

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Landasan Teori

##### 1. Definisi Antraks

Antraks adalah infeksi zoonosis yang disebabkan oleh *B. anthracis* yang terjadi hewan herbivora dan dapat ditularkan ke manusia, melalui kontak langsung maupun tidak langsung (Tunkel *et al.*, 2010).

##### 2. Epidemiologi

Kejadian antraks dapat ditemukan hampir di seluruh dunia, tetapi umumnya kasus antraks terjadi di wilayah dengan geografis yang terbatas. Daerah endemis umumnya memiliki karakteristik tanah yang berkapur, alkalin, dengan episodik banjir serta lingkungan yang hangat (Xie, Auth dan Frucht, 2011). Indonesia merupakan salah satu wilayah yang memiliki angka kejadian antraks cukup tinggi. Terdapat 14 provinsi yang dinyatakan sebagai daerah endemis antraks yaitu Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Jawa Barat, DKI Jakarta, Jawa Tengah, Sulawesi Tenggara, Selatan dan Tengah, Sumatera Barat, Jambi, dan DI Yogyakarta. Pada tahun 2010-2016 terdapat 172 kasus antraks dan 97% di antaranya adalah kasus antraks kulit (Kemenkes RI., 2017).

##### 3. Penyebab Antraks

Agen penyebab penyakit antraks adalah bakteri *B. anthracis* yang termasuk dalam *kingdom phylum firmicutes*, *genus bacillus* dan *species B. anthracis* (Martin *et al.*, 2010). Bakteri ini ada di alam mempunyai dua bentuk, yaitu sebagai sel tumbuh aktif yang disebut bentuk vegetatif dan spora aktif (Tunkel *et al.*, 2019). Spora sangat kuat dan tahan terhadap suhu, kelembaban dan sinar ultraviolet yang ekstrem. Spora antraks dapat hidup dalam waktu hingga 60 tahun di lingkungan tanpa nutrisi atau air. Pada saat spora memasuki inang mamalia, lingkungan internal inang yang kaya akan air, gula, dan asam amino akan menginduksi spora untuk

*commit to user*

berkembang menjadi sel vegetatif yang kemudian menghasilkan toksin yang dapat menyebabkan manifestasi klinis (Savransky *et al.*, 2020).

*Bacillus anthracis* membentuk koloni besar dengan pertumbuhan keluar dengan tepi yang tidak teratur. Pada kondisi *in vitro* tumbuh sebagai cincin panjang serta membentuk koloni mukoid. Hal ini disebabkan oleh karena pembentukan kapsul yang bersifat *prominen*. Pembentukan kapsul dapat diamati dengan menumbuhkan bakteri pada agar nutrisi berisi 0,7% *sodium bikarbonat* dalam *karbondioksida* 5%-20%. Bakteri ini memiliki kapsul yang menghasilkan 3 sub toksin (Martin *et al.*, 2010). Bentuk vegetatif bakteri memiliki daya yang kurang baik, jika berada di luar tubuh binatang atau manusia, seperti saat dibiakkan di air, jumlah koloni akan menurun secara cepat dalam 24 jam (Tunkel *et al.*, 2019). Bakteri ini akan mati pada pemanasan 60°C dalam waktu 30 menit (Moayeri *et al.*, 2015)

a. Morfologi dan Identifikasi *B. anthracis*

Bakteri ini mempunyai ukuran 3-4 mili mikron, persegi, berspora dan tersusun dalam rantai panjang, yang merupakan koloni bulat seperti kaca yang diukir, bila disinari cahaya, dengan ciri *non haemolytic* dan mempunyai *culred edge* (Tunkel *et al.*, 2019).

b. Lingkungan hidup

Pertumbuhan *B. anthracis* memerlukan karbon sederhana dan sumber nitrogen, dengan perubahan lingkungan spora bersifat resisten, tahan terhadap panas kering dan desinfektan kimia tertentu dalam waktu yang cukup lama (Moayeri *et al.*, 2015).

Bakteri ini mempunyai dinding sel polisakarida somatik yang terdiri dari *N-asetilglukosamin* dan *D-galaktosa*. *pXO1* dan *pXO2* merupakan Faktor virulensi utama *B. anthracis* (Prince, 2003). *Plasmid pXO1* mengandung gen yang memproduksi kompleks toksin antraks. (Tunkel *et al.*, 2019). Antigen protektif merupakan komponen yang berguna saat berikatan dengan *anthrax toxin receptor* (ATR) di permukaan sel. Setelah berikatan dengan reseptor maka oleh furin protease permukaan sel, antigen protektif (83-kDa) membelah

menjadi bentuk 63-kDa dan selanjutnya akan mengalami oligomerisasi menjadi bentuk *heptamer* (Martin *et al.*, 2010; Savransky *et al.*, 2020)

c. Siklus Hidup

1) Fase Vegetatif

Basil mempunyai bentuk batang, berukuran besar dengan panjang 1-8  $\mu\text{m}$  dan lebar 1-1,5  $\mu\text{m}$ . Basil ini bersifat non motil, non hemolitik pada agar darah biri-biri dan tumbuh pada berbagai kondisi media laboratorium dalam temperatur 37°C. Pada saat hewan terinfeksi mati, bakteri yang berada didalam tubuh hewan akan keluar melalui pendarahan di hidung, mulut, anus atau pendarahan lainnya. Ketika inangnya mati dan oksigen tidak tersedia lagi dalam darah, bentuk vegetatif akan memasuki fase tidur (*dormant*). Apabila dalam fase itu ada kontak dengan oksigen di udara bebas, bakteri antraks akan membentuk spora (Moayeri *et al.*, 2015).

2) Fase Spora

Spora berukuran 1-1,5 mikrometer, dengan bentuk seperti bola golf. Selama fase ini bakteri tidak aktif, menunggu sampai dapat berubah kembali menjadi bentuk vegetatif dan memasuki inangnya (Liu *et al.*, 2018). Ini dapat terjadi karena daya tahan spora antraks yang tinggi untuk melewati kondisi lingkungan yang kurang mendukung, diantaranya panas, radiasi ultraviolet dan ionisasi, tekanan tinggi, serta sterilisasi dengan senyawa kimia. Spora terbentuk pada saat binatang yang terinfeksi mati. Spora antraks memiliki dinding tebal sehingga bersifat resisten terhadap panas, radiasi ultraviolet dan ion, tekanan, serta bahan kimia, yang dapat bertahan lebih dari 60 tahun dan masih mampu menginfeksi manusia atau binatang (Moayeri *et al.*, 2009). Basil ini tidak dapat bertahan diluar tubuh binatang atau manusia tanpa kemampuannya membentuk spora karena merupakan *obligate pathogen*, suatu

bakteri yang tinggal di dalam tubuh binatang atau manusia untuk mempertahankan hidupnya (Savransky *et al.*, 2020).

Kondisi optimal bagi pertumbuhan spora dan multiplikasi bakteri adalah tanah yang mengandung kalsium dan dataran rendah yang basah dalam waktu lama kemudian terkena panas. Binatang yang merumput pada area ini dapat menghirup spora, jika penyakitnya berkembang dan binatang tersebut mati, jasadnya menyatu dengan tanah dan menghasilkan spora pada kondisi tertentu (Moayeri *et al.*, 2009). Manusia paling sering terinfeksi antraks dari spora yang terdapat di kulit atau daging binatang terinfeksi, ketika spora menempel pada kulit inang yang terluka atau juga dapat terhirup saat bernafas (Liu *et al.*, 2018). Setelah spora antraks memasuki tubuh inang, spora itu berubah ke bentuk vegetatif. Antraks inhalasi jarang terjadi melalui kontak dengan binatang terinfeksi yang hidup. Industri kulit binatang, paparan pupuk dari serbuk tulang, penggunaan kulit dan bulu binatang impor pada kerajinan rumah tangga, dapat menyebabkan inhalasi spora serta menimbulkan penyakit pada individu yang sensitif. Individu tidak tervaksinasi yang memasuki proses pengolahan kulit dan bulu berada pada risiko terbesar terhadap inhalasi atau pajanan kontak (Moayeri *et al.*, 2009).

d. Sifat-sifat kuman Antraks

Pada bakteri antraks terdiri dari tiga antigen, yaitu :

1) Kapsul Antigen Polipeptida

Susunan antigen kapsul ini terdiri dari asam *D-glutamat*, yang merupakan molekul besar dan diketahui hanya ada satu tipe antigen kapsul. Antigen ini berperan penting dalam menghambat proses opsonisasi dan fagositosis kuman (Moayeri *et al.*, 2009).

## 2) Antigen Somatik

Antigen ini terdiri dari *D-galaktosa* dan *N-asetil galaktosamin*, yang dapat bereaksi silang pada golongan darah A dan pneumokokus tipe 14 (Liu *et al.*, 2018).

## 3) Toksin Antigen

Virulensi bakteri ini ditentukan oleh kapsul kuman dan toksin, yang ditemukan pada tahun 1950-an oleh Smith dan Keping. Toksin ini terdiri dari *Edema factor* (EF), *Protective antigen* (PA) dan *Lethal factor* (LF).

Adanya toksin ini dapat menyebabkan edema, nekrosis jaringan dan perdarahan. Jika ketiga faktor ini berdiri sendiri, tidak akan menyebabkan efek toksik. *Edema toxin* (ET) terbentuk dari kompleks EF dan PA (Xie, Auth and Frucht, 2011). Adanya PA menyebabkan masuknya EF dan LF ke dalam sel, dengan cara membentuk ikatan dengan reseptor seluler (Liu *et al.*, 2018). Ikatan PA dengan reseptor selulernya memungkinkan EF dan LF masuk ke dalam sel. Aktivasi EF akan mempercepat perubahan *Adenosine trifosfat* (ATP) menjadi *Cyclic Adenosine Monophosphate* (cAMP). Kemampuan EF mengubah ATP menjadi cAMP sangat kuat dibanding dengan toksin pada kuman kolera, sedangkan LF adalah *metalloprotease* yang faktor virulensi utama *B. anthracis*. Penyuntikan *lethal toxin* pada mencit akan menyebabkan kematian dalam waktu 38 menit. Hal ini menjelaskan jika antibodi terhadap PA ini bersifat protektif dan ikatan dengan PA yang menyebabkan EF dan LF tidak dapat masuk ke dalam sel (Moayeri *et al.*, 2015).

## e. Pertahanan Hidup

Mekanisme dalam mempertahankan hidup *B. anthracis* terdiri dari bentuk kapsul dan spora. Bentuk spora melindungi bakteri terhadap kondisi ekstrim sehingga bakteri ini dapat bertahan hidup hingga puluhan tahun. Kapsul merupakan lapisan tipis yang menyelubungi dinding luar dari bakteri, yang terdiri dari polipeptida



dengan berat molekul tinggi dan mengandung *D-glutamat acid* dan merupakan suatu hapten. *Bacillus anthracis* dapat membentuk kapsul pada rantai yang berderet. Pada media biasa, kapsul tidak dapat terbentuk kecuali pada galur yang ganas (Tunkel *et al.*, 2019).

Bakteri akan berubah bentuk dengan membentuk kapsul pada jaringan hewan yang mati atau pada media khusus natrium bikarbonat dengan konsentrasi *carbondioxide* (CO<sub>2</sub>) 5%. Kapsul ini dapat menghambat proses fagositosis oleh sistem imun tubuh serta menentukan virulensi bakteri (Martin *et al.*, 2011). *Bacillus anthracis* membentuk spora sebagai bentuk *resting cells*. Perubahan ini terjadi bila nutrisi esensial tidak memenuhi kebutuhan dalam pertumbuhan, yang disebut sporulasi. Spora ini berbentuk elips atau oval, letaknya sentral dengan diameter tidak lebih dari diameter bakteri itu sendiri. Spora ini tumbuh baik di tanah maupun atau jaringan hewan yang mati karena antraks (Inglesby *et al.*, 2005 ; Moayeri *et al.*, 2015).

Bakteri ini mempunyai keistimewaan, bila keadaan lingkungan berubah kembali normal atau nutrisi esensial telah terpenuhi, spora akan berubah menjadi bentuk bakteri kembali. Spora ini dapat terus bertahan hidup, karena sulit dirusak atau mati oleh pemanasan atau bahan kimia tertentu, sehingga bakteri tersebut bersifat *dormant*, hidup tapi tak berkembang biak (Xie, Auth and Frucht, 2011).

Spora antraks tahan terhadap cuaca panas atau dingin, dan menjadi aktif setelah masuk kedalam tubuh. Pada tanah yang kering, spora akan bertahan selama 60 tahun. Spora akan mati dalam *hidrogen peroksida* dalam waktu 1 jam, pada suhu 100°C dalam waktu 10 menit, pada karbol 5% dalam waktu 40 hari, dan pada formalin 10% dalam waktu 4 jam. Kuman antraks dapat tumbuh optimal di media umum di laboratorium, misalnya media agar bernutrisi atau media agar darah pada suhu 37°C dan pH 7-7,4. Bakteri vegetatif mudah mati oleh antibiotik, disinfektan atau antiseptik (Paccani *et al.*, 2011).

#### 4. Cara Penularan

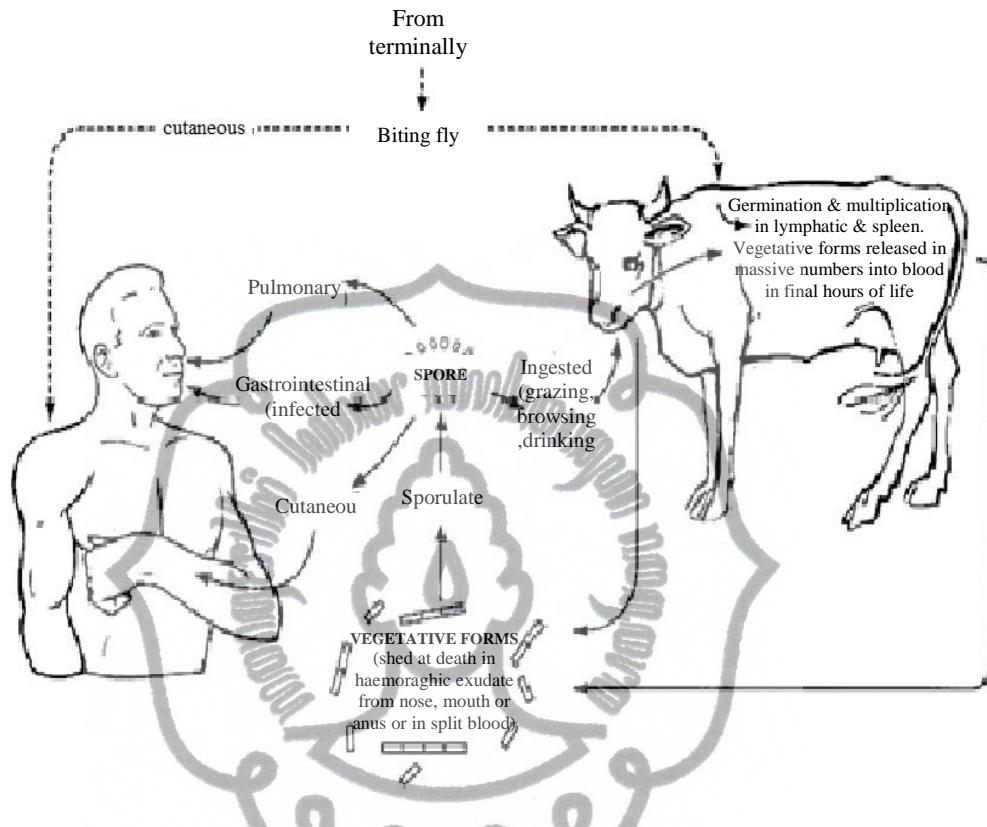
Penularan pada manusia terjadi setelah ada hewan yang terinfeksi atau produk hewan yang terkontaminasi, antara lain: daging, kulit, tulang, darah atau bisa juga melalui udara yang mengandung spora, misalnya, pada pekerja di pabrik wool atau kulit binatang. Antraks tidak dapat ditularkan dari manusia ke manusia (Inglesby *et al.*, 2002). Penularan disebabkan karena kontak langsung dengan spora yang ada di tanah (Tunkel *et al.*, 2010). Transmisi dari lalat juga dilaporkan dapat sebagai media penularan, yaitu lalat yang membawa spora dari bangkai ke hewan lain atau manusia (Moayeri *et al.*, 2015).

Manusia akan terinfeksi apabila endospora masuk ke dalam tubuh melalui kulit yang terbuka, misalnya lecet atau luka, melalui pernafasan atau makanan yang telah terkontaminasi dengan *B. anthracis* yang tidak dimasak sampai matang (Martin *et al.*, 2010).

#### 5. Patogenesis Infeksi Antraks

Infeksi antraks diawali dengan masuknya endospora yang dihasilkan oleh *B. anthracis* ke dalam tubuh manusia, melalui abrasi kulit, tertelan atau terhirup udara saat bernafas. Virulensi ditentukan oleh dua macam plasmid yang terdapat pada sitoplasma bakteri. Dua macam plasmid tersebut adalah *pXO1* dan *pXO2*. (Xie, Auth and Frucht, 2011). Pengaruh *pXO1* sebagai pembawa gen penghasil toksin sedangkan *pXO2* sebagai pembawa gen penghasil kapsul. Plasmid *pXO2* menghasilkan kapsul yang mana berfungsi melindungi sel dari fagositosis dan lisis (Porasuphatana, 2010).

Bakteri masuk ke dalam tubuh menjadi bentuk spora, lalu akan bereaksi dengan sistem kekebalan tubuh. Spora yang aktif mulai berkembang biak dan menghasilkan tiga molekul protein, yaitu *protective antigen* (PA), *lethal factor* (LF), dan *edema factor* (EF) (Xie, Auth and Frucht, 2011). Ketiga molekul ini tidak bersifat toksik, tetapi bila bergabung membentuk dua macam toksin (Inglesby *et al.*, 2002).



**Gambar 2.1** Siklus infeksi *B. anthracis* (Inglesby *et al.*, 2002).

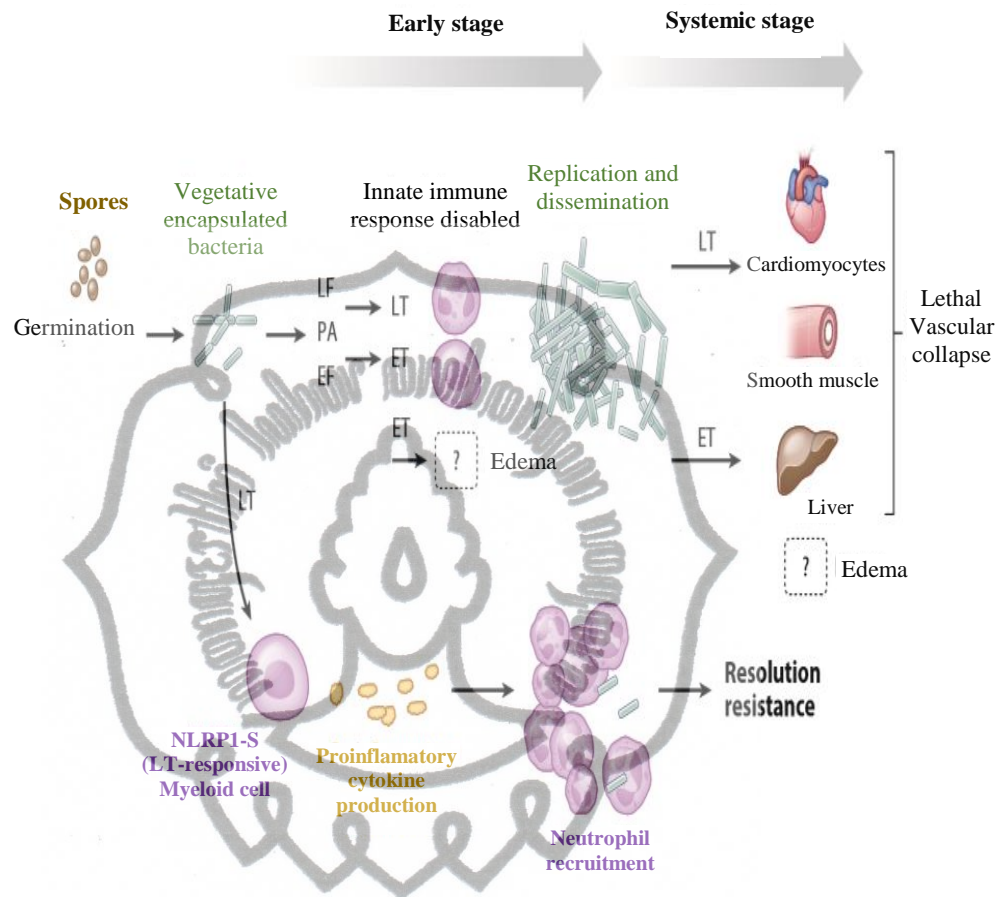
Keterangan : Spora antraks dapat masuk ke hewan melalui spora yang menempel di rumput dan masuk saat dimakan hewan, spora dapat masuk melalui inhalasi dan gastrointestinal.

Kombinasi LF dan PA membentuk *lethal toxin* (LT), EF dan PA membentuk *edema toxin* (ET), jika ada ketiga toksin tersebut (PA, LF, dan EF), akan mengakibatkan edema, nekrosis dan berakhir dengan kematian. Ketiga toksin tersebut membantu bakteri menghindari dari sistem imun *host* dan menyebabkan septikemia berakhir kematian pada *host* (Glomski *et al.*, 2007; Abboud *et al.*, 2008; Paccani *et al.*, 2011).

Adanya *Edema Toxin* menyebabkan makrofag tidak dapat melakukan fagositosis pada bakteri dan *lethal toxin* merupakan toksin yang memicu makrofag untuk mensekresikan TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  (Xie, Auth and Frucht, 2011). Pada jaringan subkutan dan mukosa usus, sebagian kecil spora berubah menjadi bentuk vegetatif. Bentuk vegetatif selanjutnya



akan membelah, mengeluarkan toksin yang menyebabkan edema dan nekrosis lokal (Moayeri *et al.*, 2015).



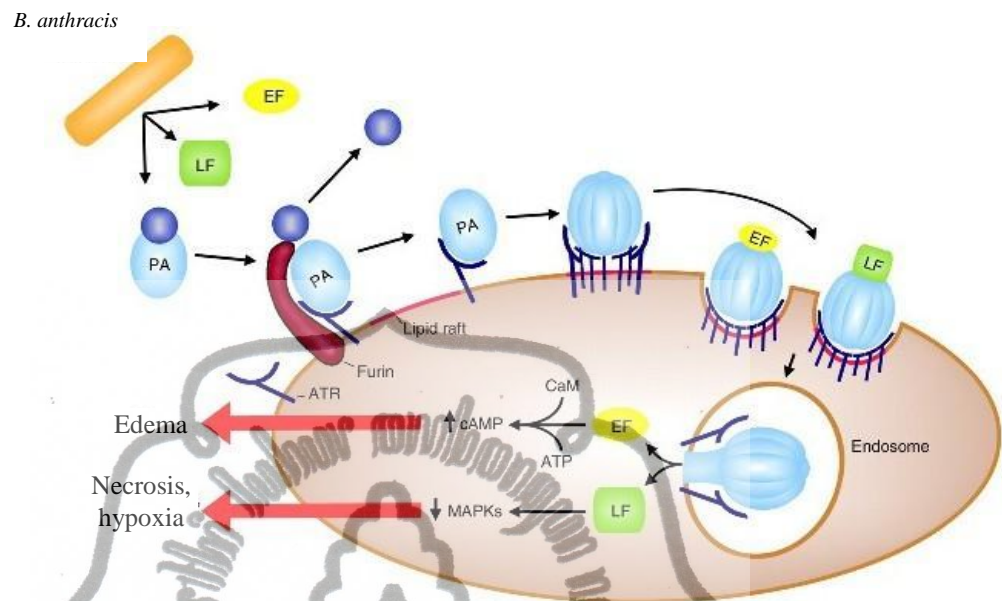
**Gambar 2.2** Toksin antraks dari bentuk vegetatif (Martin *et al.*, 2010).

Keterangan : Saat spora masuk kemudian berubah menjadi bentuk vegetatif dan menghasilkan LT dan ET, yang dapat bermanifestasi ke jantung dan hati.

*Endospora* menjadi bentuk vegetatif setelah mengalami fagositosis oleh makrofag, kemudian dibawa ke kelenjar getah bening regional. Kemudian kuman akan membelah, serta memproduksi toksin dan menimbulkan limfadenitis, yang menyebar secara hematogen dan limfogen dan menyebabkan septikemia serta toksemia. Dalam darah, kuman dapat mencapai sepuluh sampai seratus juta per milimeter darah. Reaksi peradangan hebat terjadi terutama akibat *lethal toxin*, yang memicu pelepasan *reactive oxygen species* (ROS), TNF- $\alpha$  dan *interleukin-1* (IL-1) (Martin *et al.*, 2010).

*Lethal Factor* adalah komponen sentral racun yang bekerja sebagai *protease*, aktivitasnya bergantung pada logam *zinc*. *Edema Factor* adalah enzim *adenylate cyclase* yang bekerja mensintesis molekul cAMP sehingga





**Gambar 2.3** Mekanisme Aksi Antigen Protektif (Prince, 2003).

Keterangan: PA akan berikatan dengan EF dan LF. EF akan menyebabkan manifestasi berupa edema sedangkan LF akan bermanifestasi sebagai nekrosis dan hipoksia.

adanya peningkatan yang tidak terkontrol, dapat menyebabkan hilangnya cairan tubuh (Pohan, 2005 ; Liu *et al.*, 2018).

Menurut Prince (2003), virulensi *B. anthracis* bergantung pada kapsul antifagosit dan 3 toksin berbeda, yaitu PA, LF dan EF. Untuk dapat berfungsi, LF dan EF dibantu PA, masuk ke dalam sel (Prince, 2003). Pada tahap awal intoksikasi sel *host*, PA ini dibutuhkan untuk mengawali masuknya LF dan EF sebagai enzim yang berpengaruh pada mediasi kerusakan sel *host* (Moayeri *et al.*, 2015). *Protective antigen* adalah protein yang terdiri dari satu subunit yang bila berikatan dengan reseptor khusus dalam sel, akan terbelah dua akibat aktivitas protease furin. Kemudian PA membentuk *heptamer* (tujuh subunit) yang mengikat LF dan EF, sehingga bisa masuk ke dalam sel (Paccani *et al.*, 2011).

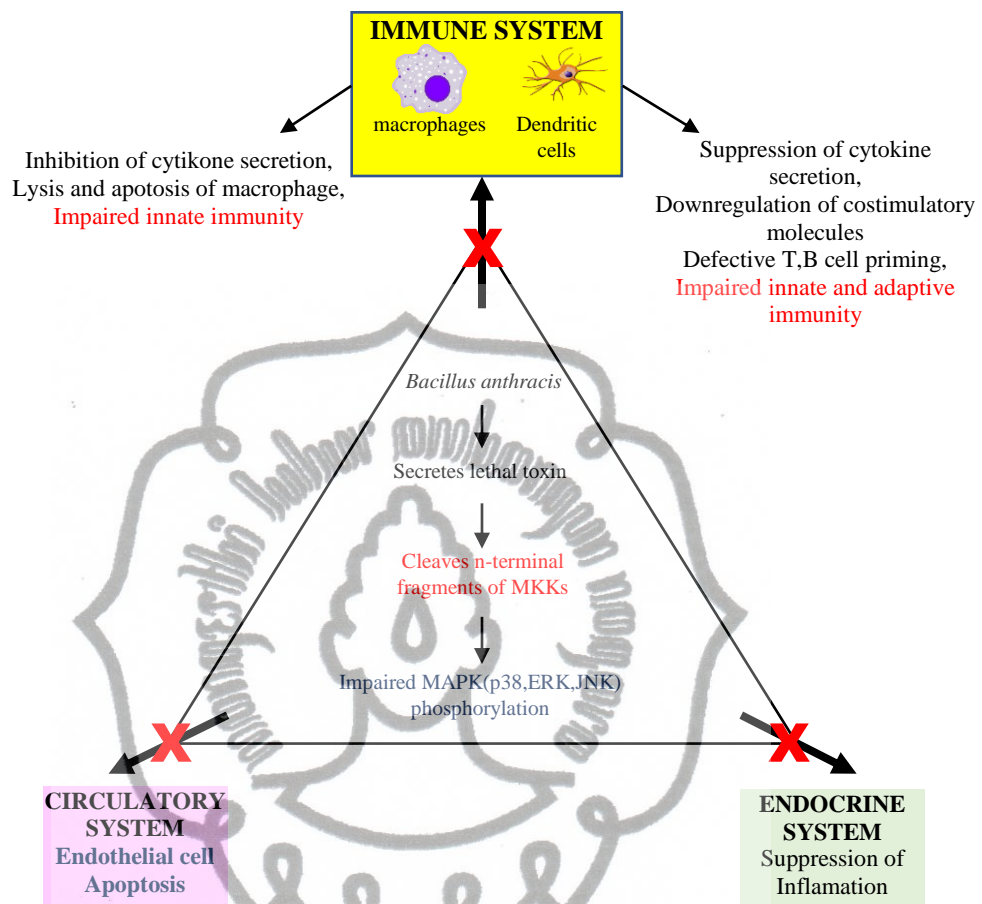
Komponen protein A yang kedua adalah *lethal toxin* yaitu *zinc metalloprotease* yang menginaktivkan *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPKK) sehingga menyebabkan penghambatan sinyal

intraseluler (Moayeri *et al.*, 2015). *Lethal toxin* memicu pelepasan IL-1 $\beta$  yang menyebabkan kondisi *hiperinflamasi* pada makrofag, mengaktifkan jalur oksidatif yang merusak dan pelepasan *reactive oxygen intermediates*, serta ekspresi pro-inflamasi, seperti TNF- $\alpha$  yang menyebabkan terjadinya syok dan kematian (Dixon *et al.*, 2000). Hal ini diakibatkan efek toksik yang terjadi pada hewan dengan bakteremia kadar tinggi, yaitu  $10^7$ - $10^8$  basil per mililiter darah dan tingginya kadar *lethal toxin* (Chamber, 2003)

Kapsul bakteri antraks terdiri dari *poly D-glutamic acid* yang dihasilkan oleh plasmid pX02 dan berfungsi untuk melindungi sel dari proses fagositosis dan lisis. (Xie, Auth and Frucht, 2011). *Protective antigen* mengikat reseptor seluler dan memfasilitasi LF masuk dalam sitosol (Heninger *et al.*, 2006). *Lethal toxin* berisi *protease* yang mengeluarkan hormon peptida dan *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Porasuphatana, 2010; Panchal, 2007).

*Lethal factor* mengeluarkan MAPK *activating enzymes* disebut *mitogen-activated protein kinase kinase* (MAPKK). Pengeluaran enzim ini mencegah fosforilasi berbagai komponen p38, *June N-terminal kinase* (JNK), *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), yang dapat menyebabkan penghambatan jalur MAPK (Panchal, 2007).

Perusakan jalur MAPK menyebabkan gangguan multisistem pada individu terinfeksi. Aktivitas LT menimbulkan kerusakan yang tersebar luas, bersifat multisistem termasuk sitotoksitas. (Xie, Auth and Frucht, 2011). Data mengenai hubungan langsung antara inaktivasi jalur MAPK dan sitotoksitas belum diketahui. Keadaan ini akan memicu munculnya *damage-associated molecular pattern* (DAMP), mengarah pada penyebaran reaksi inflamasi dan *respon* imun adaptif yang dilepaskan oleh sel-sel yang telah rusak saat terjadi jejas reperfusi iskemia Prototipe DAMP protein non histon terkait kromatin yang dikenal sebagai *high-mobility group box 1*



**Gambar 2.4** Perusakan jalur MAPK oleh antraks (Heninger *et al.*, 2006).

Keterangan: Spora *B. anthracis* mengeluarkan LT yang memicu efek sistem imun, sirkulasi dan endokrin. MAPK : mitogen activated protein kinase; ERK : extracellular signal-regulated kinase; JNK : c-June N-terminal kinase

(HMGB-1) berfungsi sebagai faktor nuklear dan sitokin pro-inflamasi, yang

merupakan reseptor multi-ligan yang mengikat HMGB-1, diekspresikan oleh sel epitel tubular akibat stres oksidatif (Wu *et al.*, 2011).

*Edema factor* merupakan suatu *adenylate cyclase* yang berpengaruh meningkatkan produksi cAMP, yang mempengaruhi perpindahan air dan ion. (Xie, Auth and Frucht, 2011). Konsentrasi cAMP tinggi menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh sel. *Edema factor* juga berpengaruh mencegah aktivasi proses inflamasi dengan cara merusak fungsi neutrofil,

*commit to user*



menurunkan kemampuan fagosit, dan mengganggu jalur pengeluaran sitokin (Heninger *et al.*, 2006).

Toksin antraks mencegah terjadinya pembekuan darah sehingga setelah individu terinfeksi mati darah mengalir ke tanah melalui lubang-lubang tubuh. Setiap 1 mililiter darah mengandung 10 sampai 100 juta bakteri (Moayeri *et al.*, 2015). *Lethal toxin* mempengaruhi endotel pembuluh darah, secara histologis dapat terlihat adanya nekrosis yang menyebabkan kerusakan dan perdarahan. Toksin antraks bekerja langsung pada membran sel endotel, menjadikannya bersifat permeabel terhadap plasma dan mengakibatkan trombosis intravaskuler. Hal ini bermanifestasi pada perdarahan di organ dalam dan perdarahan melalui lubang-lubang tubuh (Decker, 2003).

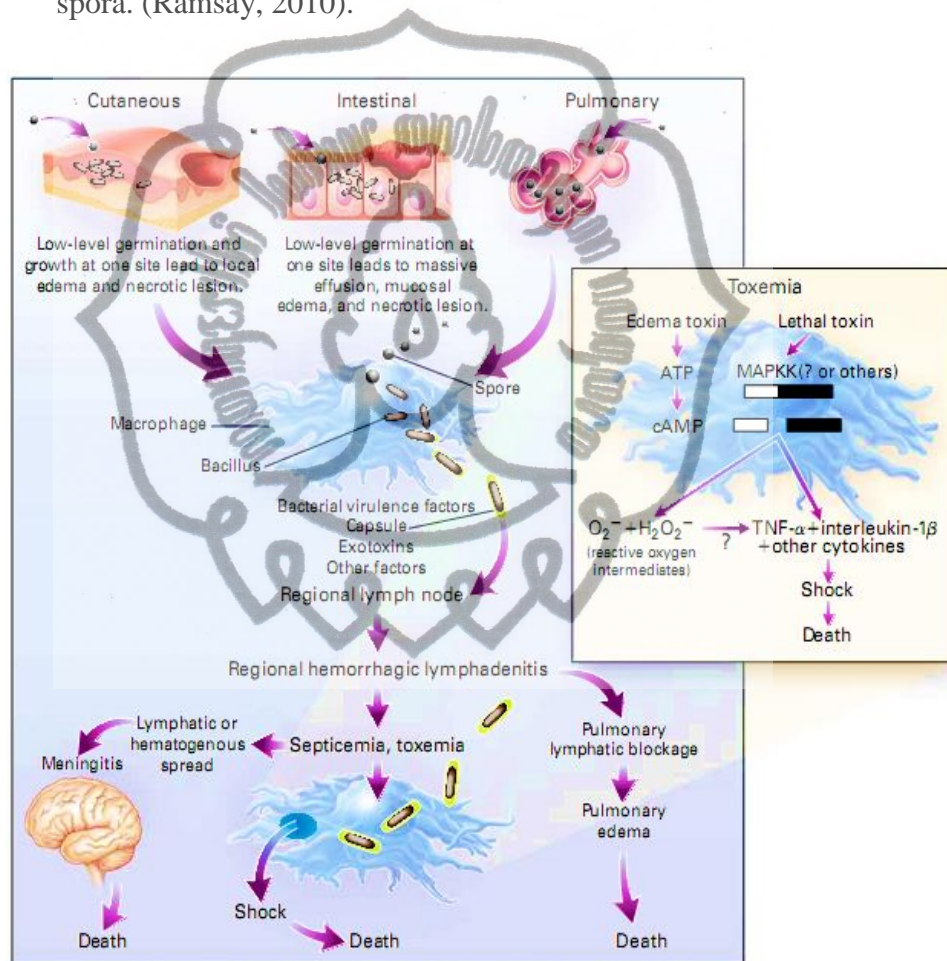
Angka kematian antraks kulit adalah kurang dari 20% di sepanjang perjalanan penyakitnya. Hal ini terjadi bila spora *B. anthracis* menembus lapisan dermal, biasanya melalui luka atau abrasi (Moayeri *et al.*, 2015). Edema lokal terlihat jelas setelah 24-48 jam pasca infeksi akibat perkembangan dari spora dan produksi toksin. Sekitar dua hari pasca infeksi, pada pasien biasanya mulai muncul ulkus berbentuk bulat besar, yang segera diikuti oleh pembentukan *eschar* (Laws *et al.*, 2006).

## 6. Klasifikasi Antraks

Terdapat 4 bentuk dari antraks yang terjadi pada manusia, yaitu :

- a. *Cutaneous anthrax* (antraks kulit) yang terjadi karena masuknya spora melalui *barrier* kulit yang tidak intak. Ujud kelainan kulit yang tampak adalah *eschar* berwarna hitam disertai ulserasi yang tidak nyeri. *Cutaneous anthrax* menyumbang 95% kejadian antraks yang terjadi pada manusia (Moayeri *et al.*, 2015).
- b. *Gastrointestinal anthrax* terjadi karena mengonsumsi daging hewan yang terkontaminasi dengan *B. anthracis*. Traktus intestinal, rongga mulut atau kerongkongan dapat terinfeksi bakteri tersebut.

- c. *Inhalational anthrax* (antraks inhalasi) dapat terjadi karena menghirup udara yang telah terinfeksi spora *B. anthracis* dan pada akhirnya menginfeksi paru.
- d. *Injection related anthrax* terkait dengan tindakan pemberian obat-obatan melalui jalur intravena. Kasus yang ditemukan di Eropa saat injeksi heroin yang terkontaminasi dengan material yang mengandung spora. (Ramsay, 2010).



**Gambar 2.5** Jalur infeksi antraks di kulit, intestinal dan paru (Decker, 2003).

Keterangan: Spora *B. anthracis* dapat masuk melalui kulit, saluran cerna dan saluran nafas kemudian ditangkap makrofag dan masuk kelenjar limfe regional yang dapat bermanifestasi pada berbagai macam organ hingga terjadi kematian.

## 7. Patogenesis Pembentukan Luka Pada Infeksi Antraks Kulit

Angka kematian antraks kulit adalah 20% di sepanjang perjalanan penyakitnya dan 1% diantaranya tanpa terapi. Bentuk antraks ini terjadi

pada saat spora *B. anthracis* menembus lapisan dermal, biasanya melalui luka atau abrasi. Edema lokal terlihat jelas setelah 24-48 jam pasca infeksi akibat perkembangan dari spora dan produksi toksin. Kurang lebih dua hari pasca infeksi, pada umumnya mulai muncul ulkus berbentuk bulat besar, yang segera diikuti oleh pembentukan *eschar* hitam yang tidak nyeri. Pada beberapa kasus, infeksi dapat menembus lapisan epitel kulit dan memasuki sistem limfatik, menjadi limfangitis dan limfadenopati diikuti dengan munculnya komplikasi sistemik. Walaupun sangat jarang terjadi, infeksi *cutaneous anthrax* juga dapat menyebabkan septikemia, syok, anemia hemolitik, koagulopati, hiponatremia, gagal ginjal, dan kematian. Infeksi antraks juga bisa didapat secara transkutan melalui suntikan. Dalam kasus antraks injeksi ini, tidak harus disertai dengan pembentukan *eschar*, sehingga diagnosis menjadi lebih sulit (Moayeri *et al.*, 2015).

Pada saat spora masuk ke tubuh manusia atau hewan, dan menemukan lingkungan yang mendukung untuk berkembang biak, yaitu lingkungan dengan kadar oksigen yang rendah, nutrisi berlimpah, dan sirkulasi darah yang akan membawa spora menyebar dalam tubuh (Tunkel *et al.*, 2019). Apabila spora berada pada lingkungan yang mendukung akan berkembang dengan cara melepaskan lapisan tebal pada kapsul luarnya, lalu menjadi sel vegetatif. Fagosit adalah sel darah putih yang bertugas untuk menelan dan membunuh kuman patogen. Makrofag, monosit dan neutrofil di dalam darah adalah jenis sel fagosit. Makrofag merupakan garis pertahanan pertama saat *B. anthracis* masuk melalui kulit dan membran mukosa (Laws *et al.*, 2006).

Makrofag adalah jenis sel yang sangat serbaguna dengan berbagai fungsi bergantung pada lokasi dan status aktivasi. Kontribusi dari makrofag sebagai mediator dari munculnya gejala dan kematian akibat antraks sistemik masih belum jelas. Strategi utama perlawanan *B. anthracis* terhadap respon imun dari pejamu melalui toksin dan kapsulnya. *Lethal toxin* dan ET disekresikan pada saat awal terjadinya infeksi, tujuannya

adalah untuk merusak sistem kekebalan tubuh baik *innate* maupun *adaptive* dan menghambat terbentuknya sitokin. Antibodi terhadap kedua toksin tersebut sangat penting dalam perlindungan terhadap infeksi, seperti ditemukannya vaksin antraks berbasis PA yang dikembangkan pada manusia, serta antibodi anti PA yang saat ini mulai digunakan. Baru-baru ini ditemukan bahwa infeksi *cutaneous anthrax* pada manusia menginduksi *respon* imun humoral terhadap PA dan LF (Liu *et al.*, 2018). Patofisiologi *cutaneous anthrax* saat ini belum dipahami dengan baik, terutama mekanisme dimana patogen menghindari *respon* imun (Tunkel *et al.*, 2019). Makrofag memainkan pengaruh penting dalam pengendalian infeksi melalui fagositosis spora dan menghancurkannya. Neutrofil yang direkrut pada awal terjadinya infeksi juga berpengaruh pada upaya kontrol awal infeksi (Moayeri *et al.*, 2009). Sebuah penelitian menemukan bahwa, konsentrasi *sublytic* dari *lethal toxin*, dimana kadarnya lebih rendah dari yang diperlukan untuk dapat menginduksi terjadinya lisis makrofag, justru akan menginduksi sel makrofag untuk mengekspresikan IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ , jalur *signaling* yang melibatkan MAPKK1, MAPKK2, dan MAPKK3 sangat penting dalam aktivasi makrofag dan secara langsung terlibat dalam produksi sitokin, yaitu TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  dan IL-6 (Liu *et al.*, 2018). Sebuah penelitian melaporkan adanya perlindungan terhadap *lethal toxin* pada mencit yang diberikan imunisasi pasif terhadap IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$  atau diberikan injeksi antagonis reseptor IL-1 $\beta$  (Laws *et al.*, 2006).

Baru-baru ini penemuan jalur *necroptosis* merupakan terobosan mayor di bidang kematian sel dalam dekade terakhir. *Necroptosis*, suatu bentuk kematian sel nekrotik yang dimediasi oleh *receptor-interacting protein kinase 1* (RIPK1) *activity kinase*, RIPK3, dan MLKL (*mixed-lineage kinase domain-like pseudokinase*), yang dapat teraktivasi pada kondisi defisiensi apoptosis. Modulasi aktivasi RIPK1 dengan *ubiquitination* dan fosforilasi sangat penting dalam mengendalikan *necroptosis* dan apoptosis. *Necroptosis* dapat terjadi ketika terjadi defisiensi apoptosis terhadap sel, yang distimulasi oleh TNF- $\alpha$ . Dalam sel



yang kompeten dengan apoptosis, stimulasi TNF- $\alpha$  dapat menginduksi apoptosis baik melalui jalur RIPK1-*independent* atau RIPK1 *dependent*. Dalam sel-sel yang distimulasi TNF- $\alpha$ , aktivitas aktivasi RIPK1 *kinase* memainkan pengaruh penting dalam mengatur *necroptosis* atau *apoptosis*. RIPK1 yang teraktivasi memicu *Caspase-8* untuk membangun kompleks imun yang memediasi interaksi dengan RIPK3 dan membentuk kompleks IL-1 $\beta$  dalam *necroptosis* (Laws *et al.*, 2006).

Berdasarkan hasil ini disimpulkan bahwa syok sistemik dan kematian akibat antraks dapat terjadi akibat efek dari sitokin proinflamasi yang meningkat tinggi, seperti IL-1 $\beta$  dan TNF- $\alpha$ , yang diinduksi oleh makrofag akibat stimulasi dari *lethal toxin* (Liu *et al.*, 2018). Studi terbaru menyimpulkan mengenai modulasi produksi TNF- $\alpha$  dan IL-1 $\beta$  oleh *lethal toxin*. Edema toksin tampaknya juga mempengaruhi produksi sitokin, melalui peningkatan cAMP intraseluler pada monosit, dengan menginduksi produksi IL-6 (Decker, 2003; Laws *et al.*, 2006).

Berbeda dengan efek stimulasi terhadap produksi IL-6, *edema toxin* hanya dapat menginduksi sedikit atau sama sekali tidak mempengaruhi produksi dan justru menghambat stimulasi TNF- $\alpha$  yang diinduksi oleh *Lipopolysaccharide* (LPS). Fenomena ini muncul pada tingkat mRNA. Menariknya, monosit yang di stimulasi menggunakan *dibutyryl cAMP*, yaitu suatu analog aktif cAMP, menghasilkan sitokin dengan pola yang identik seperti sel yang distimulasi oleh edema toxin, yang juga dapat menghambat aktivitas fagositik pada manusia secara *in vitro*. Sebaliknya, *edema toxin* dapat menstimulasi *chemotaxis neutrofil polimorfonuklear* (PMN) manusia, serta dapat meningkatkan kerentanan host terhadap infeksi dengan cara menekan fungsi PMN, yang dapat merusak sistem pertahanan tubuh dari host (Liu *et al.*, 2018). Sel fagosit mengenali mikroba melalui molekul yang terdapat pada permukaan sel mikroba yang kemudian melekat pada reseptor di luar membran sel fagosit. Reseptor adalah protein pada sel membran yang mengikat mikroba, hormon seperti insulin, faktor pertumbuhan, atau bahan makanan seperti karbohidrat atau



asam amino. Pengikatan reseptor memberi sinyal pada sel untuk memberikan *respon* yaitu menelan mikroba yang telah terikat, mulai membelah diri, memberikan sinyal kimia yang akan mengikat reseptor pada sel lain, atau mengalami apoptosis. Setiap jenis sel memiliki reseptor yang berbeda beda, tergantung pada sinyal apa yang dapat diterima. Fagosit memiliki reseptor terhadap molekul yang biasa ditemukan pada bakteri, dan sebagai *respon* terhadap terikatnya *B. anthracis* pada reseptor sel fagosit, maka sel fagosit mengeluarkan pseudopodia panjang yang disebut “*Fingers*” dari permukaan sel, untuk membasmi patogen. Pada saat kuman patogen telah ditelan, maka bakteri tersebut akan masuk dan dilapisi oleh semacam membran vesikel yang berada di dalam sel fagosit yang kemudian mengisi vesikel tersebut dengan molekul-molekul yang akan membunuh dan mencerna bakteri patogen. Beberapa molekul ini, salah satunya adalah enzim yang merusak lapisan protein bakteri, selain itu juga superoksida yang akan menonaktifkan enzim yang diperlukan bakteri untuk tumbuh. *Bacillus anthracis* melakukan beberapa pertahanan diri untuk menghindari kematian akibat fagositosis. Spora secara alami resisten terhadap molekul-molekul di dalam sel fagosit seperti halnya mekanisme pertahanan diri saat berada pada lingkungan yang tidak mendukung terhadap pertumbuhan bakteri. Bahkan spora bisa berkembang menjadi sel vegetatif di dalam vesikel fagosit dan mulai membelah diri. Dari dalam sel, bakteri antraks akan membunuh sel fagosit, kemudian setelah sel fagosit dihancurkan, bakteri akan terlepas ke dalam jaringan. Enzim destruktif dan superoksida juga akan dilepaskan dari sel fagosit, sehingga dapat membunuh sel terdekat. *Bacillus anthracis* dapat bereplikasi di tempat terjadinya infeksi atau terbawa ke jaringan ke limfonodi terdekat. Lokasi limfonodi tersebar di seluruh tubuh, tugasnya adalah menyaring patogen dari cairan yang beredar pada seluruh jaringan tubuh (Liu *et al.*, 2018). *Bacillus anthracis* yang tumbuh di dalam kulit atau kelenjar getah bening disekitar infeksi akan membuat suatu lapisan kapsul di sekitar sel, sehingga sel fagosit tidak dapat menempel pada kapsul bakteri, kemudian

*B. anthracis* dapat tumbuh dan berkembang tanpa ditelan oleh sel fagosit. Sel fagosit kemudian mengeluarkan sinyal kimia yang disebut *cytokines* untuk menarik sel fagosit lain ke lokasi infeksi, kumpulan dari sitokin tersebut akan menginduksi kebocoran pada pembuluh darah di dekatnya, sehingga sel fagosit yang melewati pembuluh darah dapat meninggalkan sirkulasi dan bergerak ke arah situs infeksi untuk membantu menghadapi bakteri, komplemen juga ikut ke tempat terjadinya infeksi, yang bertugas menempel pada bakteri dan membuat sel fagosit lebih mudah untuk menelan bakteri (Moayeri *et al.*, 2015).

Pada *cutaneous anthrax*, sel-sel fagosit dan cairan yang bocor ke dalam kulit menghasilkan benjolan dan pembengkakan kulit pada lokasi situs infeksi. Limfonodi di sekitar tempat terjadinya infeksi, seperti di ketiak atau leher, dapat ikut mengalami pembengkakan akibat dari pertumbuhan *B. anthracis* dan akibat meningkatnya jumlah sel darah putih yang mencoba menelan bakteri tersebut (Liu *et al.*, 2018). Pada antraks kulit, sebagian besar bakteri masih berada pada tempat masuknya infeksi, sel fagosit mungkin masih bisa menelan dan membunuh semua bakteri dan Infeksi dapat dihilangkan tanpa pengobatan. Area hitam pada kulit, disebabkan oleh kumpulan dari sel-sel fagosit yang mati dan sel-sel kulit di sekitarnya, lesi tersebut akan menghilang karena sel-sel kulit baru menggantikan sel yang telah mati (Moayeri *et al.*, 2015).

#### a. Peran TNF- $\alpha$ pada Infeksi Antraks

*Tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) dikloning lebih dari 2 dekade yang lalu dan identifikasi menjadi awal penemuan *super family of tumor necrosis factors* (TNFs) dan reseptornya. Sinyal TNF- $\alpha$  melalui dua reseptor transmembran, TNFR1 dan TNFR2, dan mengatur sejumlah fungsi sel yang penting termasuk proliferasi sel, kelangsungan hidup, diferensiasi, dan apoptosis. Makrofag adalah produsen utama TNF- $\alpha$  dan juga sangat *responsif* terhadap TNF- $\alpha$ . Produksi TNF- $\alpha$  yang terganggu dan pensinyalan reseptor TNF telah dikaitkan dengan patogenesis beberapa penyakit, termasuk rheumatoid

arthritis, penyakit Crohn, aterosklerosis, psoriasis, sepsis, diabetes, dan obesitas. Hal ini membuktikan bahwa TNF- $\alpha$  memainkan peran penting dalam mengatur kaskade sitokin pada banyak penyakit inflamasi dan karena peran ini disebut sebagai “pengatur utama” produksi sitokin inflamasi, telah diusulkan sebagai target terapeutik untuk sejumlah penyakit, yang saat ini anti TNF- $\alpha$  dilisensikan untuk mengobati penyakit inflamasi tertentu termasuk rheumatoid arthritis (Parameswaran *et al.*, 2010).

TNF- $\alpha$  merupakan agen pro-inflamasi yang kuat. Produksinya dipicu oleh adanya trauma, infeksi, atau paparan LPS yang diturunkan dari bakteri, dan telah terbukti menjadi salah satu mediator awal yang paling banyak ditemukan pada jaringan yang mengalami inflamasi. Peran TNF- $\alpha$  yang paling penting dalam mengatur produksi kaskade sitokin pro inflamasi, oleh karena itu, TNF- $\alpha$  dianggap sebagai "pengatur utama" produksi sitokin pro inflamasi. Makrofag berpengaruh penting pada awal patogenesis antraks. Pada antraks inhalasi, spora difagositosis oleh makrofag alveolar, dan bergerak ke kelenjar getah bening regional. Spora berkembang biak di dalam makrofag, yang akhirnya menyebabkan lisis makrofag (Liu *et al.*, 2018). 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- $\alpha$  dilepaskan kurang lebih 5 jam setelah infeksi dan jumlah terus meningkat hingga 7,5 jam pasca infeksi. Tidak ada sitokin lain yang diinduksi pada infeksi makrofag oleh spora *B. anthracis* dengan pengecualian IL-12, yang meningkat secara signifikan antara 5 dan 7,5 jam pasca infeksi dengan spora dari strain 7702 (Pickering *et al.*, 2004).

*Lethal toxin* dianggap menyebabkan lisis makrofag, yang disertai dengan pelepasan sitokin, khususnya TNF- $\alpha$  dan IL 1 $\beta$ . Sitokin ini merupakan pemain utama yang bertanggung jawab atas syok septik

dan kematian mendadak pada infeksi antraks sistemik (Wu *et al.*, 2013). Fungsi dari TNF- $\alpha$  adalah sebagai sitokin dalam proses proliferasi sel, differensiasi, apoptosis, metabolisme lipid dan koagulasi, yang dapat dilihat dengan menggunakan pengecatan imunohistokimia, metode streptavidin dan biotin (Burnett dan Hunt, 2000).

#### **b. Peran *Caspase-1* pada Infeksi Antraks**

Keluarga *caspases* (*cysteiny aspartic proteases*) terdiri dari keluarga *protease sistein* (*caspase-1* hingga *caspase-10*, *caspase-12* dan *caspase-14* pada manusia), yaitu dikenal terutama karena peran esensial mereka dalam apoptosis (Li & Yuan, 2008). *Caspase-1* memainkan peran fundamental pada imunitas bawaan dan beberapa penyakit inflamasi penting, dimana protease mengaktifkan sitokin pro-inflamasi proIL-1 $\beta$  dan proIL-18. *Caspase-1* sendiri diaktifkan di kompleks *inflammasome* yang berbeda, yang berkumpul sebagai *respon* terhadap berbagai stresor eksogen dan endogen. Terdapat bukti bahwa *caspase-1* mendukung kelangsungan hidup sel dengan aktivasi NF- $\kappa$ B, induksi perbaikan membran dan regulasi sekresi protein tertentu yang tidak konvensional (Sollberger *et al.*, 2014).

Sebuah studi genetik pada tikus menunjukkan keberadaan empat inflamasi berbeda yang merespon keragaman *Pathogen Associated Molecular Pattern* (PAMP) dan DAMP. Kemudian *Inflammasome* berkumpul dan mengaktifkan *caspase-1* ketika DNA terdeteksi di kompartemen sitosol makrofag yang terinfeksi virus DNA *cytomegalovirus* dan virus vaksinia, atau patogen bakteri intraseluler fakultatif *Francisella tularensis*. *Inflammasome* NLRP3 diperlukan untuk aktivasi *caspase-1* dan sekresi IL-1 $\beta$ / IL-18 sebagai *respon* terhadap berbagai patogen bakteri, virus dan jamur, serta zat kristal yang relevan secara medis, dan pola molekuler terkait bahaya endogen yang memiliki telah dikaitkan dengan etiologi autoimun. Adanya

bakteri menyebabkan respon *Inflammasome* NLRP4, sehingga *inflammasome* ini terbukti bertanggung jawab untuk aktivasi *caspase-1* pada deteksi sitosol flagellin bakteri yang dikonservasi dari sistem sekresi bakteri tipe III yang diekspresikan oleh patogen intraseluler fakultatif seperti, *S. Flexneri* dan *P. Aeruginosa*. Adanya *inflammasome* NLRP1b penting untuk aktivasi *caspase-1* oleh LT, faktor virulensi kunci dari *B. anthracis* (Van Opdenbosch *et al.*, 2014).

*Anthrax lethal factor* merupakan komponen protease dari LT, yang menginduksi *pyroptosis* pada *strain* mencit. Pada mencit, sensitivitas terhadap kematian sel diinduksi oleh letal toksin yang ditentukan oleh adanya sekuens pembelahan LF, yang mengaktifkan *caspase-1* dan menyebabkan kematian sel (Hellmich *et al.*, 2012). Aktivasi *caspase-1* menginduksi pelepasan IL-1 $\beta$  dan IL-18. Sitokin seperti IL-1 $\beta$  meningkatkan permeabilitas endotel di *Blood Brain Barrier* (Xie, Auth and Frucht, 2011). Mikroorganisme patogen mengaktifkan *inflammasome* NLRP3 melalui beberapa agonis dan jalur. Adanya infeksi dari bakteri dan toksin menyebabkan aktivasi *inflammasome*, yaitu sensor intraseluler yang mendeteksi mikroba, faktor endogen dan gangguan dari lingkungan (Kim dan Jo, 2013).

Aktivitas NLRP3 diawali dengan sinyal pertama adanya PAMP, yang mengarah ke peningkatan regulasi transkripsi dari kanonikal dan non-kanonik NLRP3, sinyal kedua adanya PAMP atau (DAMPs), seperti partikulat, kristal dan ATP, eflux K<sup>+</sup>, fluks Ca<sup>+</sup>, lisosom, produksi *spesies oksigen reaktif mitokondria* (mtROS). Pembentukan *inflammasome* akan mengaktifkan *caspase-1*, yang selanjutnya memotong pro-IL-1 $\beta$  dan IL-18 (Swanson *et al.*, 2019).

Pada infeksi antraks diawali dengan adanya kapsul *poly- $\gamma$ -d-glutamic acid* (PGA), yaitu salah satu faktor virulensi utama *B. anthracis* yang menyebabkan infeksi yang sangat mematikan. Baru-baru ini, upaya telah dilakukan untuk memasukkan PGA sebagai komponen vaksin antraks. Dalam suatu studi, adanya respon imun



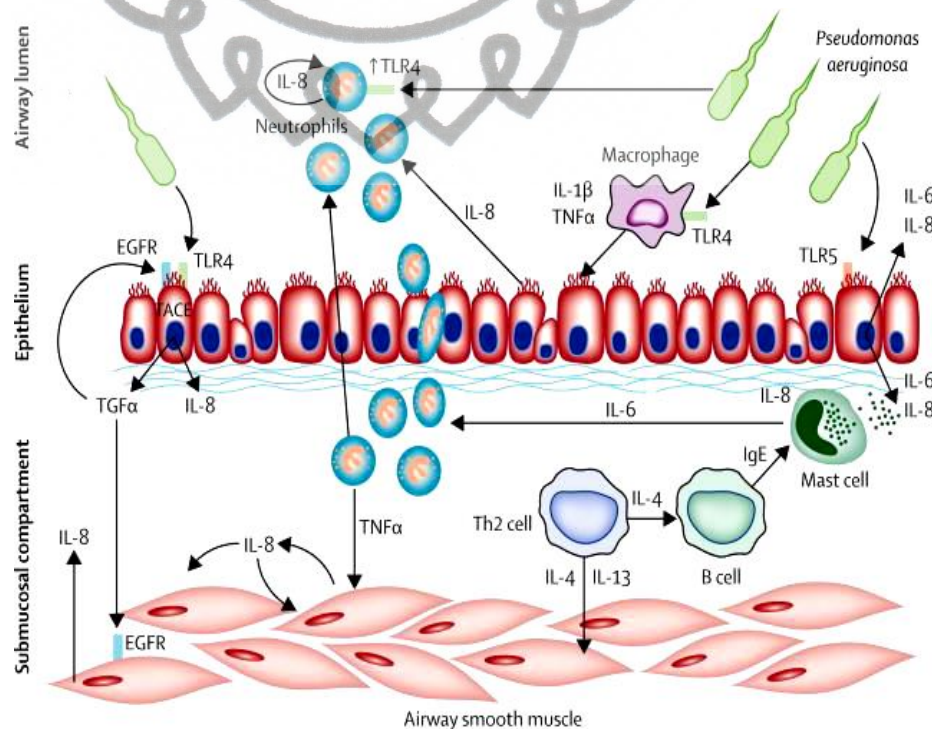
bawaan yang ditimbulkan oleh PGA dibedakan menjadi makrofag dengan *phorbol 12-myristate 13-acetate* (PMA) dan sel dendritik yang diturunkan dari monosit manusia. Kapsul PGA diisolasi dari supernatan kultur dari strain *B. anthracis*. Pemberian PGA menyebabkan pelepasan ekstraseluler spesifik dari IL-1 $\beta$ . Peningkatan IL-1 $\beta$  secara langsung berkorelasi dengan peningkatan aktivasi *caspase-1*, yang juga dikenal sebagai IL-1 $\beta$ -*converting enzyme* (ICE). Pelepasan ekstraseluler IL-1 $\beta$  sebagai *respon* terhadap PGA bergantung pada ICE karena pemberian ICE *inhibitor* sebelum pemberian PGA dapat memblokir induksi IL-1 $\beta$ . Hasil ini menunjukkan bahwa *B. anthracis* PGA dapat meningkatkan produksi IL-1 $\beta$  melalui aktivasi ICE, selain penting secara klinis dalam infeksi dan autoimunitas, tidak adanya adaptor *inflammasome* pada mencit BALB/c dan C57BL/6 yang mengekspresikan NLRP1b fungsional dapat mencegah LT yang diinduksi oleh *caspase-1* yang memiliki pengaruh penting untuk autoproteolisis dan sekresi IL-1 $\beta$  (Van Opdenbosch *et al.*, 2014).

### c. Peran IL-8 pada Infeksi Antraks

*Interleukin-8* adalah salah satu sitokin yang dilepaskan oleh fagosit dan sel jaringan saat ada paparan. Struktur IL-8 dibentuk dari 99 asam amino yang disekresi setelah adanya sinyal dari 20 residu, dengan berat molekulnya 8.383 D, yang mengandung empat sistein yang dibentuk dari dua jembatan sulfida. Sitokin ini tahan terhadap panas, pH ekstrim, peptida plasma, dan terapi denaturasi lain, namun cepat diinaktivasi saat berkurangnya ikatan disulfida. Strukturnya dapat dilihat dengan rontgen kristalografi dan spektroskopi magnetik resonansi nuklir. Jenis monomernya pendek, yang mengandung domain N-terminal dengan dua jembatan disulfida, dengan tiga ikatan  $\alpha$  helix terminal dan antiparalel  $\beta$  (Li J & Yuan J, 2008). Sitokin ini merupakan kemotaktik regulator pada neutrofil, yang diproduksi oleh

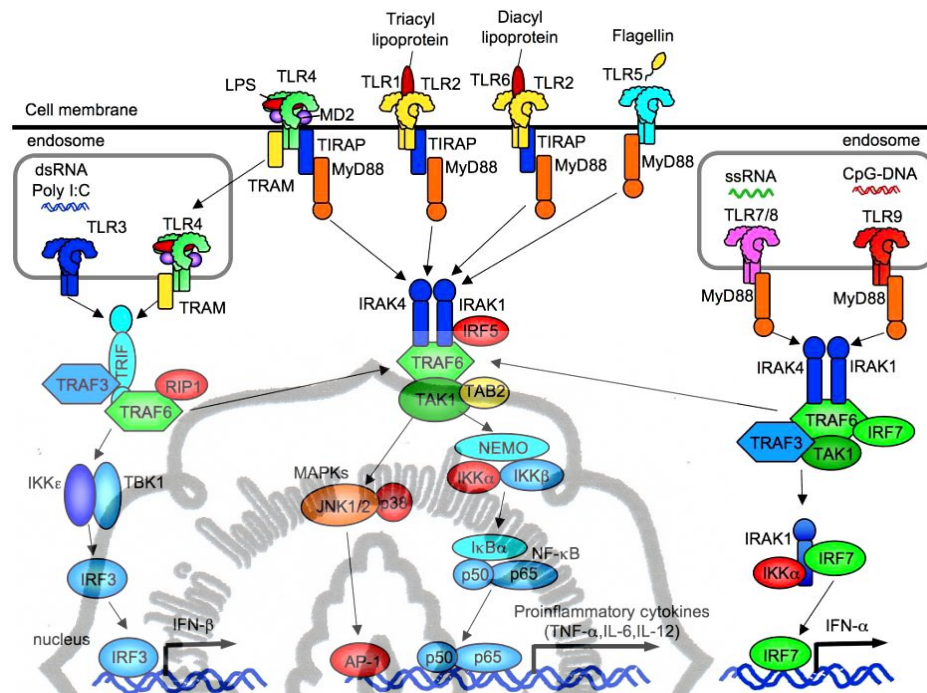
sel monosit, tipe sel leukosit lain: neutrofil, eosinofil, sel *Natural Killer*, sel mast, *fibroblast* dan sel endotelial, yang diinduksi oleh berbagai stimulus, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , agen infeksi, iskemia, sel neoplasma, trauma atau gangguan homeostasis jaringan (Li *et al.*, 2013).

Interleukin-8 telah lama dikenal memiliki aktivitas anti-inflamasi, yang telah terbukti pada berbagai model infeksi, peradangan, dan kanker. Beberapa jenis sel mengekspresikan reseptor untuk IL-8 dan berperan dalam menghasilkan molekul yang aktif baik secara lokal maupun sistemik. Peningkatan ekspresi IL-8 dan / atau reseptornya telah ditandai pada banyak kondisi inflamasi kronis, termasuk psoriasis, ARDS, COPD, dan RA serta banyak kanker, dan peningkatan regulasi sering berkorelasi dengan aktivitas penyakit. Interleukin-8 merupakan kelas kemokin CXC yang ampuh dan aktivator neutrofil dan sel imun lainnya (Qazi *et al.*, 2011).



**Gambar 2.6** Interleukin 8 pada *respon* inflamasi (McChuaig dan Martin, 2013).  
Keterangan : Adanya infeksi bakteri menyebabkan TLR4 mengaktifkan IL-8, dan peningkatan kadar TNF- $\alpha$  menyebabkan aktivasi pada IL-8.

Adanya infeksi *B. anthracis* memicu ekspresi IL-8 melalui jalur PAMP, merupakan bagian sistem kekebalan tubuh bawaan, yang terikat dengan *Toll like receptor* (TLR). Contoh PAMP adalah *Lipopolysaccharide* (LPS), suatu endotoksin membran pada bakteri gram negatif. *Lipopolysaccharide* secara khusus terikat TLR4, sedangkan *flagellin* akan terikat TLR5, sedangkan PAMP lain seperti bakteri gram positif, peptidoglikan dan *double-stranded RNA* (dsRNA) virus, akan terikat oleh TLR2 dan 3, sedangkan CpG *unmethylated* terikat oleh TLR9. Perbedaan tersebut akan mengakibatkan reaksi inflamasi yang ditimbulkan oleh bakteri, virus dan jamur (Min dan Dhong, 2013). *Toll Like Receptor* (TLR) 1, TLR2, TLR4, TLR5, dan TLR6 akan diekspresikan ke sel membran. *Toll Like Receptor* 3, TLR7, TLR 8, dan TLR9 diekspresikan dalam endosome. Semua TLR, dapat menginduksi NF- $\kappa$ B dan aktivasi p38/JNK, kecuali TLR3 (Yang dan Seki, 2012). Produksi IL-8 diatur melalui aktivasi dua faktor transkripsi, yaitu NF- $\kappa$ B dan AP-1. Faktor NF- $\kappa$ B memiliki peran di Th1 tergantung respon tipe *delayed hypersensitivity*. Aktivasi NF- $\kappa$ B akan meningkatkan VCAM-1, *E-selectin* dan ICAM-1, sedangkan penghambatan NF- $\kappa$ B mengurangi adhesi dan transmigrasi leukosit. Aktivasi NF- $\kappa$ B terlibat juga dalam apoptosis. Misalnya, aktivasi NF- $\kappa$ B dapat menyebabkan induksi apoptosis. Hal ini menunjukkan bahwa NF- $\kappa$ B merupakan regulator penting pada ekspresi sitokin pro-inflamasi. Sintesis TNF- $\alpha$ , IL-1  $\beta$ , IL-8, IL-6 dan *cyclooxygenase 2* (Cox-2) dimediasi oleh NF- $\kappa$ B (Liu *et al.*, 2013; McChaig dan Martin, 2013).



Gambar 2.7. Jalur Toll like receptor (Yang dan Seki., 2012).

Keterangan: IL-6: interleukin -6; TNF: Tumor Necrosis Factor Alpha; IRAK: interleukin-1 receptor-associated kinase; TLR4: Toll like receptor 4; Th2: T helper 2

#### d. Peran *E-selectin* pada Infeksi Antraks

*Selectin* adalah molekul yang diekspresikan pada sel endotel yang telah diaktifkan oleh sitokin. *E-selectin* berperan dalam proses rekrutmen leukosit yang bersirkulasi. Rekrutmen leukosit diawali dengan aktivasi endothelium vascular, dan ekspresi molekul adhesi termasuk selectins. Anggota dari lektin glikoprotein pada permukaan sel ini diekspresikan oleh sel *endothelial* (*E-selectin*), endotelium dan megakariosit/ trombosit (*P-selectin*), dan leukosit (*L-selectin*). Ekspresi basal dari *E-selectin* biasanya rendah dan beberapa mediator inflamasi, termasuk TNF- $\alpha$ , IL-1, CD40 *ligand* dan LPS, yang merangsang ekspresi dengan mengaktifkan transkripsinya. Aktivasi ini dimediasi melalui promotor yang bergantung pada NF- $\kappa$ B. Menariknya, stimulasi ekspresi *E-selectin* oleh TNF- $\alpha$ , IL-1, atau Ligan CD40 membuat sel endotel untuk sementara tidak *responif* terhadap rangsangan ulang dengan cara yang sama (Milstone *et al.*,



2000).

Pengukuran *E-selectin* menggunakan metode pemeriksaan imunohistokimia dengan antibodi monoklonal terhadap *E-selectin*. Cara penilaiannya secara kuantitatif visual dengan mikroskop cahaya pembesaran 400x pada sel yang mengekspresikan *E-selectin*, yang dihitung dari jumlah sel-sel tersebut yang imunoreaktif berwarna coklat perak pada membran sel, dan jumlah semua sel imunoreaktif yang ditemukan kemudian dilakukan skoring.

*Selectin* ini adalah lektin tipe C yang diekspresikan pada permukaan leukosit, trombosit dan sel endotel yang teraktivasi, dengan memicu penarikan leukosit dan trombosit pada endotel vaskular dan hal ini penting bagi limfosit yang menuju ke organ limfoid sekunder dan untuk perekrutan leukosit ke lokasi peradangan (McEver, 2002; Cummings dan McEver, 2009). *Selectin* ini terbagi menjadi tiga, yaitu: *L-selectin*, yang diekspresikan pada semua leukosit kecuali sel-T yang diaktifkan, *E-selectin* yang diekspresikan oleh endotel yang diaktivasi oleh sitokin dan *P-selectin*, yang diekspresikan oleh trombosit dan endotel yang teraktivasi. *E-selectin* diekspresikan dalam sel endotel yang distimulasi sitokin dengan mengenali sejumlah glikoprotein pada leukosit (Ivetic dan Ridley, 2004; Cummings dan McEver, 2009).

Aktivasi endotel terhadap *respon* inflamasi sistemik pada infeksi bakteri, yang diawali dengan pelepasan penanda endotel yang larut ke dalam sirkulasi, ditandai dengan peningkatan kadar CAMs dalam plasma (Golias *et al.*, 2007). Infeksi antraks akan menghasilkan toksin, yaitu *lethal toxin*, yang merupakan faktor virulensi utama dari *B anthracis*, dimana akan meningkatkan ekspresi *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) pada sel endotel manusia sebagai *respon* imun dan menyebabkan timbulnya vaskulitis (Warfel dan D'Agnillo, 2008).

e. Peran *Malondialdehyde* pada infeksi antraks



Stress oksidatif adalah keadaan dimana terjadi adanya perbedaan antara jumlah oksidan dan antioksidan, dengan jumlah oksidan yang lebih tinggi. Oksidan merupakan senyawa reaktif yang dapat memindahkan elektron dari molekul lain (Ayala *et al.*, 2014). Hal ini menyebabkan kerusakan seluler dan molekuler yang selanjutnya menyebabkan kerusakan jaringan (Chaple dan Matthews, 2007). Adanya ROS 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, *antiprotease*,  *$\alpha$ -antitripsin*, stimulasi pelepasan sitokin proinflamasi oleh monosit dan makrofag dengan menipiskan senyawa tiol intraseluler dan mengaktifkan faktor inti). Stress oksidatif umumnya muncul setelah terpapar ROS dengan konsentrasi yang relatif tinggi dan/atau penurunan sistem pertahanan antioksidan terhadap ROS.

*Malondialdehyde* merupakan produk akhir dari peroksidasi lipid dalam tubuh. Kadar MDA tinggi menunjukkan adanya stress oksidatif di awal proses terjadinya penyakit (Durackova and Zdenka, 2009). Pada saat terjadi stress oksidatif, ROS dan *Reactive halogen species* (RNS), dapat menyerang asam lemak tak jenuh ganda dari membran lipid yang menyebabkan peroksidasi lipid dan disorganisasi struktur dan fungsi sel. Peroksidasi lipid adalah mekanisme cedera sel yang digunakan sebagai indikator stres oksidatif dalam sel dan jaringan. Peroksida lipid yang berasal dari asam lemak tak jenuh ganda tidak stabil dapat terurai membentuk serangkaian kompleks produk degradasi. Diantaranya, senyawa karbonil reaktif merupakan MDA yang paling melimpah (El-Badry, 2006). Beberapa penelitian telah menunjukkan bahwa MDA merupakan komponen pengukuran peroksidasi lipid yang bersifat akurat, stabil dan dapat menjelaskan pengaruh stres oksidatif pada suatu penyakit (Mulianto, 2020).

Manusia memiliki sistem keseimbangan antara oksida dan

antioksidan secara terorganisir dan sinergis, baik antioksidan enzimatis maupun non-enzimatis. Antioksidan melindungi sel tubuh terhadap kerusakan oksidatif dan dapat mencegah pengeluaran produk oksidatif. Pada sistem pertahanan enzimatis, *catalase* (CAT), *glutathione peroxidase* (GPx), dan *superoxide dismutase* (SOD) memainkan pengaruh utama. Sel dan plasma memiliki *free radical scavengers non-enzimatis* seperti vitamin C dan E dan kelompok sulfhidril (Durackova and Zdenka, 2009). Antioksidan adalah molekul yang memiliki kemampuan untuk mengimbangi efeknya oksidan sebelum ini menyerang sel. Ada sistem antioksidan yang sangat kompleks dalam sel manusia, bekerja sama untuk melindungi tubuh akibat radikal bebas (Mulianto, 2020).

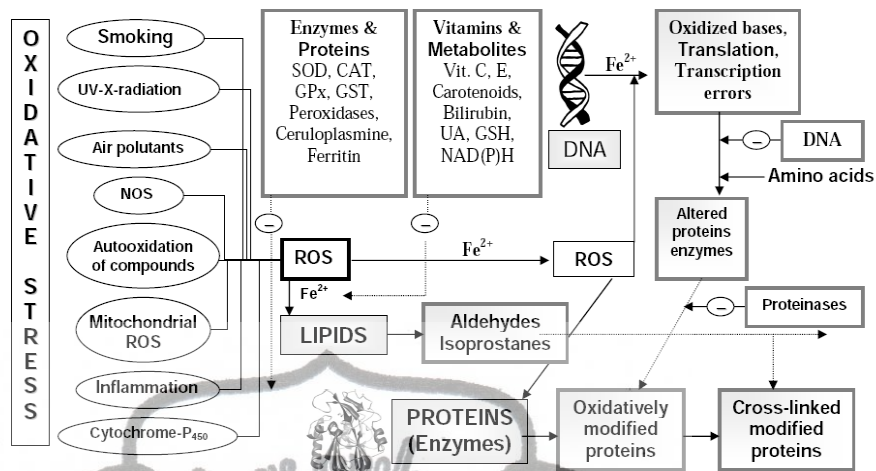
Antioksidan dapat bersifat endogen atau eksogen, sebagai bagian dari diet atau melalui suplemen makanan. Mereka bisa juga dikonsumsi sebagai senyawa yang tidak menetralkan radikal bebas, melainkan meningkatkan aktivitas endogen (Durackova dan Zdenka, 2009). Menghitung kadar MDA merupakan cara menilai radikal bebas secara tidak langsung dan cukup mudah. Analisis radikal bebas secara langsung sangat sulit karena senyawa radikal ini sangat tidak stabil dan cenderung merebut elektron senyawa lain agar lebih stabil. Reaksi ini berlangsung sangat cepat, sehingga pengukurannya sangat sulit (Durackova dan Zdenka, 2009).

*Malondialdehyde* ini ditemukan pada seluruh cairan di dalam tubuh, antara lain urin, plasma, cairan sendi, cairan empedu, cairan getah bening, cairan amnion, cairan perikardial, dan cairan seminal. Plasma dan urin merupakan sampel yang paling umum digunakan karena paling mudah didapat dan paling tidak invasif. *Malondialdehyde* merupakan marker yang sering digunakan dalam penelitian, karena dianggap sebagai marker peroksidasi *lipid in vivo* yang baik, pada manusia maupun pada binatang, yang signifikan akurat dan stabil dibandingkan senyawa lainnya. *Malondialdehyde*

digunakan sebagai biomarker untuk stress oksidatif dengan alasan, yaitu : (1) kadar MDA akan meningkat sejalan dengan proses stres oksidatif, (2) jumlahnya dapat diukur secara akurat, (3) mempunyai sifat stabil dalam sampel cairan tubuh yang diisolasi, (4) merupakan produk spesifik dari peroksidasi lemak, (5) tidak dipengaruhi oleh adanya variasi diurnal dan tidak dipengaruhi oleh kandungan lemak dan (6) ada dalam jumlah yang dapat terdeteksi pada semua jaringan tubuh, sehingga memungkinkan untuk menentukan referensi interval. Pada infeksi antraks, kadar MDA meningkat secara signifikan (Karadas *et al.*, 2016).

#### **f. Manifestasi Infeksi Antraks di Kulit**

*Cutaneous anthrax* merupakan 95% kasus yang terjadi di dunia, diawali dengan infeksi oleh spora bakteri batang gram positif *B. anthracis* yang masuk melalui lesi kulit berupa abrasi, luka, atau gigitan serangga (Dun dan Rosen, 2019). Spora akan berubah menjadi bentuk vegetatif di jaringan subkutan, yang kemudian membelah, menghasilkan eksotoksin, yang dapat menyebabkan terjadinya edema dan nekrosis. Spora yang di fagositosis makrofag akan berubah menjadi bentuk vegetatif kemudian dibawa ke kelenjar getah bening regional dan menimbulkan limfadenitis hemoragik, selanjutnya menyebar secara hematogen dan limfogen sehingga dapat menyebabkan septikemia dan toksemia (Tanzil, 2013).



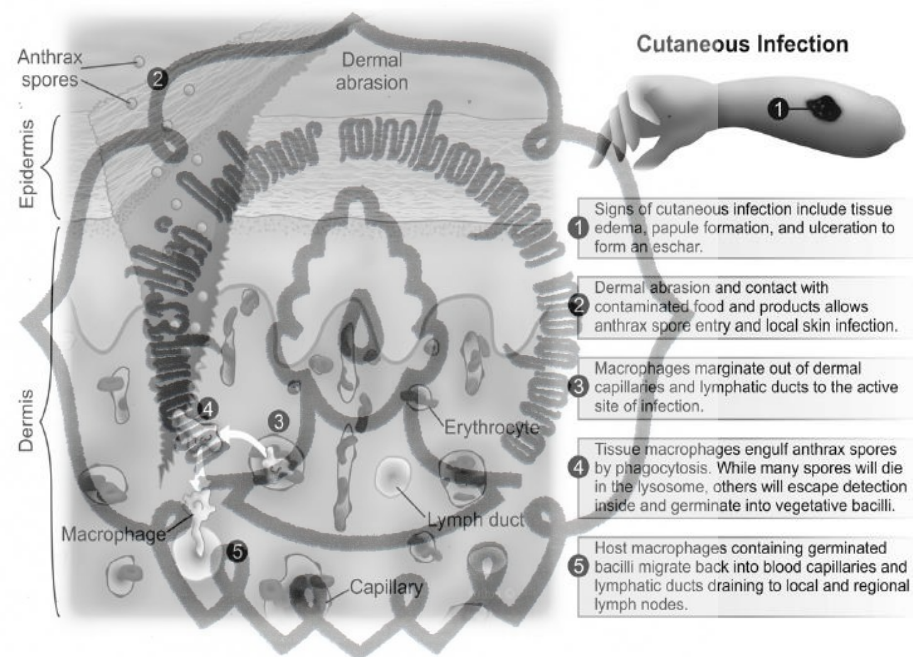
**Gambar 2.8** Faktor-faktor Penyebab Stress Oksidatif (Durackova and Zdenka, 2009)

Keterangan: Faktor merokok, radiasi, ROS, inflamasi dapat menyebabkan terjadinya stress oksidatif. ROS = *reactive oxygen species*

Antraks kulit ini sering disebut sebagai *black eschar*. Penderita biasanya mempunyai riwayat kontak dengan hewan atau produk hewan tersebut. Lesi pertama terjadi dalam waktu tiga sampai lima hari pasca inokulasi spora, yang sering terjadi pada daerah terbuka, yaitu pada ekstremitas atas dan bawah, terutama tangan, jari, betis, tungkai, wajah dan leher (Tekin *et al.*, 2015). Secara klinis, antraks muncul sebagai papula eritema atau pruritus tanpa rasa sakit yang mirip dengan gigitan serangga dan berkembang menjadi lesi ulserasi dengan *eschar* sentral (Tekin *et al.*, 2015; Dun dan Rosen., 2019). Dalam waktu 12-36 jam setelah infeksi akan timbul papula, selanjutnya dalam kurun waktu 24-36 jam, papula berubah menjadi vesikel yang berisi cairan berwarna biru gelap dan membentuk cincin vesikel diikuti oleh ulserasi papula sentral yang mengering dan meninggalkan bekas berupa *eschar* kehitaman pada bagian pusat lesi yang khas disekitar ulkus disertai adanya eritema dan edema (Tanzil, 2013; Timofeev *et al.*, 2019).

Lesi kulit antraks tidak gatal dan tidak nyeri. Biasanya, pada hari kelima atau keenam *eschar* kehitaman akan menebal dan melekat erat pada jaringan dasarnya. Terdapat limfadenopati regional dan juga terjadi pembengkakan di wajah atau leher yang bisa berkembang

menjadi meningitis. Demam, nanah dan nyeri terjadi jika terdapat infeksi sekunder. Ditemukannya lesi eritema dan nyeri pada daerah radang biasanya menunjukkan infeksi sekunder oleh kuman lain seperti *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus sp.* (Timofeev *et al.*, 2019).



**Gambar 2.9** Proses infeksi antraks di kulit (Gupta, 2020).

Keterangan: proses masuknya infeksi anthrax pada kulit, dimulai dari abrasi pada dermal, kemudian proses imunologi yang terjadi yang pada akhirnya terjadi *eschar* berwarna hitam.

Lesi antraks kulit umumnya sembuh sendiri tanpa meninggalkan parut. Komplikasi antraks kulit adalah terjadinya bula multipel disertai edema hebat dan renjatan. Edema maligna ini jika mengenai leher dan di dalam dada akan menyebabkan gangguan pernafasan. Pada pemeriksaan histologik, antraks kulit memperlihatkan nekrosis, edema hebat dan infiltrasi limfosit (Tanzil, 2013). Proses infeksi kulit dimulai sebagai akibat dari spora antraks yang berkoloni di kulit. Lesi berkembang menjadi *eschar* hitam tanpa rasa sakit. *Eschar* ini biasanya berkembang dalam 2-5 hari setelah terpapar. Selama tahap infeksi ini, germinasi spora tingkat rendah dapat terjadi di tempat



utama infeksi yang menyebabkan edema dan nekrosis lokal. Meskipun infeksi ini seringkali tetap terlokalisasi, beberapa pasien mengalami gejala sistemik.

Penyakit sistemik akibat antraks kemungkinan disebabkan oleh fagositosis oleh makrofag di dermis yang keluar dari saluran limfatik dan kapiler darah. Pada infeksi antraks kulit, germinasi umumnya terjadi langsung di dalam inang. Makrofag inang yang membawa *B. anthracis* bermigrasi kembali ke pembuluh darah dan duktus limfatik menuju ke kelenjar getah bening lokal dan regional (Misgie *et al.*, 2015). Tahapan terjadi luka pada antraks kulit adalah (Suggu dan Konakanchi, 2020) :

- a. Setelah masa inkubasi sekitar 7 hari (kisaran waktu 1-12 hari), antraks kulit dimulai sebagai papula, biasanya di area yang terbuka, seperti kepala, leher atau ekstremitas atas. Papula dapat menyerupai gigitan serangga atau laba-laba dan gatal.
- b. Papula membesar dan berkembang menjadi vesikula sentral atau bula, *non pitting* edema.
- c. Vesikel sentral menjadi hemoragik, nekrotik dan dapat dikelilingi oleh vesikula satelit.
- d. Bentuk *eschar* hitam sentral dan eritema serta edema di sekitarnya meningkat. Ulkus nekrotik biasanya tidak menimbulkan rasa sakit yang merupakan ciri pembeda penting dari gigitan laba-laba lainnya yang menyerupai infeksi antraks kulit.
- e. Pustula jarang ditemukan pada lesi antraks. Lesi primer yang muncul berupa papula atau vesikel.
- f. Lesi berkembang dari papula ke vesikula menjadi ulkus ke *eschar* dengan atau tanpa terapi antibiotik karena perkembangannya dipengaruhi oleh produksi toksin *B. anthracis*.
- g. Lesi kulit dapat soliter atau multipel. Jika lesi multipel biasanya ditemukan di bagian tubuh yang sama.

- h. Gejala klinis limfadenopati regional, *fatigue*, demam, dan/atau menggigil dapat menyertai infeksi antraks kulit.

## 8. Propolis Gunung Lawu

Lebah madu dapat menghasilkan berbagai manfaat, antara lain madu, propolis, *bee pollen* dan *royal jelly*. 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, sedangkan *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 berpengaruh penting dalam perubahan morfologis larva menjadi lebah ratu. Makanan super ini yang berpengaruh pada umur panjang ratu lebah dibandingkan dengan lebah lainnya (Kocot *et al.*, 2018).

Propolis merupakan resin yang dikumpulkan dari berbagai sumber tanaman untuk kemudian dicampur dengan air liur lebah madu dan menghasilkan produk lebah yang bermanfaat (Marcucci *et al.*, 2001; Salatino *et al.*, 2005). Bentuk, aroma dan komposisi kandungan propolis sangat bervariasi, tergantung dari banyak faktor. Warna propolis dapat putih kekuningan, coklat, kuning atau hijau. Beberapa sampel memiliki tekstur, rapuh keras, elastis dan kenyal. Kata propolis berasal dari bahasa Yunani, *pro* yang berarti pertahanan dan *polis* berarti kota, sehingga propolis dapat diartikan produk yang terlibat dalam pertahanan dari lebah (Salatino *et al.*, 2005), yang juga merupakan bahan dalam pembuatan, pemeliharaan dan perlindungan sarangnya (Marcucci *et al.*, 2001). Kualitas propolis tergantung dari letak geografi dan lingkungan (Pereira *et al.*, 2009). Komposisinya juga dipengaruhi oleh banyak faktor, antara lain jenis tanaman, musim dan faktor lingkungan (jenis tanah, cuaca, faktor

genetik serta metode pengolahan). Hal ini menyebabkan propolis sangat bergantung pada lokasi dan lingkungan (Baltrusaityte *et al.*, 2007).

Unsur utama propolis adalah lilin lebah dan resin yang berasal dari tanaman. Aktivitas biologisnya ditentukan oleh zat tanaman ini berasal, sehingga meskipun propolis jelas merupakan produk binatang, proporsi yang cukup besar dari komponen yang berpengaruh dalam menentukan aktivitas biologisnya. Resin merupakan kandungan terbanyak yang dapat ditemukan dalam ekstrak alkohol, yang dihasilkan dari berbagai negara sebagai makanan pelengkap atau alternatif (Salatino *et al.*, 2005). Senyawa yang ada dalam propolis, yaitu resin (50%), lilin (30%), minyak esensial (10%), serbuk sari (5%) dan senyawa organik lainnya (5%) (Sivasubramaniam dan Seshadri, 2005; G´omez-Caravaca *et al.*, 2006). Produk dari lebah mempunyai efek sebagai antioksidan, antara lain flavonoid, *cinnamic acid* dan terpenoid (Kocot *et al.*, 2018). Senyawa tersebut berpengaruh dalam aktivitas biologis, antara lain sebagai antioksidan, anti-inflamasi, antiparasit, antiproliferatif antifungal dan antiprotozoa (Lotfy, 2006 ; El-Bassuony dan Abouzid., 2010). Propolis merupakan sumber potensial antioksidan alami seperti asam fenolat dan flavonoid. Efek biologisnya yang luas telah dikenal dan digunakan sejak jaman dahulu, antara lain efek dalam stres antioksidan, yang mendasari penyakit, seperti kanker, diabetes, dan aterosklerosis (Kurek *et al.*, 2013). Pengaruh faktor biologi, zona geografi, lingkungan, musim serta jenis larutan ekstraksi dapat memengaruhi jumlah dan kualitas produksi propolis (Pereira *et al.*, 2009 ; Kocot *et al.*, 2018)

Propolis terdiri dari bagian paling dalam, di mana terdapat sisir, dilapisi dengan lapisan tipis propolis (resin tanaman yang dicampur dengan lilin) menciptakan “selubung propolis” di sekitar koloni (Simone-Finstrom dan Spivak, 2010). Propolis yang dikenal juga sebagai “*bee glue*”. Propolis berfungsi sebagai penutup lubang dan retakan dalam rekonstruksi sarang lebah, menghaluskan permukaan bagian dalam sarang lebah, mempertahankan suhu di dalam sarang (35°C), mencegah

pelapukan dan invasi oleh predator, yang menjadi lunak dan lengket saat dipanaskan, serta memiliki bau yang khas (Pasupuleti *et al.*, 2017).

*Caffeic Acid Phenethyl Ester* merupakan antioksidan fenolik, yang memperlihatkan aktivitas anti-inflamasi (Armutcu *et al.*, 2015), antiviral dan anti-tumor (Ulasli *et al.*, 2013) dan , merupakan penghambat yang poten dan spesifik terhadap aktivasi NF- $\kappa$ B (Fitzpatrick *et al.*, 2001). Adanya peningkatan ROS atau NF- $\kappa$ B dapat diminimalkan dengan pemberian CAPE (Murtaza *et al.*, 2014), yang juga dapat menghalangi produksi ROS pada neutrofil manusia dan dalam sistem *xanthine oxidase* pada konsentrasi 10 mol/L (Irmak *et al.*, 2003). Zat aktif lainnya adalah *quersetin*, yang dapat mengurangi produksi *nitric oxide* (NO) yang di induksi lipopolisakarida, ekspresi *inducible nitric oxide synthase* (iNOS), dan pelepasan TNF- $\alpha$  serta IL-6, sehingga dapat mengurangi aktivasi MAPK dan NF- $\kappa$ B, yang merupakan kompleks faktor transkripsi yang sangat berpengaruh dalam ekspresi gen-gen pro-inflamasi (Lee *et al.*, 2010).

Total kandungan yang terdapat pada EEP Gunung Lawu adalah CAPE sebanyak  $30,24 \pm 3,53 \times 10^{-6}$  g dan *quersetin* sebanyak  $4,42 \pm 0,50 \times 10^{-6}$  g (Sarsono *et al.*, 2012). Efek anti-inflamasi ditunjukkan pada hasil penelitian yang menyatakan pemberian propolis Gunung Lawu dapat menurunkan HMGB-1 pada mencit model infertilitas jantan. Efek EEP sebagai antioksidan telah terbukti pada dosis 200 mg/kgBB/hari yang diberikan selama 30 hari, dapat menurunkan kadar MDA serum, serta memperbaiki luka pada mencit Balb/C model kaki diabetik (Diding *et al.*, 2013).

Propolis ini tidak dapat langsung digunakan, namun harus dilakukan pemurnian melalui ekstraksi menggunakan pelarut (Pietta *et al.* 2002). Penelitian Cunha dalam Sforcin dan Bankova (2011) menyatakan bahwa pelarut berbeda akan menghasilkan komponen yang berbeda serta berpengaruh terhadap aktivitasnya. Saat ini propolis dapat diekstrak dengan menggunakan air dan etanol pada berbagai konsentrasi sebagai

pelarut. *Isosaquranetin*, *quersetin* dan *kaempferol* pada umumnya diekstrak dari campuran propolis dengan etanol 60%. Etanol 70% umumnya digunakan untuk mengekstrak *pinocembrin* dan sakuranetin. Etanol 80% digunakan untuk mengekstrak *kaempferide*, *acacetin*, dan isorhamnetin dari propolis. Propolis yang diekstrak dengan etanol 60-80% sangat menghambat pertumbuhan mikroba dan yang diekstrak dengan etanol 70-80% mempunyai aktivitas antioksidan terbesar. Adapun 80% ekstrak etanol propolis sangat menghambat aktivitas enzim *hyaluronidase*. Konsentrasi tertinggi senyawa fenolik diperoleh dengan menggunakan pelarut etanol pada konsentrasi yang lebih rendah dan konsentrasi propolis mentah yang lebih tinggi. Etanol merupakan pelarut yang sering, namun memiliki beberapa kelemahan, seperti memiliki bau yang kuat, rasa yang tidak enak, dan konsentrasi etanol yang tinggi (Cottica *et al.*, 2011).

Konsentrasi rata-rata CAPE pada EEP adalah 12,268 µg/mL dan konsentrasi rata-rata CAPE pada propolis ekstrak air sebesar 5,564 µg/mL. Hal tersebut terlihat bahwa konsentrasi CAPE pada EEP lebih tinggi daripada ekstrak air (Hastuti *et al.*, 2013). Kandungan CAPE di wilayah Karanganyar adalah  $30,24 \pm 3,53 \times 10^{-6}$  g, lebih tinggi dibandingkan wilayah lain, misalnya Sragen, dengan kandungan  $12,40 \pm 0,77 \times 10^{-6}$  g atau Wonogiri, dengan kandungan  $17,00 \pm 1,84 \times 10^{-6}$  g. Kandungan CAPE ini lebih dipengaruhi oleh jenis tanamannya dan bukan dari ketinggian wilayahnya (Hadinoto *et al.*, 2013).

Dosis propolis dibedakan berdasarkan penggunaannya, yaitu untuk jangka pendek dan jangka lama. Perhitungan dosis didasarkan pada asupan polifenol total rata-rata pada manusia, yang diperkirakan antara 600 hingga 1800 mg/hari, kemudian perkiraan rata-rata asupan harian propolis, yang berkisar 0,5-1,0 g. Konsentrasi polifenol yang terjadi dalam sampel propolis yang diuji (7,21 mg/g). 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. Dosis propolis pada hewan diperoleh dengan 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, sehingga 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. Untuk penggunaan jangka panjang dapat digunakan dosis 100 mg/kg (sesuai dengan 30% polifenol yang biasanya dikonsumsi dengan propolis), 250 mg/kg (setara dengan 70% polifenol yang biasa dikonsumsi dengan propolis) atau 500 mg/kg (setara dengan 140% polifenol yang biasa dikonsumsi dengan propolis). Selama 30 hari. Analisis dilakukan pada sampel plasma yang diambil satu jam setelah asupan propolis terakhir setelah pemberian, menunjukkan tidak adanya komponen propolis (Curti *et al.*, 2019).

Propolis yang digunakan pada penelitian berasal dari lereng Gunung Lawu, dari peternak lebah di Kecamatan Kerjo, Kabupaten Karanganyar, Surakarta. Pembuatan ekstrak dilakukan di Laboratorium PAU UGM Yogyakarta, yaitu dengan metode maserasi. Cara metode maserasi adalah propolis kering dibersihkan dan diblender hingga halus, kemudian ditimbang sebanyak 500 g, dan dimasukkan ke dalam gelas beaker. Selanjutnya ditambahkan 3,75 liter etanol 70% sebagai pelarut. Campuran yang dihasilkan, kemudian disimpan dalam tujuh hari, pada ruangan tanpa sinar matahari, kemudian dikocok atau diaduk dengan spatula sebanyak

dua kali tiap hari (Trusheva *et al.*, 2007). Tahap selanjutnya dilakukan penyaringan dengan corong *buchner* dan kertas saring untuk memisahkan filtrat dari ampas ke dalam tabung erlemeyer sehingga diperoleh filtrat. Hasil filtrasi (penyaringan) yang didapat dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 45°C dengan tekanan vakum (<1 atm) selama kurang lebih 4 jam sehingga diperoleh ekstrak propolis yang konsentrasinya kental ( $\pm 100$  g). Selanjutnya ekstrak propolis diuapkan selama 24 jam di dalam gelas beaker sehingga kandungan etanolnya menguap (Fu *et al.*, 2005).

Pemberian propolis pada infeksi antraks belum pernah dilakukan, analisis pada *respon* inflamasi dan stress oksidatif merupakan fokus utama penelitian ini. Propolis telah digunakan sejak dahulu kala antara lain untuk pengobatan, produk makanan dan kosmetik. Faktanya, berbagai sifat biologis propolis telah dibuktikan sebagai antibakteri, antijamur, antiprotozoa, antioksidan, antitumor, anti-inflamasi, anestesi, penyembuhan luka, imunomodulator, antiproliferative dan antikariogenik (Toreti *et al.*, 2013; Vijay, 2013; Mohamad *et al.*, 2015; Jose, 2016). Komposisi kimia propolis sangat dipengaruhi oleh jenis vegetasi yang dikunjungi lebah dan musim. Propolis umumnya terdiri 50-60% resin dan balsam, 30-40% lilin, 5-10% minyak esensial dan aromatik, 5% serbuk sari, dan 5% senyawa lain (Jose, 2016). Studi menunjukkan bahwa propolis berfungsi sebagai anti-inflamasi yang ampuh untuk peradangan akut dan kronis (Vincenzo *et al.*, 2017). Zat terkandung dalam propolis yang dapat menghambat siklooksigenase karena prostaglandin (Vijay, 2013; Washio *et al.*, 2015). Pengujian berbasis antibodi ini biasanya divalidasi terhadap pengukuran MDA dengan *high-performance liquid chromatography* (HPLC) dan menunjukkan kinerja yang baik dengan peningkatan spesifisitas (Kandar and Stramova, 2015, Washio *et al.*, 2015).

Propolis mentah mengandung zat pengotor seperti kayu, lilin, serbuk sari bahkan lebah yang mati, sehingga perlu dilakukan pengamatan

makroskopis terhadap sampel untuk menghilangkan komponen tersebut dan memurnikannya sebelum preparasi ekstrak. Pelarut yang sering digunakan untuk ekstraksi adalah alkohol, yaitu metanol dan etanol. Pelarut yang paling sering digunakan adalah etanol 70% (Sforcin dan Bankova, 2011). Air juga telah digunakan sebagai pelarut, namun air melarutkan sebagian kecil unsur propolis, sekitar 10% dari beratnya, sedangkan 70% etanol dapat melarutkan 50–70%. Ekstrak propolis dibuat dengan cara maserasi (Trusheva *et al.*, 2007).

Ekstraksi adalah proses memindahkan satu atau lebih senyawa yang dari lokasi aslinya ke lokasi yang terpisah secara fisik. Pada dasarnya, proses ini memisahkan suatu senyawa dari zat padat, cair atau gas menjadi pelarut yang berbeda. Isolasi adalah teknik pemisahan di mana kita dapat memperoleh senyawa yang dimurnikan. Karena itu kita dapat menyebutnya “pemurnian” juga. Dalam teknik ini, kita dapat menghilangkan semua zat asing atau yang terkontaminasi untuk mendapatkan senyawa yang diinginkan (Trusheva *et al.*, 2007).

Perbedaan lain antara ekstraksi dan isolasi adalah bahwa kemurnian produk akhir dalam ekstraksi rendah sedangkan pada Teknik isolasi, kemurnian produk akhir lebih tinggi. Beberapa teknik yang dapat kita gunakan untuk ekstraksi termasuk ekstraksi cair-cair menggunakan corong pemisah, ekstraksi cair-padat, sedangkan teknik untuk isolasi meliputi distilasi, pemurnian afinitas, filtrasi, dan lain-lain (Altemimi *et al.*, 2017).

## 9. Tikus Putih *Rattus norvegicus*

Tikus adalah spesies yang telah menjadi model genetik mamalia pilihan sejak lama, dengan fokus awal pada sifat monogenik. Model tikus dari sifat dan penyakit monogenik juga telah diisolasi tetapi tikus pada dasarnya telah menjadi model penting studi sifat kompleks di bidang seperti fisiologi, penelitian kardiovaskular dan diabetes, arthritis, farmakologi, toksikologi dan onkologi (Szpirer, 2020).

Sifat tikus jenis *Rattus norvegicus* antara dapat mencapai

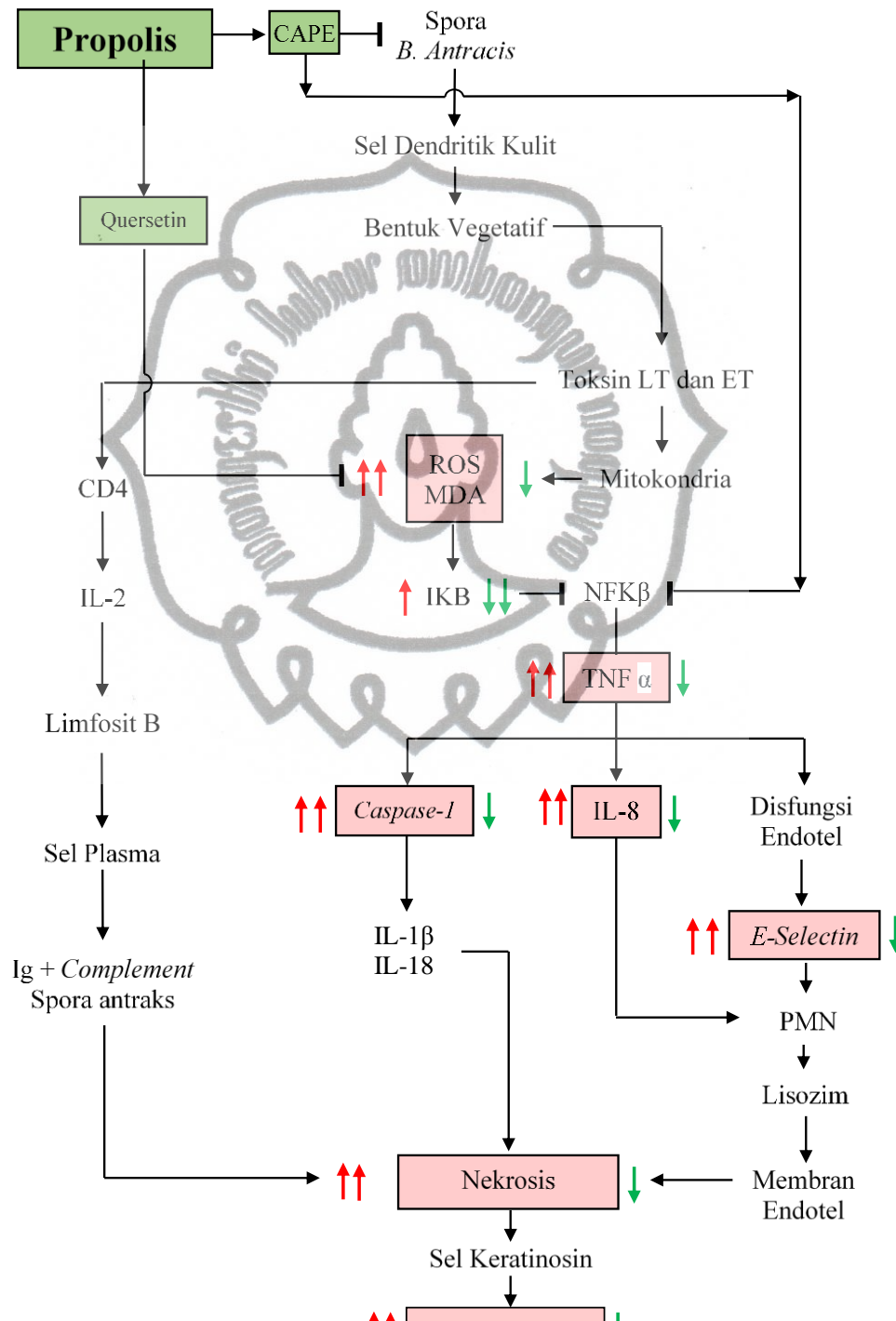
kematangan seksual sekitar 11 minggu, bunting selama 21-24 hari, dan melahirkan sekitar 7 atau 8 ekor anak. Tikus betina membangun sarang sebelum melahirkan, dan tikus muda dilahirkan hampir telanjang, buta dan sangat bergantung pada induknya. Tikus kecil mulai meninggalkan sarang dan menelan makanan padat sekitar 14 hari setelah lahir. Tikus ini dapat berkembang biak sepanjang tahun dan memiliki 3–5 anak per tahun. Harapan hidupnya lebih dari 1 tahun (Modlinska dan Pisula, 2020).

Tikus Norwegia terutama aktif di malam hari. Tikus ini lebih menyukai tempat kecil, gelap, terbatas, dan menghindari bergerak di ruang terbuka dan cukup terang. Tikus Norwegia cenderung bergerak dengan empat anggota tubuh dengan bulu dan kumis bersentuhan dengan dinding dan benda-benda besar. Tikus tidak memiliki kelenjar keringat dan mengatur suhu tubuhnya melalui tingkah laku, misalnya dengan bersembunyi di liang. Ekor yang berambut jarang juga berpengaruh dalam termoregulasi (Modlinska dan Pisula, 2020).

Pada tikus, sinyal sensorik utama adalah sentuhan dari kumis wajah (atau *vibrissae*) dan indra penciuman yang berkembang dengan baik. Tikus liar Norwegia memiliki penglihatan yang relatif buruk dan sensitif terhadap cahaya tajam. Mereka memiliki penglihatan warna dichromatic berkat dua kelas sel kerucut pada retina: satu sensitif terhadap sinar ultraviolet dan yang lainnya paling sensitif terhadap panjang gelombang tengah dari spektrum yang terlihat, seperti warna hijau. Mereka dapat mendeteksi suara antara sekitar 0,25–80 KHz yang memungkinkan mereka untuk berkomunikasi dengan ultrasound. Suara ini tidak dapat didengar oleh manusia tanpa menggunakan peralatan khusus (Modlinska dan Pisula, 2020). Tikus ini merupakan salah satu jenis tikus yang sensitif terhadap *anthrax toxin receptor 2* (Antxr2) (Scobie *et al.*, 2006).

## B. Kerangka

### Teori







Gambar 2.10. Kerangka Teori

commit to user



**Keterangan:**

ET	: <i>Edema Toxin</i>
Ig	: <i>Immunoglobulin</i>
IKB	: <i>Inhibitor Nuclear Factor NF-<math>\kappa</math>B</i>
IL-8	: <i>Interlukin 8</i>
IL-1 $\beta$	: <i>Interlukin 1 beta</i>
LT	: <i>Lethal Toxin</i>
PMN	: <i>Neutrofil Polimorfonuklear</i>
ROS	: <i>Reactive Oxygen Species</i>
TLR4	: <i>Toll Like Reseptor 4</i>
TNF $\alpha$	: <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>
NFKB	: <i>Nuclear Factor NF-<math>\kappa</math>B</i>
MDA	: <i>Malondialdehyde</i>
MMP	: <i>Matrix Metalloproteinase</i>
	: Variabel yang diteliti
	: Variabel bebas
	: Menghambat
	: Memicu

**Penjelasan Kerangka Teori**

Pada tikus model *cutaneous anthrax* akan terjadi peningkatan sitokin pro- inflamasi IL-8 dan TNF alfa di sel dendrit. Peningkatan IL-8 akan memacu produksi CD4, sehingga merangsang Th1 untuk melepaskan IL-2. Adanya peningkatan IL-2, yang memicu sel beta untuk menghasilkan imunoglobulin dan komplemen. Komplemen ini memicu terjadinya nekrosis pada kulit.

Peningkatan IL-8 ini juga memacu sel hepatosit untuk mengeluarkan CRP yang selanjutnya akan menghasilkan ROS. Produksi ROS yang

berlebihan menyebabkan terjadinya disfungsi endotel, kemudian dapat menyebabkan nekrosis pada kulit.

Infeksi antraks dimulai dengan masuknya bakteri *Bacillus anthracis* ke dalam tubuh dalam bentuk spora, yang kemudian berubah menjadi bentuk vegetatif dan berkembang biak. Bentuk vegetatif ini selanjutnya mengeluarkan toksin, yang memicu produksi ROS. Selanjutnya ikatan ini memicu aktivasi sinyal transduksi melalui aktivasi NF- $\kappa$ B. Aktivasi ini akan mengaktifkan I- $\kappa$ B untuk memfosforilasi IL-1 $\beta$  sehingga ikatan NF- $\kappa$ B dengan IL-1 $\beta$  terlepas dan NF- $\kappa$ B menjadi aktif dan memicu ekspresi TNF  $\alpha$ , 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.

Aktivasi NF- $\kappa$ B ini juga akan memicu terbentuknya kompleks inflamasi NLRP1 memicu perubahan pro *caspase-1* menjadi *caspase-1* yang akan mengaktifkan pro IL-1 $\beta$  dan IL-18 menjadi IL-1 $\beta$  dan IL-18 aktif. Sekresi TNF- $\alpha$  akan memicu enzim NADPH, yang merangsang produksi ROS. Bila produksi ini terus berlanjut dan berlebihan, menyebabkan stres oksidatif yang berakibat terjadi disfungsi endotel. Adanya TNF- $\alpha$  akan merangsang endotel mengekspresikan *E-selectin*, yang akan mengikat PMN dan mengekspresikan *lisozim*, kemudian memicu disfungsi endotel dan berlanjut menjadi nekrosis jaringan. Ekspresi TNF- $\alpha$  akan memicu produksi IL-8 yang kemudian akan mengaktifkan PMN untuk mengeluarkan netrofil sebagai bagian dari pertahanan tubuh.

Penghambatan NF- $\kappa$ B merupakan jalan untuk menghentikan proses inflamasi yang terjadi. Propolis dengan kandungan flavonoidnya yaitu CAPE dan *quersetin*, memiliki aktivitas anti peradangan dan antioksidan.

Proses terjadinya nekrosis juga dapat terjadi karena peningkatan TNF- $\alpha$  yang memicu sel endotel mengeluarkan *E-selectin*, yang kemudian memicu produksi sel PMN dan terbentuk lisozim. Pemberian flavanoid diharapkan dapat menghambat progresifitas pada sel dendrit untuk memicu sekresi IL-6 dan TNF  $\alpha$ , sehingga tidak terjadi proses nekrosis.

