

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN BERBASIS KOMPETENSI  
(PBK)**

18.



**TERAPI TUBERKULOSIS DENGAN INTERVENSI JALUR  
KEMATIAN MAKROFAG**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

**Dr. Wiwin Retnowati, SSi, MKes.**

**0009046803**

**Dr. Manik Retno Wahyunitisari, dr., MKes**

**0021056602**

**Dr. Juniastuti, dr., MKes**

**0024067104**

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/S/211/P/TNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN BERBASIS KOMPETENSI  
(PBK)**



**TERAPI TUBERKULOSIS DENGAN INTERVENSI JALUR  
KEMATIAN MAKROFAG**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

<b>Dr. Wiwin Retnowati, SSi, MKes.</b>	<b>0009046803</b>
<b>Dr. Manik Retno Wahyunitisari, dr., MKes</b>	<b>0021056602</b>
<b>Dr. Juniastuti, dr., MKes</b>	<b>0024067104</b>

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : TERAPI TUBERKULOSIS DENGAN INTERVENSI  
JALUR KEMATIAN MAKROFAG

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : WIWIN RETNOWATI,  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0009046803  
Jabatan Fungsional : Asisten Ahli  
Program Studi : Kedokteran  
Nomor HP : 081330321200  
Alamat surel (e-mail) : wiwin-r@fk.unair.ac.id

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dr. dr. MANIK RETNO WAHYUNITISARI M.Kes  
NIDN : 0021056602  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

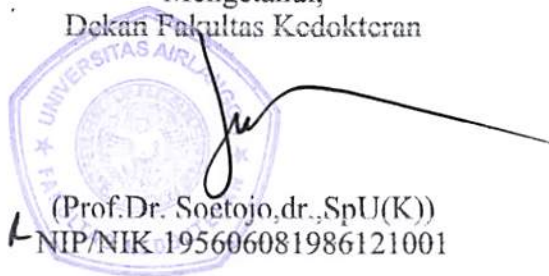
**Anggota (2)**

Nama Lengkap : JUNIASTUTI M.Kes  
NIDN : 0024067104  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**

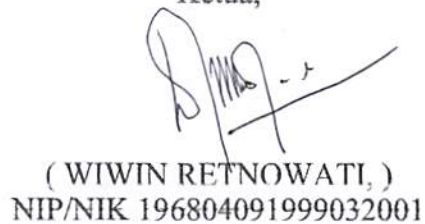
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 110,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 346,050,000

Mengetahui,  
Dekan Fakultas Kedokteran



(Prof. Dr. Soetojo, dr., SpU(K))  
NIP/NIK 195606081986121001

Surabaya, 14 - 11 - 2018  
Ketua,



( WIWIN RETNOWATI, )  
NIP/NIK 196804091999032001

Menyetujui,  
Ketua Lembaga Penelitian & Inovasi



(Prof. H. Hery Purnobasuki, M.Si., Ph.D)  
NIP/NIK 196705071991021001



## RINGKASAN

Jumlah kasus tuberkulosis (TB) dan jumlah kematian TB tetap tinggi untuk penyakit yang bisa disembuhkan. Defisiensi vitamin D sering didapatkan pada pasien TB. Hal tersebut dikarenakan stimulasi *Toll-like receptor 2/1* oleh antigen *Mycobacterium tuberculosis* menginduksi enzim CYP27B1 untuk mengubah vitamin D menjadi bentuk aktif. Jadi jika asupan vitamin D pada pasien TB tidak terjaga, akan terjadi kekurangan vitamin.

Patogenesis tuberkulosis paru berkaitan erat dengan stres oksidatif. Suplementasi antioksidan akan sangat bermanfaat untuk meningkatkan efektivitas terapi. Astragaloside 4, antioksidan yang poten, berinteraksi dengan NF- $\kappa$ B inhibitor (I $\kappa$ B) dan subunit p65 NF- $\kappa$ B. *Astragalus membranaceus* adalah keluarga Leguminosae (kacang-kacangan). Senyawa aktif Astragalus a.1 astragaloside 4 (Ast4).

Mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* dibagi secara acak menjadi kelompok yang menerima terapi obat anti tuberkulosis (OAT) saja, kelompok yang menerima OAT dan suplementasi astragaloside 4, kelompok yang menerima OAT dan suplementasi vitamin D, serta kelompok yang menerima OAT, kombinasi suplementasi astragaloside 4 dan vitamin D.

Penelitian tahun pertama menganalisis tentang 2 jalur kematian makrofag terinfeksi TB, didapatkan hasil bahwa suplementasi vitamin D berperan penting pada peningkatan ekspresi CYP27B1 dan autofagi. Vitamin D diperlukan untuk menurunkan MMP9. Kombinasi suplementasi astragaloside 4 dan vitamin D diperlukan untuk menurunkan nekrosis makrofag. Nekrosis sel memungkinkan bakteri menyebar dan menginfeksi sel baru.

Penelitian tahun ke-2 menganalisis pengaruh suplementasi Ast4 dan atau vitamin D terhadap stres retikulum endoplasmik pada TB khususnya jalur PERK-ATF4-CHOP dengan mengukur ekspresi GRP78, PERK, *activating transcription factor 4* (ATF4) dan *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein* (CHOP). Kesimpulan penelitian untuk menurunkan ekspresi GRP78, PERK, ATF4 dan CHOP perlu kombinasi suplementasi vitamin D dan Ast4.

Seperti diketahui kolesterol dan asam lemak pada tubuh inang dikatabolisme *M. tuberculosis* untuk sumber energi dan menyusun vegetatifnya seperti asam mikolat. Peroksidasi lipid memperberat kerusakan jaringan paru dengan menambah stres oksidatif. Penelitian tahun ke-3 menganalisis peran sinyal antioksidan dalam hal ini Ast4 dan atau vitamin D terhadap homeostasis redoks pada tuberkulosis. Kesimpulan penelitian suplementasi astragalosida 4 pada OAT meningkatkan ekspresi superoksida dismutase (SOD) endogen, suplementasi vitamin D pada OAT meningkatkan aktivitas *glutathione peroxidase* (GPx), suplementasi Astragaloside 4 pada OAT dapat menurunkan malondialdehida (MDA), dan suplementasi vitamin D menurunkan ekspresi Hsp70.

**Kata Kunci:** Tuberkulosis, homeostasis redoks, GPx, SOD, MDA, Hsp70



## PRAKATA

Meskipun obat anti tuberkulosis (OAT) lini I dikatakan sangat efektif, TB masih menjadi masalah kesehatan dunia. Indonesia menempati urutan ke-3 di dunia setelah India dan China dalam hal prevalensi TB. OAT lini I membunuh 99% bakteri yang sensitif, tetapi juga menimbulkan stres oksidatif pada sel inang.

Pada patogenesis TB, jalur kematian makrofag berperan pada viabilitas *M. tuberculosis*. Penelitian tahun pertama menganalisis peran suplementasi ast4 dan vitamin D pada jalur kematian makrofag dan mendapatkan hasil bahwa kombinasi suplementasi menekan nekrosis sel.

Penelitian tahun ke-2 juga membuktikan manfaat kombinasi suplementasi pada penekanan stres retikulum endoplasmik sel inang, khususnya jalur PERK-ATF4-CHOP (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK); activating transcription factor 4 (ATF4); CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP)*).

Hasil penelitian tahun berjalan telah membuktikan bahwa suplementasi Ast4 bersinergi dengan suplementasi vitamin D pada homeostasis redoks. Terjadi peningkatan aktivitas SOD dan GPx serta penurunan MDA dan Hsp70. Agar dapat digunakan pada terapi tuberkulosis perlu dilakukan uji toksisitas kombinasi kedua suplementasi tersebut.

## DAFTAR ISI

Halaman sampul .....	1
Halaman pengesahan .....	2
Ringkasan .....	3
Prakata .....	4
Daftar isi .....	5
Bab 1 Pendahuluan	
1.1 Latar Belakang Masalah .....	7
1.2 Rumusan Masalah .....	7
Bab 2 Tinjauan Pustaka	
2.1 Radikal bebas dan tuberkulosis .....	10
2.2 Antioksidan .....	12
2.3 Lipooksigenase .....	13
2.4 Superoxide dismutase .....	14
2.5 Glutathione peroxidase .....	15
2.6 Hsp70 .....	15
2.7 Suplementasi Vitamin D pada terapi tuberkulosis .....	15
2.8 Peran Astragalosida 4 pada terapi tuberkulosis .....	17
Bab 3 Tujuan dan manfaat penelitian .....	19
Bab 4 Metode penelitian	
4.1 Rancangan penelitian .....	20

4.2 Hipotesis penelitian .....	22
4.3 Prosedur kerja laboratorium .....	22
<b>Bab 5 Hasil dan luaran penelitian</b>	
5.1 Hasil penelitian .....	24
5.2 Luaran penelitian tahun berjalan .....	31
<b>Bab 6 Kesimpulan dan saran .....</b>	<b>32</b>
<b>Daftar Pustaka .....</b>	<b>33</b>
<b>Lampiran: Bukti Luaran pada periode penelitian .....</b>	<b>35</b>



## BAB 1

### PENDAHULUAN

#### 1.1 Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis (TB) bukan penyakit infeksi biasa, karena kronisitas dan lamanya terapi diperlukan data nilai-nilai kecukupan makro dan mikronutrien yang terkait TB. Defisiensi vitamin D pada pasien TB mencerminkan peningkatan utilisasi vitamin D. Jika asupan vitamin D pada pasien TB tidak terjaga, akan terjadi kekurangan vitamin.

Patogenesis tuberkulosis paru berkaitan erat dengan metabolisme lipid. Vitamin D bukan sesuatu yang baru untuk tuberkulosis. Bahkan sebelum era antibiotik, digunakan minyak ikan yang banyak mengandung vitamin D untuk terapi tuberkulosis. Telah ditemukan lebih dari 60 gen yang membutuhkan reseptor vitamin D. Gen tersebut digolongkan menjadi 6 biorespon yaitu 1) metabolisme tulang 2) homeostasis mineral 3) detoksifikasi senyawa yang tidak diperlukan tubuh 4) siklus sel mulai dari proliferasi, diferensiasi, migrasi dan kematian sel 5) imunitas tubuh 6) metabolisme asam amino, lemak dan karbohidrat.

Infeksi TB meningkatkan lipooksigenasi yang akan meningkatkan MDA. Pemberian antioksidan astragaloside 4 (Ast4) dari *Astragalus membranaceus* diharapkan dapat menurunkan  $H_2O_2$  dan mencegah lipooksigenasi. *A. membranaceus* adalah keluarga Leguminosae (kacang-kacangan). Tumbuh di daratan Asia terutama Cina. Senyawa aktif pada akar *Astragalus* antara lain komponen polisakarida fraksi glikosida siklo artone yaitu astragalosida 1-7. Pustaka menyebutkan bahwa antiinflamasi Ast4 melalui inhibisi NF-kappaB dan menurunkan produksi nitric oxide. Ast4 juga terbukti mempunyai aktivitas antifibrotik.

Melalui reseptor nuklear VDR, pemberian Vitamin D3 diharapkan meningkatkan aktivitas antioksidan endogen SOD dan GPx, sehingga terjadi penurunan MDA dan juga penurunan ekspresi Hsp70.

#### 1.2 Rumusan Masalah Penelitian Tahun Ke-3

1. Apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat meningkatkan aktivitas *preventive antioxidant* superoksida dismutase (SOD)?
2. Apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat meningkatkan aktivitas *chain-breaking antioxidant glutathione peroxidase* (GPx)?



3. Apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat menurunkan malondialdehida (MDA)?
4. Apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat menurunkan HSP70?



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

Infeksi TB berkaitan erat dengan terbentuknya radikal bebas. Aktivitas antimycobacterial obat anti tuberkulosis (OAT) dalam membunuh *M. tuberculosis* juga dengan cara membentuk radikal bebas. Jadi radikal bebas menjadi pisau bermata 2, menurunkan jumlah bakteri, juga merusak jaringan paru bahkan sampai terjadi kavitas. Agar terapi optimal, harus ada keseimbangan oksidan dan antioksidan. Suplementasi antioksidan akan sangat bermanfaat untuk meningkatkan efektivitas terapi. Astragaloside 4, antioksidan yang poten, berinteraksi dengan NF- $\kappa$ B inhibitor (I $\kappa$ B) dan subunit p65 NF- $\kappa$ B. *Astragalus membranaceus* adalah keluarga Leguminosae (kacang-kacangan). Senyawa aktif *Astragalus* a.l astragaloside 4 (Ast4).

Mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* dibagi secara acak menjadi kelompok yang menerima terapi OAT saja, kelompok yang menerima OAT dan suplementasi astragaloside 4, kelompok yang menerima OAT dan suplementasi vitamin D, serta kelompok yang menerima OAT, kombinasi suplementasi astragaloside 4 dan vitamin D.

Penelitian tahun pertama menganalisis tentang 2 jalur kematian makrofag terinfeksi TB, didapatkan hasil bahwa suplementasi vitamin D berperan penting pada peningkatan ekspresi CYP27B1. Kombinasi suplementasi astragaloside 4 dan vitamin D diperlukan untuk menurunkan nekrosis makrofag. Nekrosis sel memungkinkan bakteri menyebar dan menginfeksi sel baru. Yang berperan dalam jalur kematian autofagi adalah suplementasi vitamin D.

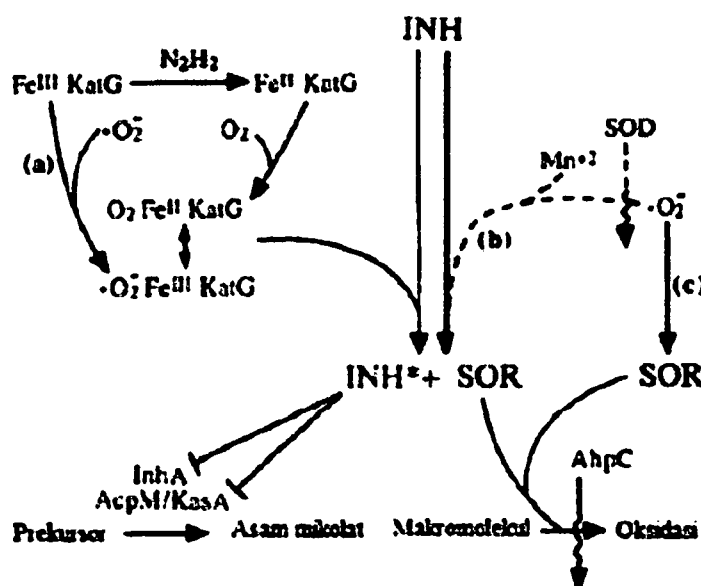
Penelitian tahun ke-2 menganalisis pengaruh suplementasi Ast4 dan atau vitamin D terhadap stres retikulum endoplasmik pada TB khususnya jalur PERK-ATF4-CHOP dengan mengukur ekspresi GRP78, PERK, *activating transcription factor 4* (ATF4) dan *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein* (CHOP). Kesimpulan penelitian untuk menurunkan ekspresi GRP78, PERK, ATF4 dan CHOP perlu kombinasi suplementasi vitamin D dan Ast4.

Seperti diketahui kolesterol dan asam lemak pada tubuh inang dikatabolisme *M. tuberculosis* untuk sumber energi dan menyusun vegetatifnya seperti asam mikolat. Peroksidasi lipid memperberat kerusakan jaringan paru. Penelitian tahun berjalan akan menganalisis efek suplementasi Ast4 dan atau vitamin D terhadap homeostasis redoks pada

tuberculosis. Khususnya pengaruh suplementasi Ast4 dan atau vitamin D pada aktivitas antioksidan endogen *glutathione peroxidase* (GPx) dan *superoxide dismutase* (SOD), serta penurunan malondialdehida (MDA) dan Hsp70.

## 2.1 Radikal Bebas dan Tuberkulosis

INH sebagai prodrug diaktifkan oleh enzim katalase peroksidase (KatG). Spesies oksigen reaktif (SOR) muncul pada saat aktivasi INH. Enzim AhpC muncul untuk membatasi akumulasi dari kerusakan oksidatif makromolekul tersebut.



Gambar 2.1.1 Aktivasi INH (Janson *et al.*, 2012).

Radikal bebas adalah unsur yang mempunyai satu atau lebih elektron yang tidak berpasangan di orbit yang paling luar. Elektron yang tidak berpasangan membuat mereka sangat reaktif, mempunyai spesifisitas rendah, mampu bereaksi dengan protein, lipid, karbohidrat dan DNA, terjadi reaksi berantai yang menyebabkan kerusakan sel. Akibat dari stres oksidatif antara lain 1) peroksidasi lipid 2) kerusakan membran sel maupun membran organel 3) keluarnya protease lisosomal 4) inhibisi enzim 5) peningkatan aktivitas kemoatraktan yang justru meningkatkan stres oksidatif.

Terdapat 2 radikal bebas utama yaitu senyawa oksigen reaktif (SOR) dan senyawa nitrogen reaktif (SNR). SOR merupakan produk normal yang dihasilkan pada metabolisme selular. 95% mekanisme ini tanpa kerusakan. Sumber SOR dibagi menjadi 2: sumber endogen antara lain netrofil, *direct-producing enzymes* (*NO synthase*), *indirect-producing*

*ROS enzymes (xanthin oxidase)*. Sumber eksogen antara lain iradiasi gamma, iradiasi UV, *ultrasound*, makanan, obat-obatan, polutan, xenobiotik, dan toksin. Target biologi yang peka adalah protein enzim, membran lipid dan DNA.

SOR dapat diklasifikasikan menjadi 2 yaitu radikal dan non radikal. Kelompok radikal yang sering dikenal sebagai radikal bebas mengandung elektron tidak berpasangan pada orbit atomik atau molekulernya. Kelompok non radikal terdiri dari berbagai bahan yang sangat reaktif, walaupun secara definisi bukan radikal.

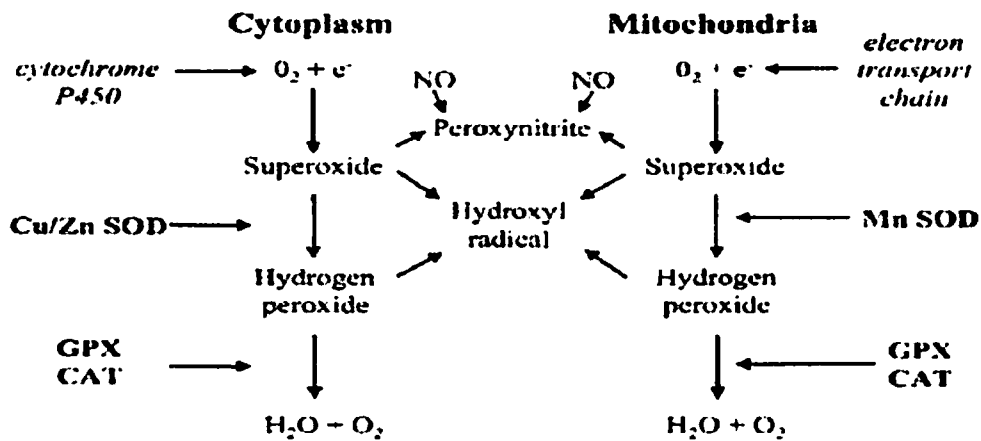
Tabel 2.1 Spesies oksigen reaktif

Radikal	Turunan Non Radikal
Oxygen (bi-radical) ( $O_2^{\cdot\cdot}$ )	Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )
Superoxide ion ( $O_2^{\cdot}$ )	(Organik peroxide) ( $ROOH$ )
Hydroxyl ( $OH^{\cdot}$ )	Hypochlorous acid ( $HOCl$ )
Peroxyl ( $ROO^{\cdot}$ )	Ozone ( $O_3$ )
Alkoxy ( $RO^{\cdot}$ )	Aldehydes ( $HCOR$ )
Nitric oxide ( $NO^{\cdot}$ )	Singlet oxygen ( $^1O_2$ )
	Peroxynitrite ( $ONOOH$ )

Oxygen (bi-radical) ( $O_2^{\cdot\cdot}$ ) ditemukan pada pH fisiologis, memiliki 2 elektron tidak berpasangan pada 2 orbit yang berbeda. Pada pH rendah ditemukan sebagai hidroperoksil ( $HO_2$ ). Hidroperoksil lebih mudah berpenetrasi ke dalam membran biologis. Kemampuan reduksi  $HO_2$  lebih tinggi. Dalam larutan organik, kelautan  $O_2^{\cdot\cdot}$  lebih tinggi dan kemampuannya sebagai pereduksi lebih kuat.

Hidrogen peroksida dapat menyebabkan kerusakan sel pada konsentrasi yang rendah ( $10\mu M$ ), karena mudah larut dalam air dan mudah melakukan penetrasi ke dalam membran biologis. Efek buruk kimiawinya dapat dibedakan menjadi 2, yaitu efek langsung dari kemampuan oksidasinya dan efek tidak langsung akibat bahan lain yang dihasilkan seperti  $OH^{\cdot}$  dan  $HClO$ . Efek langsung  $H_2O_2$  seperti degradasi protein haem, pelepasan besi, inaktivasi enzim, oksidasi DNA, lipid, kelompok  $-SH$  dan asam keto. Dalam reaksi Fenton, ion ferro ( $Fe^{+2}$ ) bereaksi dengan  $H_2O_2$  membentuk ion ferri ( $Fe^{+3}$ ) dan radikal hidroksil

(OH<sup>•</sup>). Adanya logam transisi inilah yang dapat menerangkan mekanisme kerusakan in vivo yang ditimbulkan oleh radikal hidroksil.



Gambar 2.1.2 Fisiologi pembentukan dan katalisasi radikal bebas

## 2.2 Antioksidan

Manusia mempunyai senyawa antioksidan dalam meredam dampak buruk dari oksidan atau radikal bebas yang terjadi selama kehidupan. Senyawa anti oksidan adalah senyawa yang dapat memberikan elektron (donor elektron). Semua senyawa yang dapat meredam oksidan termasuk enzim, protein pengikat logam disebut sebagai antioksidan. Senyawa antioksidan meredam oksidan melalui pencegahan terhimpunnya senyawa – senyawa oksidan berlebihan (*preventive antioxidants*), atau mencegah reaksi rantai yang berkelanjutan (*chain-breaking antioxidants*). Masuk dalam preventive antioxidants yaitu superoksida dismutase (SOD), katalase, peroksidase, transferin dan feritin, seruloplasmin dan albumin. Sedangkan yang masuk dalam chain-breaking antioksidants adalah vitamin E, beta karoten, glutation, sistein dan vitamin C. Juga terdapat penggolongan antioksidan sebagai antioksidan enzimatik dan non-enzimatik.

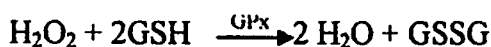
### 1. Antioksidan non-enzimatik

Antioksidan non enzimatik dapat digolongkan menjadi Low-Molecular-Wight-Antioxidant (LMWA) yang disintesis sendiri oleh sel, misalnya histidine di-peptides, carnosine, serta glutathione dan indirect acting LMWA yang didapatkan dari diet sehari-hari misalnya tokoferol, karoten dan asam askorbat. Antioksidan nonenzimatik ada yang larut dalam lemak dan ada yang larut dalam air. Antioksidan nonenzimatik bekerja secara langsung berikatan dengan radikal bebas sehingga mengurangi reaktivitasnya. Beta karoten dan vitamin E adalah antioksidan yang larut dalam lemak, sedangkan asam askorbat dan glutation larut dalam air.

Alfa tokoferol (vitamin E) mencegah peroksidasi membran fosfolipid dan membersihkan radikal bebas sebelum radikal bebas bereaksi dengan protein membran sel atau bereaksi membentuk lipid peroksidasi. Beta karoten (vitamin A) bereaksi dengan radikal bebas atau mengalami auto-oksidasi. Asam askorbat (vitamin C) berfungsi sebagai agen pereduksi (donor elektron) radikal bebas. Pemberian 1 elektron dari asam askorbat membentuk radikal semi-dehidroaskorbat (DHA). Askorbat bereaksi dengan  $O_2$  dan OH untuk membentuk DHA.

## 2. Antioksidan Enzimatik

Copper – zinc superoxide dismutase (CuZn-SOD) sebagai pereduksi superoksida dengan membentuk  $H_2O_2$ , yang kemudian deaktivasi ke  $H_2O$  oleh katalase (CAT) dan glutathione peroxidase (GPx). Katalase dan G-Px mereduksi  $H_2O_2$  menjadi  $H_2O$ . Peningkatan superoksida akan menghambat GPx dan CAT, sehingga kadang diperlukan suplementasi antioksidan eksogen. Peningkatan  $H_2O_2$  akan menurunkan SOD. Sementara CAT dan GPx dengan mereduksi  $H_2O_2$  akan menghemat SOD. SOD dengan mereduksi superoksida akan menghemat CAT dan GPx. Melalui sistem umpan balik ini tercapailah keseimbangan.



Glutathione peroxidase menetralkan hidrogen peroksida dengan mengambil hidrogen dari dua molekul GSH (bentuk glutathione tereduksi) menghasilkan dua  $H_2O$  dan satu GSSG. Enzim glutathione reductase kemudian meregenerasi GSH dari GSSG (bentuk glutathione teroksidasi) dengan NADPH sebagai sumber hidrogen. GPx juga mereduksi peroksida organik yang berhubungan dengan alkohol (Best, 2008).

Pada beberapa penelitian merokok tembakau dapat mengurangi trace elements. Trace elements diperlukan dalam jumlah kecil sebagai komponen esensial enzim antioksidan (sitoplasmik Cu-Zn SOD mengandung metal tembaga dan seng sebagai kofaktor, enzim GPx mengandung selenium dan CAT mengandung besi), merokok tembakau dapat berpengaruh terhadap aktivitas enzim antioksidan, yang secara tidak langsung berakibat pada metabolisme trace elements (Zahraie et al, 2005).

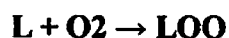
### 2.3 Lipooksigenase

Lipooksigenase adalah kumpulan enzim yang mengandung besi, yang mengkatalisa dioksigenasi asam lemak tak jenuh, khususnya lemak yang mengandung cis, cis-1,4-pentadiene. Reaksi kimia tersebut menghasilkan sinyal sel baik autokrin, parakrin maupun endokrin. Lipooksigenasi ditemukan di eukariota.

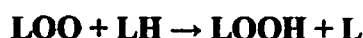
#### Lipooksigenase



Pada proses dioksigenase radikal peroksi (LOO) diubah menjadi hidroperoksida (LOOH). Ikatan rangkap pada asam lemak melemahkan ikatan CH pada atom karbon kemudian membuat abstraksi atom hidrogen lebih mudah, bertempat dibelakang sebuah radikal karbon terpusat (CH) yang dapat distabilkan oleh rearrangement melokuler ke bentuk conjugated dienes, yang selanjutnya akan bereaksi dengan molekul oksigen membentuk radikal peroksi (LOO) dengan reaksi :



Selanjutnya akan abstraksi dengan atom hidrogen lain dari molekul lipid, propaganda rantai reaksi berikutnya dan terakhir membentuk lipid hidroperoksida (LOOH) dengan reaksi :



Peroksidasi lipid juga dapat diinduksi secara enzimatik oleh phospholipase dan lipoxigenase (LOX), dibentuk oleh *lipolysis releases unsaturated fatty acids*, yang bertindak subsekuensi sebagai substrat untuk LOX.

Infeksi TB menyebabkan stres oksidatif.  $H_2O_2$  dapat melintasi membran sel dan menyebabkan peroksidasi lipid dengan hasil akhir MDA. Radikal bebas pada lipid menghasilkan peroksida (ikatan -O-O-). Glutathione peroksidase merusak lipid peroksida dengan cara yang sama untuk menghilangkan hidrogen peroksida :

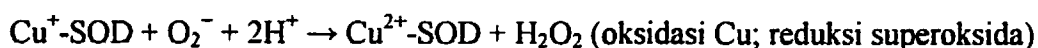
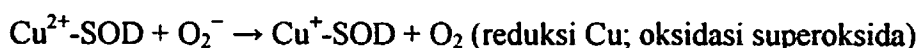


Aktivitas dioksigenase GPx membentuk asam lemak tak jenuh terhidroksilasi (-OH). Pada mamalia, lipooksigenase berperan penting pada metabolisme senyawa eicosanoid seperti prostaglandin, leukotrin yang berperan pada radang.

Prostaglandin tersintesis dari asam lemak dan asam arakidonat, prostaglandin F2 $\alpha$  meningkatkan kerusakan paru pada tuberkulosis melalui peningkatan MMP1 dan MMP3.

## 2.4 Superoxide Dismutase

Superoxide dismutase (SOD) adalah sekumpulan enzim metaloprotein yang mengubah radikal superoksida ( $O_2^-$ ) dengan menambah atau mengurangi elektron menjadi  $O_2$  atau  $H_2O_2$ .



Berdasar logam, ada 3 famili SOD yaitu CuZnSOD, FeMnSOD dan NiSOD. CuZn SOD terdapat di sitosol eukariota. Dijual di pasaran berupa hasil purifikasi phytoplankton, eritrosit sapi. Preparat SOD diberikan sebagai injeksi lokal. Pemberian SOD peroral tidak berguna karena akan dipecah menjadi asam amino sebelum diabsorpsi.

FeMnSOD didapatkan pada prokariota, protista, mitokondria dan kloroplas. SOD dideteksi juga pada peroksisom. NiSOD didapatkan pada protista. SOD pada manusia digolongkan menjadi SOD1, SOD dimer yang berada di sitoplasma, SOD2 adalah MnSOD di mitokondria dan SOD3 yang disekresi ekstraselular. SOD2 dan SOD3 terdiri dari 4 subunit (tetramer). SOD1 dan SOD3 adalah CuZnSOD. Kelainan pada SOD3 berkaitan dengan penyakit paru *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) dan *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD). SOD mencegah fibrosis dengan cara mencegah diferensiasi fibroblas menjadi myofibroblas.

## 2.5 Glutathione peroxidase

Glutathione peroxidase adalah sekelompok enzim dengan aktivitas peroksidase. Menghilangkan  $H_2O_2$  sehingga melindungi membran dan komponen sel dari kerusakan akibat stres oksidatif. GPx mengubah lipid peroksida atau menghilangkan hidrogen peroksida menjadi air. GPx juga melindungi sel dari peroksinitrit, senyawa yang merugikan hasil reaksi superoksida ( $O_2^-$ ) dan nitrous oksida.

Saat ini diidentifikasi 8 isoform GPx1-8. Dikode oleh gen yang berbeda, lokasi didalam sel berbeda, juga berbeda substrat. Kadar terbanyak adalah GPx1 yang lokasinya di sitoplasma. Lipid peroksidase paling banyak diperankan GPx4. GPx3 banyak ditemukan di plasma. GPx2 adalah enzim sitosol dan dikeluarkan ekstraselular, ekspresi di paru diinduksi oleh kebiasaan merokok.

## 2.6 Hsp70

70 kilodalton *heat shock protein* (Hsp70) berfungsi mengikat protein cacat. Mempunyai 3 bagian fungsional, yaitu 1) ujung N yang mengubah ATP menjadi AFDP 2) bagian yang mengikat substrat, mempunyai cekungan untuk mengikat sampai dengan 7 asam amino hidrofobik. 3) Ujung C menutup ikatan substrat. Jika Hsp70 sedang berikatan dg ATP, ujung C terbuka, jika Hsp70 sedang berikatan dengan ADP, ujung C melingkupi substrat.

Hsp70 juga berfungsi sebagai transport protein transmembran. Protein yang dibawa difosforilasi agar stabil melewati membran.

## 2.7 Suplementasi Vitamin D pada terapi tuberkulosis

Macam vitamin D adalah D1, D2 (ergokalsiferol), D3 (kolekalsiferol), D4 (22-dihidroergokalsiferol) dan D<sub>5</sub> (sitokalsiferol). Pada manusia vitamin D yang berperan adalah D3 dan D2. Vitamin D tersebut didapatkan dari makanan maupun suplemen. Vitamin D3 didapatkan dari minyak ikan, salmon, tuna, telur, hati. Vitamin D<sub>2</sub> didapat dari jamur.



Tumbuhan hijau dan vertebrata tidak dapat membentuk vitamin D<sub>2</sub> karena tidak mempunyai prekursor ergosterol. Vitamin D di saluran cerna diserap dan disimpan di jaringan adipose.

Diet ideal vitamin D bayi s.d 12 bulan 400 IU/hari (10 µg), 1-70 tahun 600 IU/hari (15 µg/hari), 71 tahun ke atas 800 IU/hari (20 µg/hari), ibu hamil dan ibu menyusui 600 IU/hari. Toksisitas vitamin D disebabkan jika diet >50.000 IU/hr (1250 µg/hari), dengan gejala mual, muntah, poliuria, polidipsi, sukar tidur dan gagal ginjal. Vitamin D<sub>2</sub> diubah oleh hati menjadi 25-hidroksiergokalsiferol disebut juga 25-hidroksivitamin D<sub>2</sub>, atau 25(OH)D<sub>2</sub>.

Kolesterol di kulit diubah menjadi D<sub>3</sub> dengan paparan matahari khususnya UV B jika konsentrasi serum vitamin D turun. Agar konsentrasi serum vitamin D kembali normal diperlukan paparan UV 20 menit. Terdapat 2 tahap untuk mengubah prekursor vitamin D<sub>3</sub> (7-dehidrokolesterol) di stratum basale dan stratum spinosum menjadi vitamin D<sub>3</sub> 1) 7-dehidrokolesterol diubah menjadi previtamin D<sub>3</sub> oleh UV, 2) previtamin D<sub>3</sub> spontan akan berubah menjadi vitamin D<sub>3</sub>(kolekalsiferol).

Pada hati vitamin D<sub>3</sub> diubah oleh enzim mikrosomal hepatosit vitamin D 25-hidroksilase yang dikode gen CYP2R1 dan CYP27A1 menjadi kalsidiol yang disebut juga kalsifediol (INN), 25-hidroksikolekalsiferol, 25-hidroksivitamin D<sub>3</sub>, atau 25D<sub>3</sub> (gambar 2.2.1 dan 2.2.2). Kalsidiol dalam plasma diikat oleh α-globulin *vitamin D-binding protein* (DBP). Status vitamin D seseorang biasanya ditentukan dengan mengukur kalsidiol, karena kalsidiol adalah vitamin D utama yang beredar dalam darah.

Kalsidiol menuju tubula proksimalis ginjal dan dihidroksilasi oleh 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub> 1-alfa-hidroksilase menjadi kalsitriol (aka 1,25-dihidroksikolekalsiferol, 1,25D<sub>3</sub>). Enzim 25OHD 1-alfa-hidroksilase dikode oleh gen CYP27B1 (Estrella *et al.*, 2011).

Mehta *et al.* (2013) menemukan bahwa pasien TB dengan insufisiensi vitamin D (serum kalsidiol < 75 nmol/l) mempunyai risiko kambuh sebesar 66%. Klasifikasi status vitamin D (25D<sub>3</sub>) dikatakan defisien jika < 25nmol/l, insufisien < 50 nmol/l, inadkuat < 75nmol/l, adekuat ≥ 75 nmol/l (30 ng/ml) (Micronutrient forum global conference, 2014).

*South East Asian Nutrition Survey* (SEANUTS) tahun 2011 yang dilakukan pada 276 anak 0,5-12 tahun di 48 kabupaten di Indonesia mendapatkan hasil kadar 25D<sub>3</sub> 0% defisien, 45,1% insufisien, 49,3% inadkuat dan 5,6% adekuat (Schaafsma *et al.*, 2013).

Mekanisme defisiensi vitamin D pada TB disebabkan antara lain 1) stimulasi TLR1/2 oleh *M. tuberculosis* menginduksi CYP27B1 makrofag yang meningkatkan pemakaian 1,25D3 2) Rifampicin menginduksi CYP3A4 yang meningkatkan katabolisme vitamin D (Wang, 2013; Coussens 2014).

Vitamin D3 (cholecalciferol dan metabolit aktifnya 1,25D3 adalah antioksidan yang bekerja pada membran, mencegah terjadinya peroksidasi lipid. Melalui reseptor nuklear VDR, vitamin D3 meningkatkan ekspresi SOD.

## 2.8 Peran Astragalosida 4 pada terapi tuberkulosis

Akar astragalus beredar di pasaran sebagai *food suplement*. Nama resmi dari suplemen makanan adalah *nutraceutical*. Agar penggunaannya tidak salah kaprah, sejak 1994 di Amerika dikeluarkan undang-undang *Dietary supplement Health & Education Act* (DSHEA) yang menyatakan bahwa khasiat suplemen makanan harus dibuktikan manfaatnya secara ilmiah. Di Indonesia suplemen makanan diatur dengan Surat Keputusan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan (BPOM) No HK 00.063.02360. Suplemen makanan mengandung 1 atau lebih bahan nutrisi tertentu yaitu vitamin, ekstrak herba, asam amino dan lain-lain. Nama dagang akar astragalus antara-lain Actimmune (Pharos). Dosis yang digunakan pada umumnya berkisar 50-100mg/hari. Di China, akar astragalus disebut huang qi atau *Qi tonifying* dipakai antara lain sebagai obat sesak.



Gambar 2.8 *Astragalus membranaceus*

*Astragalus membranaceus* (Mongolia astragalus) adalah keluarga Leguminosae (kacang-kacangan). Tumbuh di daratan Asia terutama Cina. Tanaman tahunan yang tumbuh hingga 4 meter. Akar dipanen dari tanaman berusia 4 tahun, memiliki rasa manis, mengandung kolin, asam amino asam gamma aminobutyric, canavanine, beta-sitosterol, dan minyak.

Fitokimia *Astragalus membranaceus*:

### 1. Saponin triterpenoid (astragalosida)

Telah diidentifikasi lebih dari 161 saponin dari *Astragalus membranaceus*. Lima saponin utama meliputi astragalosida I, II, IV dan isoastragalosida I, II merupakan 80% dari total saponin *Astragalus membranaceus*.

Astragalosida adalah *cycloartane triterpenoid saponin* yang ditandai dengan 3-, 6- dan/atau 25- konjugasi glukosa, dimana 3-glukosa terasetilasi.

Struktur kimia Ast4 adalah 3-O-beta-D-xylo-pyranosyl-6-O-beta-D-glucopyranosyl-cycloastragenol (C<sub>14</sub>H<sub>68</sub>O<sub>14</sub>).

### 2. Flavonoid

Telah diidentifikasi lebih dari 63 flavonoid *Astragalus membranaceus*, termasuk isoflavan, isoflavan, pterocarpin, flavonol, flavon, dan flavanon. Yang dominan adalah isoflavan calycosin-7-O-β-D-glucosida.

### 3. Polisakarida

Analisis polisakarida astragalus amat terbatas disebabkan karena sukarnya isolasi polisakarida. Polisakarida adalah makromolekul dengan senyawa kimia yang kompleks. Telah diidentifikasi 14 polisakarida pada *Astragalus membranaceus* dan 13 diantaranya mempunyai cabang β-D-(1→3)-galaktan dengan rantai β-D-(1→6)-galactooligosakarida

Penelitian Zhang (2003) menyimpulkan bahwa antiinflamasi astragaloside 4 melalui inhibisi NF-kappaβ, menurunkan produksi nitric oxide. Ast4 juga terbukti mempunyai aktivitas antifibrotik. Penelitian Huang (2016) menyimpulkan Ast4 menghambat terbukanya porus mitokondria yang menyebabkan nekrosis sel.

## BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

**3.1 Tujuan Penelitian****3.1.1 Tujuan Umum**

Menganalisis peningkatan efektifitas terapi OAT dengan penambahan Astragaloside IV dan atau vitamin D. Peningkatan efektifitas terapi dianalisis dengan marker-marker pada jalur lipooksigenase.

**3.1.2 Tujuan Khusus**

1. Menganalisis apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat meningkatkan aktivitas *preventive antioxidant* superoksida dismutase (SOD).
2. Menganalisis apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat meningkatkan aktivitas *chain-breaking antioksidant glutathione peroxidase* (GPx).
3. Menganalisis apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat menurunkan malondialdehida (MDA).
4. Menganalisis apakah suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat menurunkan Hsp70.

**3.2 Manfaat Penelitian**

1. Manfaat akademis diharapkan dapat melengkapi data reaksi selular perlindungan Astragaloside IV dan atau vitamin D terhadap tuberkulosis.
2. Mempunyai daya ungkit terhadap penguatan Sistem Inovasi Nasional dengan diperoleh obat herbal yang terbukti khasiatnya secara ilmiah, sehingga dapat memberikan alternatif terapi TB yang lebih efektif, dan dapat diusulkan untuk diproduksi oleh mitra industri dalam negeri

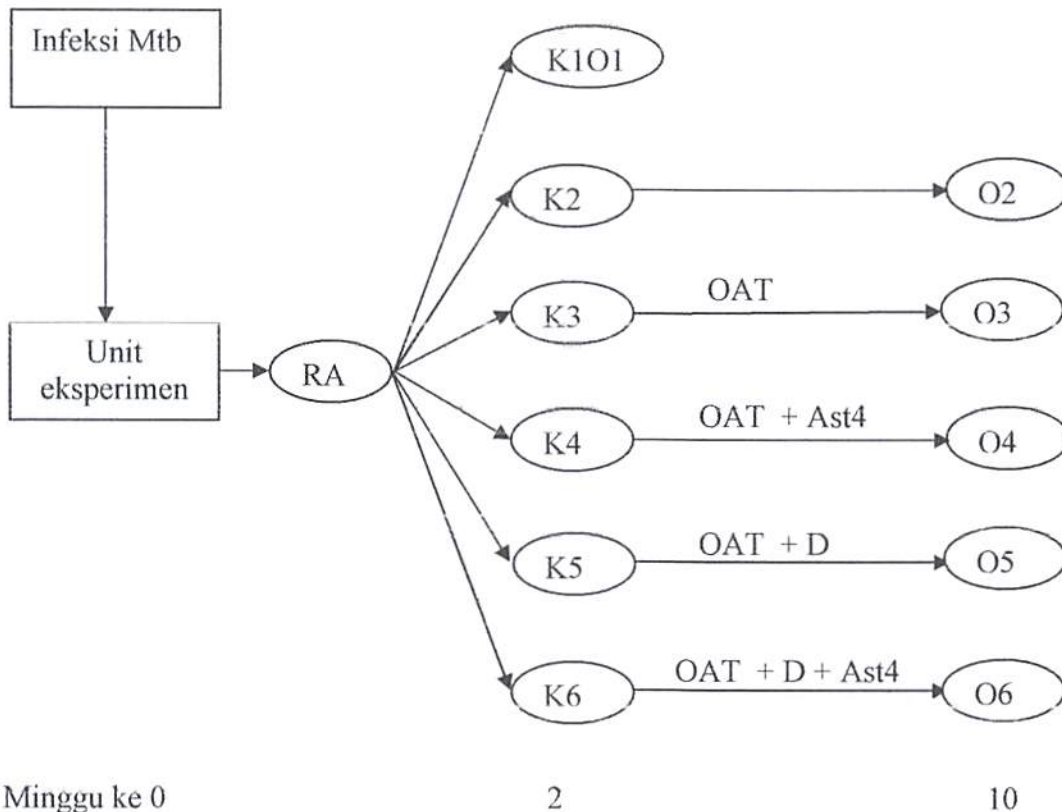
## BAB 4

## METODE PENELITIAN



## 4.1 Rancangan penelitian

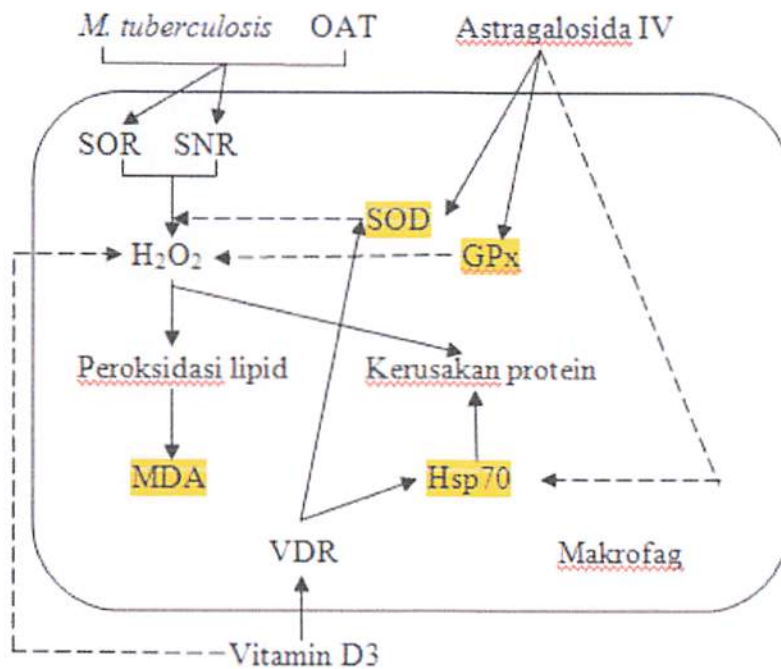
Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan rancangan *separate pretest-posttest control group design*. Hewan coba yang digunakan adalah mencit Balb/c. Alokasi mencit ke dalam 6 kelompok (K1-K6) dilakukan secara random (*random allocation/RA*) untuk mempertahankan validitas internal. Perlakuan, yaitu pemberian obat anti tuberkulosis (OAT) lini I, vitamin D (D) dan atau asam ursolau (UA) dimulai 2 minggu paska infeksi *M. tuberculosis*. Pada akhir perlakuan mencit diterminasi untuk observasi (O) efek perlakuan terhadap marker yang diteliti.



Gambar 4.1 Bagan rancangan penelitian

O1-O6: adalah pengamatan yang diukur dengan imunohistokimia pada jaringan paru, antibodi yang digunakan meliputi anti-SOD1 antibody (ab13498, Abcam), Anti-GPx1 antibody (ab22604, Abcam), anti-MDA antibody (ab6463, Abcam), anti-Hsp70 antibody (ab2787, Abcam).

marker yang diukur ditentukan berdasarkan kerangka konsep berikut



Patogenesis tuberkulosis berkaitan erat dengan terbentuknya radikal bebas. Infeksi *M. tuberculosis* akan mengakibatkan timbulnya spesies oksigen reaktif (SOR) dan spesies nitrogen reaktif (SNR). Aktivitas antimycobacterial obat anti tuberkulosis (OAT) membunuh bakteri juga dengan cara memproduksi SOR dan SNR. Radikal bebas tersebut akan menginduksi terbentuknya  $H_2O_2$  yang kemudian mengakibatkan peroksidasi lipid dan terbentuknya malondialdehid (MDA).  $H_2O_2$  juga akan mengakibatkan kerusakan protein yang memicu ekspresi Hsp70.

Pemberian antioksidan astragalosida 4 (Ast4) diharapkan dapat meningkatkan aktivitas antioksidan endogen superoksida dismutase (SOD) dan *glutathione peroxidase* (GPx). Sebagai preventif antioksidan, SOD mencegah terbentuknya  $H_2O_2$ . Sebagai *chain-breaking antioksidant* GPx mengubah  $H_2O_2$  menjadi air. Kedua aktivitas antioksidan endogen tersebut diharapkan dapat menurunkan MDA.

Pemberian vitamin D3 (cholecalciferol) melalui reseptor nuklear VDR diharapkan meningkatkan transkripsi dan ekspresi SOD, sehingga kerusakan protein dapat dihambat dengan hasil akhir penurunan ekspresi Hsp70. Pustaka menyebutkan vitamin D3 juga berfungsi sebagai antioksidan yang menghambat terbentuknya  $H_2O_2$ .

## 4.2 Hipotesis Penelitian

1. Suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat meningkatkan aktivitas *preventive antioxidant* superoksida dismutase (SOD).
2. Suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat meningkatkan aktivitas *chain-breaking antioksidant glutathione peroxidase* (GPx).
3. Suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat menurunkan malondialdehida (MDA).
4. Suplementasi Astragaloside IV dan atau vitamin D pada OAT dapat menurunkan Hsp70.

## 4.3 Prosedur Kerja Laboratorium

### 4.3.1 Dosis vitamin D (kolekalsiferol) dan Astragalosida IV

Mencit diberi pakan 10% BB atau 2-3 g diet/mencit/hr. Kebutuhan kolekalsiferol 1 mencit perhari adalah 12.500/kg diet atau 1,25 IU/g berat badan mencit/hari. Dvion Drops (Merck) mengandung 800 IU/ml. Jadi kolekalsiferol harus diberikan 1,5625  $\mu$ l/g BB mencit atau 1 tetes (37  $\mu$ l) per hari untuk mencit dengan berat badan 24 g (Wergeland *et al.*, 2011). Astragaloside 4 (74777, Sigma-Aldrich) diberikan 50mg/kg BB peroral (Lv, 2010).

### 4.3.2 Perlakuan hewan coba

Sebelum diinfeksi, mencit dianestesi dengan pentobarbital intraperitoneal. Trakea diinsisi untuk memasukkan 100  $\mu$ l suspensi *M. tuberculosis*  $10^5$  CFU per ml bakteri (10.000 bakteri per mencit). Setelah insisi dijahit kembali (Amaral *et al.*, 2014).

Dua minggu sesudah infeksi, kelompok mencit K1 dieutanasia untuk mendapatkan data dasar sebelum diberikan perlakuan. Kelompok K2 diberi placebo berupa salin peroral dengan volume sesuai terapi, kemudian dieutanasia setelah 1 bulan. Kelompok K3 sampai dengan K6, 2 minggu sesudah infeksi mulai diberikan terapi.

Mencit dieutanasia dengan pentobarbital intraperitoneal overdosis (40-60 mg/kg). Jaringan paru-paru difiksasi dengan formalin 10% dalam PBS selama 2 hari, dengan perbandingan volume bahan pemeriksaan dan buffer formalin 1:10. Kemudian dipadatkan dengan merendam dalam paraffin wax (VWR). Pembedahan paru-paru dilakukan setebal 3-5  $\mu$ m untuk pemeriksaan imunohistokimia. Limbah sisa hewan coba dimusnahkan dengan insinerator

### 4.3.3 Imunohistokimia

Jaringan paru yang telah diberi parafin diletakkan suhu kamar. Jaringan dideparafinisasi dengan xylol 3 x 5 menit, rehidrasi dengan alkohol bertahap dengan alkohol absolut, 96%, 80% dan 70% masing-masing 4 menit, dan dicuci dengan air mengalir 5 menit. Sayatan jaringan dipaparkan blocking endogen peroksidase 0,5% 30 menit dan dicuci dengan air mengalir 5 menit. Sediaan diinkubasi dalam decloaking chamber 110°C 30 menit dengan larutan Dava dan didinginkan ± 30 menit, kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 3 menit. Ikatan non spesifik dicegah (*blocking*) dengan normal horse serum 5% selama 30 menit.

Sediaan diinkubasi dengan primer antibodi 60 menit, dicuci dalam PBS pH 7,4 3 menit, dipaparkan universal link 30 menit dan dicuci kembali dalam PBS pH 7,4 3 menit. Visualisasi juga menggunakan Trekavidin HRP label yang dipaparkan 30 menit dilanjutkan dengan pencucian dalam PBS pH 7,4 3 menit. Ikatan antibodi primer dan sekunder dideteksi dengan pemberian 3,3'-diaminobenzidine tetrachloride 2-5 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir 5 menit. Zat warna banding haematoxylin dipaparkan 5-10 menit dan dicuci dengan air mengalir 5 menit. Dilakukan dehidrasi sediaan dengan alkohol 80%, 96% dan alkohol absolut masing-masing 5 menit. Proses *clearing* menggunakan xylol I, II, III selama 5 menit. Sediaan untuk kontrol negatif tanpa menggunakan antibodi primer.

Primer antibodi yang digunakan adalah anti-SOD1 antibody (ab13498, Abcam), Anti-GPx1 antibody (ab22604, Abcam), anti-MDA antibody (ab6463, Abcam), anti-Hsp70 antibody (ab2787, Abcam).



## BAB 5

## HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

## 1.1 Hasil

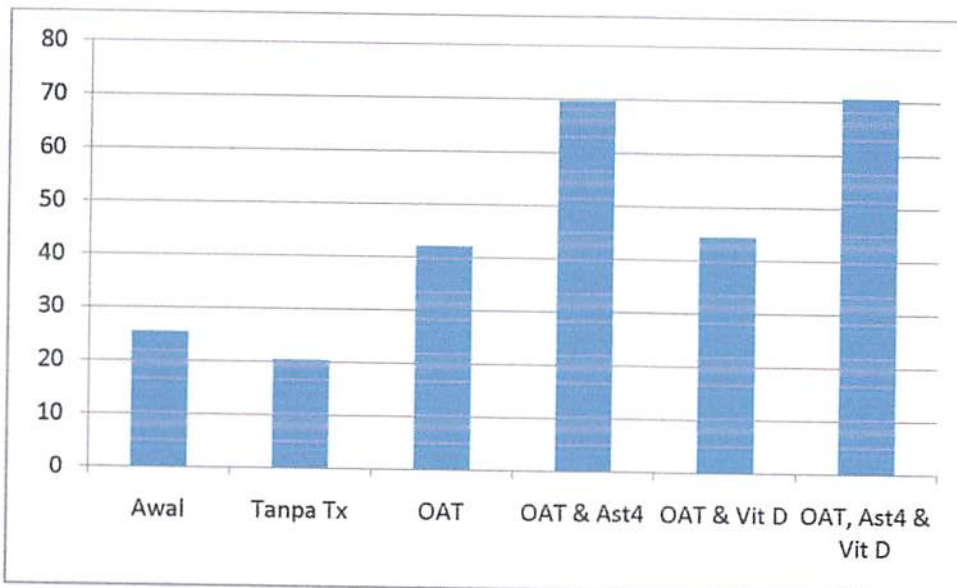
## 5.1.1 Suplementasi astragalosida 4 pada OAT meningkatkan ekspresi superoksida dismutase

Tabel 5.1.1.1 Jumlah sel positif SOD/lapang pandang di jaringan paru mencit pada pembesaran 400x

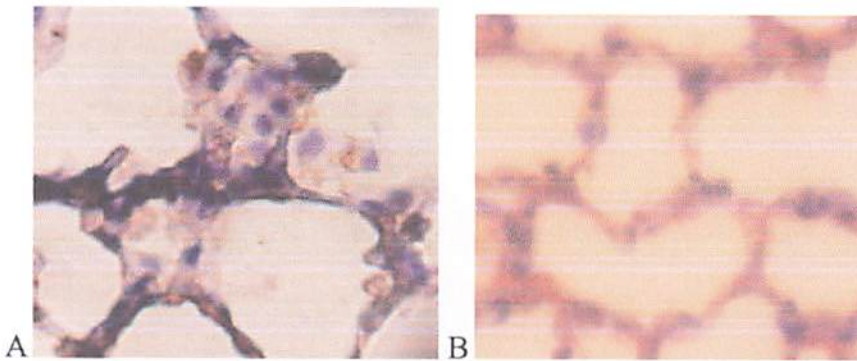
Kelompok	Rerata	SD	Minimum	Maksimum
K1	25,50	31,665	23	28
K2	20,50	25,802	19	22
K3	42,25	50,107	30	54
K4	69,75	68,110	54	85
K5	44,50	36,040	35	54
K6	70,75	52,579	60	81

Keterangan: K1: sebelum terapi, K2: tanpa terapi, K3: terapi dengan OAT, K4: terapi dengan OAT dan ast4, K5: terapi dengan OAT dan kolekalsiferol, K6: terapi dengan OAT lini II, ast4 dan kolekalsiferol

SOD



Gambar 5.1.1.1 Jumlah sel positif SOD/lapang pandang di jaringan paru mencit



Gambar 5.1.1.2 Imunohistokimia SOD (400x), A mencit hanya mendapat OAT, B mencit mendapat OAT dan suplementasi astragalosida 4

Uji asumsi dilakukan sebelum uji hipotesis agar yakin bahwa data sampel terdistribusi mengikuti model data populasi. Uji asumsi Shapiro-Wilk mempunyai kemaknaan  $> 0,05$ , menunjukkan data berdistribusi normal. Uji Levene statistika mempunyai nilai kemaknaan  $0,177$  menunjukkan data homogen. Data dianalisis dengan *one-way Anova*, *post-Hoc Tukey HSD*.

Tabel 5.1.1.2 Uji *post-Hoc Tukey HSD* ekspresi SOD

Pasangan perlakuan	<i>p-value</i>	Kesimpulan
OAT vs OAT + Ast4	$p = 0,026$	Berbeda signifikan
OAT vs OAT + D	$p = 0,993$	tidak signifikan
OAT vs OAT + Ast+D	$p = 0,016$	Berbeda signifikan
OAT + Ast4 vs OAT + D	$p = 0,047$	Berbeda signifikan
OAT + Ast4 vs OAT + Ast4 + D	$p = 0,031$	Berbeda signifikan
OAT + D vs OAT + Ast4 + D	$p = 0,998$	tidak signifikan

Dari kesimpulan *post-Hoc Tukey HSD* pada tabel 5.1.2 dapat disimpulkan suplementasi astragalosida 4 berperan dalam ekspresi SOD. Penelitian Liu dan kawan-kawan (2018) mendapatkan hasil bahwa superoksida dismutase (SOD) sangat menurun pada pasien TB. SOD menghambat inflamasi dengan cara mencegah fragmentasi oksidatif hialuronan dan mengkatalisa anion superoksida menjadi oksigen dan hidrogen peroksida. Dengan pemberian

astragalosida 4, terjadi peningkatan SOD yang juga akan menekan terbentuknya NO dan radikal oksigen.

### 5.1.2 Suplementasi vitamin D pada OAT meningkatkan aktivitas *glutathione peroxidase* (GPx)

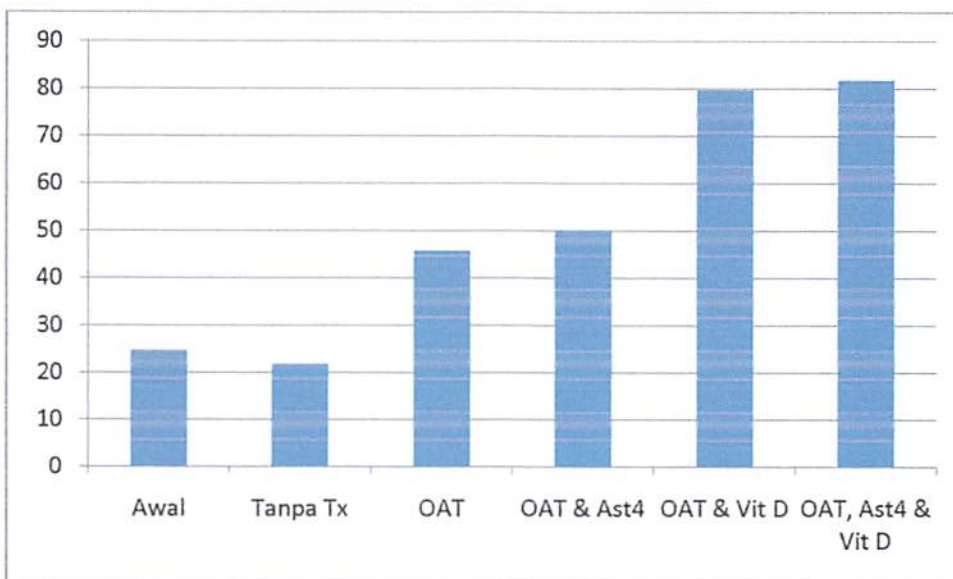
Uji asumsi Shapiro-Wilk mempunyai kemaknaan  $< 0,05$ , menunjukkan data tidak berdistribusi normal. Uji Levene statistika mempunyai nilai kemaknaan 0,003 menunjukkan data tidak homogen.

Tabel 5.1.2 Jumlah sel positif GPx/lapang pandang di jaringan paru mencit pada pembesaran 400x

Kelompok	Rerata	SD	Minimum	Maksimum
K1	24,81	13,680	20	30
K2	21,90	14,722	19	24
K3	45,99	18,251	40	52
K4	50,18	43,053	40	60
K5	79,81	61,237	68	92
K6	81,91	50,377	72	92

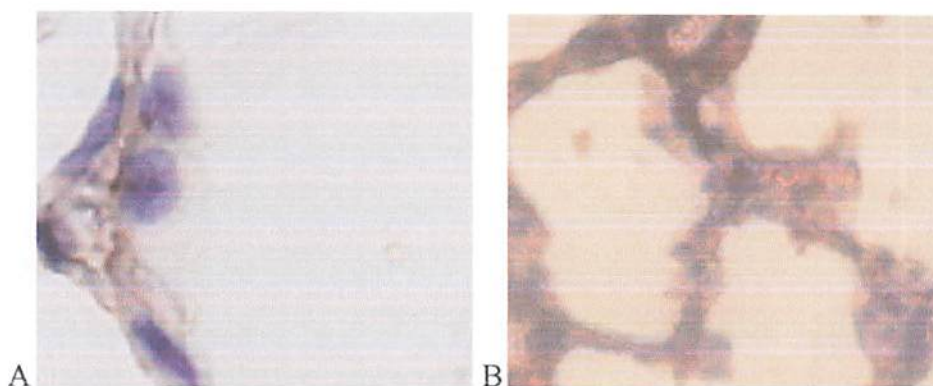
Keterangan: K1: sebelum terapi, K2: tanpa terapi, K3: terapi dengan OAT, K4: terapi dengan OAT dan ast4, K5: terapi dengan OAT dan kolekalsiferol, K6: terapi dengan OAT, ast4 dan kolekalsiferol

GPx



Gambar 5.1.2.1 Jumlah sel positif GPx/lapang pandang di jaringan paru mencit

Penelitian Qiao (2017) memberikan hasil bahwa suplementasi astragalosida 4 meningkatkan aktivitas GPx. Penelitian kami memberikan hasil yang berbeda. Uji Mann-Whitney menunjukkan tidak ada perbedaan ekspresi GPx pada mencit yang diberi terapi OAT saja dengan mencit yang diberi terapi OAT dan ast4 ( $p = 0,834$ ), tetapi terdapat perbedaan ekspresi GPx pada mencit yang diberi terapi OAT saja dengan mencit yang diberi terapi OAT dan kolekalsiferol ( $p = 0,001$ ). Pustaka yang menunjang hasil penelitian kami antara lain adalah Teixeira (2017) yang membuktikan bahwa vitamin D meningkatkan aktivitas GPx melalui translokasi NRF2 ke nukleus.

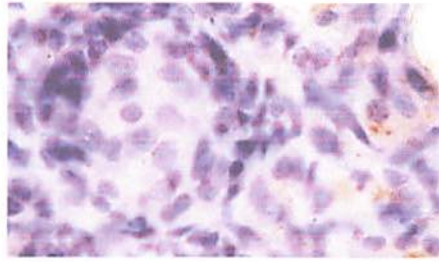


Gambar 5.1.2.2 Imunohistokimia GPx (1000x), A paru mencit yang hanya mendapat OAT, B paru mencit yang mendapat OAT dan suplementasi vitamin D

Uji Mann-Whitney juga menunjukkan terdapat perbedaan ekspresi GPx pada mencit yang diberi terapi OAT saja dengan mencit yang diberi kombinasi suplementasi kolekalsiferol dan ast4 ( $p = 0,001$ ), terdapat perbedaan ekspresi GPx pada mencit yang diberi terapi OAT dan ast4 dengan mencit yang diberi terapi OAT dan kolekalsiferol ( $p = 0,002$ ), dan tidak terdapat perbedaan ekspresi GPx pada mencit yang diberi terapi OAT dan kolekalsiferol dengan mencit yang diberi kombinasi suplementasi kolekalsiferol dan ast4 ( $p = 0,112$ ). Dari uji beda dapat disimpulkan kolekalsiferol memegang peranan penting pada ekspresi GPx.

### 5.1.3 Suplementasi Astragaloside 4 pada OAT dapat menurunkan malondialdehid (MDA)

Uji asumsi Shapiro-Wilk mempunyai kemaknaan  $> 0,05$ , menunjukkan data berdistribusi normal. Uji Levene statistika mempunyai nilai kemaknaan 0,399 menunjukkan data homogen. Data dianalisis dengan *one-way Anova, post-Hoc Tukey HSD*.

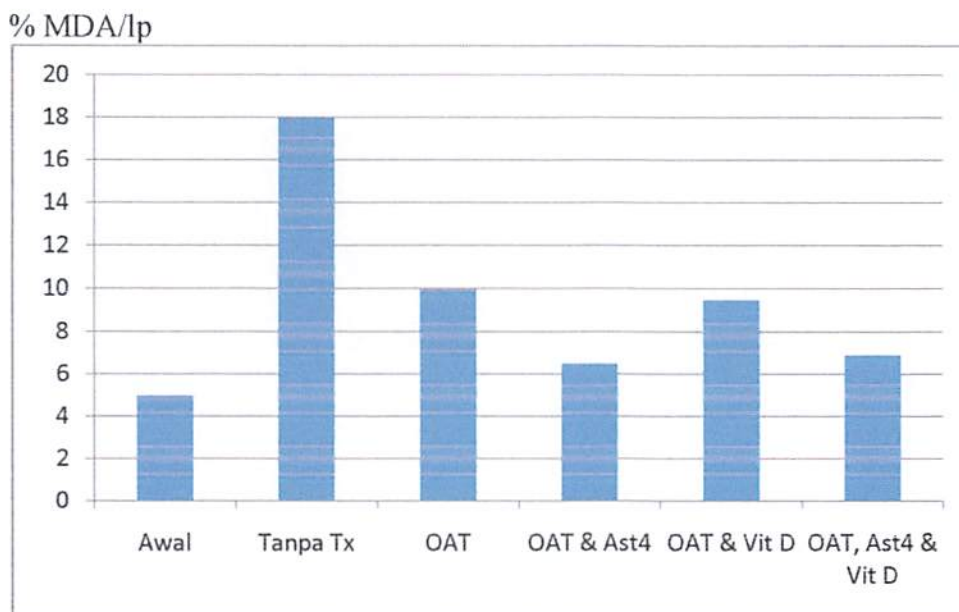


Gambar 5.1.3.1 Astragalosida 4 menurunkan MDA pada granuloma (IHC MDA 400x)

Tabel 5.1.3.1 Prosentase jumlah sel positif MDA/lapang pandang di jaringan paru mencit pada pembesaran 400x

Kelompok	Rerata	SD	Minimum	Maksimum
K1	4,92	13,650	3,75	6,00
K2	18,00	14,725	16,75	19,25
K3	10,08	18,250	8,50	11,50
K4	6,67	43,050	4,75	8,50
K5	9,58	61,2350	7,00	12,00
K6	6,92	50,300	5,25	8,50

Keterangan: K1: sebelum terapi, K2: tanpa terapi, K3: terapi dengan OAT, K4: terapi dengan OAT dan ast4, K5: terapi dengan OAT dan kolekalsiferol, K6: terapi dengan OAT, ast4 dan kolekalsiferol



Gambar 5.1.3.2 Prosentase sel positif MDA per lapang pandang paru mencit

Penelitian ini membuktikan bahwa suplementasi Ast4 menurunkan produksi MDA, sesuai dengan penelitian Mao dan kawan-kawan (2016) yang memberikan 1-50 mg/kg BB pada tikus gastritis. Ast4 bersinergi dengan vitamin D berfungsi mengembalikan homeostasis redoks, Ast4 menekan produksi MDA melalui peningkatan SOD, dan vitamin D membantu dengan meningkatkan aktivitas GPx. Penelitian Yusufoglo (2014) mendapatkan hasil bahwa ekstrak astragalus menekan produksi malondialdehida melalui peningkatan *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (Nrf-2). Analisis Liu (2017) menegaskan peran Ast4 pada aktivasi jalur Nrf-2/HO-1.

Uji beda (Tabel 5.3.1) dapat diamati suplementasi Ast4 pada OAT berperan penting pada supresi MDA.

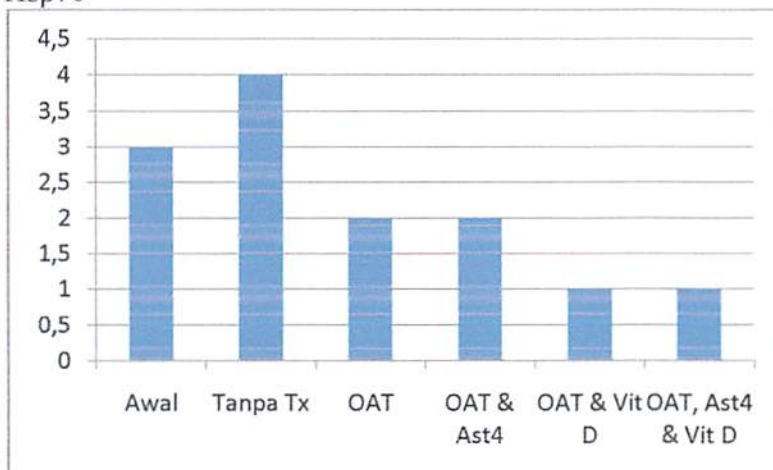
Tabel 5.1.3.2 Uji *post-Hoc Tukey HSD* prosentase sel positif MDA/lp paru mencit

Pasangan perlakuan	<i>p-value</i>	Kesimpulan
OAT vs OAT + Ast4	p = 0,000	berbeda signifikan
OAT vs OAT + D	p = 0,987	tidak signifikan
OAT vs OAT + Ast4+D	p = 0,000	berbeda signifikan
OAT + Ast vs OAT + D	p = 0,000	berbeda signifikan
OAT + Ast vs OAT + Ast + D	p = 0,090	tidak signifikan
OAT + D vs OAT + Ast + D	p = 0,001	berbeda signifikan

Keterangan: Ast4: astragalosida 4, D: vitamin D

#### 5.1.4 Vitamin D menurunkan ekspresi Hsp70

Hsp70



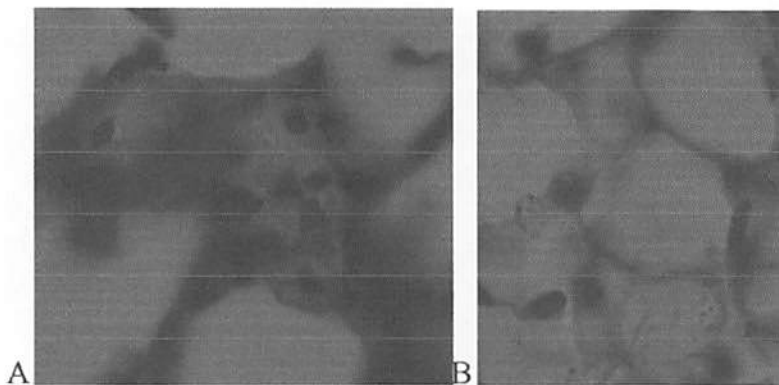
Gambar 5.1.4.1 Ekspresi Hsp70 pada jaringan paru mencit

70 kilodalton *heat shock protein* (Hsp70) berfungsi mengikat protein cacat. Peningkatan ekspresi Hsp70 menunjukkan adanya stres endogen. Uji Shapiro-Wilk  $< 0,05$ , menunjukkan data tidak berdistribusi normal. Uji Levene statistika mempunyai nilai 0,964 menunjukkan data homogen. Uji Kruskal-Wallis menunjukkan vitamin D berperan pada penurunan ekspresi Hsp70 ( $p=0,010$ ).

Tabel 5.1.4.1 Uji Mann-Whitney ekspresi Hsp70

Pasangan perlakuan	<i>p-value</i>	Kesimpulan
OAT vs OAT + Ast4	$p = 0,626$	tidak signifikan
OAT vs OAT + D	$p = 0,010$	berbeda signifikan
OAT vs OAT + Ast4+D	$p = 0,002$	berbeda signifikan
OAT + Ast4 vs OAT + D	$p = 0,018$	berbeda signifikan
OAT + Ast4 vs OAT + Ast4 + D	$p = 0,003$	berbeda signifikan
OAT + D vs OAT + Ast4 + D	$p = 0,112$	tidak signifikan

Keterangan: Ast4: Astragalosida 4, D: vitamin D

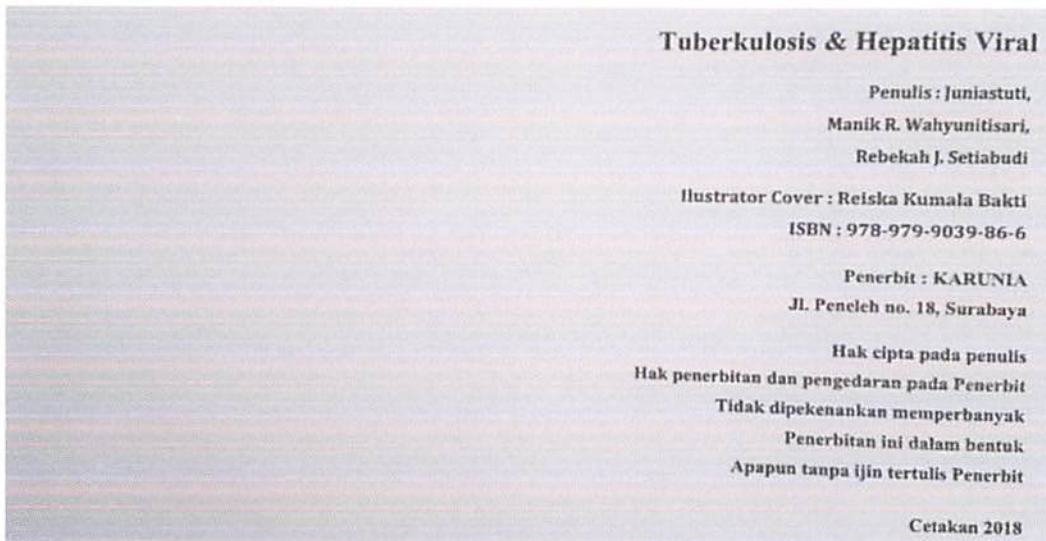


Gambar 5.1.4.2 A: Ekspresi Hsp70 pada jaringan paru mencit dengan terapi OAT saja, B: jaringan paru mencit yang mendapat terapi OAT dan suplementasi vitamin D

Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian Gmiat dan kawan-kawan (2017) yang mengamati peran vitamin D pada penurunan ekspresi Hsp70 setelah olah raga. Ada beberapa jalur yang telah membuktikan hubungan suplementasi vitamin D dengan penurunan Hsp70. Tukaj dan kawan-kawan (2012) menyimpulkan calcitriol 100nM menghambat ekspresi Hsp70 melalui aktivasi SOD1 dan  $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ . Sanz RL dan kawan-kawan (2018) membuktikan vitamin D menurunkan ekspresi Hsp70 melalui jalur Wilms tumor suppressor WT1.

## 5.2 Luaran yang dicapai tahun berjalan

### 1. Buku saku TB ber-ISBN



### 2. Bukti submit Malaysian Journal of Medicine & Helath Sciences (Q4)

Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences <onbehalf@manuscriptcentral  
to me >

Mon, Nov 12, 11:33 AM (2 days ago)

12-Nov-2018

Dear Dr. Wahyunitisari

A manuscript titled The prevalence of Diabetes Mellitus among Tuberculosis Positive Case in Surabaya (MJMHS-2018-0388) has been submitted by Dr. Dwi Indriati to the Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs>

USER ID: [manik1retno@gmail.com](mailto:manik1retno@gmail.com)

PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

[https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs?URL\\_MASK=46a131a348b447ed9d81883ab2d633bb](https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs?URL_MASK=46a131a348b447ed9d81883ab2d633bb)

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs> to update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,  
Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences Editorial Office



## BAB 6

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1 Kesimpulan

1. Suplementasi Ast4 pada OAT meningkatkan aktivitas SOD
2. Suplementasi vitamin D pada OAT meningkatkan GPx
3. Suplementasi Ast4 pada OAT menekan produksi MDA
4. Suplementasi Vitamin D pada OAT menurunkan ekspresi Hsp70

#### 6.2 Saran

Pada patogenesis TB, jalur kematian makrofag berperan pada viabilitas *M. tuberculosis*. Penelitian tahun pertama menyimpulkan kombinasi suplementasi astragaloside 4 dan vitamin D diperlukan untuk menurunkan nekrosis makrofag. Nekrosis sel memungkinkan bakteri menyebar dan menginfeksi sel baru.

Penelitian tahun ke-2 menyimpulkan bahwa kombinasi suplementasi Ast4 dan vitamin D menekan stres retikulum endoplasmik pada TB khususnya jalur PERK-ATF4-CHOP (*protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase (PERK); activating transcription factor 4 (ATF4); CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP)*).

Pada penelitian tahun berjalan terbukti suplementasi Ast4 bersinergi dengan suplementasi vitamin D pada homeostasis redoks. Terjadi peningkatan aktivitas SOD dan GPx serta penurunan MDA dan Hsp70. Agar dapat digunakan pada terapi tuberkulosis perlu dilakukan uji toksisitas kombinasi kedua suplementasi tersebut.



IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

- 1. Identifikasi / - pada GHI ...
- 2. Identifikasi / - pada GHI ...
- 3. Identifikasi / - pada GHI ...
- 4. Identifikasi / - pada GHI ...

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA

## DAFTAR PUSTAKA

- Coussens AK, Martineau AR, Wilkinson RJ, 2014. Anti-inflammatory and antimicrobial actions of vitamin D in combating TB/HIV. *Scientifica (Cairo)*: 903680.
- Feldman D, Pike JW, Adams JS, 2011. *Vitamin D*. 3<sup>rd</sup> ed, London: Academic Press.
- Garcia IM, Altamirano L, Mazzei L, Fornès M, Cuello-Carrión FD, Ferder L, Manucha W, 2014. Vitamin D receptor-modulated Hsp70/AT1 expression may protect the kidneys of SHR at the structural and functional levels. *Cell Stress Chaperones* 19(4):479-91. doi: 10.1007/s12192-013-0474-3. Epub 2013 Nov 13.
- Gmiat A, Micielska K, Kozłowska M, Flis DJ, Smaruj M, Kujach S, Jaworska J, Lipińska P, Ziemann E, 2017. The impact of a single bout of high intensity circuit training on myokines' concentrations and cognitive functions in women of different age. *Physiol Behav.* 179:290-7. doi: 10.1016/j.physbeh.2017.07.004. Epub 2017 Jul 5.
- Hornig CT, Tsai ML, Shiang JC, Chien ST, Lu CH, Chang TH, Chen FA, 2011. Glaucoma treatment with the extract of *Astragalus membranaceus* in rats experimental model. *Life Sci J* 8(4):124-32.
- Huang YF, Lu L, Zhu DJ, Wang M, Yin Y, Chen DX, Wei LB, 2016. Effects of *Astragalus* polysaccharides on dysfunction of mitochondrial dynamics induced by oxidative stress. *Oxid Med Cell Longev* 2016:9573291. doi:10.1155/2016/9573291. Epub 2016 Jan 11.
- Liu P, Zhao H, Luo Y, 2017. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (Huangqi): a well-known Chinese tonic. *Aging Dis.* 8(6):868-86. Doi: 10.14336/AD.2017.0816.
- Liu Q, Pan L, Han F, Luo B, Jia H, Xing A, Li Q, Zhang Z, 2018. Proteomic profiling for plasma biomarkers of tuberculosis progression. *Mol Med Rep.*18(2):1551-9. doi: 10.3892/mmr.2018.9134. Epub 2018 Jun 5
- Mao S, Yang G, Li W, Zhang J, Liang H, Li J, Zhang M, 2016. Gastroprotective effects of astragaloside IV against acute gastric lesion in rats. *PLoS One.* 11(2):e0148146. doi: 10.1371/journal.pone.0148146. eCollection 2016.
- Martineau AR, Timms PM, Bothamley GH, Hanifa Y, Islam K, Claxton AP, Packe GE, Moore-Gillon JC, Darmalingam M, Davidson RN, Milburn HJ, Baker LV, Barker RD, Woodward NJ, Venton TR, Barnes KE, Mullett CJ, Coussens AK, Rutterford CM, Mein CA, Davies GR, Wilkinson RJ, Nikolayevskyy V, Drobniewski FA, Eldridge SM, Griffiths CJ, 2011. High-dose vitamin D(3) during intensive-phase antimicrobial treatment of pulmonary tuberculosis: a double-blind randomized controlled trial. *Lancet* Jan 15;377(9761):242-50.
- Mehta S, Mugusi FM, Bosch RJ, Aboud S, Urassa W, Villamor E, Fawzi WW, 2013. Vitamin D status and TB treatment outcomes in adult patients in Tanzania: a cohort study. *BMJ Open* 18;3(11):e003703.
- Qiao Y, Fan CL, Tang MK, 2017. Astragaloside IV protects rat retinal capillary endothelial cells against high glucose-induced oxidative injury. *Drug Des Devel Ther* 11:3567-77. doi: 10.2147/DDDT.S152489. eCollection 2017.

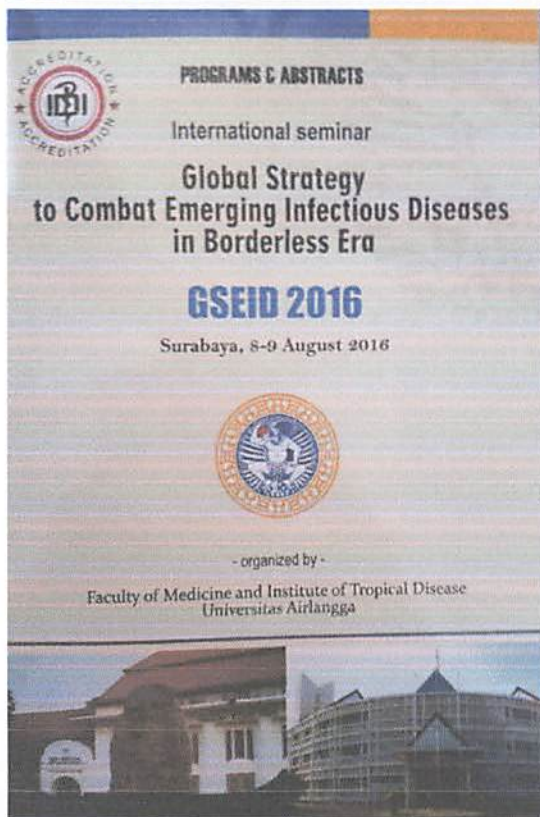
- Rhodes SG, Terry LA, Hope J, Hewinson RG, Vordermeier HM, 2003. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and development of tuberculosis in cattle. *Clin Diagn Lab Immunol.* 10(6):1129-35.
- Sanz RL, Mazzei L, Manucha W, 2018. Implication of the transcription factor WT1 linked to the pathologic cardiac remodeling post-myocardial infarction. *Clin Investig Arterioscler.* pii: S0214-9168(18)30113-X. doi: 10.1016/j.arteri.2018.08.003. [Epub ahead of print]
- Schaafsma A, Deurenberg P, Calame W, van den Heuvel EG, van Beusekom C, Hautvast J, Sandjaja, Bee Kon P, Rojroongwasinkul N, Le Ngeyen BK, Parikh P, Khouw I, 2013. Design of the South East Asian Nutrition Survey (SEANUTS): a four-country multistage cluster design study. *Br J Nutr Sep*; 110 Suppl 3:S2-10.
- Teixeira TM, da Costa DC, Resende AC, Soulage CO, Bezerra FF, Daleprane JB, 2017. Activation of Nrf2-antioxidant signaling by 1,25-dihydroxycholecalciferol prevents leptin-induced oxidative stress and inflammation in human endothelial cells. *J Nutr.* 147(4):506-13. doi: 10.3945/jn.116.239475. Epub 2017 Mar 1.
- Tukaj S, Trzonkowski P, Tukaj C, 2012. Regulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on vascular smooth muscle cells. *Acta Biochim Pol.* 59(3):395-400. Epub 2012 Aug 21.
- WHO, 2015. *Global tuberculosis report 2015*. Available at: [who.int/tb/publications/global\\_report/](http://who.int/tb/publications/global_report/) (Accessed: March 31, 2016).
- Xing W, Jian H, 2011. Pretreatment with astragaloside IV protects H9c2 cells against hydrogen peroxide-induced apoptosis by scavenging of reactive oxygen species and regulation of Bcl-2 and Bax expression. *J Med Plant Res* 5(14):3304-11.
- Yusufoglo H, Soliman GA, Abdel-Rahman RF, Alankus-Caliskan O, 2015. Hepatoprotective potential of *Astragalus kurdicus* and *Astragalus cinereus* extracts against paracetamol induced liver damage in rats. *Pak J Biol Sci* 18(6):252-9.
- Zhang Y, Leung DY, Richers BN, Liu Y, Remigio LK, Riches DW, Goleva E, 2012. Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1. *J Immunol* Mar 1;188(5):12

## Lampiran 1: Bukti Luaran

### Tahun I

1. 8-9 Agt 2016 poster presenter Internasional Seminar “Global Strategy to Combat Emerging Infectious Diseases” GSEID 2016

Judul: A role of retinoic signaling in tuberculosis



## A role of retinoic signaling in tuberculosis

*Manik Retno Wahyunitisari<sup>1\*</sup>, Ni Made Mertaniasih<sup>1</sup>, Muhammad Amin<sup>2</sup>, Eko Budi Koendhori<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Departement of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Airlangga University, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131. Telp. (031) 5020251 Fax. (031) 5022472 Indonesia  
<sup>2</sup>Department of Pulmonology and Respiratory Medicine, Faculty of Medicine, Airlangga University, Jalan Mayjen Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60131, Indonesia  
<sup>\*</sup>Corresponding author, e-mail: manik1retno@gmail.com

### Abstract

Vitamin A as an antioxidant is debatable. Despite these discrepancies, vitamin A is known to help lung repair, and therefore may be beneficial in counter-acting free radical damage. Zaragoza et al demonstrated the binding of RAR $\alpha$  to the matrix degrading enzyme MMP9 promoter. MMP9 has an important function as mediators of the tissue remodeling. In a hyperoxic environment, large quantities of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen intermediates (RNS) would be introduced into the microenvironment. As a result, antioxidant such as retinoids, would be rapidly consumed. Tuberculosis may result in exhaustion of vitamin A availability if sufficient intake is not maintained. This study has two primary goals. The first goal was to investigate the retinoic signaling pathway and its role in TB tissue remodeling. We used immunohistochemistry to assess the expression of cellular retinoic acid-binding protein CRABP2, nuclear receptor RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  and the correlation of vitamin A supplementation with MMP9 expression.

RAR or RXR preferentially bind DNA as heterodimers. The RAR or RXR heterodimer bind to vitamin D-response element (VDRE). Liu et al demonstrated that the antimicrobial peptide DEFB4 promoter had VDRE. Naturally occurring antimicrobial peptide, such as DEFB4, serve as the first line of immune defense for TB. The second goal of this research was to evaluate the correlation between vitamin A supplementation and DEFB4 expression.

Mice were randomized to 4 groups: (G1) control group, consisting of mice that were intratracheally infected with *M. tuberculosis* and sacrificed on 2 weeks post infection, was used as an evaluation of the succes of infection (G2) pulmonary TB (PTB) without treatment (G3) PTB + first line anti-TB drugs (G4) PTB + first line anti-TB drugs supplemented with retinyl palmitate 160.000 unit/kg diet, daily, orally for 2 months.

We found that co-treatment of retinyl palmitate and anti-TB drugs failed to suppress MMP9 expression. Co-treatment of retinyl palmitate and anti-TB drugs could enhance CRABP2, RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  and DEFB4 ( $p=0.027$ ,  $p=0.009$ ,  $p=0.016$ ). Upregulated of RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  was associated with high DEFB4 ( $r=0.514$  and  $r=0.514$ , respectively). We conclude that the retinoic signaling is crucial for antimicrobial peptide DEFB4 expression.

**Keywords** Tuberculosis, retinyl palmitate, CRABP2, RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ , MMP9, DEFB4

2. 11-12 Agt 2016 oral presenter 8th International Seminar of Indonesian Society for Microbiology (ISISM) 2016 at JW Marriot Jakarta, Indonesia

Judul: Effects of vitamin D on matrix degrading enzymne expression in pulmonary tuberculosis



**"Interdisciplinary approach of microbial prospecting  
for sustainable development of nature conservation and human welfare"**

FP 7

**Effects of Vitamin D on Matrix Degrading Enzyme Expression in Pulmonary Tuberculosis**

MANIK RETNO WAHYUNITISARI<sup>1,3</sup>, NI MADE MERTANIASIH<sup>1,3</sup>,  
MUHAMMAD AMIN<sup>2,3</sup>, EKO BUDI KOENDHORI<sup>1,3</sup>

1. Departement of Clinical Microbiology, Dr. Soetomo Teaching Hospital, Surabaya, Indonesia
2. Department of Pulmonology and Respiratory Medicine, Dr. Soetomo Teaching Hospital, Surabaya, Indonesia
3. Faculty of Medicine Airlangga University, Surabaya, Indonesia

Correspondence Address: manik1retno@gmail.com

**Abstract**

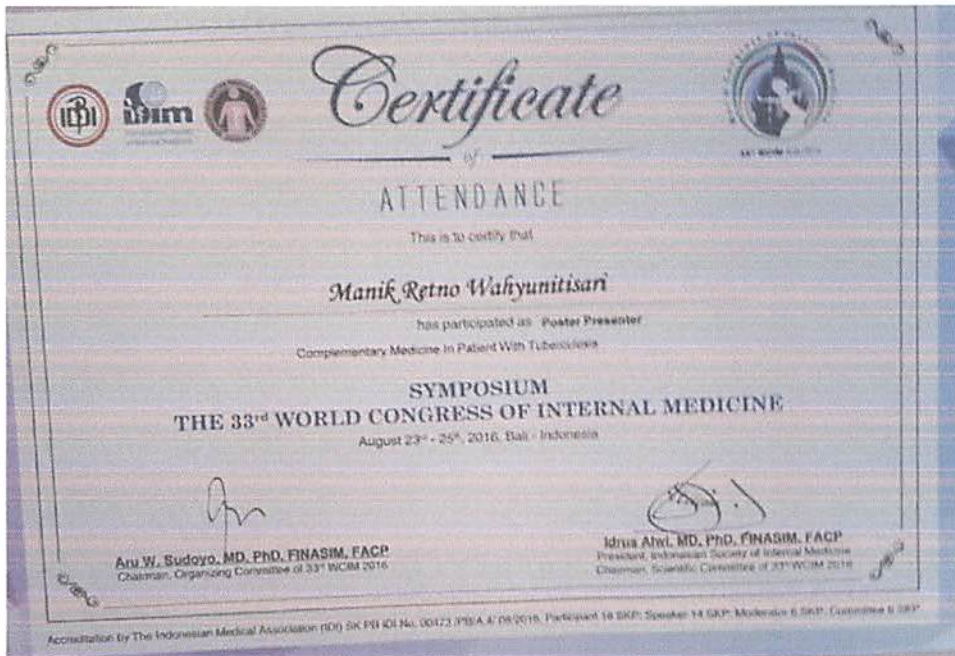
Vitamin D deficiency is common in tuberculosis patients. Toll-like receptor 1/2 stimulation by *Mycobacterium tuberculosis* antigens induces enzyme CYP27B1 to catalyzes the bioactive form of vitamin D. This infection may result in exhaustion of vitamin D availability if sufficient intake is not maintained. Vitamin D-induced autophagy has been reported. Autophagy is essential for cellular homeostasis and survival. The influence of antituberculosis drugs involved in vitamin D metabolism remains unknown. The aim of this study was to investigate the interaction between vitamin D and tuberculosis in the context of anti-tuberculosis drugs induced CYP27B1 expression, drugs induced vitamin D receptor (VDR) signaling, and vitamin D induces autophagy via autophagy effector LC3A. Adjunct vitamin D therapy may inhibit the expression of matrix degrading enzyme MMP9. In the present study we used immunohistochemistry to observe the expression of CYP27B1, VDR, LC3A and MMP9 in mouse model of tuberculosis following 2-month exposure to first line anti-tuberculosis drugs alone or in combination with vitamin D. We found that antituberculosis drugs relate with decrease of CYP27B1 expression. Co-treatment of vitamin D and anti-tuberculosis drugs could both enhance VDR and LC3A expression, in parallel, suppress the expression of MMP9. Collectively this study show that co-treatment of vitamin D and anti-tuberculosis drugs will reduce lung pathology.

**Keywords :** First line anti-tuberculosis drugs, vitamin D, CYP27B1, VDR, LC3A, MMP9



- 23-25 Agt 2016 poster presenter Symposium The 33rd World Congress of Internal Medicine, 2016, Bali Indonesia

Judul: Complementary medicine in patient with tuberculosis



## Tahun II

- Oral presentasi di The 7<sup>th</sup> Basic Science International Conference 7-8 Maret 2017

Judul: Bacteria confirmation using detection of specific 16S rRNA gene of *Mycobacterium tuberculosis* complex in sputum specimen for pulmonary TB

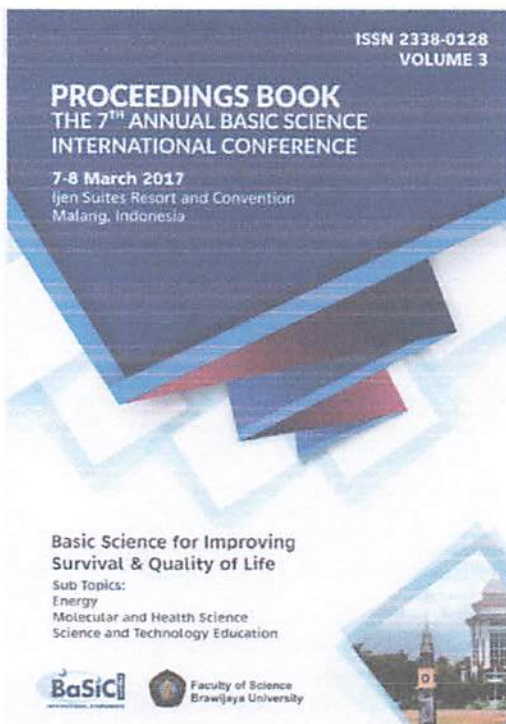


TABLE OF CONTENTS

Plenary Lectures

CRISPR/Cas9: Basics and Applications in "gene surgery" ..... 1  
Witjans Irwin

Use of Wavelet Analysis with Potential Field Data in Exploration and Monitoring Studies ..... 3  
Gulfamur Maulana, Ghette Setiawan

Mathematics for Solving 5G Massive MIMO IoT Networks Problem ..... 5  
Khotuna Anwar

The Role of Metal Ions in Diabetes - Metal Drugs and Supplements ..... 7  
Peter A. Lay, Anna Scibbi, Anna Lovina

Functionalization of Cellulose Scaffolds Via Low Temperature Plasma Etching ..... 8  
Tetsuya Arizono

Scientific Papers

A. Invited Papers

Complexity and Nano Sciences Approach to Life Sciences: The way to overcome our partial understanding on living system ..... 12  
Suryono S. Suryono

Surface Modification for Quartz Crystal Microbalance using Polystyrene as a Resin for Glucose ..... 13  
Suryawan P. Setiawan, Alvinah Sabarudin, Muzroho, Dionysius J. D. H. Santoso

Structure and Dynamics of Water: An insight from Molecular Simulation ..... 17  
Liliana Hidayat, Prandi Dwi Oka Kurniasari, Irfanayanti Putra Pradana, Masakazu Matsumoto, Mochi Taraka

Electrochemical Sensor for Industry and Medical ..... 18  
Iqbal Kurniawan, Nur An Kholiqat, Korlisa A. Mardiana

Polyamine-Modified Zeolite With A New Sorbent for Dispersive Solid Phase Extraction of Multiclass Pesticides ..... 24  
Ardiana Burhanudin, Prappa Anandhi, NagaAnandhi Pragasam

Mathematical Model of a Growing Tumor and Its Interaction with Immune System: The role of dendritic cell in controlling the immune system ..... 25  
Triandrewi and D.G. Mardani

Spatial Panel Dynamic Econometrics Model of Land Value, Land Use Intensities and Their Dynamic: Case Study of the Jakarta's Prings ..... 26  
Rafina Fikriani, Eri Sarwaningsih, Sun Andri A.

How Data Sciences Shapes Personalized Medicine Revolution ..... 27  
Seta Pristina

B. Energy

Two-Dimensional Isoscale Modeling for The Identification of Free Gas in Marine Sediments ..... 28  
Wolfgang Schmohl, and Frank J. Scholze

Analysis on Electrical Energy from Cylindrical-Geary-Type Sea Wave Power Plant Model ..... 33  
Muhammad Usman, Wawan Hendrawati

Poly (Eugenol Sulfonate) - Sulfonated Polyetherimide - Titanium Dioxide (TiO2) New blends Membrane Promising for Direct Methanol Fuel Cell (DMFC) ..... 35  
Lia Cahya Muawanah, Mardani Santoso, Ahmad Fauzi Iqbal, Nabila Asfar, Mochi Taraka, Saleh, Nurul Widiastuti

Geothermal Energy: Case Study Identification Based on Analysis of Ion Balance and Reservoir Characteristic ..... 40  
Suharno, A. Zaenudin And Ruslan

Energy Efficiency of Zinc-Carbon Accumulator and Standard Accumulator ..... 44  
Muhammad G. Irfan, Kurniawan Edo Fransis

Time Management of an anaerobic Solid Waste Digester with Lactate as A Starter to Obtain the Continuous Biogas Production ..... 48  
Dh. Ni Kethi Cahyani

Catalytic Hydrocracking to Biofuel of Kapok Seed Oil (Crotalaria Pentanther) Using Zn-Mo/NiSbMS Catalyst ..... 52  
Yusuf W. Alandari N. Prayogo, Danuwati Han Pratiwi, Achmad Rosyidi

Effect of Hierarchical Pore Structure on Performance of Co-Fe/NiSbMS-5 Catalyst in Hydrocracking of Sorghum Canehead Oil ..... 56  
Lenny Marinda, Aulia Setiawan, Muhammad Al-Ahmad, Achmad Rosyidi, Danuwati Han Pratiwi

Effect of Variable of Propeller Shaft angle for Propulsion of Traditional Fishing Vessels - A Study Case in Kemuning Waduk Bojonegara, Banten ..... 60  
Agung Sudrajat

Design of Thermoelectric Cooling Module on Tension Car ..... 64  
Dedarian, Yuzwardi Yusuf, Anwar Wicandjaja, Ivan Sopayan

C. Molecular and Health Science

Resistance Pattern of Mycobacterium Tuberculosis to First Line Anti-Tuberculosis Drugs (ATDs) in Central Java, Indonesia ..... 69  
Nevra Erwati, Der Nurrahmah

Insulin-Like Effects of anti-Diabetic Metab (V, M, W, and D) and Their Effects on Cellular Metabolism of Insulin-Sensitive Cells ..... 72  
Anna Setiawan, Anna Lovina, Peter A. Lay

Sensitivity Enhancement of Mycobacterium Tuberculosis Detection Based on Nucleotide Amplification of Exa Gene in Sputum Specimen of HIV-TB Patients ..... 75  
Dedik Riyanto Surya Swaminata Dewa, Sompalson, Wayan Tunas Ariana, Ni Made Mertaningsih

Bacteria Confirmations Using Detection of Specific IS6110 rDNA gene of Mycobacterium tuberculosis Complex in Sputum Specimen for Pulmonary TB ..... 78  
Nesti Inan Permata Sari, Anasasti, Wayan Tunas Ariana, Ni Made Mertaningsih

Sequencing DNA Analysis of The Specific Region IS6110 Gene of Mycobacterium Tuberculosis Complex Isolates from The Sputum of Pulmonary TB Patients ..... 82  
Sri Kurniasari, Soccarsono, Adnanirah, Ni Made Mertaningsih

Ethyl Acetate Fraction of Kalinchoe Pinnata (Linn) Pers Reduces the Production of TNF- $\alpha$  by Dendritic Cells in Pristane-Induced Lupus-Like Disease Mice ..... 84  
Niken Indriyanti, Josepho Scorsio, Nurhid Khadi

Total Antioxidant Activity and Anthocyanin Content of Purple Ulat Bangkok (Dioscorea Alata) ..... 88  
Ary, Pujiastuti, Nurhasbi, Sri Sukam, BA

Black Soybean (Glycine Soja L.) Mutis Decreased the Lipid Metabolism and Repair Endothelial Injury of Atherosclerosis Mice Model ..... 91  
Sri Rizkyu Lestari, Suciastuti, Carl Fauziahda, Didi Mandayana, Nurta Fery Kartika Putri

## Bacteria Confirmations Using Detection of Specific 16S rRNA gene of *Mycobacterium tuberculosis Complex* in Sputum Specimen for Pulmonary TB

Nastiti Intan Permata Sari<sup>1,3</sup>, Juniastuti<sup>2,3</sup>, Wayan Tunas Artama<sup>4</sup>, Ni Made Mertaniasih<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorium of Tuberculosis, Institute of Tropical Disease, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Departement of Clinical Microbiology, Faculty of Medicine, Airlangga University, Dr. Soetomo Hospital, Surabaya, Indonesia

<sup>3</sup>Magister of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, Airlangga University, Indonesia

<sup>4</sup>Departement of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

\*Email-address: nmademertaniasih@gmail.com

**Abstract** – *Mycobacterium tuberculosis Complex* (MTBC) still was found to be primary isolate of pulmonary infection in human. Indonesia was ranked as the second country with highest tuberculosis (TB) disease. New smear-positive cases and all cases of TB suspect in Indonesia increased from year to year. In 2015, all cases of TB amounted to 117 cases per 100,000 people. 16S rRNA gene was chosen for detection because this gene was conserved. 16S rRNA was typically used for phylogenetic analysis of various organisms. The purpose of this research was to study the suitability of PCR method using 16S rRNA gene for identification of MTBC as a confirmatory test after conventional test using standard microscopic detection of acid-resistant bacteria. Sputum sample from pulmonary tuberculosis patients at Dr. Soetomo General Hospital, Surabaya Indonesia was collected randomly from September to November 2016. The sample was examined by PCR with a target of 1537 bp 16S rRNA gene for detection and identification of MTBC, which then compared to conventional method using Ziehl Neelsen (ZN) staining. Total of 30 samples from pulmonary tuberculosis patients were analyzed for MTBC diagnosis purpose. Results of PCR product were 100% positive of 16S rRNA gene, indicated by band at size 1537 bp. While using smear method, only 63.33% of all sample found positive. Detection of MTBC in the sputum of pulmonary TB patients using conventional test still required confirmation with molecular test using nucleic acid amplification method with specific DNA target of 16S rRNA gene from *Mycobacterium tuberculosis Complex*. In other site, this method using 16S rRNA target was able to be tool potentially of species and strains differentiation of isolates and clinical specimens.

Key words: 16S rRNA gene, *Mycobacterium tuberculosis Complex*, PCR method, sputum, pulmonary tuberculosis

### 1. INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis Complex* (MTBC). The disease usually not only attack to pulmo (pulmonary tuberculosis), but also attack extra-pulmo, which then called extrapulmonary tuberculosis [1]. According to WHO, there was 9 million new TB cases with 1,5 million mortality caused by tuberculosis in 2013 and 9,6 million new TB cases with 1,5 million mortality in 2014 (WHO, 2015; WHO, 2014). Prediction about new TB cases in 2014 about 2,9 million cases (223 of 100.000 population) and in 2105 was estimated to be 2,8 million cases every year (217 of 100.000 population) [2].

This disease usually appears several years after infection when immune decreased (immunocompromised) [3]. MTBC was major group of human pulmonary infection which had various characteristics. They were an aerobic group of acid-fast, slow-growing bacteria, and difficult to distinguish among species [4].

Genes of small subunit ribosomal including 5S, 16S, and 23S, and each of them was highly conserved. Out of the three genes, 16S rRNA is the one of mostly used in the molecular epidemiology because its specificity to identify species in phylogenetic analysis [5,6].

Acid Fast Basilli smear (AFB) is commonly used for TB infection screening. This method can be used for finding bacterial form of *Mycobacteria* and counting bacterial number in the sputum specimens. But, this method still have low sensitivity (<50%) for confirming of MTBC infection [7,8,9].

2. Publikasi internasional Q3: The International Journal of Mycobacteriology volume 6 issue 4 Oct-Des 2017

## Original Article

## Vitamin D, Cell Death Pathways, and Tuberculosis

Manik Retno Wahyunisari<sup>1</sup>, Ni Made Mertaniasih<sup>1</sup>, Muhammad Amin<sup>2</sup>, Wayan T. Artama<sup>3</sup>, Eko B. Koendhori<sup>1</sup>

Departments of <sup>1</sup>Medical Microbiology and <sup>2</sup>Pulmonology and Respiratory Medicine, Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, East Java, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

## Abstract

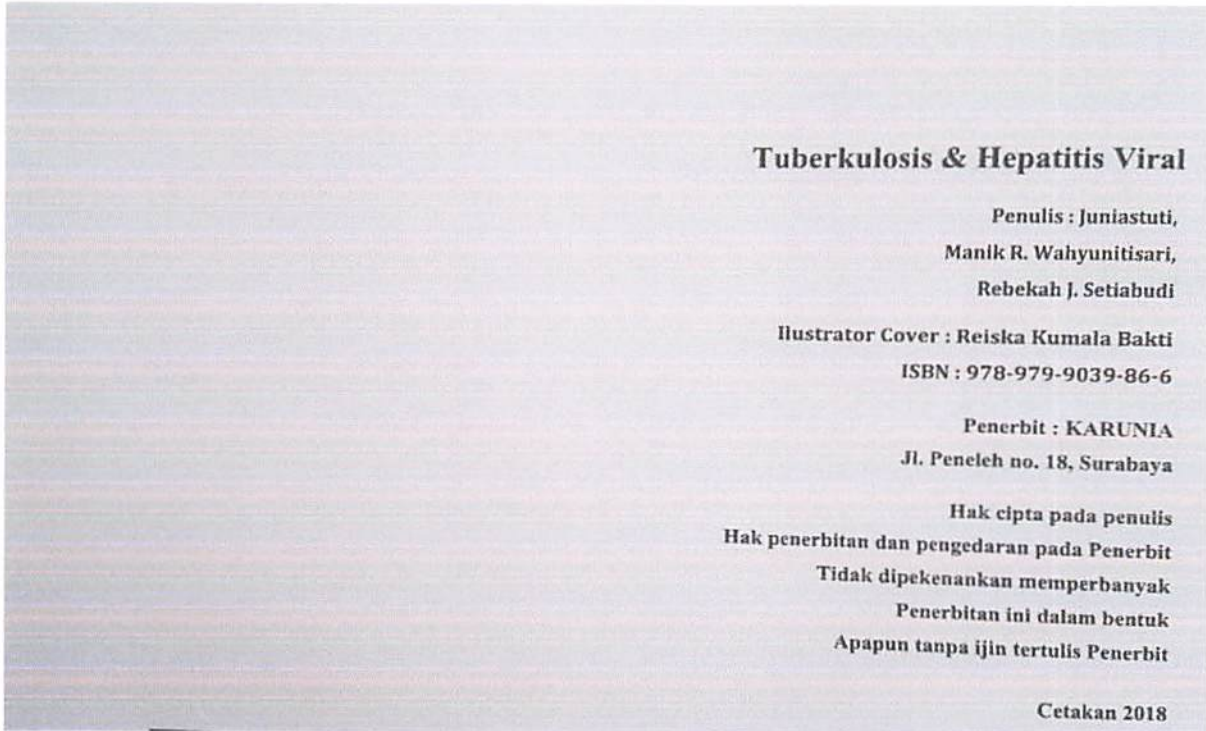
**Background:** *Mycobacterium tuberculosis* induces cellular necrosis that could promote spread of infection. The aim of this study is to analyze the effects of Vitamin D3 supplementation to improve the effectiveness of 2<sup>nd</sup>-line anti-tuberculosis (TB) drug therapy, especially in relation with cell death pathways. **Methods:** *Mus musculus* C3HeB/FeJ was randomly divided into four groups containing eight animals each. The 1<sup>st</sup> group (G1), consisting of mice that were intratracheally infected with multidrug-resistant strain of *M. tuberculosis* and sacrificed on 2-week postinfection to confirm successful infection. (G2) was a group of TB mice without therapy. Then, (G3) was a group of mice with the 2<sup>nd</sup>-line anti-TB therapy. The last group (G4) was a group of mice receiving not only the 2<sup>nd</sup>-line anti-TB therapy but also daily oral Vitamin D3 supplementation. Immunohistochemistry was used to measure expression of nuclear Vitamin D receptor, apoptosis marker cleaved caspase-3, cathelin-related antimicrobial peptide (CRAMP) and LC3B autophagy markers, necrosis marker RIPK3, and collagenase matrix metalloproteinase-1 (MMP1). The number of bacteria in the lung was calculated by colony forming units. The partial least square structural equation modeling with SmartPLS 3.2.6 software was used to analyze structural models among the variables. **Results:** Supplementation of Vitamin D3 on the 2<sup>nd</sup>-line anti-TB therapy increases Vitamin D3 receptor, CRAMP, LC3B, caspase-3 ( $P = 0.026$ ,  $P = 0.000$ ,  $P = 0.001$ ), presses MMP1, and the number of bacteria ( $P = 0.010$  and  $P = 0.000$ , respectively). The structural equation modeling analysis shows that increasing autophagy pathways reduces necrosis by lowering MMP1, whereas apoptosis reduces necrosis by decreasing the number of bacteria (each with indirect effects - 0.543 and - 0.544). **Conclusion:** A comprehensive analysis with the partial least square structural equation modeling shows decreasing necrosis requires increasing autophagy and apoptosis.

**Keywords:** Apoptosis, autophagy, matrix metalloproteinase-1, multidrug-resistant-tuberculosis, necrosis, Vitamin D3

## Tahun ke-3

1. Buku Saku Tuberkulosis dan Hepatitis Viral, ISBN 978-979-9039-86-6, Penerbit: Karunia





## 2. Bukti submit Malaysian Journal of Medicine & Helath Sciences (Q4)

Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences <onbehalf@manuscriptcentral  
to me ▾

Mon, Nov 12, 11:33 AM (2 days ago)



12-Nov-2018

Dear Dr. Wahyunitisari:

A manuscript titled The prevalence of Diabetes Mellitus among Tuberculosis Positive Case in Surabaya (MJMHS-2018-0388) has been submitted by Dr. Dwi Indriati to the Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer-review system, ScholarOne Manuscripts, automatically creates a user account for you. Your USER ID and PASSWORD for your account is as follows:

Site URL: <https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs>

USER ID: [manik1retno@gmail.com](mailto:manik1retno@gmail.com)

PASSWORD: For security reasons your password is not contained in this email. To set your password click the link below.

[https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs?URL\\_MASK=46a131a848b447ed9d81883ab2d633bb](https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs?URL_MASK=46a131a848b447ed9d81883ab2d633bb)

You can use the above USER ID and PASSWORD (once set) to log in to the site and check the status of papers you have authored/co-authored. Please log in to <https://mc.manuscriptcentral.com/mjmhs> to update your account information via the edit account tab at the top right.

Thank you for your participation.

Sincerely,  
Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences Editorial Office

**Lampiran 2: Tim Peneliti**

No	Nama/NIDN	Jabatan	Bidang Keahlian	Instansi Asal
1	Dr. Wiwin Retnowati, SSi., MKes 0009046803	Ketua	Biologi Sel	Dept Mikrobiologi FK Unair
2	Dr. Manik Retno Wahyunitisari, dr., MKes	Anggota 1	Bakteriologi	Lembaga penyakit Tropis Unair
2	Dr. Juniastuti, dr., M.Kes 0024067104	Anggota 2	Mikrobiologi Klinik	Instalasi Mikrobiologi RSU Dr Soetomo Surabaya