

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Landasan Teori

Antraks merupakan infeksi *zoonosis* yang sering terjadi pada hewan herbivora seperti kambing, sapi atau domba yang dapat ditularkan ke manusia, bila terjadi kontak secara langsung atau tidak langsung dari produk hewan yang terinfeksi, antara lain kulit, darah dan dagingnya. Sampai saat ini belum ada bukti penularan antar manusia (Savransky *et al.*, 2020). Antraks dalam bahasa Yunani berarti “arang”, hal ini disebabkan karena pada penyakit ini pada manusia muncul gejala berupa luka, yang kemudian pecah dan menyebabkan krusta berwarna hitam seperti arang yang disebut *eschar* (Tunkel *et al.*, 2019).

1. Penyebab Antraks

B. anthracis adalah bakteri penyebab antraks dan basil ini ditemukan pertama kali oleh Heinrich Herman Robert Koch pada tahun 1877. Sifat *B. anthracis* antara lain adalah (Tunkel *et al.*, 2019):

- a. Kuman ini termasuk bakteri gram positif, yang berukuran 1-2 μm x 5-10 μm , dengan bentuk batang yang mempunyai ujung berbatas tegas, tersusun berderet membentuk formasi seperti ruas bambu atau batu bata memanjang.
- b. Spora antraks berbentuk oval, yang tahan terhadap berbagai cuaca, dan dapat berubah bentuk menjadi vegetatif setelah masuk dalam tubuh hewan atau manusia. Ketahanan hidup spora ini dapat lebih dari 60 tahun di tanah yang kering.
- c. Spora akan mati pada suhu 100 °C selama 10 menit atau dengan cairan karbol 5% dalam 40 hari, serta cairan formalin 10% dalam 4 jam dan *hidrogen peroksidase* dalam waktu 1 jam.

- d. Antraks dapat tumbuh pada media di laboratorium misalnya agar darah atau agar nutrien, dengan suhu 37⁰ C serta PH antara 7 sampai 7,4.
- e. Bentuk vegetatif mudah mati dengan pemberian antibiotik, desinfektan atau antiseptik, serta dapat mati pada suhu 54 ⁰C selama 30 menit.

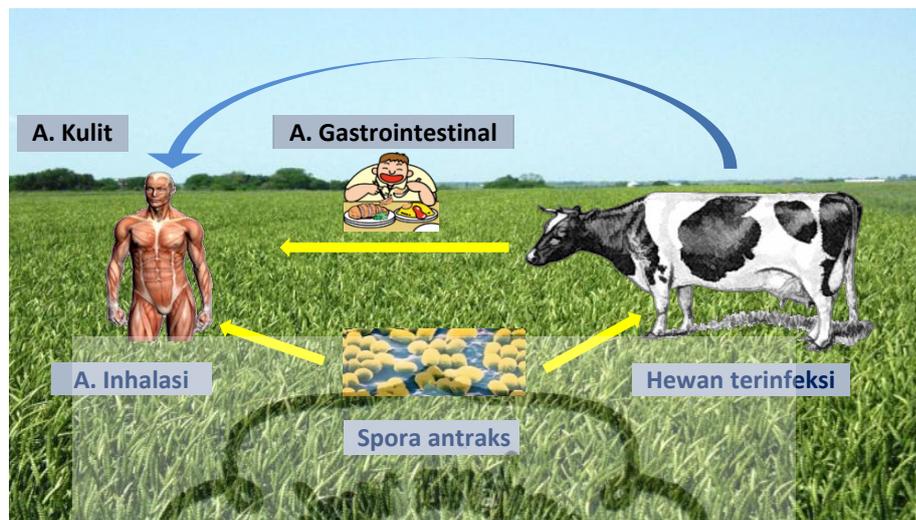
2. Siklus Hidup *B. Antraks*

Siklus hidup *B. anthracis* terbagi menjadi dua sistem pertahanan, yaitu bentuk kapsul dan spora. Bakteri ini dapat bertahan hidup hingga lebih dari 60 tahun di tanah dalam bentuk spora, sedangkan bentuk kapsul merupakan pelapis dinding luar dari bakteri, yang terdiri dari polipeptida dengan berat molekul yang besar dengan kandungan asam D-glutamat (Tunkel *et al.*, 2019).

Bakteri ini akan membentuk kapsul pada saat hidup pada jaringan hewan yang telah mati atau pada media khusus dengan kandungan natrium bikarbonat konsentrasi *carbondioksida* (CO₂) 5 %. Fungsi kapsul ini menghambat fagositosis sistem imun tubuh. *B. anthracis* serta membentuk spora sebagai bentuk *resting cells*, dalam kondisi nutrisi esensial yang tidak memenuhi kebutuhan minimal untuk pertumbuhannya, yang disebut sporulasi. Spora ini tidak terbentuk pada jaringan atau darah binatang yang hidup, tetapi spora dapat tumbuh baik di tanah, maupun pada eksudat atau jaringan hewan yang telah mati. Pada saat kondisi lingkungan membaik atau kebutuhan nutrisi esensial terpenuhi, spora tersebut akan berubah menjadi bentuk vegetatif bakteri. Spora ini dapat terus bertahan hidup selama beberapa puluh tahun dan tidak rusak atau mati oleh pemanasan atau bahan kimia tertentu, hal ini menyebabkan bakteri tersebut dapat bersifat *dormant* (Tunkel *et al.*, 2019).

3. Cara Penularan

Penularan pada manusia biasanya terjadi akibat adanya kontak langsung maupun tidak langsung dari hewan atau hasil olahan dari hewan yang terkontaminasi, antara lain: daging, kulit, tulang atau darah hewan, misalnya pada pekerja yang ada di pabrik pembuat benang atau kulit hewan (Redhono, 2016).



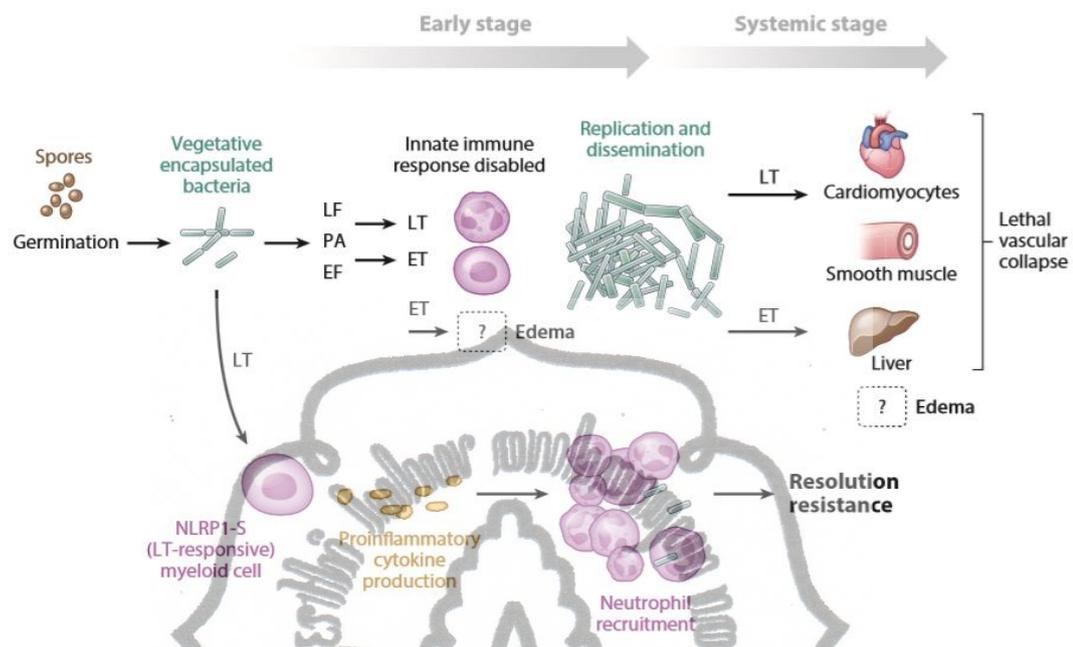
Gambar 2.1 Siklus Penularan *B. Anthracis* (Redhono, 2016)

Keterangan : Spora antraks yang ada di tanah masuk ke dalam tubuh sapi melalui rumput yang dimakan hewan tersebut, kemudian hewan tersebut akan terinfeksi antraks yang dapat ditularkan ke manusia melalui kontak langsung atau dimakan. Spora dapat langsung masuk ke paru manusia saat terhirup pada pernafasan.

Manusia akan terinfeksi apabila spora masuk melalui kulit yang tidak utuh, misalnya lecet atau luka. Spora dapat masuk melalui pernafasan saat terhirup atau melalui makanan yang terkontaminasi *B. anthracis* yang tidak dimasak dengan matang (Redhono, 2018).

4. Patogenesis Infeksi Antraks

Infeksi antraks diawali dengan masuknya endospora yang dihasilkan oleh *B. anthracis* melalui luka di kulit, tertelan atau terhirup saat bernafas. Kemudian spora akan berhadapan dengan makrofag dan sel dendrit dan mulai berkembang biak yang menghasilkan 3 sub toksin, yaitu *lethal factor* (LF), *edema factor* (EF) dan *protective antigen* (PA). Kemudian LF dan PA membentuk *lethal toxin* (LT), sedangkan EF dan PA membentuk *edema toxin* (ET), kedua toksin ini yang menyebabkan timbulnya edema dan nekrosis di kulit, gastrointestinal atau paru. Toksin ini saat berada di dalam tubuh, akan membantu bakteri dalam menghindari sistem imun *host* dan menyebabkan septikemia yang dapat menyebabkan kematian (Glomski *et al.*, 2007; Abboud *et al.*, 2008; Paccani *et al.*, 2011).



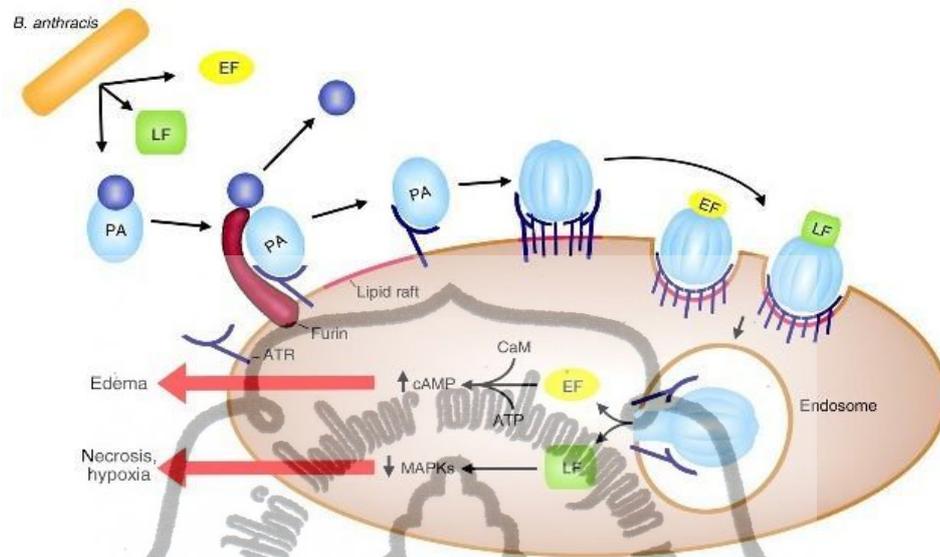
Gambar 2.2 Mekanisme Masuknya *B. anthracis* pada Tubuh (Tunkel *et al.*, 2019)
Keterangan : Pada saat masuk ke dalam tubuh manusia, spora akan berubah menjadi bentuk vegetative tanpa kapsul, yang kemudian akan menghasilkan LT dan ET. LF = *Lethal Factor*, PA = *Protective antigen*, EF = *Edema Factor*, ET = *Edema Toxin*, LT = *Lethal Toxin*.

Edema factor merupakan suatu *adenylate cyclase* berperan meningkatkan produksi *cyclic adenosine monophosphate* (cAMP). Produksi cAMP mempengaruhi perpindahan air dan ion. Konsentrasi yang tinggi dapat menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh sel. *Edema factor* juga berperan mencegah aktivasi proses inflamasi dengan cara merusak fungsi *neutrofil*, menurunkan kemampuan fagosit dan mengganggu jalur pengeluaran sitokin (Heninger, 2006).

Efek dari ET menyebabkan makrofag tidak dapat melakukan fagositosis pada bakteri, sedangkan LT merupakan racun yang memacu makrofag untuk mensekresikan TNF- α dan interleukin-1 β . Pada saat infeksi, spora dapat berubah menjadi bentuk vegetatif di jaringan subkutan atau mukosa usus, yang kemudian membelah dan menghasilkan toksin, sehingga terjadi edema dan nekrosis setempat. Kemudian spora yang di fagositosis oleh makrofag, akan berubah menjadi bentuk vegetatif yang selanjutnya dibawa ke kelenjar getah bening regional, dimana bakteri ini akan membelah,

menghasilkan toksin dan menyebabkan *limfadenitis hemorhagik*. Kemudian bakteri ini akan menyebar secara limfogen dan hematogen, yang dapat mengakibatkan toksemia dan septikemia. Kuman di dalam darah dapat mencapai sepuluh sampai seratus juta per millimeter darah, yang sebagian kecil dapat masuk hingga selaput otak dan menyebabkan meningitis. Pada antraks inhalasi, saat spora masuk dan berkembang di paru, akan memacu ekspresi makrofag alveolar dan sel dendrit untuk dibawa menuju sistem limfatik. Infeksi kemudian menyebar melalui duktus limfatikus eferen menuju peredaran darah. Bakteri dapat mencapai limfonodi peribronkial dalam 15 menit setelah inhalasi spora, kemudian terjadi edema paru, akibat terhalangnya aliran limfe pulmonal, yang mengakibatkan *hemorhagik peribronkial*. Proses terjadinya toksemia, septikemia, serta kerusakan di paru, sering terjadi pada hari pertama hingga sepuluh hari pasca paparan. Peradangan hebat terjadi akibat LT, yang memicu pelepasan ROS, TNF- α dan IL-1 (Tunkel *et al.*, 2019).

Menurut Prince (2003), virulensi *B. anthracis* bergantung pada kapsul antifagosit dan 3 komponen toksin berbeda yang saling membantu yaitu *Protective Antigen* (PA), *Lethal Factor* (LF) dan *Edema Factor* (EF). Untuk dapat berfungsi, LF dan EF perlu masuk ke dalam sel dengan bantuan PA (Gambar 2.3). Pada tahap awal intoksikasi sel *host*, PA ini dibutuhkan untuk mengawali masuknya LF dan EF sebagai enzim yang berperan pada mediasi kerusakan sel *host*, awalnya PA adalah protein yang terdiri satu subunit yang akan berikatan dengan reseptor khusus dalam sel, kemudian terbelah menjadi dua bagian oleh aktivitas *protease furin*. Kemudian, bagian PA yang masih berikatan dengan reseptor tadi membentuk *heptamer* (tujuh subunit) yang memungkinkan LF dan EF untuk berikatan, dan selanjutnya dapat masuk ke dalam sel (Paccani *et al.*, 2011).



Gambar 2.3 Mekanisme Aksi Antigen Protektif (Prince, 2003)

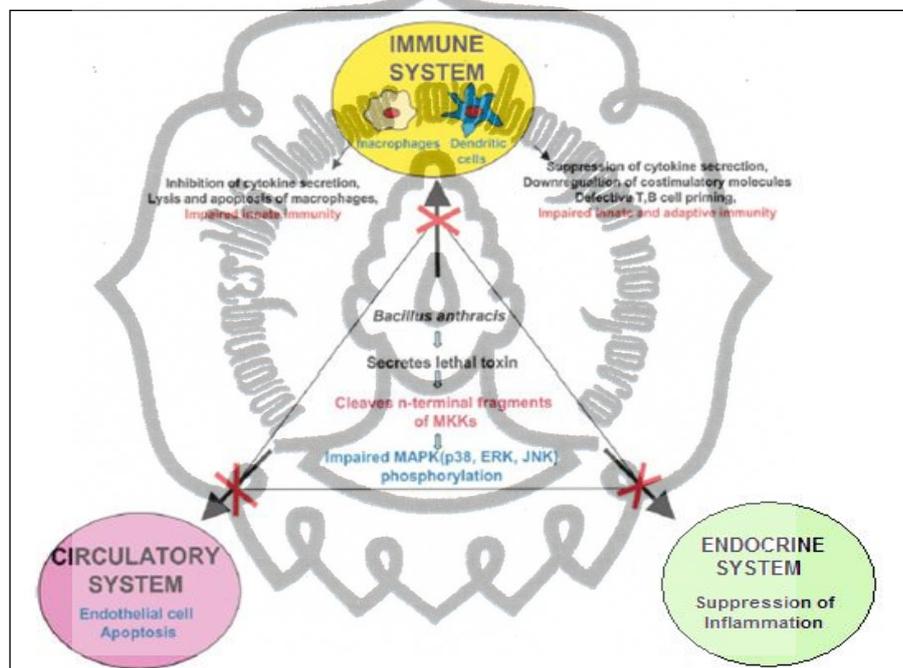
Keterangan : Kuman *B. anthracis* menghasilkan toksin akan masuk ke sel dan menimbulkan manifestasi klinis berupa edema dan nekrosis atau hipoksia. LF = *Lethal Factor*, EF = *Edema Factor*, LT = *Lethal Toxin*, PA = *Protective antigen*, ET = *Edema Toxin*

Lethal Factor adalah komponen yang bekerja sebagai protease yang aktivitasnya bergantung pada logam *zinc* sedangkan EF adalah enzim *adenilat siklase* yang bekerja dalam sintesis molekul cAMP sehingga bila kadarnya meningkat secara tak terkontrol dapat menyebabkan kehilangan cairan tubuh. *Lethal toxin* yaitu *zinc metalloprotease* yang menginaktifkan *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK), sehingga terjadi penghambatan sinyal intraseluler yang mencegah terjadinya fosforilasi berbagai komponen (p38, ERK, JNK) sehingga menyebabkan penghambatan jalur MAPK (Porasuphatana, 2010).

Lethal toxin merangsang pelepasan IL-1 β yang menyebabkan kondisi *hiperinflamatory* pada makrofag, kemudian mengaktifkan jalur oksidatif yang merusak dan pelepasan *reactive oxygen intermediates*, serta produksi sitokin pro-inflamasi, seperti TNF- α yang bertanggung jawab terhadap kejadian syok dan kematian (Dixon *et al.*, 1999). Hal ini diakibatkan oleh efek toksik yang terjadi pada hewan dengan bakteremia kadar yang tinggi (mencapai 10^7 - 10^8

basil per ml darah yang terlihat pada pewarnaan g) dan juga tingginya kadar LT (Chamber, 2003; Dixon *et al.*, 1999).

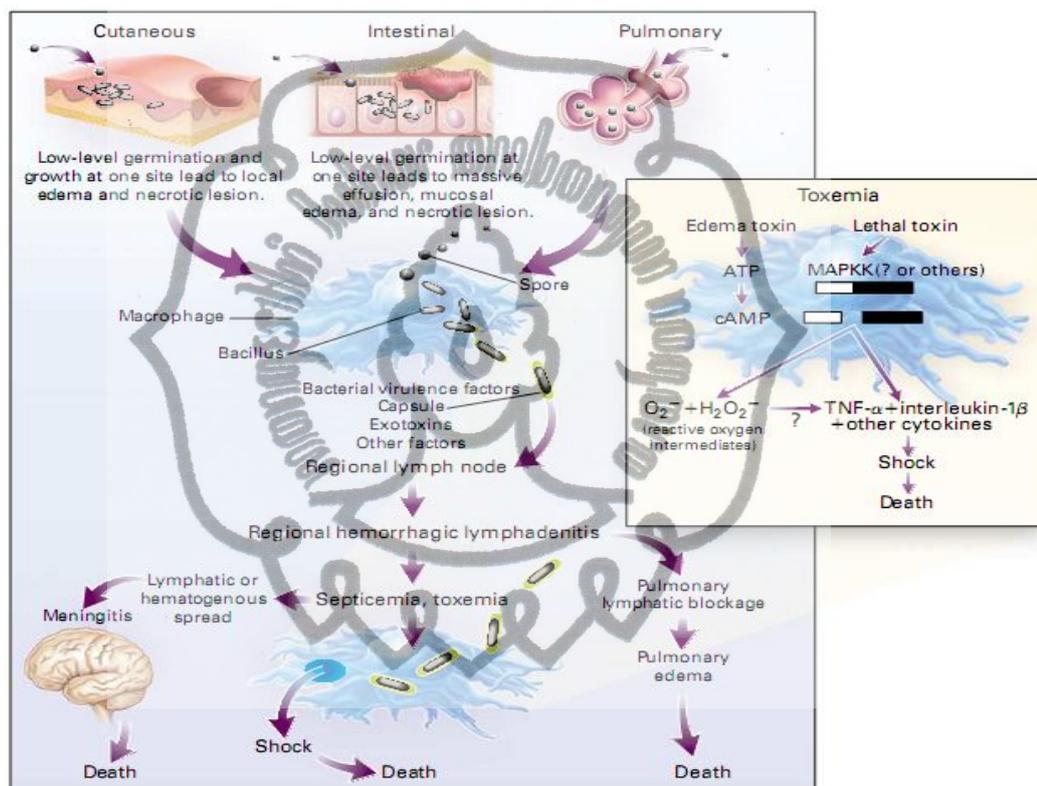
Kapsul *B. anthracis* terdiri dari *poly D-glutamic acid* yang tidak berbahaya bagi dirinya sendiri, yang dihasilkan oleh plasmid pX02, berfungsi untuk melindungi sel dari proses fagositosis dan lisis. *Lethal toxin* berperan penting pada infeksi *B. anthracis*. *Protective antigen* mengikat reseptor seluler dan memfasilitasi LF masuk dalam sitosol (Heninger, 2006).



Gambar 2.4 Perusakan Jalur MAPK oleh Toksin Antraks (Agrawal *et al.*, 2017)
Keterangan : Infeksi *B. anthracis* akan memicu respons *immune*, *circulatory* dan *endocrine system*. ERK: *extracellular signal-regulated kinase* ; MAPK: *mitogen activated protein kinase* JNK: *c-June N-terminal kinase*

Lethal toxin berisi protease yang mengeluarkan hormon peptida dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK). Perusakan jalur MAPK menyebabkan gangguan multisistem pada individu terinfeksi. Aktivitas LT menimbulkan kerusakan yang tersebar luas, bersifat multisistem, termasuk sitotoksitas. Keadaan ini akan memicu munculnya *damage-associated molecular pattern* (DAMP) yang mengarah ke penyebaran reaksi inflamasi dan respons imun adaptif dilepaskan oleh sel-sel yang telah rusak saat terjadi jejas reperfusion iskemia (Agrawal *et al.*, 2017).

Prototype DAMP protein non histon terkait kromatin yang dikenal sebagai *high-mobility group box 1* (HMGB-1) berfungsi sebagai faktor nuklear dan sitokin pro-inflamasi yang dilepaskan sel nekrotik. *Toll-like receptor 2* (TLR2) dan TLR4 merupakan reseptor multi-ligan yang mengikat HMGB-1, diekspresikan oleh sel epitel tubular dibawah pengaruh hipoksia dan stres oksidatif (Wu *et al.*, 2011).



Gambar 2.5 Jalur Infeksi Antraks di Kulit, Intestinal dan Paru (Dixon, 1999)
Keterangan : *Spora B. anthracis* dapat masuk melalui kulit, saluran cerna dan saluran nafas yang dapat berakhir menjadi meningitis atau syok.

Toksin antraks mencegah terjadinya pembekuan darah sehingga setelah individu terinfeksi mati darah mengalir ke tanah melalui lubang-lubang tubuh. Setiap 1 ml darah mengandung 10 sampai 100 juta bakteri. *Lethal Toxin* mempengaruhi endotel pembuluh darah, secara histologis dapat dilihat adanya nekrosis yang menyebabkan kerusakan dan perdarahan. Toksin antraks bekerja langsung pada membran sel endotel, menjadikannya bersifat *permeable* terhadap plasma dan mengakibatkan trombosis intravaskuler dengan manifestasi perdarahan organ dalam dan lubang-lubang tubuh (Dixon, 1999).

Angka kematian antraks kulit adalah kurang dari 20% di sepanjang perjalanan penyakitnya. Bentuk antraks ini terjadi ketika spora *B. anthracis* menembus lapisan dermal, biasanya melalui luka atau abrasi. Edema lokal terlihat jelas setelah 24-48 jam setelah infeksi akibat perkembangan dari spora dan produksi toksin. Sekitar dua hari setelah infeksi, pada pasien biasanya mulai muncul ulkus berbentuk bulat besar, yang kemudian segera diikuti oleh pembentukan eschar hitam yang tidak nyeri (Tunkel *et al.*, 2019).

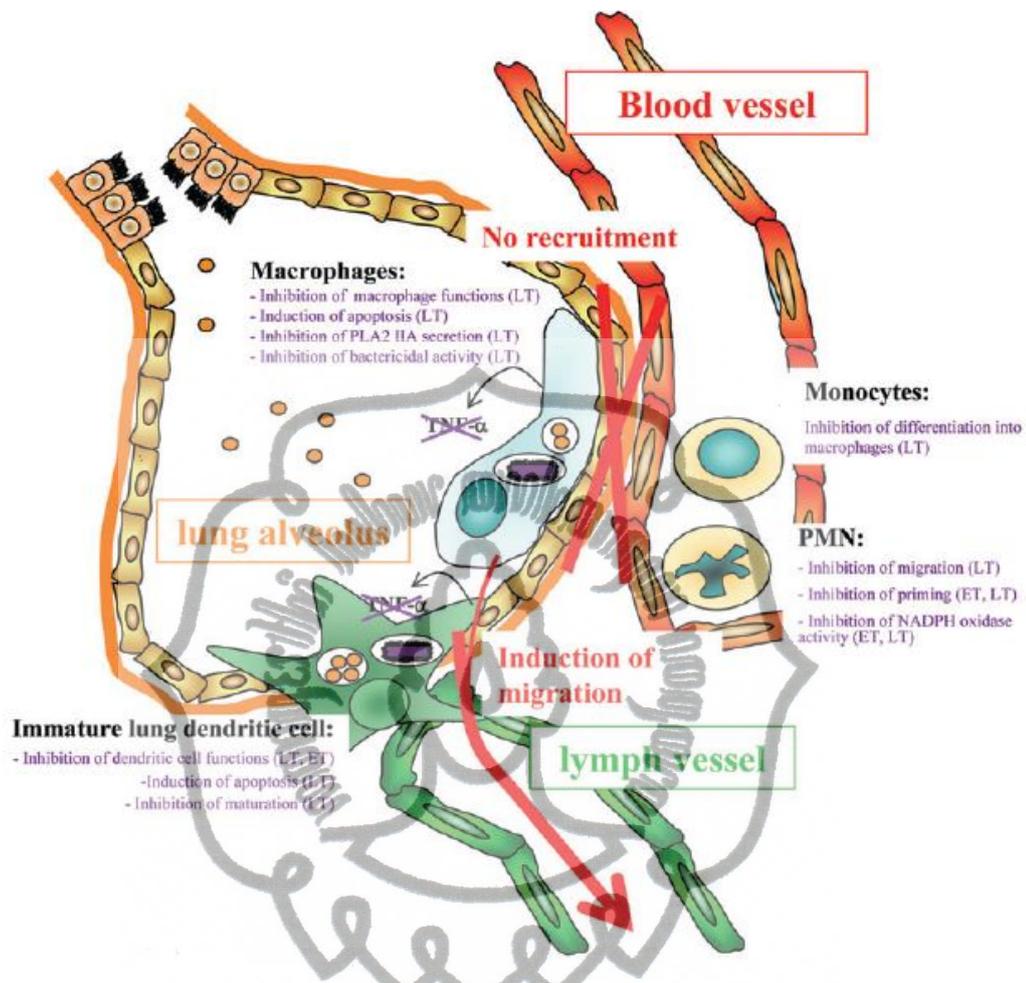
Stres oksidatif meningkatkan produksi sitokin pro-inflamasi yaitu IL-6 dan *C-reactive protein* (CRP) melalui aktivasi transkripsi *nucleus factor- β* (NF κ β). Aktivasinya menyebabkan sintesis IL-1 β , TNF- α , IL-6 dan CRP. Adanya reaksi inflamasi dan ROS dapat mengaktifasi IL-1, IL-6 dan TNF- α , yang memacu pelepasan CRP dan beberapa mediator inflamasi seperti sel endotel, *tissue factor*, *monocyte derived macrophage* dan berbagai molekul adesi sebagai bahan pembentukan plak aterosklerosis. Adanya produksi ROS, akan merusak berbagai sel, antara lain : membran basalis, tubulus proksimal, endotel, sel mesangial dan viseral glomerulus sehingga terbentuk debris. Kerusakan endotel dan membran basal pada glomerulus akan menyebabkan rusaknya sistem filtrasi sehingga terjadi mikroalbuminuria. Makrofag akan teraktifasi dengan banyaknya sel yang rusak, melalui jalur *Toll-Like Reseptor4* (TLR4) (Purwanto, 2012; Tucker *et al.*, 2015).

5. Proses Inflamasi pada Infeksi Antraks.

Pada saat spora masuk ke dalam tubuh, makrofag segera bertindak dengan melakukan proses fagositosis. Pada antraks inhalasi, mukosa atas pada hidung merupakan penyaring pertama, bila dapat lolos, maka akan masuk jaringan limfoid dan mukosa ke mukosa bawah di paru (Glomski *et al.*, 2007), Sel pertama di saluran pernapasan yang kontak dengan spora adalah makrofag alveolar dan sel dendrit, seperti yang ditunjukkan oleh analisis sel pada *lavages bronchoalveolar* (Cleret *et al.*, 2006). Spora dikenali oleh reseptor melalui mekanisme pada MyD88 (Glomski *et al.*, 2007), sedangkan sinyal basil vegetatif melalui TLR2 (Hughes *et al.*, 2005) dan sinyal *anthrolysin O* melalui

TLR4 (Park *et al.*, 2004). *Alveolar macrophage* (AMs) bertindak sebagai 'kuda Troya' selama infeksi (Guidi - Rontani *et al.*, 2002). *Lung dendritic cells* (LDCs) berada di mukosa atau *alveoli* dalam kondisi basal, atau antara dua kompartemen ini, dengan tugas mengambil spora dari *alveoli* yang bermigrasi ke kelenjar getah bening mediastinal (Jakubzick *et al.*, 2006). Spora dapat berkecambah dalam AMs atau LDCs seperti yang ditunjukkan dalam penelitian yang dilakukan secara *in vitro* (Dixon *et al.*, 2000; Ruthel *et al.*, 2004), dan toksin juga dapat disekresikan dari dalam sel-sel ini. (Banks *et al.*, 2005). Peran masing-masing bagian sel ini masih belum jelas, tetapi fagositosis paling efisien dengan LDCs (Cleret *et al.*, 2006), dan beberapa laporan telah menunjukkan aktivitas sporosidal makrofag secara *in vitro*, terhadap spora yang berkecambah (Welkos *et al.*, 2002 ; Bozue *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Ribot *et al.*, 2006). Populasi LDC menjadi perhatian khusus dalam studi *B. anthracis*, karena spora antraks telah terbukti memicu pemrogan ulang ekspresi kemokin oleh sel dendrit manusia karena hilangnya transkripsi dalam reseptor kemokin CCR2, CCR5 dan induksi Transkripsi gen CCR7 reseptor pelacak kelenjar getah bening (Brittingham *et al.*, 2005). Transkripsi gen reseptor kemokin ini dengan jelas menunjukkan bahwa *B. anthracis* dapat memanfaatkan kemampuan fagosit untuk bermigrasi.

Lethal Toxin telah terbukti menghilangkan sekresi sitokin pro-inflamasi oleh makrofag (Bergman *et al.*, 2005; Ribot *et al.*, 2006) dan sel dendrit, pada manusia dan tikus model (Alileche *et al.*, 2005; Tournier *et al.*, 2005 ; Brittingham *et al.*, 2005; Agrawal *et al.*, 2017). Toksin ini juga mengganggu fagosit paru dengan menghambat produksi fosfolipase A2 tipe IIA, produk penting untuk membunuh spora antraks (Gimenez *et al.*, 2004), serta LT telah terbukti menghambat aktivitas bakterisidal dari primata non-manusia AMs (Ribot *et al.*, 2006).



Gambar 2.6 Proses awal infeksi antraks pada paru (Tournier *et al.*, 2006)

Keterangan : Proses fagositosis yang berada di alveolus (yaitu makrofag alveolar dan sel dendritik paru) pada spora yang masuk. Saat berada di dalam fagosom, spora yang berkecambah mengeluarkan racunnya, menghambat pro-inflamasi perekrutan sel dari pembuluh darah dan memicu migrasi LDC melalui kelenjar getah bening.

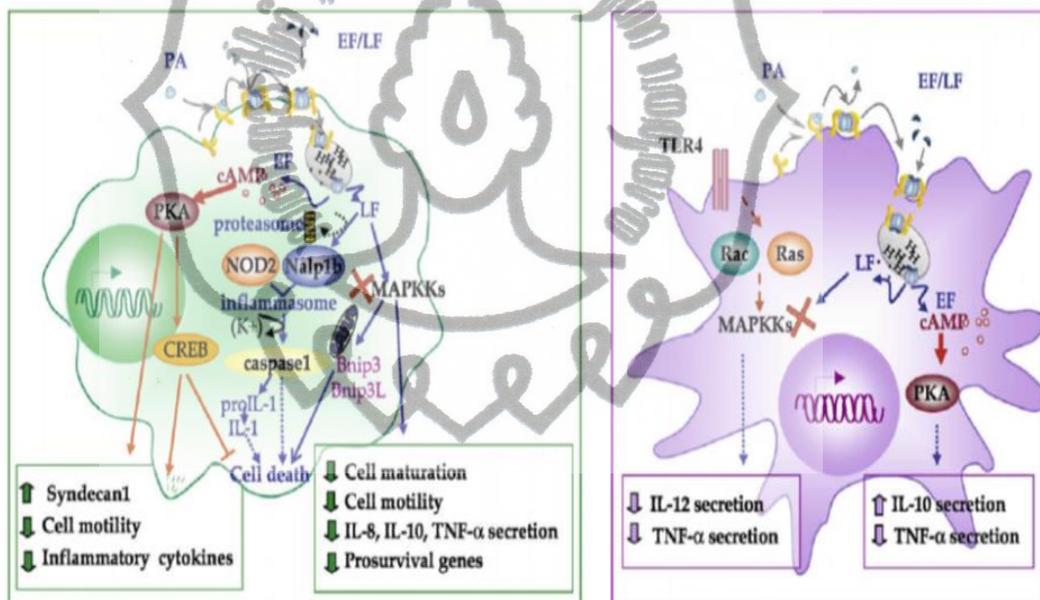
Edema Toxin meningkatkan migrasi makrofag spontan (Kim *et al.*, 2008), baik LT dan ET menghambat kemotaksis makrofag melalui aktivitas enzimatis masing-masing. Fungsi ini kemungkinan menghasilkan penekanan respons migrasi makrofag terhadap kemokin inflamasi diproduksi di lokasi infeksi, sehingga semakin merusak potensi bakterisida kuman antraks (Rossi Paccani *et al.*, 2007). Jadi, LT dan ET dengan jelas menghambat sekresi awal sitokin pro-inflamasi dan aktivasi dan / atau perekrutan sel lain, seperti PMN dan monosit

Salah satu efek paling menonjol dari LT pada makrofag adalah induksi apoptosis, berbeda dengan studi awal menunjukkan bahwa LT menginduksi apoptosis makrofag yang diaktifkan melalui jalur *p38a-dependent* (Park *et al.*, 2002), penelitian yang lebih baru telah memberikan bukti bahwa apoptosis diinduksi melalui jalur *p38a-dependent* dan *independent*. Adanya komponen inflammasome NALP1b sebagai target potensial LF, komponen enzimatis LT, dalam apoptosis makrofag. Lokus NALP1b sangat tinggi polimorfik di antara strain tikus (Boyden and Dietrich, 2006). Pembentukan *inflammasome* melibatkan asosiasi NALP1 dan NOD2 untuk mengaktifkan *caspase-1* (Fink *et al.*, 2008). Studi terbaru telah mengungkapkan peran untuk *proteasome*, *efflux kalium* dan aktivasi *caspase-1* menyebabkan kematian sel akibat LF (Wickliffe *et al.*, 2008 ; Fink *et al.*, 2008). *Lethal toxin* telah terbukti mencegah kemotaksis PMN, melalui mekanisme independen MKK-1 yang melibatkan penghambatan polimerisasi aktin (During *et al.*, 2005). Pada infeksi inhalasi, LT memblokir perekrutan PMN pada dua tingkat penting: dengan mematikan produksi kemokin oleh DC (Brittingham *et al.*, 2005), dan dengan memblokir kemotaksis sel yang merespons (During *et al.*, 2005). Monosit adalah satu-satunya sel yang tersisa di aliran darah yang berpotensi dimobilisasi untuk melawan proliferasi *B. anthracis* di alveoli. Namun, LT menghambat diferensiasi monosit menjadi makrofag, sehingga mencegah penghancuran patogen (Kassam *et al.*, 2005). Dalam sebuah penelitian baru-baru ini, makrofag ditemukan penting untuk kelangsungan hidup inang pada model infeksi tikus, sedangkan PMN tampaknya memainkan peran sekunder, tetapi peran penting dalam respons imun yang berfungsi penuh terhadap spora (Cote *et al.*, 2006).

Data ini dengan jelas menunjukkan bahwa LT dan ET memainkan peran penting dalam menghambat fagosit yang ditemukan di *alveoli* (AM dan LDC). Selain itu, spora yang berkecambah tampaknya menggunakan AM dan / atau LDC, sebagai 'kuda Troya' untuk membawanya melintasi ruang alveolo-kapiler, memungkinkan mereka untuk bermigrasi ke kelenjar getah bening, dan mencegah perekrutan monosit dan PMN (Tournier *et al.*, 2006).

Beberapa protein mitokondria, serta *inhibitor apoptosis protein* (IAP), telah terlibat dalam kontrol kematian sel yang diinduksi LF (Wickliffe *et al.*, 2008). Jalur apoptosis lain, yang melibatkan aktivasi PKR hilir dari TLR4 oleh *B. anthracis* juga telah dijelaskan (Hsu *et al.*, 2004).

Edema toxin menyelamatkan sel dari apoptosis yang diinduksi TLR4 melalui aktivasi CREB dan *protein kinase A* (PKA) (Park *et al.*, 2005). Di samping efeknya pada pembelahan MEK, LF juga bertindak di persimpangan mitokondria, *proteasome* dan yang lebih penting pada peradangan jalur. Belum jelas apakah LT bertindak melalui interaksi fisik langsung dengan komponen jalur ini atau melalui konsekuensi tidak langsung dari pembelahan MKK.



Gambar 2.7 Respons inflamasi pada Infeksi Antraks (Cote *et al.*, 2006)

Keterangan : Respons makrofag dan sel dendrit pada infeksi antraks yang menyebabkan proses inflamasi hingga kematian sel.

Salah satu efek LT dan ET yang paling kuat pada fagosit adalah gangguan fungsi sel yang bertanggung jawab dalam mengambil spora dan basil. Peran yang tepat dari setiap sel yang terlibat dalam pertahanan terhadap infeksi antraks masih harus diuraikan. Makrofag ditemukan sangat penting untuk menjaga kelangsungan hidup dalam model infeksi tikus, sedangkan PMN tampaknya memainkan peran sekunder, tetapi perlu dalam respons imun yang berfungsi penuh terhadap spora (Cote *et al.*, 2006).

Mitogen activated protein kinase (MAPKs) adalah regulator penting untuk ekspresi gen sitokin. Tiga jalur MAPK utama, *c-Jun-NH2-terminal kinase* (JNK), *ekstraseluler signal-regulated kinase* (ERK) dan p38 MAPK, penting untuk induksi berbagai mediator sitokin dari respons imun bawaan. Peran aktivasi MAPK dalam induksi sitokin oleh spora *B. anthracis* dalam sel turunan monosit belum diteliti secara definitif, meskipun telah terbukti berhubungan dengan induksi komponen pensinyalan ERK1 / 2, p38, dan pada tingkat yang lebih rendah, *Stress Activated Protein Kinase* (SAPK) / JNK. Selain itu, LT yang dihasilkan oleh bakteri bentuk vegetatif yang menghambat pensinyalan MAPK melalui pembelahan MAPK kinase (Friebe, 2016).

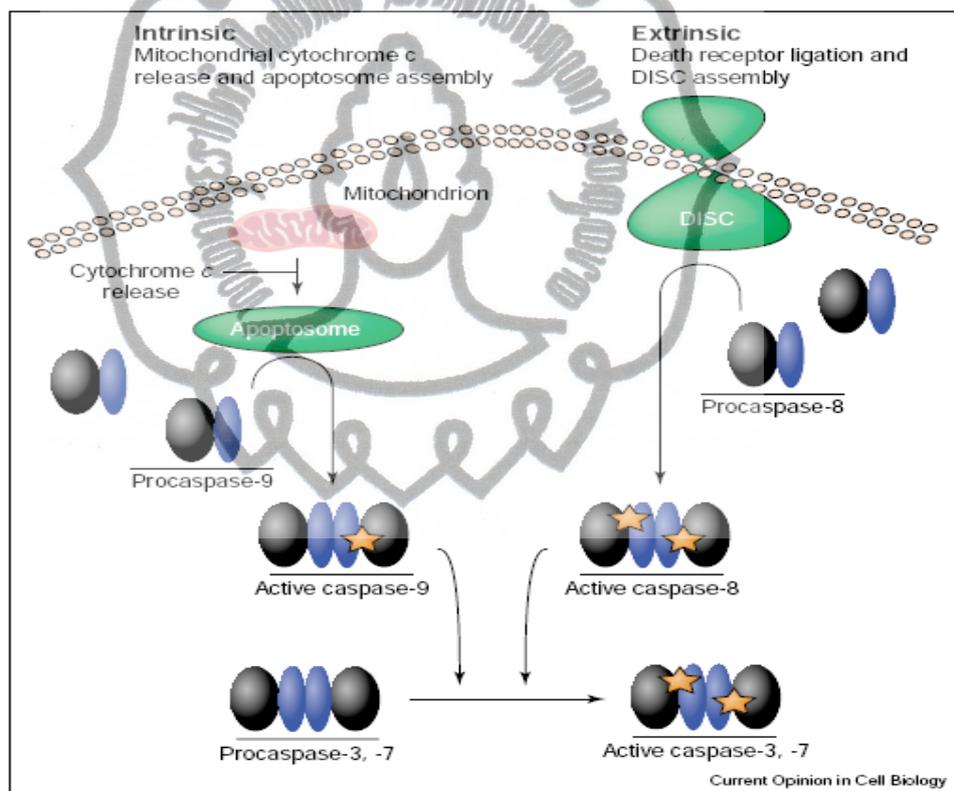
a. Peran TNF- α pada Infeksi Antraks

Makrofag berperan penting pada awal patogenesis antraks, terutama antraks inhalasi, spora akan difagositosis oleh makrofag alveolar, dan berkembang biak di dalam makrofag, yang akhirnya menyebabkan lisis pada makrofag. Spora kemudian berubah menjadi bentuk vegetatif yang berkembang biak di dalam kelenjar getah bening mediastinum dan masuk ke aliran darah. Pada saat makrofag terinfeksi dengan spora, TNF- α dilepaskan kurang lebih 5 jam setelah infeksi dan jumlah terus meningkat hingga 7,5 jam pasca infeksi. Strain pXO1 + menyebabkan pelepasan lebih awal dari level TNF- α yang lebih tinggi daripada strain pXO1- yang terjadi. Tidak ada sitokin lain yang diinduksi pada infeksi makrofag oleh *B. anthracis* spora saja dengan pengecualian IL-12, yang meningkat secara signifikan antara 5 dan 7,5 jam pasca infeksi dengan spora dari strain 7702 (Pickering, 2004). *Lethal toxin* dianggap bertanggung jawab atas lisis makrofag, yang disertai dengan pelepasan sitokin TNF- α dan IL-1 β dan sitokin ini yang bertanggung jawab terhadap syok septik dan kematian antraks sistemik (Wu *et al.*, 2013).

b. Peran Caspase-3 pada Infeksi Antraks

Berdasarkan fungsi dalam proses apoptosis, *caspase* dibagi menjadi dua kelompok, yaitu *inisiator* dan *eksekutor*. Kelompok pertama adalah *caspase-2*, 8, 9, 10 dan 11 yang dapat mengaktifkan kelompok kedua,

sebagai *eksekutor*, yaitu *caspase-3*, 6 dan 7. *Caspase* ini dapat secara langsung mendegradasi beberapa substrat termasuk protein struktural dan regulator dalam inti sel, sitoplasma, dan sitoskeleton. *Caspase-1*, 4 dan 5 memiliki struktur yang mirip dan sebagian besar terlibat dalam pematangan sitokin pro-inflamasi. Namun, bukti eksperimental secara signifikan menunjukkan peran yang berlebihan aksesori *caspase* ini dalam apoptosis. Kaskade pensinyalan proteolitik *caspase* saling berhubungan, sehingga sinyal apoptosis diperkuat secara signifikan (Ghavami *et al.*, 2009; Walters *et al.*, 2009).



Gambar 2.8 Skema Aktivasi *caspase-3* (Boatright *et al.*, 2003)

Keterangan : Jalur intrinsik dan ekstrinsik yang memicu *pro caspase-3* menjadi *caspase-3* dari aktivasi *caspase-8* dan *caspase-9*

Keterlibatan jalur apoptosis dapat secara ekstrinsik maupun intrinsik. Pada jalur ekstrinsik, DISC adalah tempat aktivasi untuk *caspase-8*. Stimulasi jalur intrinsik mengarah pada aktivasi *caspase-9* di *apoptosome*. Setelah aktivasi, *caspase inisiator* kemudian membelah dan mengaktifkan *caspases-3* dan *caspase-7* (Boatright *et al.*, 2003).

Caspase-3 akan diaktivasi baik melalui jalur ekstrinsik dan intrinsik, sebagai *caspase eksekutor*, *caspase-3 zymogen* tidak memiliki aktivitas hingga pembelahan yang terjadi pada *caspase inisiator* setelah peristiwa pensinyalan apoptosis, yang selanjutnya mengaktifkan *caspase inisiator*, masuk ke dalam sel target untuk apoptosis oleh sel T. Aktivasi ekstrinsik ini kemudian memicu kaskade apoptosis, di mana peran *caspase-3* menjadi dominan. Dalam aktivasi intrinsik, *sitokrom c* dari mitokondria akan memacu *caspase-9*, *Activated apoptosis factor 1* (Apaf-1) dan ATP untuk memproses *caspase-3* (Boatright *et al.*, 2003).

Lethal toxin juga menginisiasi aktivasi dari berbagai *caspase*, *inisiator caspase-3* dan *efektor caspase-8* yang akan memicu proses terjadinya apoptosis. *Caspase-3* dan *caspase-8* melalui mekanisme *Fas/Fasligand* akan memicu terjadinya kerusakan mitokondria dan akhirnya terjadi kematian sel (Popov *et al.*, 2002).

c. Peran *E-selectin* pada Infeksi Antraks

Selectin ini adalah lektin tipe C yang diekspresikan pada permukaan leukosit, trombosit dan sel endotel yang teraktivasi. *Selectin* memacu penarikan leukosit dan trombosit pada endotel vaskular, sehingga limfosit menuju ke limfoid sekunder dan menarik leukosit ke lokasi peradangan (McEver, 2002; Cummings and McEver, 2009). *Selectin* terbagi menjadi tiga, yaitu : *L-selectin*, yang diekspresikan pada semua leukosit kecuali sel-T yang diaktifkan, sedangkan *E-selectin*, dihasilkan oleh sel endotel yang diaktivasi oleh sitokin serta *P-selectin*, diekspresikan oleh trombosit dan sel endotel yang diaktivasi (Alberts *et al.*, 2002). *E-selectin* diekspresikan dalam sel endotel yang distimulasi oleh sitokin yang mengenali sejumlah glikoprotein pada leukosit (Ivetic and Ridley, 2004; Cummings and McEver, 2009). Infeksi antraks akan menghasilkan toksin, yaitu *lethal toxin*, yang merupakan faktor virulensi utama dari *B. anthracis*, yang dapat meningkatkan *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) pada sel endotel manusia dan menyebabkan vaskulitis (Warfel *et al.*, 2008).

Lapisan tunggal yang melapisi seluruh sistem vaskuler adalah sel endotel, yang letaknya di bagian intima pembuluh darah dan melekat pada membran basalis, yang menghasilkan *Nitric Oxyde* (NO), yang berperan dalam mempertahankan tonus pembuluh darah, terutama pada proses relaksasi pembuluh darah. *Nitric Oxyde* adalah hasil perubahan dari *L-Arginine* menjadi sitrulin yang dikatalisis oleh enzim *Nitric Oxyde Syntase* (NOS) (Baraas, 2006). Disfungsi endotel adalah perubahan fungsional pada sel endotel yang terjadi akibat respons terhadap adanya rangsangan dari lingkungan (Kumar *et.al*, 2007). Hal ini akan menurunkan daya vasodilatasi darah, karena terjadi penurunan produksi dan bioaktivitas faktor vasodilatasi lokal, khususnya *Nitrogen Monoksida*, yang disebut juga *Endothelium Derivate Relaxing Factor* (EDRF) (Lawrence, 2004). Disfungsi endotel dapat dipicu oleh dua hal utama yaitu stres fisik dan zat-zat iritan. Disfungsi endotel juga dapat terjadi akibat paparan zat-zat toksik. Sebagai contoh merokok, level lipid yang abnormal atau hiperkolesterolemiadan diabetes, yang merupakan faktor risiko aterosklerosis, yang dapat menginduksi terjadinya disfungsi endotel (Libby, 2005).

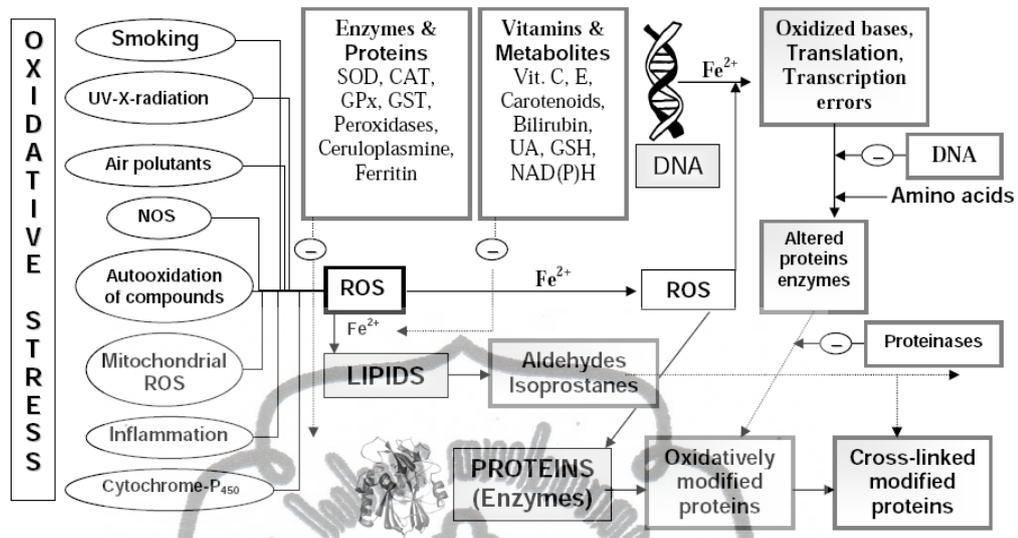
d. Peran *Malondialdehyde* pada Infeksi Antraks

Adanya ketidakseimbangan antara oksidan dan antioksidan disebut stress oksidatif. Oksidan merupakan senyawa reaktif yang dapat memindahkan elektron dari molekul lain serta menghasilkan oksidasi pada molekul tersebut (Ayala *et al.*, 2014). Hal ini diyakini menyebabkan kerusakan seluler dan molekuler, yang selanjutnya menyebabkan kerusakan jaringan. Adanya stress oksidatif menyebabkan kerusakan jaringan dengan berbagai mekanisme, yang meliputi kerusakan DNA, peroksidasi lipid, kerusakan protein termasuk asam hialuronat gingiva dan proteoglikan dan oksidasi enzim penting, misalnya enzim *antiprotease*, *α -antitripsin* (Cherian *et al.*, 2019).

Malondialdehyde adalah suatu senyawa *dialdehyde* yang merupakan produk akhir dari proses peroksidasi lipid dalam tubuh. Adanya peningkatan MDA dapat menunjukkan adanya stress oksidatif dan ketidakseimbangan oksidatif di awal proses terjadinya penyakit (Durackova, 2009), sehingga MDA dapat merupakan penanda peroksidasi lipid yang bersifat stabil dan akurat dalam menilai ROS (Muliando, 2020).

Pada tubuh manusia terdapat keseimbangan antara oksidan dan antioksidan, baik enzimatik maupun non-enzimatik, yang bekerja secara sinérgis. Antioksidan dapat melindungi sel tubuh terhadap kerusakan oksidatif serta mencegah produk oksidatif yang berlebihan. Pada sistem pertahanan enzimatik terdapat beberapa antioksidan internal, yaitu *superoxide dismutase* (SOD), *glutathione peroxidase* (GPx), *catalase* (CAT), sedangkan pada sel dan plasma terdapat *free radical scavengers non-enzimatik*, yaitu *ascorbat acid*, *alphatocopherol* (vitamin E) dan kelompok sulfhidril (Durackova, 2009).

Antioksidan adalah molekul yang memiliki kemampuan untuk mengimbangi efek oksidan sebelum menyerang sel. Ada sistem antioksidan yang sangat kompleks dalam sel manusia, bekerja sama dalam lainnya untuk melindungi tubuh dari kerusakan akibat radikal bebas (Muliando, 2020). Antioksidan dapat bersifat endogen atau diperoleh secara eksogen, sebagai bagian dari diet atau melalui suplemen makanan. Antioksidan bisa juga dikonsumsi sebagai senyawa yang tidak menetralkan bebas radikal, melainkan meningkatkan aktivitas endogen (Durackova, 2009). Penilaian dengan kadar MDA serum, dapat merupakan analisis adanya radikal bebas secara tidak langsung dan cukup mudah. Sangat sulit bila menentukan radikal bebas secara langsung, karena senyawa ini sangat tidak stabil dan cenderung merebut elektron senyawa lain agar lebih stabil dan pengukurannya sangat sulit, karena reaksi yang berlangsung sangat cepat (Durackova, 2009).



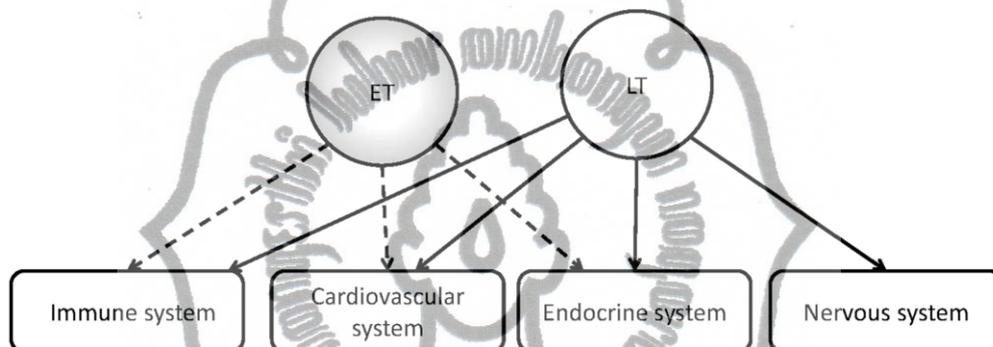
Gambar 2.9 Faktor-Faktor Penyebab Stress Oksidatif (Durackova, 2009)

Keterangan : Faktor-faktor yang dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif.
 ROS = *reactive oxygen species*

Malondialdehyde dapat ditemukan pada cairan dalam tubuh, yaitu plasma darah, cairan sendi, urin, cairan getah bening, cairan bronkoalveolar, cairan empedu, cairan perikardial, seminal dan amnion. Sampel yang paling sering digunakan dari plasma dan urin, karena mudah didapat dan tidak invasif. Sampai saat ini MDA merupakan penanda yang sering digunakan dalam penelitian, karena dapat sebagai penanda peroksidasi lipid *in vivo*, baik pada manusia maupun pada binatang, yang signifikan akurat dan stabil dibandingkan senyawa lainnya. Alasan penggunaan *Malondialdehyde* sebagai biomarker pada stres oksidatif, karena: (1) Bersifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, (2) Kadarnya dapat diukur secara akurat (3) Pembentukan MDA meningkat sesuai stres oksidatif, (4) Jumlahnya dapat dideteksi pada semua jaringan tubuh dan cairan biologis, (5) Ini adalah produk spesifik dari peroksidasi lemak, (6) Tidak dipengaruhi oleh variasi diurnal dan kandungan lemak diet. Pada infeksi antraks, kadar MDA, meningkat secara signifikan (Karadas, 2016).

6. *Multi Organ Dysfunctions (MODs)*

Manifestasi klinis infeksi antraks pada beberapa sistem organ antara lain system imun, kardiovaskuler, endokrin dan syaraf. Pada sistem imun sangat berhubungan dengan aktivitas sitokin pro-inflamasi dan kejadian apoptosis dan nekrosis. Pada sistem kardiovaskular, akan menyebabkan sianosis serta penurunan denyut nadi dan tekanan darah pada tahap akhir infeksi. (Cui *et al.*, 2004; Sweeney *et al.*, 2010). Hal ini membuktikan adanya pengaruh toksin terhadap pembuluh darah dan jantung. (Lowe, 2012)



Gambar 2.10 Efek Toksin Antraks pada Beberapa Organ (Lowe, 2012)

Keterangan : Toksin pada antraks menyebabkan pengaruh pada sistem imun, kardiovaskuler, endokrin dan syaraf. ET = Edema Toxin, LT = Lethal Toxin.

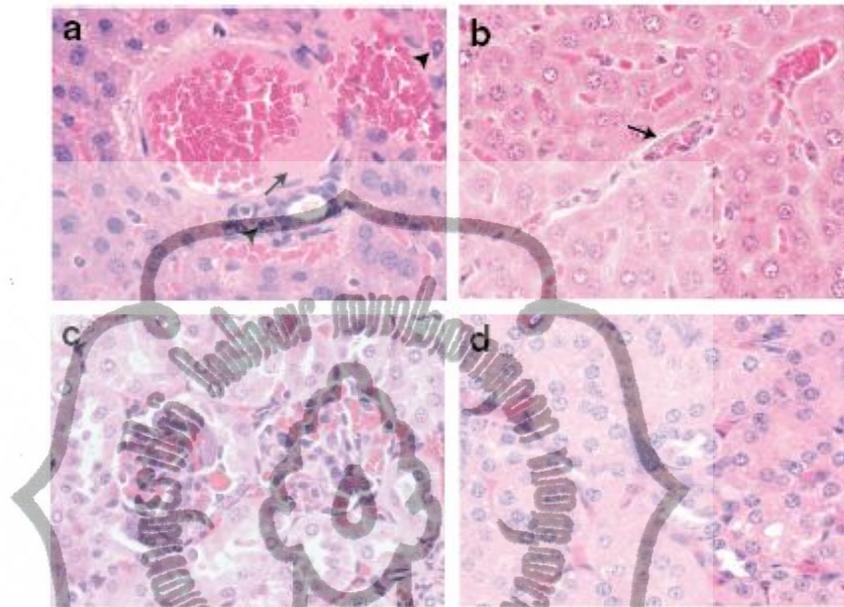
Pada suatu studi yang membandingkan dengan kontrol, ET yang diberikan sendiri dapat menurunkan HR dan CVP, serta meningkatkan kadar hemoglobin dan kadar natrium serum. Efek pemberian LT sendiri atau dengan ET akan meningkatkan kadar kreatinin serum, sedangkan pemberian LT sendiri atau dengan ET akan meningkatkan AST, ALT dan tingkat laktat dan menurunkan pH. Pemberian LT sendiri atau dengan ET tidak secara signifikan menyebabkan perubahan pada sel paru (Sweeney *et al.*, 2010).

Infeksi antraks yang berlanjut menjadi sepsis akan menyebabkan kerusakan pembuluh darah dan syok pada tahap terminal, yang merupakan kerusakan sistem kardiovaskular. Studi pada tikus membuktikan adanya kerusakan jaringan tubuh yang menyebabkan hipoksia (Moayeri *et al.*, 2003).

a. **Gambaran Infeksi Antraks di Hati dan Ginjal**

Adanya infeksi antraks, pada hati ditandai dengan *congesti* di dalam pembuluh portal hepatic, sinus dan vena sentral (Gambar 2.11 a). Gambaran

kecil basil secara fokal ada dalam sinus, sel *Kupffer*, parenkim hati dan vena portal (Gambar 2.11 b). Ada juga yang ringan infiltrasi *neutrofil periportal*, *sinusoidal* dan *sentrilobular*.



Gambar 2.11 Histopatologi jaringan hati dan ginjal (Doung *et al.*, 2006)

Keterangan : (a) *Hepatic portal triad* berisi vena portal yang tersumbat dengan deposit fibrinosa (panah), menunjukkan kerusakan pembuluh darah. Parenkim hati yang berdekatan menunjukkan *congesti vaskular* dan infiltrasi *neutrofil* yang tersebar (kepala panah). (b) Bagian hati yang menunjukkan basil dalam sinusoid (panah). (c) Glomerulus ginjal diisi dengan basil dan minimal berhubungan respons inflamasi. (d) Bagian korteks ginjal menunjukkan tali pusat dari basil dalam interstitium dan tidak adanya asosiasi peradangan. HE, perbesaran asli 400x.

Efek infeksi antraks pada ginjal, menyebabkan banyaknya bakteri dan area perdarahan yang terjadi di dalam *glomeruli* dan jaringan *interstitial* (Gambar 2.11 c, d). Respons inflamasi ringan yang menyertai terutama terdiri dari *neutrofil* yang tersebar. Lapisan bakteri sering menutupi permukaan kapsul ginjal, hal ini menunjukkan penyebarannya di sepanjang bidang jaringan di *retroperitoneum*. Pada saluran gastrointestinal tidak didapatkan adanya patologi di dinding usus, meskipun bakteri kadang-kadang diamati pada permukaan *serosal* dan *Peyeri* (Doung *et al.*, 2006).

b. Gambaran Infeksi Antraks di Paru

Secara makroskopis, paru dari hewan yang terinfeksi tampak berwarna kemerahan kontras dengan paru normal yang berwarna merah muda kecokelatan. Area yang gelap, menunjukkan perdarahan di paru. Secara mikroskopis, sebagian besar paru terjadi pneumonia sekunder. Pada area ini, baik jaringan *interstitial* dan *alveoli* mengembang dengan kongesti kapiler, edema, perdarahan dan infiltrat *neutrofil* dan makrofag (Gambar a, b). Dengan *orcein stain* (noda untuk kolagen dan elastin), garis besar *alveoli* menjadi jelas (Gambar c). Noda menyoroti ekspansi dari jaringan interstitial dan infiltrasi basil dan sel inflamasi melalui dinding *alveolar* yang rusak (Doung *et al.*, 2006).



Gambar 2.12 Histopatologi Jaringan Paru (Doung *et al.*, 2006)

Keterangan : (a) Bagian jaringan paru yang tampak sebagai pneumonia sekunder. Septum alveolar dan pleura viseral diperluas dengan *neutrofil*, makrofag dan perdarahan. Timus apoptosis yang berdekatan terlihat di kanan bawah. (b) Pembesaran yang lebih tinggi, tampak rantai basil terlihat di jaringan paru interstitial. (c) Noda orcein menandai membran basal alveolar (struktur linier coklat), menunjukkan perluasan dari jaringan interstitial dan memperjelas kerusakan dan kerusakan dari beberapa *alveoli* oleh infiltrat inflamasi. Bakteri adalah terbukti sebagai struktur linier biru.

7. Propolis

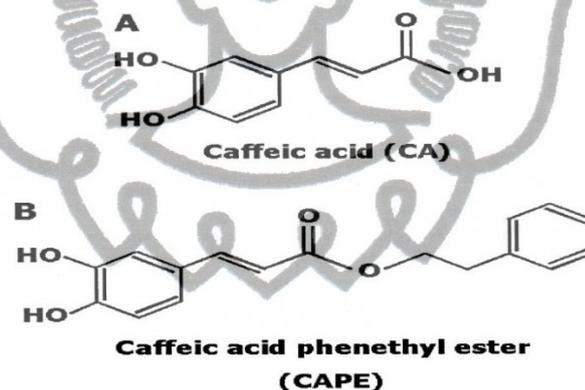
Lebah madu dapat menghasilkan berbagai produk yang bermanfaat bagi manusia, antara lain *royal jelly*, propolis, madu dan *bee pollen*. Madu adalah cairan manis yang diproses oleh lebah madu, dengan kandungan nutrisi yang tinggi, dengan banyak manfaat, antara lain sebagai dalam hal menyembuhkan luka dan penyakit usus. *Royal jelly* adalah zat seperti jelly putih dengan konsistensi kental, yang merupakan produk sekresi kelenjar

hipofaring dan mandibula dari lebah pekerja yang hanya dikonsumsi oleh lebah ratu. *Royal jelly* ini juga diberikan ke larva lebah madu setelah menetas, yang merupakan makanan khusus bagi larva muda pada 2-3 hari pertama, dengan kandungan utamanya adalah *royalactin*, yaitu senyawa utama yang berperan penting dalam perubahan morfologis larva menjadi lebah ratu. Makanan super ini yang berperan pada umur panjang ratu lebah dibandingkan dengan lebah lainnya (Kocot *et al.*, 2018). Asam fenolat dan *flavonoid* merupakan kandungan alami pada propolis, efek biologisnya antara lain efek dalam stres oksidatif, yang mendasari banyak penyakit, seperti kanker, diabetes, dan aterosklerosis (Kurek *et al.*, 2013). Pengaruh faktor biologi, zona geografi, lingkungan, musim serta jenis larutan ekstraksi dapat mempengaruhi kualitas maupun jumlah produksi propolis (Kocot *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2014).

Propolis dikenal juga sebagai *bee glue*, yang merupakan bahasa Yunani yaitu *pro* berarti pertahanan dan *polis* berarti komunitas atau sarang lebah. Fungsi propolis antara lain, sebagai penutup lubang dan retakan dalam rekonstruksi sarang lebah, menghaluskan permukaan bagian dalam sarang lebah, mempertahankan suhu internal sarang (35°C), mencegah pelapukan dan invasi oleh predator. Propolis ini akan menjadi lunak dan lengket saat dipanaskan, serta memiliki bau yang khas (Pasupuleti, 2017).

Unsur propolis terdiri dari resin, lilin dan senyawa volatil. Lilin berasal dari lebah, tanaman menghasilkan resin dan senyawa volatil. Kualitas dari propolis sangat ditentukan oleh asal tanaman tersebut. Resin banyak ditemukan dalam ekstrak alkohol yang sering digunakan sebagai obat alternatif atau makanan pelengkap (Salatino *et al.*, 2005). Senyawa yang terkandung di dalam propolis, adalah resin yang paling tinggi, yaitu 50%, lilin sebanyak 30%, minyak esensial 10%, serbuk sari 5% dan senyawa organik lainnya 5% dengan karbohidrat maksimal g/100 g, protein maksimal 1 g/100 g dan lemak maksimal 1g/100g (Gomez-Caravaca *et al.*, 2006; Farooqui, 2010). Secara garis besar propolis dibagi dalam tiga kelompok yaitu (i) *flavonoid* (ii) turunan *cinnamic acid* dan (iii) *terpenoid* (Khalil, 2006; Adewumi and Ogunjinmi, 2011). Senyawa-senyawa ini berperan penting dalam aktivitas biologis

propolis, yaitu sebagai anti-inflamasi, antimikrobal, antiparasit, imunomodulator, antioksidan, antiprotozoa, antiproliferatif dan antifungal (Lotfy, 2006 ; El-Bassuony *and* Abouzid, 2010; Farooqui, 2010). *Caffeic Acid Phenethyl Ester* mempunyai efek antioksidan fenolik, anti-inflamasi, antiviral dan antitumor (Ulasli *et al.*, 2013), serta dapat menghambat aktivasi NF κ B yang poten dan spesifik (Fitzpatrick *et al.*, 2001) serta dapat menurunkan produksi ROS pada *neutrofil* manusia pada *xanthine oxidase* dengan konsentrasi 10 mol/L (Irmak *et al.*, 2003). Zat aktif lain dari propolis adalah *quersetin*, yang berefek dapat mengurangi produksi *nitric oxide* (NO) oleh lipopolisakarida, ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), dan pelepasan IL-6 dan TNF- α . *Quersetin* dapat menghambat aktivasi MAPK dan NF κ B, suatu kompleks faktor transkripsi berperan pada ekspresi gen-gen pro-inflamasi (Liu *et al.*, 2018).



Gambar 2.13 Struktur CAPE (Liu *et al.*, 2018)
Rantai CAPE : *Caffeic Acid Phenethyl Ester*.

Penelitian Sarsono, *et al.* (2012) menyatakan kandungan zat aktif yang terdapat dalam EEP Gunung Lawu, yaitu CAPE sebesar $30,24 \pm 3,53 \times 10^{-6}$ g dan *quersetin* sebesar $4,42 \pm 0,50 \times 10^{-6}$ g (Sarsono *et al.*, 2012). Efek anti-inflamasi ditunjukkan pada penelitian Diding *et al.* (2013), yaitu efek propolis Gunung Lawu dapat menurunkan kadar HMGB-1 pada mencit model infertilitas jantan dan efek antioksidan dengan dosis 200 mg/kgBB/hari yang diberikan selama 30 hari, dapat menurunkan kadar MDA dan memperbaiki luka kaki diabetik pada mencit Balb/C (Prasetyo *et al.*, 2013). Kandungan

CAPE pada propolis di wilayah ini lebih tinggi dibandingkan dengan daerah lain, yaitu $30,24 \pm 3,53 \times 10^{-6}$ g, sedangkan propolis di Sragen, yaitu $12,40 \pm 0,77 \times 10^{-6}$ g dan Wonogiri $17,00 \pm 1,84 \times 10^{-6}$ g (Prasetyo *et al.*, 2013).

Propolis ini tidak dapat langsung digunakan, namun harus dengan proses pemurnian melalui ekstraksi menggunakan pelarut (Pietta *et al.*, 2002). Cunha dalam Sforcin (2011) menyatakan bahwa ekstraksi dengan menggunakan pelarut yang berbeda akan menghasilkan komponen yang berbeda serta mempengaruhi aktivitasnya (Sforcin, 2011). Ekstrak propolis dapat menggunakan air dan etanol pada berbagai konsentrasi sebagai pelarut. *Quersetin*, *isosakuranetin* dan *kaempferol* sering menggunakan etanol 60% dalam proses ekstraksi dari propolis, sedangkan etanol 70% umumnya digunakan untuk mengekstrak pinocembrin dan sakuranetin. Etanol 80% digunakan untuk mengekstrak *kaempferide*, *acacetin*, dan *isorhamnetin*. Propolis yang diekstrak dengan etanol 70 sampai 80% mempunyai aktivitas antioksidan yang paling baik, sedangkan dengan pelarut etanol 60 sampai 80% dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme serta etanol 80% dapat menghambat aktivitas enzim *hyaluronidase*. Konsentrasi tertinggi senyawa fenolik diperoleh dengan menggunakan pelarut etanol dan konsentrasi propolis mentah yang lebih tinggi. Etanol merupakan pelarut yang sering, namun memiliki beberapa kelemahan, yaitu rasanya kurang enak, memiliki bau yang kurang sedap serta konsentrasi etanol yang masih tinggi (Cottica *et al.*, 2011).

Ekstraksi adalah proses memindahkan satu atau lebih senyawa tertentu dari lokasi aslinya ke lokasi yang terpisah secara fisik, baik berupa zat padat, cair atau gas menjadi pelarut yang berbeda, sedangkan isolasi, yaitu teknik pemisahan di mana kita dapat memperoleh senyawa yang dimurnikan, sehingga disebut juga pemurnian. Pada teknik ini, semua zat asing atau yang terkontaminasi dapat dihilangkan, untuk mengisolasi senyawa yang diinginkan. Untuk mendapatkan senyawa yang sangat murni, dapat dilakukan serangkaian ekstraksi. Jadi perbedaan antara ekstraksi dan isolasi adalah pada ekstraksi, senyawa dapat dipisahkan dari campuran sedangkan pada isolasi, dapat memurnikan senyawa yang diekstraksi.

Dosis pemberian propolis dibedakan berdasarkan penggunaannya, yaitu dalam kondisi jangka pendek atau panjang, dengan mempertimbangkan data berikut :

- a. Asupan polifenol total rata-rata pada manusia, yang diperkirakan antara 600 mg hingga 1800 mg/hari.
- b. Perkiraan rata-rata asupan harian propolis, yang berkisar 0,5-1,0 g.
- c. Konsentrasi polifenol yang terjadi dalam sampel propolis yang diuji (7,21 mg).

Polifenol harian manusia dari propolis berkisar 3,61 hingga 7,21 mg, setara 0,2% -1,2% dari total asupan polifenol yang berasal dari semua makanan dan minuman diet lainnya (Zamora-Ros *et al.*, 2016). Dosis propolis untuk penggunaan pada hewan dihitung menggunakan dosis setara manusia polifenol *human equivalent dose* (HED), yaitu sekitar 17 mg/kg untuk 70 kg orang. Kemudian, dosis hewan diperoleh dengan menormalkan ke area permukaan tubuh melalui rumus berikut :

$$\text{DOSIS HEWAN} = (\text{HED} \times \text{Km Human}) / \text{Km mouse}.$$

Human equivalent dose adalah dosis setara manusia, Km adalah faktor koreksi, dengan Km Human adalah 37 dan Km mouse adalah 3. Berdasarkan hasil diatas, dosis harian tikus sebagai hewan coba adalah 210 mg/kg polifenol, dengan mempertimbangkan asupan polifenol harian tertinggi yang berasal dari propolis sebesar 1,2%, dosis polifenol untuk hewan percobaan sekitar 2,5 mg/kg sesuai dengan sekitar 350 mg/kg propolis. Untuk penggunaan jangka pendek, dosis propolis adalah 200 hingga 500 mg/kg, sesuai dengan 140% polifenol yang biasa dikonsumsi dengan propolis (Curti *et al.*, 2019).

Pada penggunaan jangka panjang dapat digunakan dosis 100 mg/kg (sesuai dengan 30% polifenol), 250 mg/kg (setara dengan 70% polifenol) atau 500 mg/kg (setara dengan 140% polifenol) yang diberikan selama 30 hari (Curti *et al.*, 2019).

Penelitian sebelumnya telah menunjukkan tidak ada efek samping yang diamati pada tikus dan manusia setelah pemberian propolis, namun demikian, masih ada kasus alergi dan dermatitis kontak dilaporkan (Wagh,

2013). Propolis dianggap tidak beracun, dan konsentrasi yang aman bagi manusia adalah sekitar 1,4 mg / kg bb / hari atau 70 mg / hari (Salatino *et al.*, 2005).

Propolis memiliki toksisitas yang rendah, seperti yang ditunjukkan oleh uji LD50 pada tikus (2000 hingga 7300 mg / kg BB dan pengujian flavonoidnya pada tikus (8000 sampai 4000 mg / kg BB). Selain itu, tidak ada efek samping yang terlihat pada kasus pemberian oral EEP pada tikus dalam diet pada konsentrasi lebih tinggi dari 4000 mg / kg bb / hari selama dua minggu, dan perlakuan mencit dan tikus dalam air minumnya sebesar 1400 mg / kg bb / hari selama 90 hari dan 2740 mg / kg bb / hari masing-masing selama 60 hari. Pada penelitian ini menunjukkan tidak ada karsinogenisitas EEP yang diterapkan pada tikus Wistar Hannover selama 2 tahun dengan dosis dari 2,5% (1000–2000 mg / kg bb / hari (Kakehashi *et al.*, 2016).

8. Hewan Model antraks

a. Tikus Putih

Hewan coba adalah hewan yang digunakan sebagai model dalam mempelajari berbagai bidang ilmu pada penelitian atau pengamatan laboratorium. Pada penelitian, ada beberapa hewan uji yang sering digunakan, yakni mencit, tikus, kelinci dan kelompok primata. Hewan coba tersebut harus memenuhi kriteria standar, sehingga hewan uji dapat sesuai untuk fungsi atau penyakit yang diinginkan. Tikus merupakan hewan coba yang paling banyak digunakan pada penelitian penyakit infeksi, toksikologi, uji efikasi dan proses penuaan. Mencit ukurannya mini, dengan 99% gennya mirip manusia dan dapat berkembang biak sangat cepat (Nye *et al.*, 2006).

Tikus sebagai hewan coba dipilih pada penelitian antraks berdasarkan kriteria berikut: (1) penggunaan strain sebelumnya dalam studi terkait antraks (2) keragaman maksimal dengan latar belakang inang ditentukan dari strain, (3) perkiraan pemisahan pada pohon filogenetik dan (4) ketersediaan komersial dari strain (Nye *et al.*, 2006). Pada penelitian ini

menggunakan *Rattus norvegicus*, karena tikus jenis ini memiliki *Anthrax toxin receptors 2* (ANTXR2) yang mudah beradaptasi dan dapat dijumpai serta telah menghasilkan banyak galur bawaan dan turunan (Scobie *et al.*, 2006; Modlinska dan Pisula, 2020).

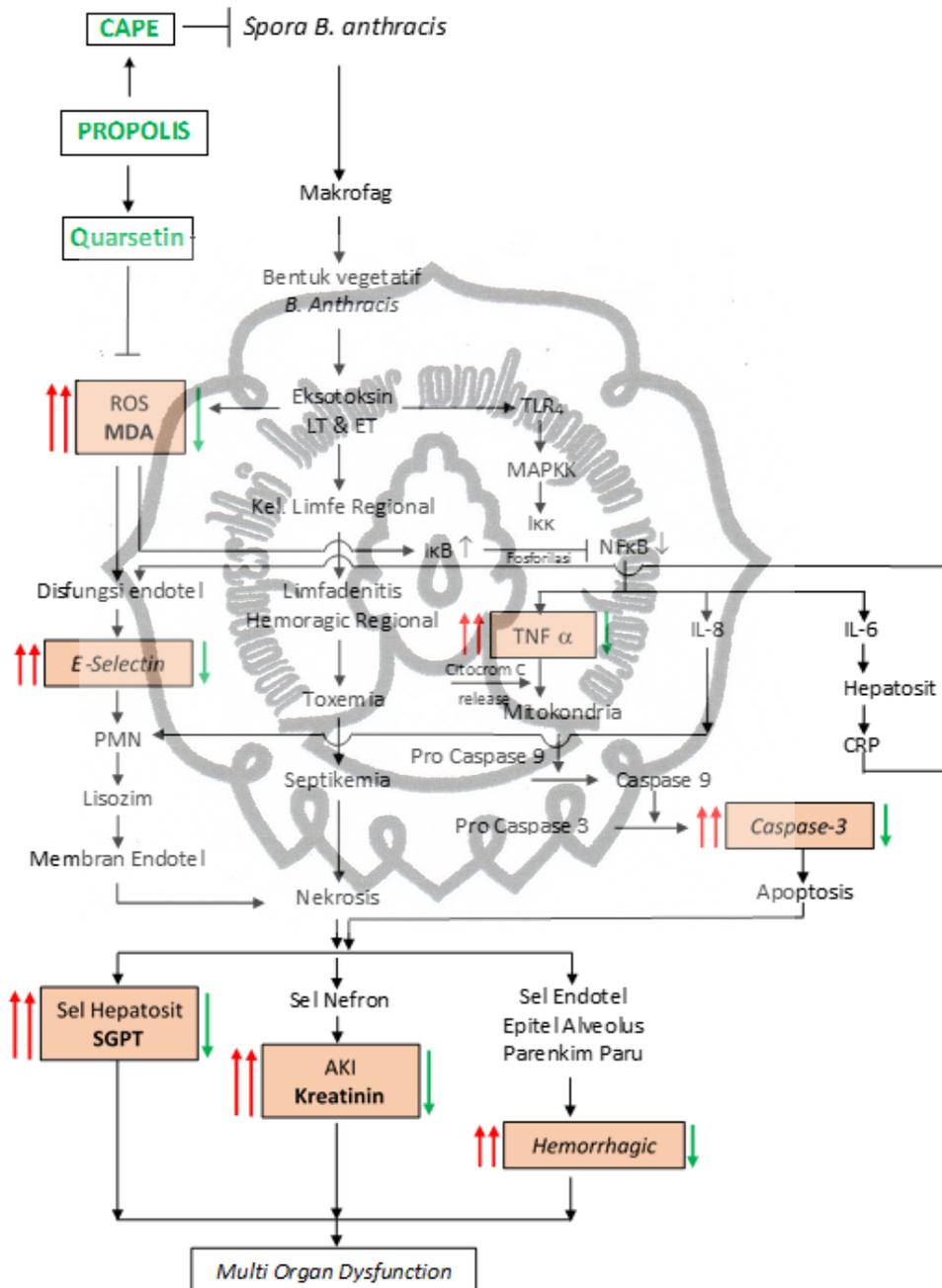
b. Model Antraks

Penggunaan model antraks dalam penelitian sudah banyak dilakukan, terutama pada antraks kulit dan inhalasi. Model hewan tidak hanya digunakan untuk studi *in vivo*. Sel primer yang berasal dari spesies hewan ini sering digunakan untuk studi *in vitro*, yang dapat memberikan informasi *B. anthracis* di seluler dan molekuler (Goossens., 2009).

Kalns *et al.*, (2002) mengamati bahwa pada tikus C57Bl/5 terinfeksi oleh injeksi *subcutan* (SC) dengan *Sterne*, bakteri hanya diamati di tempat suntikan, bahkan pada tikus yang hampir mati, menunjukkan kematian hewan adalah karena efek sistemik dari toksin tersebut dari bakteremia (Kalns J *et al.*, 2002). Sebuah model untuk antraks kulit dikembangkan pada tikus dengan menggunakan inokulasi spora *Sterne* ke kulit utuh atau terkelupas (Hahn BL *et al.*, 2008). Berbeda dengan kebanyakan infeksi paru, infeksi kulit pada model ini menyebabkan perkecambahan dan pertumbuhan vegetatif *B. anthracis* yang melibatkan inflamasi neutrofilik eksudasi sel ke dalam cairan epidermis kulit yang terinfeksi, sehingga mengakibatkan kerusakan lanjut (Hahn *et al.*, 2008).

Pengembangan model pneumonia yang khas pada antraks penting dalam memahami patogenesisnya. Mayoritas model hewan pada antraks digunakan untuk menguji efektivitas vaksin (Gail *et al.*, 2014). Tikus, digunakan untuk menguji vaksin, dengan menggunakan induksi secara *subcutan* (SC), dapat juga dengan *intratrakeal* (IT), model untuk menguji peran iradiasi antraks pada infeksi paru. Untuk *B. anthracis* yang virulen, dengan melalui SC 50% *Lethal doses* (LD50) (Lyons *et al.*, 2004).

B. Kerangka Teori



Gambar 2.14 Kerangka Teori Penelitian

Keterangan :

ROS : *Reactive Oxygen Species*

TNF-α : *Tumor Necrosis Factor Alpha*

NfκB : *Nuclear Factor K Beta*

↑ : Variabel yang diteliti

↑ : Memacu

TLR4 : *Toll Like Reseptor 4*

IL1β : *Interleukin 1 Beta*

↓ : Menghambat

↓ : Menghambat

Infeksi antraks berawal dari masuknya bakteri *B. anthracis* ke dalam tubuh dalam bentuk spora melalui kulit, spora ini berkembang dan berubah menjadi bentuk vegetatif, yang selanjutnya mengeluarkan eksotoksin LT and ET, yang memicu produksi ROS dan TLR-4, selanjutnya ikatan ini memicu aktivasi sinyal transduksi melalui aktivasi NfKB maupun jalur MAPK. Aktivasi ini akan mengaktifkan I κ B untuk memfosforilasi IB sehingga ikatan NfKB dengan IB terlepas dan NfKB menjadi aktif dan memicu ekspresi TNF- α , yang mempunyai reseptor di endotel. Ikatan ini akan memicu endotel mensekresikan *E-selectin* yang akan mengikat PMN untuk melepaskan lisozim yang akan menyebabkan terjadinya nekrosis di jaringan.

Sekresi TNF- α akan memicu mitokondria untuk mengubah *pro caspase-9* menjadi *caspase-9* aktif, kemudian *caspase-9* aktif akan memacu perubahan *pro caspase-3* menjadi *caspase-3* aktif, yang selanjutnya terjadi proses apoptosis, yang mempengaruhi sel target organ disamping adanya nekrosis karena proses inflamasi dan disfungsi endotel, antara lain hati, ginjal dan paru. Bila hal ini berlanjut, akan menyebabkan MODs.

Penghambatan pada produksi ROS dan TLR4 merupakan jalan untuk menghentikan proses inflamasi, apoptosis serta disfungsi endotel, sehingga proses terjadinya nekrosis dapat dicegah. Propolis dengan kandungan *flavonoid* yaitu CAPE dan *quersetin*, memiliki aktivitas anti-inflamasi dan antioksidan. Pemberian propolis Gunung Lawu diharapkan mampu menghambat ROS, respons inflamasi yang menyebabkan apoptosis dan nekrosis di jaringan hati, ginjal dan paru.