada **Gambar 10**.

Pada manusia dan tikus, telah dibuktikan bahwa terjadinya mutasi pada gen TLR4, berdampak terhadap penurunan kemampuan individu dalam mengenali LPS dari bakteri *Salmonella sp.* Individu tersebut menjadi peka dan mudah terinfeksi *Salmonella* (Lorenz, *et al.*, 2002). Adanya mutasi menyebabkan gen TLR4 membentuk beberapa genotipe.



Gambar 10. Mekanisme kerja TLR4 terhadap infeksi bakteri gram negatif

Bagian IV

Telaah *Thalassia hemprichii*

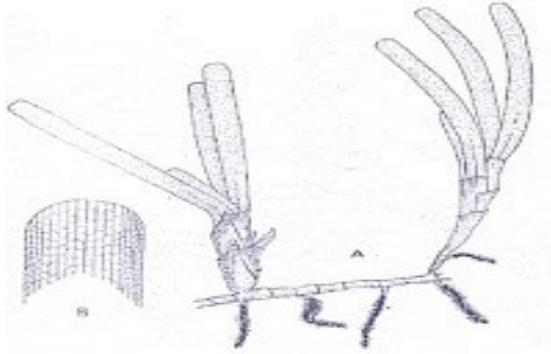
Menelaah Lamun *Thalassia hemprichii*

A. Morfologi dan klasifikasi

Thalassia hemprichii merupakan salah satu jenis lamun yang tumbuh di perairan tropik dan penyebarannya cukup luas (Thomascik, et. Al., 1997). Menurut Kiswara (1992) lamun jenis ini sangat umum dan banyak ditemukan di daerah rata-rata terumbu, baik yang tumbuh sendiri-sendiri (monospesifik) maupun yang tumbuh bersama-sama dengan lamun jenis lain atau tumbuhan lain (mixed vegetasi). Fortes (1993 dalam Latuconsina, 2002) mengatakan bahwa *Thalassia hemprichii* mempunyai rimpang (rhizoma) yang berwarna coklat atau hitam dengan ketebalan 1 - 4 mm dan panjang 3 - 6 cm. Setiap nodus ditumbuhi oleh satu akar di mana akar dikelilingi oleh rambut kecil yang padat. Setiap tegakan mempunyai 2 - 5 helaian daun dengan apeks daun yang



membulat, panjang 6 - 30 cm dan lebar 5 - 10 mm (**Gambar 11 dan 12**).



Gambar 11. *Thalassia hemprichii*

Sebaran kedalaman relatif sempit, dari daerah eulitoral sampai kedalaman 4 - 5 m, walaupun juga ditemukan pada kedalaman 30 m. Sering merupakan spesies yang melimpah di daerah intertidal rata-rata terumbu karang yang menerima hempasan energi yang tinggi dengan substrat pasir dan pecahan-pecahan karang yang kasar (Thomascik, et al., 1997). Philips dan Menez (1988) dalam Latuconsina (2002) mengemukakan bahwa pada prinsipnya jenis ini didapatkan di daerah sub tidal dari pasang rendah sampai kedalaman 5 m. Juga dapat tumbuh di daerah intertidal sampai pinggiran mangrove.

Berikut klasifikasi *Thalassia hemprichii* menurut Den Hartog (1970); Philips dan Menez (1988 dalam Latuconsina 2002) :

- Divisio : Anthophyta
- Kelas : Monocotyledonia
- Ordo : Helobiae
- Famili : Hydrocaritaceae
- Sub Famili : Vallisnerioideae
- Genus : *Thalassia*
- Spesies : *Thalassia hemprichii*



Gambar 12. Lamun *Thalassia hemprichii*

Dalam Hertanto (2008) disebutkan beberapa parameter lingkungan yang mempengaruhi hidup lamun yaitu kecerahan untuk intensitas cahaya dalam melaksanakan fotosintesis, kisaran temperatur yang optimum bagi spesies lamun adalah 28-30 C, salinitas optimum adalah 35%, substrat dengan tipe lumpur sampai sedimen dasar yang terdiri dari endapan lumpur halus sebesar 40%, dengan kecepatan arus sekitar 0,5 m/detik⁻¹.

B. Senyawa metabolit

Metabolit sekunder adalah senyawa hasil metabolisme sekunder yang tidak dibutuhkan bagi pertumbuhan organisme akan tetapi dibutuhkan bagi kelangsungan hidupnya yaitu senyawa yang digunakan untuk menangkal serangan predator dan untuk bertahan terhadap lingkungannya Metabolit ini dihasilkan dalam jumlah yang kecil (bisa mencapai ng/g atau 10⁻⁹ g/g bahan), dan dalam kondisi tertentu (*stressing*), serta tidak diproduksi secara universal tetapi hanya pada spesies atau *strain* spesifik (Wink 1999

dalam Sudibyo 2002). Fungsi metabolit ini bagi organisme penghasil belum secara jelas diketahui, namun diduga senyawa tersebut dibutuhkan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya (toksin, antifungal, antibakteri, antibodi, dll) serta dibutuhkan untuk pengaturan proses reproduksi, sporulasi dan metabolisme sekunder lainnya (seperti vitamin, hormon, pigmen, dll) (Quenner *and* Day 1986, Dewick 1999 dalam Sudibyo 2002). Beberapa senyawa metabolit sekunder:

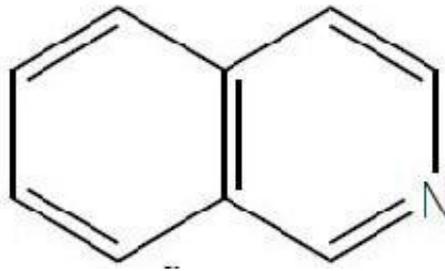
1. Alkaloid

Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. Umumnya alkaloid mencakup senyawa bersifat basa yang mengandung satu atau lebih atom nitrogen, biasanya dalam gabungan sebagai bagian dari sistem siklik. Alkaloid biasanya tanpa warna tetapi beberapa senyawa yang kompleks aromatik berwarna (contoh berberin berwarna kuning dan betanin berwarna merah). kebanyakan berbentuk kristal tetapi hanya sedikit yang berupa cairan (misalnya nikotina) pada suhu kamar (Harborne 1987).

Beberapa contoh senyawa alkaloid yang telah umum dikenal menurut Putra (2007, dalam Permatasari (2011) dalam bidang farmakologi di antaranya adalah nikotin (stimulan pada saraf otonom), morfin (analgesik), kodein (analgesik dan obat batuk), kokain (analgesik), piperin (*antifeedant*), quinine (obat malaria), vinkristin (obat kanker), ergotamine (analgesik untuk migrain), reserpin (pengobatan simptomatis disfungsi ereksi), mitraginin (analgesik dan antitusif), serta vinblastin (antineoplastik dan obat kanker).

Sifat fisik dari alkaloid kebanyakan alkaloid yang telah diisolasi berupa padatan kristal dengan titik lebur tertentu atau mempunyai kisaran dekomposisi. Sifat kimia alkaloid adalah basa. Kebiasaan alkaloid menyebabkan senyawa tersebut sangat mudah mengalami dekomposisi, terutama oleh panas dan sinar dengan adanya oksigen. Hasil dari reaksi

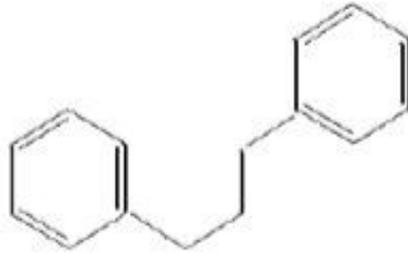
ini sering berupa N-oksida. Dekomposisi alkaloid selama atau setelah isolasi dapat menimbulkan berbagai persoalan jika penyimpanan berlangsung dalam waktu yang lama. Pembentukan garam dengan senyawa organik (tartarat, sitrat) atau anorganik (asam hidroklorida atau sulfat) sering mencegah dekomposisi. Oleh karena itu, dalam perdagangan alkaloid lazim berada dalam bentuk garamnya (Nadjeb 2006). Berikut contoh struktur alkaloid isoquinolin (**Gambar 13**).



Gambar 13. Struktur Dasar Alkaloid Isoquinolin

2. Flavonoid

Flavonoid terutama senyawa yang larut dalam air dan dapat diekstraksi dengan etanol 70%. Flavonoid berupa senyawa fenol, karena itu warnanya berubah bila ditambahkan basa atau ammonia sehingga mudah dideteksi pada kromatogram atau dalam larutan. Senyawa ini mengandung sistem aromatik yang terkonjugasi dan daerah itu menunjukkan pita serapan kuat pada daerah spektrum ultra violet (V) dan spectrum tampak. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga di lapisan amil alkohol pada uji fitokimia menunjukkan adanya flavonoid (Harbone 1987). Berikut struktur dasar dari flavonoid (**Gambar 14**)

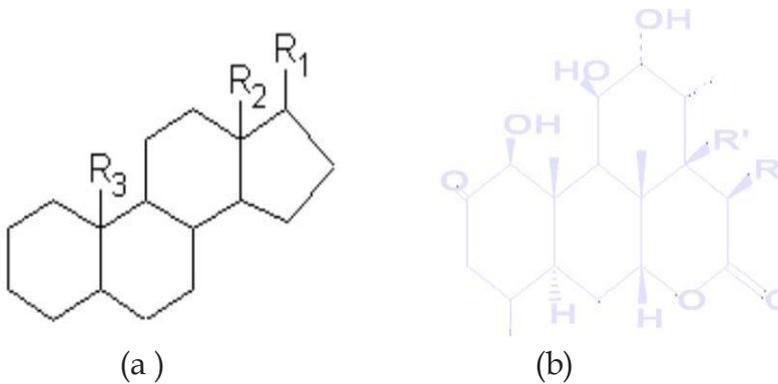


Gambar 14. Struktur Dasar Senyawa Flavonoid

Flavonoid memiliki banyak kegunaan baik bagi tumbuhan maupun manusia. Flavonoid digunakan tumbuhan sebagai penarik serangga dan binatang lain untuk membantu proses penyerbukan dan penyebaran biji. Sedangkan bagi manusia, dalam dosis kecil flavon bekerja sebagai stimulan pada jantung, dan flavon yang terhidrosilasi bekerja sebagai diuretik dan sebagai antioksidan pada lemak (Sirait 2007).

3. Triterpenoid/Steroid

Sterol dan triterpena memiliki kerangka dasar sistem cincin siklopentana perhidrofenantrena. Tiga senyawa yang disebut fitosterol mungkin terdapat pada setiap tumbuhan tingkat tinggi yaitu sitosterol, stigmasterol, dan kampesterol yang terdapat dalam tumbuhan tingkat rendah, contohnya ergosterol yang terdapat dalam khamir dan sejumlah fungi. Sterol lain terutama terdapat dalam tumbuhan tingkat rendah kadang-kadang terdapat juga dalam tumbuhan tingkat tinggi misalnya fukosterol, yaitu steroid utama pada alga coklat dan juga terdeteksi pada kelapa (Harborne 1987). Kedua senyawa ini strukturnya ditampilkan dalam gambar berikut (**Gambar 15**)

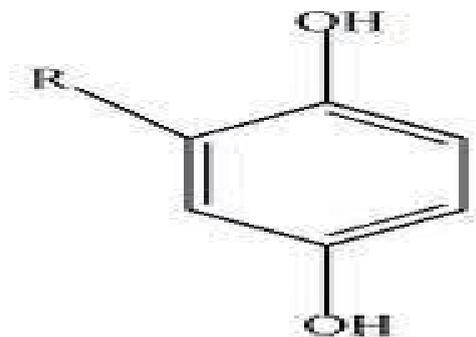


Gambar 15. Contoh Struktur Dasar Senyawa Steroid dan Triterpenoid

(a) Steroid, (b) Quassinoid triterpenoid

4. Fenol Hidrokuinon

Komponen fenolat merupakan struktur aromatik yang berkaitan dengan satu atau lebih gugus hidroksil, beberapa mungkin digantikan dengan gugus metal atau glikosil. Komponen fenolat bersifat larut air selama komponen tersebut berikatan dengan gula membentuk glikosida, dan biasanya terdapat dalam vakuola sel. Berikut struktur dasar dari senyawa fenol hidrokuinon (**Gambar 16**).

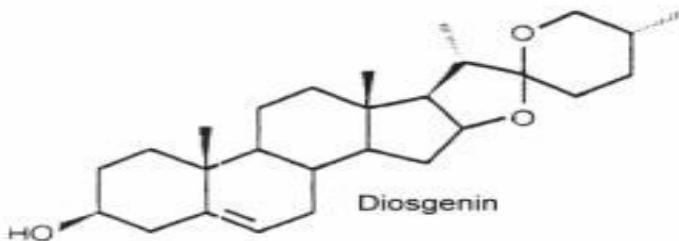


Gambar 16. Struktur Dasar Senyawa Fenol Hidrokuinon

Flavonoid merupakan kelompok yang terbesar diantara kompoen fenolat alami yang strukturnya telah diketahui, tetapi fenol monosiklik sederhana, fenilpropanoid, dan fenolat quinon juga terdapat dalam jumlah besar. Pigmen quinon alami berada pada kisaran warna kuning muda atau hitam. Kuinon adalah senyawa berwarna mempunyai kromofor dasar seperti kromofor pada benzokuinon. Senyawa ini diidentifikasi menjadi 4 kelompok yaitu benzokuinon, naftokuinon, antrakuinon, dan kuinon isoprenoid. Tiga kelompok pertama biasanya terhidroksilasi dan bersifat senyawa fenol (Harborne, 1987). Sedangkan benzakuinon terdiri atas dua gugus karbonil yang berkonjugasi dengan dua ikatan rangkap karbon-karbon (Ketaren,1986).

5. Saponin

Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun. Saponin dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah. Dari segi ekonomi, saponin penting karena kadang-kadang menimbulkan keracunan pada ternak (**Gambar 17**) (Harborne, 1987).



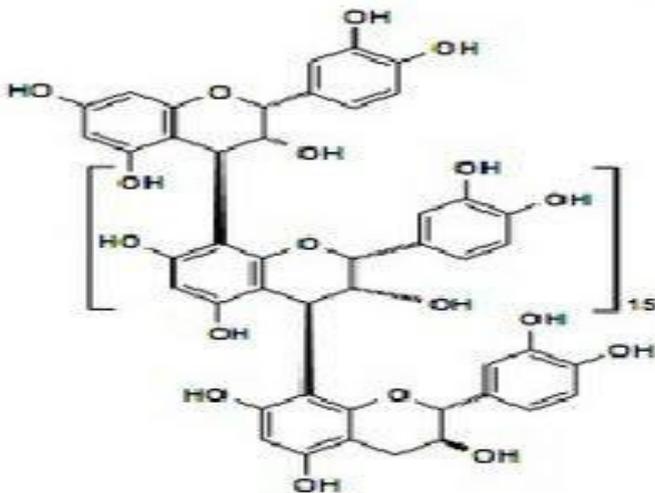
Gambar 17. Contoh Struktur Senyawa Saponin

Sebagian besar saponin bereaksi netral (larut dalam air), beberapa ada yang bereaksi asam (sukar larut dalam air), dan sebagian kecil ada yang bereaksi basa. Saponin dapat membentuk senyawa kompleks dengan kolesterol. Saponin

bersifat toksik terhadap ikan dan binatang berdarah dingin lainnya. Hal inilah yang menyebabkan saponin banyak dimanfaatkan sebagai racun ikan. Saponin yang beracun disebut sapotoksin (Sirait, 2007).

6. Tanin

Tanin adalah senyawa organik yang terdiri dari campuran senyawa polifenol kompleks, dibangun dari elemen C, H, dan O serta sering membentuk molekul besar dengan berat molekul lebih besar dari 2000. Tanin dapat dijumpai pada hampir semua jenis tumbuhan hijau di seluruh dunia baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah dengankadar kualitas yang berbeda-beda (Shut 2002 dalam Putri 2011). Berikut merupakan contoh struktur golongan senyawa tanin (Gambar 18).



Gambar 18. Struktur Sorghum Procyanidin Golongan Tanin

Senyawa ini memiliki sifat antara lain dapat larut dalam air atau alkohol karena tanin banyak mengandung fenol yang memiliki gugus OH, dapat mengikat logam berat, serta adanya zat yang bersifat antirayap dan jamur. Tanin yang

terdapat pada kulit kayu dan kayu dapat berfungsi sebagai penghambat kerusakan akibat serangga dan jamur, karena memiliki sifat antiseptik (Shut, 2002 dalam Putri, 2011).

C. Kandungan senyawa bioaktif

Lamun *Thalassia hemprichii* merupakan salah satu jenis tumbuhan perairan yang telah diketahui mengandung steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin (Kusmardiyani dan Elfahmi, 2000). Seperti organisme perairan tropis lainnya, lamun memproduksi produk alam metabolit sekunder berupa antioksidan sehingga lamun ini sangat prospektif digunakan sebagai sumber obat-obatan dan sebagai makanan kesehatan yakni dapat mencegah munculnya berbagai penyakit degeneratif (Setyat, *et al.*, 2003).

Thalassia hemprichii yang dikoleksi dari Pamban, Tamil Madu, India diketahui mengandung senyawa bioaktif potensial sebagai antibakteri, antifungi, antiprotozoa, *antiviral*, *antifertility*, dan bahan obat-obatan yang berpengaruh pada sistem *cardiovascular* (Laksmi, *et al.*, 2006). Raja-Kannan, *et al.*, (2010) memaparkan *Thalassia hemprichii* juga memiliki potensi bioaktif sebagai antioksidan dan mengandung senyawa golongan fenolik.

Metode Ekstraksi & Pemeriksaan Ekspresi mRNA Gen

A. Metode Ekstraksi

Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam baik pada tanaman, hewan maupun biota laut dengan pelarut organik tertentu. Proses ekstraksi ini berdasarkan pada kemampuan pelarut organik untuk menembus sel dan masuk rongga sel yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan larut dalam pelarut organik dan arena adanya perbedaan konsentrasi di dalam dan luar sel, mengakibatkan terjadinya difusi

pelarut organik yang mengandung zat aktif keluar sel. Proses ini berlangsung terus menerus sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif di dalam dan di luar sel (Dirjen POM, 1986).

Jenis-jenis metode ekstraksi bahan alam yang sering digunakan adalah :

1. Ekstraksi Secara Maserasi

Maserasi dilakukan dengan cara memasukkan 10 bagian simplisia dengan derajat halus yang cocok ke dalam sebuah bejana, kemudian ditambahkan 75 bagian cairan penyari, ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil diaduk sekali-kali, dicuci ampasnya dengan penyari sampai diperoleh 100 bagian, penyarian diakhiri setelah hasil Kromatografi Lapis Tipis (KLT) tidak memperlihatkan adanya noda, lalu dipindahkan ke bejana tertutup terlindung dari cahaya, dibiarkan selama 2 hari kemudian endapannya dipisahkan (Dirjen POM, 1995).

2. Ekstraksi Secara Soxhletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya adalah ekstraksi secara berkesinambungan, di mana cairan penyari dipanaskan hingga mendidih, uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembunkan oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan penyari akan turun ke labu alas bulat dan terjadi pada sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersaring seluruhnya yang ditandai dengan jernihnya cairan yang lewat pada pipa sifon (Dirjen POM, 1995).

3. Ekstraksi Secara Perkolasi

Perkolasi dilakukan dengan cara membasahi simplisia dengan cairan penyari, dimasukkan ke dalam bejana tertutup sekurang-kurangnya 3 jam. Simplisia dipindahkan sedikit

demi sedikit ke dalam bejana perkolator, kemudian dituangi cairan penyari, bejana perkolator ditutup dan dibiarkan selama 24 jam, kemudian kran perkolator dibuka dengan kecepatan menetes 1 ml/menit, sampai diperoleh 100 bagian. Ekstrak yang diperoleh dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan selama 2 hari di tempat yang terlindung dari cahaya dan endapan yang terbentuk dipisahkan (Dirjen POM, 1995).

4. Ekstraksi Secara Refluks

Ekstraksi secara refluks pada dasarnya adalah ekstraksi berkesinambungan. Bahan yang akan diekstraksi direndam dalam cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan pendingin tegak, lalu sampel dan cairan penyari dipanasi sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap, tersebut akan diembunkan oleh pendingin tegak dan akan turun kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut. Demikian seterusnya sampai terjadi pencarian sempurna (Dirjen POM, 1995).

5. Ekstraksi Secara Penyulingan

Penyulingan dapat dipertahankan untuk menyari serbuk simplisia yang mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih yang lebih rendah pada tekanan udara normal, yang pada pemanasan biasa dapat terjadi kerusakan zat aktif. Untuk mencegah hal-hal tersebut maka penyarian dilakukan dengan cara penyulingan (Dirjen POM, 1995).

Metode ekstraksi yang dipilih dalam penelitian ini adalah metode maserasi, karena metode ini cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan, serta dapat menghindari kerusakan senyawa kimia yang terdapat dalam simplisia akibat pemanasan (Dirjen POM, 1986).

B. Pemeriksaan Ekspresi mRNA Gen

1. Ekspresi Asam Nukleat

Volume sampel sekitar 100 µg/ul darah dimasukkan ke dalam 900 µl larutan "L6" yang terdiri dari 120g Guanidium thyocyanate (GuSCN) (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland, cat no. 50990) dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4, 22 ml 0.2 M Etylen Diamine Tetra Acetat (EDTA) pH 8.0 dan 2.6g Triton X-100 (Packard, Instrumens) dengan konsentrasi akhir 50 mM Tris HCl, 5 M GuSCN, 20 mM EDTA, 0.1 % Triton X-100 Selanjutnya ditambahkan suspensi diatom 20 µl yang terdiri dari 50 ml H₂O dan 500 µl dari 32 % (w/v) "Celite" ("diatom") (Jansen Chimica, Beerse, Belgium, 10.846.79). Dimana 20 µl suspensi diatom ini dapat mengikat 10 µg RNA darah, kemudian dilakukan *vortex* dan disentrifugasi di dalam tabung *eppendorf* 1.5 ml dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik. Supernatan dibuang dan sedimen dicuci dengan larutan "L2" yang terdiri dari 120 g GuSCN dalam 100 ml 0.1 M Tris HCl, pH 6.4 yaitu dengan menambahkan 1 ml larutan "L2". Selanjutnya dilakukan *vortex* dan disentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 15 detik, kemudian pencucian diulangi sebanyak 2 kali dengan menggunakan larutan "L2", dilanjutkan dengan pencucian dengan 1 ml etanol 70% sebanyak 2 kali dan 1 ml aseton. Hasilnya kemudian dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu 56°C selama 10 menit dan ditambahkan 60 µl larutan "TE" yang terdiri dari 1 mM EDTA dalam 10 mM Tris HCl pH 8.0, kemudian dilakukan *vortex* dan dilanjutkan sentrifugasi dengan kecepatan 13.000 rpm selama 2 menit, kemudian diinkubasi dalam *oven* selama 10 menit pada suhu 56°C. Kemudian dilakukan *vortex* dan sentrifugasi ulang selama 30 detik pada kecepatan 13.000 rpm dan diambil supernatannya. *Supernatan* dari proses ini akan diperoleh hasil ekstraksi nukleotida dan disimpan pada suhu -

80°C sebelum dilakukan analisis PCR. (Mochammad Hatta. Henk L Smits. 2007 dan Rene B.et al.,1990).

2. Ekspresi mRNA gen dengan metode Real Time Polymerase Chain Reaction (RT PCR).

Proses pemeriksaan gen spesifik oligonukleotida primer untuk beta actin (β actin) sebagai primer forward: CACTGTGCCCATCTACGA dan primer reverse: GTTCATGGATGCCACAGGA sebagai "housekeeping gene" (internal control). Cara untuk mendeteksi gen mRNA HGMB1 dengan menggunakan primer spesifik forward 5'-GGAGGAGCAATAAGAAGAAGC-3' dan Reverse 5'-CATCTTCCTCCTCCTTCCTTC - 3'. Protokol PCR, dilakukan penggandaan DNA dengan siklus 94°C selama 3 menit, siklus diulang 38 kali dengan 94°C (30 detik) dan reverse primer: CATCTTCCTCCTCCTTCCTTC sesuai dengan protokol Zetterström CK. (Zetterström CK.et.al., 2006). Proses Real-time reverse transcription-PCR (QRT-PCR) menggunakan Green QRT-PCR master mix kit, satu tahap. Protokol ini dioptimalkan untuk instrumen Mx4000. Protokol disesuaikan menggunakan instrumen dengan mengubah pengenceran pewarna berdasarkan petunjuk manual dan mengikuti instrumen pabrik yang direkomendasikan untuk program siklus RT-PCR. Referensi pewarna pasif dimasukkan dalam tabung reaksi, diencerkan 1: 500. Larutan yang mengandung pewarna dijauhkan dari cahaya. Kemudian mengencerkan 2 x SYBR @Green QRT-PCR master mix dan disimpan di atas es serta mengikuti pencairan awal master mix, bagian yang tidak digunakan disimpan pada 40° C dengan catatan, menghindari siklus beku-cair yang berulang. SYBR @Green adalah senyawa yang berfluorescent yang digunakan untuk mewarnai DNA yang mengandung bahan N',N'-dimethyl-N-[4-[(E)-(3-methyl-1,3-benzothiazol-2-ylidene) methyl]-1 phenylquinolin-1-ium-2-yl]-N-propylpropane-1,3-diamine (IUPAC). Tabung reaksi

percobaan disiapkan dengan menambahkan komponen-komponen berikut. Disiapkan campuran reagen dalam tabung reaksi menggunakan beberapa komponen seperti di bawah ini. Campuran reagen dengan mengambil volume akhir 25 μl (termasuk RNA percobaan) 12,5 μl dari 2 x SYBR Green QRT-PCR master mix ditambah $x \mu\text{l}$ dari primer awal (konsentrasi dioptimalkan) ditambah lagi Nuklease - bebas PCR - tingkat H2 $x \mu\text{l}$ primer akhir (konsentrasi dioptimalkan) dan juga 0,375 μl larutan pewarna referens dari tahap 1 (pilihan) serta 1,0 μl dari Reverse transcriptase (RT) yang membawa enzim modular polymerase dan ribonuclease H (RNase H) campuran enzim blok dengan 50 μl total volume reaksi juga dapat digunakan. Tabung reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi), kemudian distribusikan campuran ke tabung reaksi percobaan dengan menambahkan $x \mu\text{l}$ RNA percobaan pada setiap tabung reaksi. Tabung reaksi dicampur secara perlahan agar tidak terbentuk gelembung (tidak dirotasi).

Kemudian tabung reaksi disentrifus dengan singkat dan reaksi ditempatkan dalam instrumen dan program PCR siap dijalankan dengan menggunakan mesin Realtime PCR seperti (**Gambar 19**) (CFX Connect system, Biorad Laboratories, Real Time PCR 96 well 0.1 ml, USA) (Zetterström CK, et.al., 2006).



Gambar 1. Alat Real Time PCR

PCR adalah suatu teknik yang melibatkan beberapa tahap yang berulang (siklus) dan pada setiap siklus terjadi duplikasi jumlah target DNA untai ganda. Untai ganda DNA templat (unamplified DNA) dipisahkan dengan denaturasi termal dan kemudian didinginkan hingga mencapai suatu suhu tertentu untuk memberi waktu pada primer menempel (anneal primers) pada daerah tertentu dari target DNA. Polimerase DNA digunakan untuk memperpanjang primer (extend primers) dengan adanya dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP) dan buffer yang sesuai. Umumnya keadaan ini dilakukan antara 20 - 40 siklus. Target DNA yang diinginkan (short "target" product) akan meningkat secara eksponensial setelah siklus keempat dan DNA non-target (long product) akan meningkat secara linier seperti tampak pada bagan di atas (Newton and Graham, 1994).

Perhitungan Kurva kalibrasi dengan Ct (Cycle threshold)

Pengukuran kuantifikasi relatif ekspresi pada gen Human maka dibuat kalibrasi kurva dimana RNA β -actin, sebagai "housekeeping" enzim, digunakan sebagai control endogen. Kurva kalibrasi sebagai xy (scatter) dan plot mewakili log dari jumlah input (log ng mRNA total awal) sebagai sumbu x dan Ct sebagai sumbu y. Persamaan yang berasal dari garis kurva kalibrasi. Dua rumus untuk log gen dan beta actin adalah sebagai berikut: Konsentrasi ekspresi mRNA gen = - slope X log (ng mRNA sampel awal) + Ct (r= 0.998).

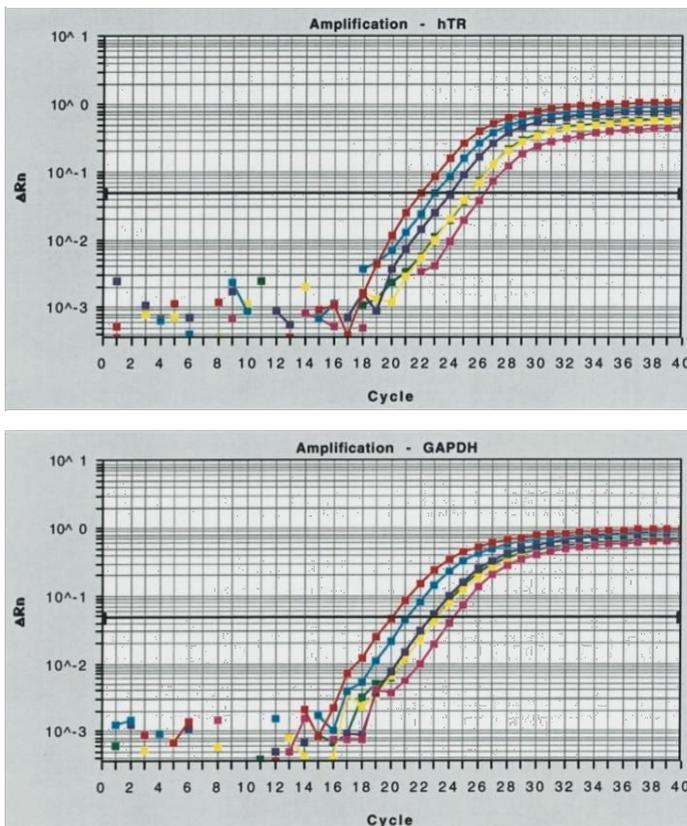
Contoh :

$$\text{Konsentrasi ekspresi mRNA gen} = -3.26x + 28.63 \text{ (r=0,999)}$$

$$\text{Konsentrasi ekspresi mRNA gen beta actin} = -3.19x + 26.46 \text{ (r= 0.997).}$$

Biasanya berat sampel awal sekitar 50 ng mRNA (= log50 = 1.698).

Bila nilai Ct sampel adalah dimasukkan kedalam rumus untuk gen HMGB 1 atau beta actin maka konsentrasi gen atau beta actin dapat dihitung. Untuk menormalkan perbedaan dalam jumlah total RNA ditambahkan ke setiap reaksi, beta actin adalah terpilih sebagai kontrol RNA endogen. Normalisasi konsentrasi gen, jumlah dengan sendirinya dapat digunakan untuk membandingkan jumlah relatif gen di berbagai sampel, ditentukan dengan membagi konsentrasi mRNA gen oleh konsentrasi beta actin (Zetterström CK. et.al. 2006). Perhitungan kurva mRNA gen tersebut akan menghasilkan grafik amplifikasi mRNA gen dan beta actin (**Grafik. 1**)



Grafik 1. Titik-titik amplifikasi *Real Time PCR* (Yajima, et al., 1998)

Untuk membandingkan 2 sampel gen Setelah RT-PCR maka dilakukan kuantisasi amplifikasi gen dengan menentukan ambang siklus (Ct). Kuantisasi relatif ekspresi gen HMGB 1 dievaluasi menggunakan metode perbandingan Ct. Nilai Δ Ct ditentukan dengan cara mengurangkan target Ct masing-masing sampel dengan nilai Ct dari β -actinnya. Perhitungan $\Delta\Delta$ Ct ialah nilai rata-rata Δ Ct sampel ASC sebagai kalibrator dikurangi nilai rata-rata Δ Ct sampel kelompok normal. Kelipatan perubahan dari ekspresi dari gen target yang setara dengan $2^{-\Delta\Delta$ Ct.

RUMUS : Perbedaan kelipatan dalam membandingkan ekspresi gen 1 dengan ekspresi gen 2 = $[2^{-\Delta\Delta$ Ct]

dan diketahui :

$\Delta\Delta$ Ct = {rata-rata (triplicate) Ct (Δ Ct1) sampel 1} - {rata-rata (triplicate) Ct (Δ Ct2) sampel 2} (Yajima et al,1998;Tang and Chen 2009).

3. Cara Kerja *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA) untuk Menentukan Kadar Protein TLR4 pada Serum

Sampel serum penderita disiapkan bersama seluruh reagen sesuai dengan KIT yang gunakan yang diperlukan dalam suhu kamar sebelum digunakan. Setiap sampel dilakukan secara rangkap tiga untuk menjamin kebenaran atau validitas hasil ELISA. Kemudian diisi paknya semua reagen, dilusi standar dan sampel serum penderita. Buka mikroplate strip dan buat susunan dari sampel sesuai dengan jumlah sampel yang akan dimasukkan kedalam sumur. Tahap pertama dilakukan penambahan 100 μ L assay diluent yang berisi protein penyangga kedalam setiap sumur. Selanjutnya ditambahkan 100 μ L cairan standar yang berisi recombinant human protein TLR4 dari KIT yang telah ditentukan atau dilusi sampel dari serum penderita kedalam setiap sumur. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Isap cairan disetiap sumur dan dicuci dengan cairan

Phosphate Buffered Saline (PBS) steril. Proses pencucian ini dilakukan 4 kali secara berturut turut. Kemudian ditambahkan 200 μ L cairan “conjugate” yang berisi streptavidin “*horseradish peroxidase*” (HRP) kedalam setiap sumur dan tutup dengan penutup plastik dan inkubasi selama 2 jam pada suhu kamar. Cairan diisap dan selanjutnya dilakukan pencucian ulang sebanyak 4 kali dengan menggunakan cairan PBS steril. Proses berikutnya ditambahkan 200 μ L larutan substrat yang berisi cairan 3,3’,5,5’-Tetramethylbenzidine (TMB) kedalam setiap sumur dan inkubasi selama 20 menit pada suhu kamar yang mana mikroplate disimpan pada keadaan gelap untuk menghindari cahaya. Setelah selesai diinkubasi reaksi dihentikan dengan menambahkan 50 μ L cairan larutan penghenti yang berisi H₂SO₄ kedalam setiap sumur dan dibaca dengan menggunakan ELISA Reader 270 (Biomerieux, Perancis) (**Gambar 20**) dengan panjang gelombang sebesar 450 nm dalam waktu 30 menit . Selanjutnya, dibaca konsentrasi protein gen HMGB 1 dengan satuan pg/ml (MybioSource, USA)



Gambar 20. Mesin ELISA Microplate Reader

Hubungan , Ekstrak *Thalassia hemprichii* dan Gen TLR 4

Demam tifoid akut merupakan penyakit infeksi akut bersifat sistemik yang disebabkan oleh mikroorganisme *Salmonella enterica* serotipe *typhi* yang dikenal dengan (*S. typhi*). Pada dinding sel *S. typhi* terdapat pirogen LPS (endotoksin) dan sedikit peptidoglikan. Endotoksin merupakan pirogen eksogen yang sangat potensi untuk merangsang respons imun makrofag dan sel lain untuk menginduksi sekresi sitokin. Mikroba dikenal kedatangannya karena memiliki penanda PAMPs (bakteri gram negatif adalah lipopolisakarida atau LPS) yang segera akan berikatan dengan reseptor TLR yakni TLR4 khusus untuk LPS.

Infeksi pada manusia, disebabkan oleh system imunitas tubuh yang mengalami penurunan aktivitas (defisiensi), sehingga system imunitas tubuh tidak mampu membunuh dan menghancurkan (meregulasi) bakteri *S. typhi*. Hal ini mengakibatkan yang berada dalam peredaran darah dapat bertahan hidup, berkembang, melakukan invasi serta merusak sel-sel tubuh. (Urgrinovic, et al., 2003; Diepen, et al., 2005; Cummings, et al., 2005). Sistem imunitas tubuh yang memiliki peran utama dalam meregulasi bakteri adalah Sel T CD4+ dan sel T CD8+ (Lapaquea, et al., 2008; Warrington, et al., 2011). Abbas dan Lichman (2011) mengemukakan bahwa sel T CD4+ atau sering disebut Sel T *Helper* mengaktifkan makrofag untuk meningkatkan fagositosis terhadap mikroba yang berada di vesikula sedangkan Sel T CD8+ atau yang disebut dengan sel T Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) membunuh sel yang mengandung mikroba atau protein mikroba dalam sitoplasma sehingga menghilangkan reservoir infeksi. Proses fagositosis oleh makrofag melepaskan sejumlah sitokin, di antaranya pirogen endogen IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α . Sitokin ini mencapai organ sirkumventrikuler otak yang ada pada organ ini berdekatan dengan area pre optic dan organ

vaskulosa lumina terminalis melalui prostaglandin PGE-2 yang mengakibatkan demam (Silbernagi S, 2006).

Thalassia hemprichii merupakan salah satu jenis tumbuhan perairan yang telah diketahui mengandung steroid/triterpenoid, flavonoid, saponin, dan tanin (Kusmardiyani dan Elfahmi, 2000).

Steroid sebagai antiinflamasi berhubungan dengan membran lipid dan sensitivitas terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom (Madduluri dkk, 2013). Steroid dapat berinteraksi dengan membran fosfolipid sel yang bersifat permeable terhadap senyawa-senyawa lipofilik sehingga menyebabkan integritas membran menurun serta morfologi membran sel berubah yang menyebabkan sel rapuh dan lisis (Ahmed, 2007).

Flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi tiga yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi (Hendra, dkk., 2011). Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Cushnie, dkk., 2005). Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membrane sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria dkk, 2009). Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga pembentukan metabolisme terhambat (Cushnie dkk, 2005). Kandungan lain yang terdapat dalam ekstrak *Thalassia hemprichii* yaitu flavonoid dimana senyawa ini berfungsi sebagai antiinflamasi dan antioksidan. Flavonoid yang bersifat hidrofilik membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan dengan dinding sel bakteri, serta dapat merusak membran sel bakteri. Senyawa fenolik dalam ekstrak *Thalassia hemprichii* bertanggung jawab untuk aktivasi anti-inflamasi. Mekanisme ini melibatkan

penindasan kegiatan pro inflamasi COX-2 dan/ atau diinjeksi nitrat oksida sintesa (*iNOS*) melalui senyawa fenolik atau flavonoid. Ekstrak *Thalassia hemprichii* telah didokumentasikan untuk terlibat dalam regulasi protein seperti dekarboksilase ornithine, tyrosine kinase, iNOS dan COX-2 (Zakiah J, et al., 2013).

Senyawa saponin akan merusak membran sitoplasma dan membunuh sel (Assani, 1994). Senyawa steroid/triterpenoid juga memiliki potensi sebagai senyawa antibakteri. Senyawa steroid/triterpenoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan mekanisme penghambatan terhadap sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan perubahan komponen-komponen penyusun sel bakteri itu sendiri. Senyawa terpenoid mudah larut dalam lipid sifat inilah yang mengakibatkan senyawa ini lebih mudah menembus dinding sel bakteri Gram positif dan sel bakteri Gram negatif (Rosyidah, et al., 2010).

Tanin memiliki persenyawaan fenol yang memiliki gugus hidroksil di dalamnya maka mekanisme dalam meniadakan bakteri dengan memanfaatkan perbedaan polaritas antara lipid dengan gugus hidroksil. Apabila sel bakteri semakin banyak mengandung lipid maka dibutuhkan konsentrasi yang tinggi untuk membuat bakteri tersebut lisis. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa kandungan molekul tanin yang terdapat dalam ekstrak *Thalassia hemprichii* akan membentuk kompleks dengan protein melalui kekuatan nonspesifik seperti ikatan hidrogen dan efek hidrofobik sebagaimana pembentukan ikatan kovalen. Cara kerja antimikroba berhubungan dengan kemampuan tanin dan saponin untuk menginaktivasi adhesin mikroba (molekul yang menempel pada sel inang) yang terdapat pada permukaan sel, enzim yang terikat pada membran sel dan protein transport sel, selain itu tanin juga membentuk kompleks dengan lipopolisakarida (LPS) untuk memudahkan perlekatan dengan TLR 4. Tanin yang membentuk kompleks dengan lipopolisakarida pada bakteri dapat dengan mudah melekat pada TLR 4 sehingga meningkatkan respons imun innate, disini

termasuk sitokin inflamatori (TNF,IL-1, IL-8 dan IL-12), endothelial adhesion molecules (E-selection), dan protein yang berperan dalam mekanisme pembunuhan mikroba (termasuk iNOS).

Hasil RT-PCR pada penelitian yang dilakukan di China membuktikan bahwa flavonoid menurunkan regulasi tingkat gen inflamasi termasuk interleukin-1 beta (IL-1), interleukin-1 (IL-6), dan tumor necrosis factor alpha (TNF). Penelitian lebih lanjut menunjukkan bahwa hepatoproteksi yang diinduksi oleh flavonoid menghambat TLR4 / MDF88 dan mengaktifkan jalur signaling Sirt1 / Nrf2. Blokade dari TLR4 jalur oleh flavonoid menghambat aktivitas transkripsi NF- κ B dan AP-1 dan reaksi inflamasi (Tao X., *et al*, 2016). Kandungan Fenolat memiliki mekanisme aksi penghambatan senyawa fenolat pada mikroorganisme di karenakan oleh gangguan pada integritas membran sel dan sintesis komponen struktural bakteri. Aktivitas antimikroba dari senyawa fenolik terkait dengan inaktivasi enzim seluler, yang tergantung pada tingkat penetrasi zat ke dalam sel atau disebabkan oleh perubahan permeabilitas membran. Permeabilitas membrane yang meningkat merupakan faktor utama dalam mekanisme antimikroba, di mana senyawa dapat mengganggu membran dan menyebabkan hilangnya integritas sel dan kematian sel akhirnya (Cetin Karaca H, 2011).



Bagian V

Analisis Ekstraksi Senyawa *Thalassia hemprichii* pada

A. Pengujian Fitokimia

Hasil uji fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak *Thalassia hemprichii* memiliki kandungan senyawa bioaktif meliputi flavonoid, saponin dan tanin. Ekstrak *Thalassia hemprichii* dengan pelarut ethanol memperlihatkan respon positif terhadap uji flavonoid. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa bioaktif golongan flavonoid. Flavonoid dapat menghambat DNA gyrase, sehingga menyebabkan sintesis asam nukleat terganggu. Senyawa golongan flavonoid dilaporkan berperan aktif sebagai *antifouling*, dan berperan sebagai isolate terhadap penempelan organisme (Cushnie, T.P.Tim. Lamb, Andrew J., 2005). Penelitian lain menunjukkan *Thalassia hemprichi* memiliki potensi untuk menginhibisi bakteri pathogen and strain jamur (Nisa, Humeera., 2015). Flavonoid merupakan senyawa

polifenol proaktif dalam kebanyakan tanaman dan tidak dapat disintesis atau diproduksi oleh manusia (Knekt P., et al., 2002). Ekstrak *Thalassia hemprichii* dengan pelarut ethanol memperlihatkan respon positif terhadap uji saponin. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa bioaktif golongan saponin. Saponin dapat menghambat DNA polimerase sehingga sintesis asam nukleat terganggu (McClure, R., & Massari, P., 2014). Ekstrak *Thalassia hemprichii* dengan pelarut ethanol memperlihatkan respon positif terhadap uji tanin. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak mengandung senyawa bioaktif golongan tanin. Tanin dapat menghambat pembentukan polipeptida dinding sel bakteri yang menyebabkan lisisnya dinding sel sehingga sel bakteri mati (Boakye, A. A., 2015). Tanin adalah senyawa organik yang terdiri dari campuran senyawa polifenol kompleks, dibangun dari elemen C, H, dan O serta sering membentuk molekul besar dengan berat molekul lebih besar dari 2000. Tanin dapat dijumpai pada hampir semua jenis tumbuhan hijau di seluruh dunia baik tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah dengan kadar kualitas yang berbeda-beda (Puri, Pramadita Aristi., 2011). Menurut Malangngi *et al.* (2012), kandungan tanin yang semakin banyak maka aktivitas antioksidannya juga semakin besar karena tanin tersusun dari senyawa polifenol yang memiliki aktivitas penangkap radikal bebas. Mekanisme kerja antibakteri tanin mempunyai daya antibakteri dengan cara memprepitasi protein. Efek antibakteri tanin melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Sari, F.P. dan S. M. Sari, 2011). Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba, menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Madduluri., et al., 2013). Tanin juga mempunyai target pada polipeptida

dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Kartika, Angga Raka Gde, 2016). Kompleksasi dari ion besi dengan tanin dapat menjelaskan toksisitas tanin. Mikroorganisme yang tumbuh di bawah kondisi aerobik membutuhkan zat besi untuk berbagai fungsi, termasuk reduksi dari prekursor ribonukleotida DNA. Enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sel bakteri tidak dapat terbentuk oleh kapasitas pengikat besi yang kuat oleh tannin (Ngajow, Mercy, 2013).

Penentuan kadar polifenol yang dilakukan pada ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan bahwa pada konsentrasi metanol 90% didapatkan kadar tanin sebesar 10.25 % (simplo), kemudian dilakukan pengulangan (duplo) dan memperoleh nilai yang tidak jauh berbeda yaitu 10,31%. Polifenol mempunyai khasiat sebagai antibakteri dan antiinflamasi (Coppo, E., & Marchese, A. 2014., Laganà, P, et al.,2019). Polifenol dapat menekan over ekspresi mediator inflamasi melalui intervensi persinyalan TLR4/NFκB/STAT. Polifenol aktif (quercetin) kelas flavonoid melalui intervensi persinyalan TLR4/NFκB dapat menurunkan IL-6 sehingga memberikan efek *down regulates* produksi enzim inflamasi (Azam, S., et al., 2019).

B. Pengujian Antioksidan

Aktivitas antioksidan diuji dengan menggunakan metode DPPH diinterpretasikan kedalam parameter IC50 atau konsentrasi penghambatan 50. Hasil uji tersebut menunjukkan bahwa nilai persentase absorbansi semakin rendah seiring dengan peningkatan jumlah konsentrasi ekstrak. yakni pada konsentrasi 10 µg/mL memiliki nilai absorbansi 0.355, konsentrasi 20 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.335, konsentrasi 40 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.299, konsentrasi 80 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.201, konsentrasi 160 µg/mL dengan nilai absorbansi 0.085.

Berbeda halnya dengan aktivitas antioksidan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka semakin besar presentasi aktivitas antioksidan yakni konsentrasi 10 µg/mL memiliki nilai aktifitas antioksidan 16.08 %, konsentrasi 20 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 20.80 %, konsentrasi 40 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 29.31 %, konsentrasi 80 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 52.48 %, konsentrasi 160 µg/mL dengan nilai aktifitas antioksidan 87.75 %. Hasil uji tersebut, sebagaimana Amrun dan Umiyah (2005) berpendapat bahwa adanya penurunan absorbansi menunjukkan peningkatan kemampuan peredaman radikal bebas DPPH. Lebih lanjut, Hanani (2005) mengungkapkan bahwa aktivitas antioksidan dari suatu ekstrak dinyatakan dalam persentase peredaman terhadap radikal bebas DPPH. Sehingga dapat diartikan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak mengakibatkan aktivitas antioksidan semakin besar atau persentase absorbansi semakin kecil.

Terkait hal tersebut, Santosa.,et al. (2012) mengungkapkan bahwa ekstrak lamun *Thalassia hemprichii*, *Cymodocea rotundata*, *Enhalus acoroides* dari Indonesia mengandung lebih banyak senyawa fenolik, sehingga menunjukkan aktivitas peredaman radikal bebas DPPH yang tinggi. Demikian pula Neelima, C.S.S.,et al. (2015) mengungkapkan bahwa di antara spesies lamun yang diselidiki, *Thalassia hemprichii* dan *Cymodocea serrulata* memiliki aktivitas peredaman DPPH yang tinggi.

Hasil uji aktivitas antioksidan ekstrak *Thalassia hemprichii* menggunakan metode DPPH yang dilakukan dengan pengulangan tiga kali berturut-turut diperoleh nilai IC50 = 80,0331; 80, 6979 ; 82,1214 yang tergolong antioksidan kuat, sebagaimana Molyneux (2004) menyatakan bahwa suatu senyawa memiliki aktivitas antioksidan yang kuat bila nilai IC50 = (50 ppm - 100 ppm). Molyneux (2004) menggolongkan aktivitas antioksidan berdasarkan nilai IC50, yaitu sangat kuat (IC50 < 50 ppm), kuat (50 ppm - 100 ppm), sedang (100 ppm -150 ppm), lemah (150 ppm - 200 ppm), dan sangat lemah (IC50 > 200 ppm). Lebih lanjut,

Molyneux berpendapat bahwa semakin kecil nilai IC50 maka aktivitas antioksidan semakin tinggi. *Thalassia hemprichii* juga memiliki metabolit sekunder yang unik yang tidak hanya dapat dimanfaatkan sebagai antioksidan, namun memiliki peran sebagai antikanker, analisis secara invitro menggunakan sel HeLa menunjukkan bahwa ekstrak semipolar dan polar menunjukkan potensi sebagai anti kanker, tingkat letalitas sel dengan ekstrak semipolar lebih tinggi daripada ekstrak polar, tetapi tidak berbeda dengan obat kanker doxorubicin (Hawas W Usama, 2016). Saat ini fitokimia telah menjadi fokus intens kepentingan penelitian, karena menguntungkan bagi kesehatan termasuk antikarsinoma, antiatherogenik, antiulser, anti trombotik, anti inflamasi, immunomodulatory, antimikroba, vasodilatory, dan efek analgesic. Oleh karena itu, pencarian untuk eksplorasi antioksidan alami terutama yang berasal dari tumbuhan telah sangat meningkat dalam beberapa tahun terakhir (Rao, et al., 2014).

C. Pengujian Kandungan Gizi

Hasil uji kandungan ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan bahwa kandungan air atau kadar air pada ekstrak adalah 11.09 %. Kadar air merupakan salah satu karakteristik yang sangat penting pada bahan pangan, karena air dapat mempengaruhi penampakan tekstur, dan cita rasa pada bahan pangan. Kadar air dalam bahan pangan ikut menentukan kesegaran dan daya awet bahan pangan tersebut, kadar air yang tinggi mengakibatkan mudahnya bakteri, kapang, dan khamir untuk berkembang biak, sehingga akan terjadi perubahan pada bahan pangan (Winarno, 2009). Kandungan Abu pada ekstrak adalah 2.07 %. Kandungan abu yang terkandung dalam suatu bahan menunjukkan jumlah mineral yang terkandung dalam bahan tersebut. Kandungan Protein Kasar pada ekstrak adalah 23.96 %. Tingginya nilai protein berhubungan erat dengan senyawa bioaktif yang dikandung oleh lamun tersebut (Coria M, et al., 2015). Topotubun (2005)

mengatakan bahwa bila kadar air suatu produk lebih kecil atau berkurang, maka nilai protein meningkat dan sebaliknya. Lemak Kasar yang terdapat pada ekstrak adalah 57.64 %. Thril, et al., 2009 menyebutkan bahwa jika lamun yang memiliki komponen asam lemak tidak jenuh lebih besar dibandingkan dengan asam lemak jenuh, maka dapat dikonsumsi dengan baik dan aman bagi kesehatan manusia. Kandungan karbohidrat pada ekstrak diperoleh nilai sebesar 7.22 %. Karbohidrat merupakan kandungan kimia yang umum terdapat pada bahan makanan dan merupakan sumber kalori yang paling utama. Karbohidrat merupakan kalori utama bagi hampir seluruh penduduk dunia (Winarti, 2006). Kandungan lain yang dimiliki ekstrak *Thalassia hemprichii* adalah Vitamin C 4.26 %, Beta Caroten 0.18 %, Polifenol 0.99 %, Calcium 0.42 %, Magnesium 0.37 % dan Zink 108.82 %.

D. Efek Ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 sebelum injeksi bakteri (Preventif).

Pada kelompok dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri, dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf kepercayaan 99% diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 < α = 0.01 atau dengan kata lain H_0 ditolak artinya ada perbedaan ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok-kelompok pemeriksaan atau dengan kata lain ada pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi terhadap ekspresi mRNA gen TLR4, dengan peningkatan rerata mean dari pemeriksaan sebelum perlakuan (P1) = 5,909; setelah 10 hari pemberian ekstrak (P2) = 6,308; setelah 3 hari injeksi (P3) = 8,043 sampai hari ke-10 post injeksi (P4) = 8,352. Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4 setelah injeksi berbeda antara kedua kelompok pemeriksaan P3 dan P4 artinya ekstrak *Thalassia hemprichii* yang diberikan sebelum

injeksi mempunyai efek terhadap ekspresi mRNA gen TLR4, yaitu menekan kenaikan ekspresi mRNA gen TLR4.

Hasil kultur untuk kelompok preventif, terjadi penurunan jumlah bakteri dari 3 hari setelah injeksi 20,50 menjadi 3,6 pada hari ke-10 sesudah injeksi artinya pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi dapat menurunkan pertumbuhan bakteri. Hal ini menandakan bahwa pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi bakteri kedalam tubuh merupakan intervensi yang dapat dilakukan sehingga proses inflamasi - infeksi yang disebabkan pertumbuhan bakteri pathogen berbahaya dapat dikendalikan. Penurunan jumlah bakteri ini juga diperkuat dengan adanya kandungan senyawa metabolit ekstrak *Thalassia hemprichii* berupa flavonoid, saponin dan tannin yang mampu menekan pertumbuhan bakteri pathogen walaupun pemberian dilakukan sbelum injeksi bakteri (secara preventif).

Perpaduan metabolik sekunder yang dikandung tanaman bekerja sama melindungi tumbuhan, dan jika dikonsumsi oleh mamalia tetap berkoordinasi menghasilkan efek bagi tubuh. Flavonoid dilaporkan mampu memodulasi mediator inflamasi yang diproduksi makrofag mencit yang sedang terinfeksi. Makrofag yang terinfeksi bakteri menghasilkan spektrum luas sitokin inflamasi dan chemokines. Dua hari pasca infeksi ditandai dengan produksi yang signifikan IL-6, TNF, dan IL-8. Sitokin inflamasi dan kemokin berperan untuk perekrutan dan kemostran dari neutrophil dan leukosit lainnya. Neutrofil memiliki kemampuan untuk hancurkan EBs yang mudah diakses dan ketika direkrut dalam jumlah besar dilepaskan molekul matrix metalloprotease (MMPs) dan neutrophil elastase yang telah terbukti berkontribusi dalam kerusakan jaringan (Yilma, A. N, et al., 2013).

Hasil uji lanjut (*pos Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 $\alpha = 0.01$ menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 (P3) dan hari ke-10 (P4) sesudah diinjeksi adalah signifikan

atau pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi memberi pengaruh pada sistem imun. Rao, et al., (2014) mengatakan bahwa konsumsi obat herbal melindungi dan menyembuhkan sejumlah penyakit dan telah menjadi pengobatan utama pada zaman prasejarah hingga ditemukannya obat sintetik di abad ke-19. Manfaat kesehatan telah diturunkan dari senyawa bioaktif yang umum ditemukan pada bagian tanaman yang dapat dimakan seperti buah, sayuran, bunga, daun dan telah terbukti memberikan perlindungan terhadap resiko berbagai penyakit (Loganayaki N, et al., 2010). Menariknya, bagian-bagian dari tanaman tersebut banyak diketahui mengandung sejumlah besar antioksidan fenolik (Yen GC, et al., 2002).

E. Efek Ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA TLR4 sesudah injeksi bakteri (Kuratif).

Pada kelompok dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi, dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf Kepercayaan 99% diperoleh nilai sig (p-value) = $0.000 < \alpha = 0.01$ atau dengan kata lain H_0 ditolak artinya ada perbedaan ekspresi mRNA gen TLR4 pada setiap pemeriksaan sesudah injeksi bakteri terhadap ekspresi mRNA TLR4, dengan perubahan rerata mean dari pemeriksaan sebelum injeksi (P1) sampai dengan hari ke-14 post pengobatan (P4). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA TLR4 setelah injeksi mengalami peningkatan signifikan pada pemeriksaan awal (P1) = 5,996 dan pada pemeriksaan kedua (P2) setelah 3 hari diinjeksi adalah 10,833. Seperti yang sudah dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami infeksi bakteri. Hal ini sebanding dengan rerata jumlah bakteri setelah 3 hari

infeksi yaitu 27,67. Perubahan terjadi setelah pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* selama 7 hari yakni memberikan efek penurunan ekspresi mRNA TLR4, hal ini terlihat pada hasil pemeriksaan ke-3 (P3) = 6,823 (pemeriksaan dilakukan 7 hari setelah therapy ekstrak *Thalassia hemprichii*) dan terus menurun sampai pada pemeriksaan ke-4 (P4) = 6,495 (pemeriksaan hari ke-14 setelah therapy ekstrak *Thalassia hemprichii*) dan sebanding dengan penurunan rerata jumlah bakteri setelah therapy yakni 5,67. Hal ini membuktikan bahwa ekstrak *Thalassia hemprichii* berpotensi sebagai antibakteri dan bekerja sebagai bakterisi atau bakteriostatik.

Penurunan ekspresi mRNA TLR4 setelah tujuh hari pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* menunjukkan adanya penurunan lipopolisakarida (LPS) dalam darah mencit, yang menandakan adanya proses penyembuhan infeksi dalam tubuh mencit. Royle, M. C., et al (2003) mengatakan bahwa hal yang sangat vital dalam stimulasi respon imun non spesifik dalam melawan lipopolisakarida yang merupakan bagian dari adalah aktivasi TLR4. Adanya lipopolisakarida akan menstimulasi TLR4 kemudian menyebabkan translokasi nuclear dari NF κ B dan sitokin TNF- α serta inducible No synthase (iNOS).

Salah satu mekanisme herbal sebagai *complementary and alternative medicine* (CAM) dalam meningkatkan imunitas atau kekebalan tubuh adalah memodulasi respon pathogen/pengaturan sel T (Venkatesha, S. H., et al, , 2011). Lebih lanjut, Venkatesha, S.H., et al (2011) mengatakan bahwa mekanisme lain fungsi herbal dalam meningkatkan imunitas atau kekebalan tubuh adalah dengan memodifikasi tingkat dan kualitas respon imunitas sel T, sel B dan sitokin. Tanaman yang berfungsi sebagai herbal CAM dapat meningkatkan imunitas atau kekebalan tubuh dengan mekanisme mengubah keseimbangan antara inflamasi dan anti inflamasi pada sitokin. Fungsi imunomodulator dari tanaman obat ditentukan oleh komponen aktif yang terkandung dalam sel tanaman. *Thalassia hemprichii* merupakan

tanaman yang mengandung senyawa metabolit berupa flavonoid, saponin dan tannin. Mekanisme antibakteri senyawa fenolik dan terpenoid adalah merusak struktur dinding sel, mengganggu kerja transport aktif dan kekuatan proton di dalam membrane sitoplasma bakteri. Senyawa tersebut akan mendenaturasi dan menginaktifkan protein seperti enzim. Oleh karena itu dinding sel bakteri akan mengalami kerusakan karena terjadinya penurunan permeabilitas yang memungkinkan terganggunya transport ion-ion organik penting yang akan masuk ke sel bakteri, sehingga dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme atau matinya sel bakteri (Bota, W., Martosupono, M., & Rondonuwu, F. S., 2015).

Flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membrane sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Cowan, 1999; Nuria, et al., 2009; Bobbarala, 2012). Flavonoid juga berperan dalam menghambat metabolisme energy dengan cara yang mirip dengan menghambat system respirasi, karena dibutuhkan energy yang cukup untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekul. Flavonoid juga dapat merusak membrane sitoplasma, yang dapat menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menonaktifkan system enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan aktif ke dalam sel, sehingga menyebabkan kematian bakteri. Senyawa saponin dapat merusak membrane sitoplasma. Kerusakan pada membrane sitoplasma mengakibatkan penurunan permeabilitas membrane sel, dan transportasi zat yang tidak terkontrol ke dalam sel akan terlepas dari sel. Zat yang ada dalam sel seperti enzim ion organik, asam amino dan nutrisi keluar dari sel. Ketika sel melepaskan enzim bersama dengan zat-zat seperti air dan nutrisi menyebabkan terhambatnya metabolisme yang berakibat menurunnya ATP yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan poliferasi sel, sehingga menghambat pertumbuhan sel bakteri dan menyebabkan

kematian sel. Tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transcriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tannin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivkan adhesi sel mikroba juga menginaktivkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.

Hasil uji lanjut (*post Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai $.sig$ (p -value) = 0.000 $< \alpha = 0.01$ menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 setelah diinjeksi (P2) adalah signifikan, hari ke-7 setelah pemberian ekstraksi *Thalassia hemprichii*, dan hari ke-14 setelah pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* adalah signifikan atau pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4. *Thalassia hemprichii* sebagai salah satu tanaman obat dari Family *Hydrocaritaceae* mengandung senyawa antara lain flavonoid, saponin dan tannin. Ekstraksi *Thalassia hemprichi* yang dilanjutkan dengan uji fitokimia menunjukkan bahwa *Thalassia hemprichi* memiliki beberapa senyawa bioaktif yang dapat menjadi antikanker, antibakteri dan antifungi (Jebasingh, S. E. J., et al., 2016).

Penurunan ekspresi TLR4 setelah hari ke-7 pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi menunjukkan adanya penurunan lipopolisakarida (LPS) dalam darah mencit yang menandakan adanya proses penyembuhan dari infeksi dalam tubuh mencit. Sebaliknya pada kelompok yang diberikan Aquadest (K4), ekspresi TLR4 terus meningkat setelah hari ketujuh sampai hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa lipopolisakarida masih tetap tinggi dalam darah mencit.

Pada kelompok dengan pemberian antibiotik *Levofloxacin* sesudah injeksi dalam penelitian ini secara statistik dengan uji

anova pada taraf kepercayaan 99% diperoleh nilai .sig (p-value) = $0.000 < \alpha = 0.01$ artinya ada perbedaan ekspresi gen TLR4 pada kelompok-kelompok pemeriksaan sesudah injeksi bakteri terhadap ekspresi mRNA TLR4, dengan perubahan rerata mean dari pemeriksaan sebelum injeksi (P1) sampai dengan hari ke-14 post pengobatan (P4). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA TLR4 setelah injeksi mengalami peningkatan signifikan pada pemeriksaan awal (P1) = 6,07 dan pada pemeriksaan kedua (P2) setelah 3 hari diinjeksi adalah 10,635. Seperti yang sudah dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami infeksi bakteri. Hal ini sebanding dengan rerata jumlah bakteri setelah 3 hari infeksi yaitu 28,00. Perubahan terjadi setelah pemberian levofloxacin selama 7 hari yakni memberikan efek penurunan ekspresi mRNA TLR4, hal ini terlihat pada hasil pemeriksaan ke-3 (P3) = 6,618 (pemeriksaan dilakukan 7 hari setelah levofloxacin) dan terus menurun sampai pada pemeriksaan ke-4 (P4) = 6,006 (pemeriksaan hari ke-14 setelah diberikan levofloxacin) dan sebanding dengan penurunan rerata jumlah bakteri setelah pemberian levofloxacin yakni 1,67. Hal ini terjadi karena efek levofloxacin sebagai antibiotik.

Hasil uji lanjut (*pos Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai .sig (p-value) = $0.000 < \alpha = 0.01$ menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 setelah diinjeksi (P2) adalah signifikan, hari ke-7 setelah pemberian levofloxacin, dan hari ke-14 setelah pemberian levofloxacin adalah signifikan atau pemberian levofloxacin mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4.

Pada kelompok dengan pemberian *aquadest* sesudah injeksi dalam penelitian ini secara statistik dengan uji anova pada taraf kepercayaan 99% diperoleh nilai .sig (p-value) = $0.000 < \alpha = 0.01$ artinya ada perbedaan ekspresi gen TLR4 pada kelompok-kelompok pemeriksaan sesudah injeksi bakteri terhadap ekspresi mRNA TLR4, dengan perubahan rerata mean dari pemeriksaan

sebelum injeksi (P1) sampai dengan hari ke-14 post pengobatan (P4). Dari hasil tersebut terlihat bahwa besarnya peningkatan ekspresi mRNA TLR4 setelah injeksi mengalami peningkatan signifikan pada pemeriksaan awal (P1) = 5,962 dan pada pemeriksaan kedua (P2) setelah 3 hari diinjeksi adalah 10,698. Seperti yang sudah dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami infeksi bakteri. Hal ini sebanding dengan rerata jumlah bakteri setelah 3 hari infeksi yaitu 27,83. Peningkatan ekspresi mRNA TLR4 terus meningkat pada pemeriksaan ke-3 (P3) = 12,707 (pemeriksaan dilakukan 7 hari setelah pemberian aquadest) dan terus meningkat sampai pada pemeriksaan ke-4 (P4) = 13,534 (pemeriksaan hari ke-14 setelah pemberian aquades) dan sebanding dengan rerata jumlah bakteri yang jumlahnya hampir sama dengan jumlah bakteri setelah 3 hari di injeksi yakni 26,17. Hal ini disebabkan karena aquades tidak menyandung senyawa antibakteri.

Hasil uji lanjut (*pos Hoc Test*) menggunakan Bonferroni diperoleh nilai .sig (p-value) = 0.000 < α = 0.01 menunjukkan bahwa ekspresi mRNA TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) dengan hari ke-3 setelah diinjeksi (P2) adalah signifikan, hari ke-7 setelah pemberian aquadest, dan hari ke-14 setelah pemberian aquadest adalah signifikan atau pemberian levofloxacin mempengaruhi ekspresi mRNA TLR4.

Penurunan ekspresi mRNA TLR4 setelah hari ke-7 pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* (K2) sesudah injeksi dan kelompok yang diberikan levofloxacin (K3) menunjukkan adanya penurunan lipopolisakarida (LPS) dalam darah mencit yang sebanding dengan ekspresi mRNA TLR4 menandakan adanya proses penyembuhan dari infeksi dalam tubuh mencit. Sebaliknya pada kelompok yang diberikan Aquadest (K4), ekspresi mRNA TLR4 terus meningkat setelah hari ketujuh sampai hari ke-14. Hal ini menunjukkan bahwa lipopolisakarida masih tetap tinggi dalam darah mencit.

Royle, M. C., et al., (2003) mengungkapkan bahwa hal yang sangat vital dalam stimulasi respon imun non spesifik dalam melawan lipopolisakarida yang merupakan bagian dari adalah aktivasi TLR4. Adanya lipopolisakarida akan menstimulasi TLR4 kemudian menyebabkan translokasi nuclear dari NF κ B dan sitokin TNF- α serta inducible NO synthase (iNOS). Komponen bakteri yang berperan sebagai *stimulating innate immunity*, antara lain: lipopolisakarida (LPS), peptidoglikan, lipoprotein (lipopeptida), dan DNA bakteri (Emertcan *et al.* 2011). Komponen-komponen ini disebut sebagai *ligand*, yang kemudian berikatan dengan reseptor TLRs (Kabelitz 2007).

Salah satu anggota dari *TLRs genes* adalah gen TLR4, yang mentranskripsi reseptor TLR4. *Ligand* dari reseptor TLR4 adalah LPS dari bakteri gram negatif, termasuk *Salmonella sp.* (Akashi *et al.* 2001; Akira dan Takeda 2004) . Pada bakteri, LPS adalah endotoksin. Apabila bakteri ini berhasil menginfeksi tubuh, maka komponen inilah yang menyebabkan inflamasi atau peradangan (Gantois *et al.* 2009). Dengan demikian peran reseptor TLR4 adalah sangat penting untuk mengontrol sejak awal terjadinya peradangan akibat infeksi bakteri *Salmonella sp.*

F. Pengaruh Ekspresi mRNA TLR4 pada kelompok yang diberikan Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum dan sesudah injeksi bakteri .

Dari hasil analisis uji statistik dengan one way ANOVA pada taraf dengan *one way* ANOVA pada taraf signifikan $\alpha=0,01$ atau 99% didapatkan nilai $\text{sig}=0,462 > \alpha=0,01$ atau dengan kata lain H_0 diterima artinya tidak terdapat perbedaan rerata ekspresi mRNA gen TLR4 sebelum dan sesudah diinjeksi bakteri . Hal tersebut menunjukkan bahwa secara preventif maupun kuratif pemberian Ekstrak *Thalassia hemprichii* memiliki efek yang sama terhadap Ekspresi mRNA gen TLR4 pada hewan uji yang terinfeksi bakteri . Pada kelompok preventif mampu menekan ekspresi mRNA TLR4

dan pada kelompok kuratif mampu menurunkan ekspresi mRNA TLR4. Efek preventif dan kuratif ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap bakteri adalah sama-sama sebagai antibakteri *Salmonella thypi*. Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai antibakteri berbeda dengan antibiotik. Ekstrak *Thalassia hemprichii* sebagai tanaman dapat digunakan sebelum invasive bakteri ataupun sesudah invasive bakteri. Obat herbal terfokus pada penyebab sakit dan butuh waktu menyatu dalam metabolisme tubuh beberapa hari hingga beberapa minggu. Obat tradisional menghasilkan efek samping yang lebih kecil dan bahan mudah di dapat, bahkan dapat menetralkan efek samping dari zat aktif yang membahayakan tubuh.

LPS pada terikat oleh LPS-binding protein (LBP) dalam darah dan kemudian mengaktifkan *Toll Like Receptor-4* (TLR4). TLR4 yang teraktivasi akan merekrut protein adaptor MyD88. Kemudian MyD88 merekrut IRAK4, IRAK1 dan IRAK2. IRAK kinase kemudian memfosforilasi dan mengaktifkan protein TRAF6 sehingga memungkinkan NF κ B berdifusi ke dalam inti sel dan mengaktifkan transkripsi dan induksi akibat sitokin inflamasi. Selain jalur MyD88, juga ada jalur lain dalam mengaktifkan TLR4 yaitu jalur Trif-dependent. Kedua TLR3 dan TLR4 memanfaatkan jalur Trif-dependent, di mana masing-masing dipicu oleh dsRNA dan LPS. Untuk TLR3, dsRNA menyebabkan aktivasi reseptor, merekrut Trif adapter. Trif mengaktifkan kinase TBK1 dan RIPK1, yang menciptakan cabang di jalur sinyal. Kompleks sinyal Trif-TBK1 memfosforilasi IRF3 memungkinkan translokasi ke dalam nucleus dan produksi interferon tipe I. Sementara itu, aktivasi RIPK1 menyebabkan terjadinya proses polyubiquitinasi dan aktivasi TAK1 dan NF κ B transkripsi dengan cara yang sama sebagai jalur MyD88-dependent.

TLR4 adalah satu-satunya TLR yang menggunakan keempat adapter. Kompleks yang terdiri dari TLR4, MD2 dan LPS merekrut TIR yang mengandung adapter TIRAP dan MyD88 dan dengan demikian memulai aktivasi NF κ B (fase awal) dan MAPK. TLR4-

MD2-LPS kompleks kemudian mengalami endositosis dan di endosome membentuk kompleks sinyal dengan TRAM dan Trif adapter. Jalur Trif-dependent ini lagi menyebabkan aktivasi IRF3 dan produksi interferon tipe I, tetapi juga menyebabkan aktivasi NFκB fase akhir. Kedua fase awal dan akhir dari aktivasi NFκB diperlukan untuk produksi sitokin inflamasi. Respon inflamasi dimediasi oleh berbagai molekul pensinyalan. Aktivasi TLR menghasilkan produksi molekul pensinyalan lipida seperti molekul pensinyalan prostaglandin dan protein (atau peptide) seperti sitokin, yang semuanya berkontribusi terhadap respon inflamasi. Beberapa sitokin yang diproduksi oleh makrofag teraktivasi adalah dikenal sebagai kemokin. Beberapa di antaranya menarik netrofil, yang merupakan sel pertama yang direkrut dalam jumlah besar ke tempat infeksi baru. Kemudian menarik monosit dan sel dendritik. Sel dendritic mengambil antigen dari pathogen yang menyerang dan membawa mereka ke kelenjar getah bening di dekatnya, di mana mereka menyajikan antigen ke limfosit untuk mengerahkan kekuatan sistem kekebalan adaptif. Sitokin lainnya memicu demam, kenaikan suhu tubuh. Pada keseimbangan, demam membantu sistem kekebalan tubuh dalam melawan infeksi, karena kebanyakan bakteri dan pathogen virus tumbuh lebih baik pada suhu yang lebih rendah, sementara respon imun adaptif lebih kuat pada suhu yang lebih tinggi. Beberapa molekul persinyalan proinflamasi merangsang sel endotel untuk mengekspresikan protein yang memicu pembekuan darah di pembuluh darah kecil setempat. Dengan menutup pembuluh darah dan memotong aliran darah, respon ini dapat membantu mencegah pathogen memasuki aliran darah dan menyebabkan infeksi ke bagian tubuh yang lain.

G. Hubungan Ekspresi mRNA TLR4 dan Kadar TLR4 pada Kelompok yang diberikan Ekstrak *Thalassia hemprichii* Sebelum dan Sesudah Injeksi Bakteri .

Pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sebelum injeksi (Preventif), terlihat dapat dijelaskan bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,171, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 2,637; pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 4,799 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 5,171. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Infeksi di dalam tubuh akan berakibat munculnya berbagai respon imun yang diawali dengan meningkatnya sel fagosit. Sel fagosit seperti neutrofil maupun makrofag akan bergerak kearah rangsangan, selanjutnya memfagositosis sel yang di anggap asing tersebut. Kandungan lipopolisakarida pada dinding sel bakteri merupakan sinyal bagi makrofag untuk melakukan aktivasi. Aktivasi makrofag ini mempunyai kemampuan yang tinggi dalam melakukan penelanan benda asing melalui proses fagositosis. Meningkatnya jumlah makrofag ke tempat infeksi ini berasal dari migrasi makrofag ke sumber rangsangan (Besung INK, dkk., 2016). Pada kelompok yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada diatas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,180, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 9,291, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 3,923 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 3,578. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Pada saat terinfeksi bakteri, ekspresi mRNA gen TLR4 meningkat seiring dengan peningkatan kadar TLR4 dan setelah pengobatan dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, terjadi penurunan kadar

ekspresi mRNA gen TLR4 yang diikuti pula dengan penurunan kadar TLR4.

Pada kelompok yang diberikan *levofloxacin* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada di atas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 1,838, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,705, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 3,571 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 2,188. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Pada saat terinfeksi bakteri, ekspresi mRNA gen TLR4 meningkat seiring dengan kadar TLR4 dan setelah pengobatan dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, terjadi penurunan kadar ekspresi mRNA gen TLR4 yang diikuti pula dengan penurunan kadar TLR4.

Pada kelompok yang diberikan *lAquadest* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada di atas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 2,105, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,880, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 11,480 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 13,324. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Hongyong *et al.* (2012) dalam penelitiannya melaporkan bahwa penurunan ekspresi gen TLR4 berdampak pada penurunan jumlah bakteri di dalam darah.

Bagian VI

Konklusi Kajian

Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sebelum** diinjeksi . Ada pengaruh pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan **sesudah** diinjeksi . Tidak ada perbedaan pengaruh ekstrak *Thalassia hemprichii* terhadap ekspresi mRNA gen TLR4 pada kelompok mencit BALB/C yang diberikan ekstrak *Thalassia hemprichii* **sebelum** dan **sesudah** diinjeksi .

Ada pula yang perlu diperhatikan dari apa yang ada pada salmonella etric sovar typhi (S.Typhi), merupakan mikroorganisme kelompok bakteri gram negative berbentuk batang, masuk dalam kelompok family *Enterobacteriacie* yang menyebabkan penyakit Demam Filoid (FD), transmisi penyakit ini



terjadi melalui makanan dan air yang terkontaminasi. Saat memahami akan hal ini tentu masyarakat akan mengambil sikap paling bijaksana, entah secara pribadi maupun secara komunal. Hal tersebut akan membuat kesadaran secara kolektif akan hal yang perlu dialami secara bersama untuk kemajuan kita.

Adapun yang perlu mengingat potensi dan tingginya kandungan senyawa bioaktif pada ekstrak *Thalassia Hemprichii*, maka sangat perlu dikaji untuk mengembangkn ekstrak Thalasia hemprichii menjadi herbal bersandar yang berefek sebagai antioksidan dan antibakteri, yang dikaji berdasarkan ekspresi mRNA gen TLR4 pada Mice BALB/c yang diinjeksi bakteri *Salmonella typhi* dengan metode RT-PCR.

Pada kelompok yang diberikan *levofloxacin* sesudah injeksi (Kuratif) terlihat pada di atas bahwa kadar TLR4 pada pemeriksaan awal (P1) diperoleh nilai rerata = 1,838, pemeriksaan kedua (P2) diperoleh nilai rerata = 8,705, pemeriksaan ketiga (P3) diperoleh nilai rerata = 3,571 dan pemeriksaan keempat (P4) diperoleh nilai rerata = 2,188. Hal ini memperlihatkan hubungan yang linear antara peningkatan kadar TLR4 dengan peningkatan ekspresi mRNA gen TLR4. Pada saat terinfeksi bakteri, ekspresi mRNA gen TLR4 meningkat seiring dengan kadar TLR4 dan setelah pengobatan dengan pemberian ekstrak *Thalassia hemprichii*, terjadi penurunan kadar ekspresi mRNA gen TLR4 yang diikuti pula dengan penurunan kadar TLR4.

Di Indonesia, ketika kita menyadari kalau tifoid perlu perhatian dari berbagai pihak maka penyakit tersebut. Padahal penyakit ini yang bersifat endemis dan mengancam kesalahan masyarakat. Saat mengetahui kronologi yang kompleks dengan tingkat kasus-kasus karier (carier) atau releps dan restensi terhadap obat-obat yang dipakai. Sehingga memyulitkan upaya pencegahan. Sebagai bukti pada tahun 2008, angka kesakitan tifoid di Indonesia dilaporkan 81.7 per 100.000 penduduk, dengan sebelum menurut kelompok 0,0/100.000 penduduk (0-1 tahun). Data yang dapat diketahui tentu akan menjadikan kita untuk bisa,

secara bersamaan mampu menangani sekaligus menjadikan sebuah sampel agar problem tersebut ditemukan indikator-indikatornya solusi apa yang mampu disajikan kepada masyarakat Indonesia. Tentu ini akan menjadi sebuah cara kerja masyarakat saling kolektif dengan membangun kesadaran dari bawah hingga ke atas . tidak dapat dipungkiri jika ini terjadi dari beberapa wilayah secara bersama, yakin Indonesia bukan hanya berkembang tapi akan menuju maju, lebih baik dan bijaksana.

Daftar Pustaka



- Abasht, B., M.G. Kaiser, J. van der Poel, S.J. Lamont. (2009). Genetic lines differ in Toll-like receptor gene expression in spleens of chicks inoculated with *Salmonellaenterica* serovar *enteritidis*. *Poult Sci* 88: 744- 749.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (2000). B cell activation and antibody production. *Cellular and molecular immunology*, 1, 243-67.
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2014). *Basic immunology: functions and disorders of the immune system*. Elsevier Health Sciences.
- Adapala, V. J., Buhman, K. K., & Ajuwon, K. M. (2011). Novel anti-inflammatory role of SLPI in adipose tissue and its regulation by high fat diet. *Journal of inflammation*, 8(1), 5.

- Ahmed, Bahar. Chemistry Of Natural Products. New Delhi: Department of Pharmaceutical Chemistry Faculty of Science Jamia Hamdard. 2007.
- Akashi, S.Y., H. Nagai, M. Ogata, K. Oikawa, S. Fukase, K. Kusumoto, M. Kawasaki, S. Nishijima, M. Hayashi, Kimoto, K. Miyake. 2001. Human MD-2 confers on mouse Toll-like receptor-4 species-specific lipopoly-saccharide recognition. *Int. Immunol.* 13:1595-1599.
- Akira, S. (2000). The role of IL-18 in innate immunity. *Current opinion in immunology*, 12(1), 59-63.
- Akira, S., K. Takeda. 2004. TLR signaling pathways. *Nature Reviews Immunology* 4: 499-511.
- Albiger B, Dahlberg S, Henriques-Normark B, Normark S. Role of the innate immune system in host defence against bacterial infections: fokus on the Toll-like receptors. Journal of Internal Medicine. 2007;261:1-10.
- Animura, N.S., F. Saitoh, S. Matsumoto, T. Akashi, and K. Miyake. 2008. Roles for LPS-dependent interaction and relocation of TLR4 and TRAM in TRIF-signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368: 94-99.
- Assani, S. 1994. Mikrobiologi Kedokteran. Jakarta : Fakultas kedokteran Universitas Indonesia.
- Azam, S., Jakaria, M., Kim, I. S., Kim, J., Haque, M. E., & Choi, D. K. (2019). Regulation of Toll-Like Receptor (TLR) Signaling Pathway by Polyphenols in the Treatment of Age-Linked Neurodegenerative Diseases: Focus on TLR4 Signaling. *Frontiers in immunology*, 10.
- Bachtiar, A. 2007. Penelusuran Sumber Daya Hayati Laut (Alga) Sebagai Biotarget Industri. [Makalah], Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Padjadjaran, Jatinagor.

- Baratawidjaja, K. G. (2006). Basic immunology 7th eds. *Faculty of Medicine, Indonesia University. Jakarta.*
- Bhutta ZA. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. *BMJ*. 2006;333:78-82.
- Boakye, A. A., Wireko-Manu, F. D., Agbenorhevi, J. K., & Oduro, I. (2015). Antioxidant activity, total phenols and phytochemical constituents of four underutilised tropical fruits.
- Boom, T. V., & Cronan Jr, J. E. (1990). Nonsense mutants defining seven new genes of the lipid-containing bacteriophage PR4. *Virology*, 177(1), 11-22.
- Bota, W., Martosupono, M., & Rondonuwu, F. S. (2015). Potensi Senyawa Minyak Sereh Wangi (citronella oil) dari Tumbuhan *Cymbopogon nardus* L. sebagai Agen Antibakteri. *Prosiding Semnastek*.
- Bourbeau, P. P., & Pohlman, J. K. (2001). Three days of incubation may be sufficient for routine blood cultures with BacT/Alert FAN blood culture bottles. *Journal of clinical microbiology*, 39(6), 2079-2082.
- Carpenter S, O'Neill L. How important are Toll-like receptors for antimicrobial responses? Journal compilation. 2007;9:1891-901.
- Cetin-Karaca H. Evaluation of Natural Antimicrobial Duenolic Compounds Against Foodborne. 2011
- Chanwitheesuk, A., Teerawutgulrag, A., & Rakariyatham, N. (2005). Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food chemistry*, 92(3), 491-497.
- Choo, P. W., Rand, C. S., Inui, T. S., Lee, M. L. T., Cain, E., Cordeiro-Breault, M., ... & Platt, R. (1999). Validation of patient reports, automated pharmacy records, and pill counts with

- electronic monitoring of adherence to antihypertensive therapy. *Medical care*, 846-857.
- Coppo, E., & Marchese, A. (2014). Antibacterial activity of polyphenols. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(4), 380-390.
- Crump, J. A, and Mintz, E. D. 2010. Global Trends in Typhoid and Paratyphoid Fever. *Clin.Infect. Dis.*, 50(2):241-246.
- Cushnie, T.P.Tim. Lamb, Andrew J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2005;26;343-356.
- Damgaard R. Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins in regulation of inflammation and innate immunity. *Discovery Medicine* 2011:1-5.
- Den Hartog, C. (1970). The sea-grasses of the world. *North-Holland, Amsterdam*.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1995. Cara Pembuatan Siraplisia, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Jakarta. 1-32.
- Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan. 1986. Sediaan Galenik, Edisi II, Departemen Kesehatan Republik Indonesia, Bhakti Husada, Jakarta. 1-12.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal.Chem.* 28:350-356.
- Ehrentraut H, Meyer R, Schwederski M, Ehrentraut S, Velten M, Grohe C. Systemically administered ligands of Toll-like receptor 2, -4, and -9 induce distinct inflammatory responses in the Murine Lung. *Mediators of inflammation* 2011:1-11.

- Elisabeth Purba, I., Wandra, T., Nugrahini, N., Nawawi, S., & Kandun, N. (2016). Program pengendalian demam tifoid di Indonesia: tantangan dan peluang. *Media Penelitian dan Pengembangan Kesehatan*, 26(2), 99-108.
- Elson G, Dunn-Siegrist I, Daubeuf B, Pugin J. Gram-negative and Gram-positive bacteria Contribution of Toll-like receptors to the innate immune response. *Blood*. 2006;109:1574-82.
- Emertcan A, Öztürk F, Gündüz K. Toll-like receptors and skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2011;11:1-7.
- Gunn, J.S., Marshall, J.M., Baker, S., Dongol, S., Charles, R.C. & Ryan, E.T. 2014. Salmonella chronic carriage : epidemiology, diagnosis, and gallbladder persistence. *Trends Microbiol*, 22, 648-55
- Hanani, E., A. M. Abdul., dan S. Ryany. 2005. Identifikasi Senyawa Antioksidan Dalam Spons Callyspongia SP Dari Kepulauan Seribu. *Majalah Ilmu Kefarmasian*, II (3). Halaman 130
- Harrison, P. J. (1999). The neuropathology of schizophrenia: a critical review of the data and their interpretation. *Brain*, 122(4), 593-624.
- Hatta, M., & Smits, H. L. (2007). Detection of by nested polymerase chain reaction in blood, urine, and stool samples. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(1), 139-143.
- Hawas W Usama, 2016, Genetic Regulation and manipulation for natural product discovery. *Applied Microbiology and Biotechnology*.
- Hendra R, Ahmad S, Sukari A, Shukor MY, Oskoueian E. Flavonoid analyses and antimicrobial activity of various parts of *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl fruit. *Int J Mol Sci*. 2011;12: 3422-3431.

- Hertanto, Y. (2008). Sebaran dan Asosiasi Perifiton pada Ekosistem Padang Lamun (*Enhalus acoroides*) di Perairan Pulau Tidung Besar, Kepulauan Seribu, Jakarta Utara.[Skripsi]. *Institut Pertanian Bogor*.
- Hery Winarsi. 2007. Antioksidan Alami dan Radikal Bebas. Yogyakarta: Kanisius. Hal. 189-90
- House, J. S. (2001). Social isolation kills, but how and why?. *Psychosomatic medicine*, 63(2), 273-274.
- Humayoon Shafiq Satti, S. H., and Qamar Javed. 2013. Association of Interlukin-6 Gene Promoter Polymorphism with Coronary Artery Disease in Pakistani Families. *Journal ListScientific World Journal*. V. 2013; 2013 Dec 2. Doi :101155/2013/538365, 5, 538365.
- Hurley, D., Mccusker, M.P., Fanning, S & Martins, M. 2014. Salmonella-host Interaction - Modulation of the Host Innate Immune System. *Front Immunol*, 5, 481.
- Jafriati. 2005. Potensi dan Penentuan Senyawa Bioaktif Bakteri Simbion Penghasil Antibiotika dari Rumput Laut *Thalassia hemprichii* dari Perairan Pulau Barrang Lompo Sulawesi Selatan. Pascasarjana Universitas Hasanuddin.
- Jafriati. 2013. Potensi Senyawa Penghasil Antibiotika dari Lamun *Thalassia hemprichii* yang tumbuh di perairan Wakatobi. Bappeda Kabupaten Wakatobi.
- Jafriati. 2014. Isolasi Bakteri penghasil Antibiotika dari *Thalassia hemprichii* yang tumbuh di Pulau Barrang Lompo Sulawesi Selatan. *Jurnal Ilmiah Kesehatan Masyarakat* ISSN : 2088-0928, Vol. 5, No 2, Edisi Agustus 2014, Halaman 39-46, Webside: <http://www.uho.ac.id/karya-ilmiah.php>.
- Jebasingh, S. E. J., Lakshmikandan, M., Sivaraman, K., & Uthiralingam, M. (2016). Assessment of Antibacterial, Antifungal Property and Purification of Bioactive Compounds

- from Seagrass, *Thalassia hemprichii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 86(4), 905-910.
- Kang S, Kauls L, Gaspari A. Toll-like receptors: applications to dermatologic disease. *J Am Acad Dermatol*. 2006;54:951-83.
- Kartika, Angga Raka Gde, 2016, Potensi Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) sebagai penghambat bakteri *Vibrio harveyi*, *Journal of Marine and Aquatic Sciences Vol 2 No 2* 49-53
- Kiswara W. 1992. Vegetasi lamun (seagrass) di rataan terumbu Pulau Pari, Pulau-pulau Seribu, Jakarta. *Oseanologi di Indonesia*. 25:31-49.
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Järvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., ... & Aromaa, A. (2002). Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 76(3), 560-568.
- Kordi, K. 2010. A to Z Budi Daya Biota Akuatik untuk Pangan, Kosmetik dan Obat-obatan. Penerbit Andi, Yogyakarta: 226 hlm.
- Kusmardiyani, S. dan Elfahmi. 2000. *Phytochemical Studies of Thalassia hemprichii* (Ehrenb.) Aschers [Prosiding]. *Dalam: ISMB 2000*. Perhimpunan Bioteknologi Laut, Jakarta, 51-55.
- Laganà, P., Anastasi, G., Marano, F., Piccione, S., Singla, R. K., Dubey, A. K., ... & Haddad, M. A. (2019). Phenolic Substances in Foods: Health Effects as Anti-Inflammatory and Antimicrobial Agents. *Journal of AOAC International*.
- Lakshmi V, Goel AK, Srivastava MN, Kulshreshta DK, Raghurir R. 2006. Bioactivity of marine organism: part IX – screening of some marine flora from Indian Coasts. *IJEB*, Vol 44; 137 – 141.

- Latuconsina, M.U., 2002. *Studi Kepadatan dan Laju Pertumbuhan Lamun Enhalus acoroide dan Thalassia hemprichii di Pulau Barrang Lompo dan Pulau Bone Batang*. Fakultas Ilmu Kelautan dan Perikanan. Universitas Hasanuddin.
- Laurence, D. R., & Bacharach, A. L. (Eds.). (1964). *Evaluation of drug activities: pharmacometrics* (Vol. 1, pp. 160-162). New York: Academic press.
- Liadaki K, Petinaki E, Skuolakis C, Tsirevelou P, Klapsa D. Toll-like receptor 4 Gene (TLR4), but not TLR2, polymorphisms modify the risk of tyonsillar disease due to *streptococcus pyogenes* and *haemophilus influenza*. *Clinical and vaccine immunology*. 2011;18:217-22.
- Loganayaki, N., Rajendrakumaran, D., & Manian, S. (2010). Antioxidant capacity and phenolic content of different solvent extracts from banana (*Musa paradisiaca*) and mustai (*Rivea hypocrateriformis*). *Food Science and Biotechnology*, 19(5), 1251-1258.
- Lorenz, E., J.P. Mira, K.L. Frees, D.A. Schwartz. 2002. Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*. 162: 1028-1032.
- Madduluri, Suresh. Rao, K. Babu. Sitaram, B. In Vitro Evaluation Of Antibacterial Activity of Five Indegenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2013:5(4): 679-684.
- Malangngi LP, Sangi MS, Paendong JJE. 2012. Penentuan kandungan tanin dan uji aktivitas antioksidan ekstrak biji buah alpukat (*Persea americana* Mill.). *Journal MIPA Universitas Sam Ratulangi* 1(1): 5-10.

- Marleni, N., Gray, S., Sharma, A., Burn, S., & Muttill, N. (2012). Impact of water source management practices in residential areas on sewer networks—a review. *Water Science and Technology*, 65(4), 624-642.
- Massi, M, N., Toshiro S, Akinobu G, Acharya B, Mochammad H, Masato K, 2003. Rapid Diagnosis of Typhoid Fever bt PCR Assay Using One Pair of Primers from Flagellin Gene of . *Jurnal Infect Chermother* 9; 233-237
- Merrell, D. S. & Folkow, S. 2004. Frontal and stealth attack strategies in microbial pathogenesis. *Nature*, 430, 250-6.
- McClure, R., & Massari, P. (2014). TLR-dependent human mucosal epithelial cell responses to microbial pathogens. *Frontiers in immunology*, 5, 386.
- McIntruff J, RL M, Kim J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J Invest Dermatol*. 2005;125:1-8
- Mochammad Hatta and Henk L Smits. 2007. Detection of by nested Polymerase Chain Reaction in blood, urine and stool samples. *American J. Tropical Medicine Hygiene*. vol : 76;139-143
- Modlin R, Kim J, Maurer D, Bangert D, Stingl D. Innate and adaptive immunity in the skin. In: Freedberg I, Eisen A, Wolff A, et al, editor. *Dermatology in general medicine*. New York: Mc.Graw-Hill; 2008:95-126.
- Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical dyphenylpicrylhydrazil (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Journals of Science and Technology*. 26:211-219.
- Nasronudin, *Immunopatogenesis molekuler, Diagnosis dan Penatalaksanaan Demam Tifoid Masa Kini*, in *Penyakit Infeksi di Indonesia Solusi Kini & Mendatang 2007*, Surabaya: Airlangga University Press: Indonesia.

- Neelima, C.S.S. and Seenivasan, R., 2015. DPPH radical scavenging activity of selected Seagrasses from South East Coast of India. *Int. J Adv. Res*, 3, pp.950-956.
- Newton, C., & Graham, A. (1994). PCR, Bios Scientific.
- Ngajow, Mercy, 2013, Pengaruh Anti Bakteri ekstrak Kuit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *S. Aureus* secara in-vitro. *Jurnal Mipa Unsrat*.
- Nguyen, G., Delarue, F., Burcklé, C., Bouzahir, L., Giller, T., & Sraer, J. D. (2002). Pivotal role of the renin/prorenin receptor in angiotensin II production and cellular responses to renin. *The Journal of clinical investigation*, 109(11), 1417-1427.
- Nisa, Humeera, 2015, Fungal Endophytes as prolific source of Phytochemicals and other Bioactive Natural Products: a Review. *Microbial Phathogenesis Vol 82*
- Nuria, Maulita cut, Faizaitun, Arvin, Sumantri, Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Atcc 25923, *Escherichia coli* Atcc 25922, Dan Atcc 1408, *Mediagro*. 2009;5(2):26-37.
- Olsen SJ et al. 2004. Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever. *Journal of Clinical Microbiology*. 1885-1889.
- Palsson-McDermott, E.M., and L.A. O'Neill. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor Toll-like receptor-4. *Immunology* 113: 153-162.
- Parry, C. M. (2004). The treatment of multidrug-resistant and nalidixic acid-resistant typhoid fever in Viet Nam. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 98(7), 413-422.

- Pastoor, R., Hatta, M., Abdoel, T. H., & Smits, H. L. (2008). Simple, rapid, and affordable point-of-care test for the serodiagnosis of typhoid fever. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 61(2), 129-134.
- Paul-Clark M, Mc Master S, Belcher E, Sorrentino R, Anandarajah J, Fleet M. Differential effects of Gram-positive versus Gram-negative bacteria on NOSII and TNFa in macrophages: role of TLRs in synergy between the two. British Journal of Pharmacology 2006;148:1067-75.
- Petry V, Gaspari A. Toll-like receptors and dermatology. International Journal of Dermatology. 2006:558-70.
- Philips, R.C. and E.G. Menez. 1988. *Seagrasses*. Smithsonian Institution Press, Washington D.C. 104 pp.
- Pringgenies, D., N.L. Ekasari dan Gunawan. 2011. Potensi Beberapa Ekstrak Rumput Laut sebagai Antibakteri Upaya Sebagai Bahan Antibakteri Makanan. Dalam: Prosiding Seminar Nasional Aplikasi Pemanfaatan Rumput Laut dan Bahan Hayati Laut dalam Bidang Pangan dan Energi di Semarang 29 Januari 2011. Semarang, 133-142 hlm.
- Purba, I.E., Wandra, T., Nugrahini, N., Nawawi, S., dan Kandum, M. (2016). Program Pengendalian Demam Tifoid di Indonesia: Tantangan dan Peluang. *Media Litbangkes*, Vol. 26 No.2
- Puri, Pramadita Aristi, 2011, Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Anti Oksidan Lamun Dugong (*Thalassia hemprichii*), *Jurnal Teknologi Hasil Perairan*
- Raja-Kannan RR, Arumugam R, Meenakhshi S, Anantharaman P. 2010. Thin layer chromatography analysis of antioxidant constituents from seagrasses of Gulf of Mannar biosphere reserve, South India. *IJCRGG*. Vol (2)3; 1526 - 1530.

- Rao, U. M., Mohd, K. S., Muhammad, A., Ahmad, B. A., Mohamad, M., & Ali, R. M. (2014). Taxonomical, Phytochemical and Pharmacological Reviews of *Musa sapientum* var. *Paradisiaca*. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 7(11), 12.
- Ravikumar, S., Thajuddin, N, P. Suganthi, S. Jacob Inbaneson and Vinodkumar, 2008. *Bioactive potential of seagrass bacteria against human bacterial pathogens*. *Journal of Environmental Biology* 31 387-389
- Refdanita, Maksum, R., Nurgani, A., dan Endang, P. 2004. Faktor yang Mempengaruhi Ketidaksesuaian Penggunaan Antibiotika dengan Uji Kepekaan di Ruang Intensif Rumah Sakit Fatmawati Jakarta Tahun 2001-2002. *Makara, Kesehatan* 8 (1): 21-26.
- Rosyidah, K., Nurmuhaimina, Komari, M.D.Astuti. 2010. Aktivitas Antibakteri Fraksi Saponin dari Kulit Batang Tumbuhan Kasturi *Mangifera casturi*. *Bioscientiae*, 7 (2): 25-31.
- Royle, M. C., Töttemeyer, S., Alldridge, L. C., Maskell, D. J., & Bryant, C. E. (2003). Stimulation of Toll-like receptor 4 by lipopolysaccharide during cellular invasion by live murium is a critical but not exclusive event leading to macrophage responses. *The Journal of Immunology*, 170(11), 5445-5454.
- Sandor, F., & Buc, M. (2005). Toll-like receptors. III. Biological significance and impact for human medicine. *Folia Biol (Praha)*, 51(6), 198-203.
- Santoso, J., Anwariyah, S., Rumiantin, R.O., Putri, A.P., Nabila Ukhty & Yumiko Yoshie-Stark (2012). Phenol content, antioxidant activity and fibers profile of four tropical sea grasses from Indonesia. *Journal of coastal development*. 15:189-196.
- Sari, F.P. dan S. M. Sari, 2011, Ekstraksi Zat Aktif Antimikroba dari Tanaman Yodium (*Jatropha multifida* Linn) sebagai Bahan

Baku Alternatif Antibiotik Alami. Semarang: Fakultas Teknik Universitas Diponegoro.

Sato M, Kawagoe T, Meguro A, Ota M. Toll-like receptor 2 (TLR2) gene polymorphisms are not associated with sarcoidosis in the Japanese population. *Molecular vision*. 2011;17:731-6.

Schuler P. (1990), "Natural Antioxidant Exploited Commercially", dalam *Husdant BJB, Food Antioxidants*, New York: Elsevier Applied Science

Setiabudy, R. (2007). *Farmakologi dan Terapi Edisi 5. Departemen Farmakologi dan Terapeutik. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia.*

Sudoyo, S., & Alwi, S. Setiati. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid III Edisi V. Jakarta Pusat: Interna Publishing.*

Tam, F.C.H., et al., *New rapid test for paratyphoid a fever: usefulness, cross-detection, and solution.* *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008. 62(2): p. 142-150.

Tao X, Sun X, Xu L, Yin L, Han X, Qi Y., et al, Total Flavonoids from *Rosa Laevigata* Michx Fruit Ameliorates Hepatic Ischemia/Reperfusion Injury through Inhibition of Oxidative Stress, 2016.

Terhorst D, Kalali B, Ollert M, Ring J, Mempel M. The role of toll-like receptors in host defenses and their relevance to dermatologic diseases. *Am J Clin Dermatol*. 2010;11:1-10.

Tomascik, T., Mah, A.J., Nontji, A., dan Moosa, M.K., 1997. *The Ecologi Of Indonesian Seas. Part two.* The Ecologi of Indonesia Series. Volume VII.

Tumbelaka, *Tata Laksana Demam Tifoid Pada Anak. Pediatrics Update. Naskah lengkap Pendidikan Kedokteran Berkelanjutan.* Ilmu Kesehatan Anak IDAI Jaya, 2003.

- Uchiya, K., Groisman, E. A. & Nikai, T. 2004. Involvement of Salmonella Pathogenicity Island 2 in the up-Regulation of Interleukin-10 Expression in Macrophages; role of Protein Kinase A Signal Pathway. *Infect Immun*, 72, 1964-73
- Valins W, Amini S, Berman B. The expression of Toll-like receptors in dermatological diseases and the therapeutic effect of current and newer topical Toll-like receptor modulators. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2010;9:20-9.
- Venkatesha, S. H., Rajaiah, R., Berman, B. M., & Moudgil, K. D. (2011). Immunomodulation of autoimmune arthritis by herbal CAM. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Wain, J., Hendriksen, R. S., Mikoleit, M. L., Keddy, K. H. & Ochiai, R. L. 2014. Typhoid Fever. *Lancet*
- WHO, 2003. Background Document: The Diagnosis, Treatment and Prevention Of Typhoid Fever. *Communicable Disease Surveillance and Response Vaccines and Biologicals*.
- Widodo, D. 2009. *Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam* Vol. III. Jakarta: Interna Publishing. 2797-2806.
- Yen, G. C., Duh, P. D., & Tsai, H. L. (2002). Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. *Food chemistry*, 79(3), 307-313.
- Yilma, A. N., Singh, S. R., Dixit, S., & Dennis, V. A. (2013). Anti-inflammatory effects of silver-polyvinyl pyrrolidone (Ag-PVP) nanoparticles in mouse macrophages infected with live *Chlamydia trachomatis*. *International journal of nanomedicine*, 8, 2421.

Zetterström, C. K., Strand, M. L., & Söder, O. (2006). The high mobility group box chromosomal protein 1 is expressed in the human and rat testis where it may function as an antibacterial factor. *Human Reproduction*, 21(11), 2801-2809.

Zoste M, Bouwman L, Marijke K, Putten J. Cleavage and activation of a Toll-like receptor by microbial proteases. *PNAS* 2011;108:4968-73.

