

BAB 6
PEMBAHASAN

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Penghitungan jumlah makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* antara makrofag yang distimulasi dengan Andrographolide dan tanpa Andrographolide

Dari Tabel 5.1 dan grafik pada Gambar 5.8 dapat dilihat bahwa jumlah rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen lebih besar daripada kelompok kontrol pada langsung pasca ingesti maupun setelah waktu inkubasi 24 jam dan 72 jam. Hasil analisis statistik dari rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* antara kelompok eksperimen dibandingkan dengan kelompok kontrol digunakan $p < 0,005$, hasilnya lebih kecil berarti ada perbedaan bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa makrofag yang distimulasi dengan Andrographolide mempunyai daya fagositosis lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Terjadinya fagositosis oleh makrofag diperantarai oleh beberapa reseptor. *Mycobacterium tuberculosis* memasuki makrofag melalui *receptor-mediated fagositosis* yang merupakan suatu proses yang melibatkan reseptor komplemen (CR1, CR3 dan CR4), reseptor mannose, scavenger receptor dan reseptor Fc γ (McDonough *et al.*, 1993 ; Lucy *et al.*, 2002).

Agar kuman mudah berikatan dengan makrofag , sebelum diinfeksi dengan dioopsonisasi terlebih dulu. *Mycobacterium tuberculosis* dioopsonisasi dengan

Fresh pooled human serum dimana komplemennya masih aktif. Saat opsonisasi dieramkan suhu 37°C pada inkubator CO₂ 5%, agar opsonisasinya optimal. Suspensi *Mycobacterium tuberculosis* yang telah diopsonisasi dicuci dengan PBS dan terakhir peletnya diresuspensi dengan media RPMI. Suspensi kuman ini agar tidak terjadi *clumps*, dilewatkan dalam jarum tuberkulin 26 G. Jarum tuberkulin diameternya sangat kecil sehingga diharapkan kuman bisa tersebar rata sehingga pada saat diinfeksi setiap kuman punya kesempatan yang sama untuk berikatan dengan makrofag.

Agar proses *adherence* dan penelanan dapat lebih efektif, maka *Mycobacterium tuberculosis* yang ditambahkan ke dalam kultur harus tersuspensi merata dan tidak berkelompok (*clumping*) (Zabaleta *et al.*, 1998).

Hal tersebut juga sesuai dengan pendapat Turgeon (1999) dan Banki *et al.*, (2000) bahwa *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginvasi makrofag hospes setelah terjadi opsonisasi (Turgeon, 1999; Banki *et al.*, 2000) oleh sebab itu dalam penelitian ini *Mycobacterium tuberculosis* yang diinfeksi sebelumnya diopsonisasi dengan serum golongan darah AB yang belum diinaktivasi. Setelah *Mycobacterium tuberculosis* dikenali oleh reseptor makrofag, maka akan terjadi *engulfment*, dimana membran makrofag akan melingkupi *Mycobacterium tuberculosis* secara melingkar (*zipper mechanism*) (Langermans *et al.*, 1994; Verhoef, 2003), sehingga *Mycobacterium tuberculosis* berada dalam fagosom (Leijh *et al.*, 1986; Turgeon, 1999). *Engulfment* tersebut dapat terjadi karena keterlibatan berbagai reseptor (Banki *et al.*, 2000) Fagosom kemudian mengalami maturasi dan selanjutnya berfusi dengan lisosom untuk membentuk

fagolisosom (Arlita, 2005), suatu organel dengan komponen antimikroba dan memiliki pH asam (pH ~ 6.2) (Lorenz and Gerald, 2002).

Andrographolide dapat meningkatkan produksi IFN- α , IFN- γ pada PBMCs dan juga dapat meningkatkan kemampuan fagositosis peritoneal makrofag guinea pig untuk memfagositosis eritrosit ayam (Peng *et al.*, 2002).

Kemampuan *Mycobacterium tuberculosis* untuk mensintesis protein dan berbagai komponen seluler ternyata dapat menyebabkan kuman ini mampu bertahan terhadap proses antimikroba fagolisosom. (Lorenz and Gerald, 2002).

Pengamatan untuk mengetahui fagositosis *Mycobacterium tuberculosis* oleh sel-sel makrofag dilakukan dengan pewarnaan Acridine Orange dan diamati dengan mikroskop fluorescein, sehingga *Mycobacterium tuberculosis* yang berada dalam makrofag bisa dibedakan dengan *Mycobacterium tuberculosis* yang berada diluar makrofag. Pada metode ini *Mycobacterium tuberculosis* yang berada dalam makrofag akan tampak makrofagnya berwarna orange, dan didalamnya tampak *Mycobacterium tuberculosis* berbentuk batang. Sedangkan pewarnaan Ziehl Nelsen menggunakan pemanasan yang dapat meningkatkan penetrasi zat warna ke dalam sel *Mycobacterium tuberculosis*, tetapi dapat menyebabkan rusaknya sel makrofag (Zabaleta *et al.*, 1998; Bishayi *et al.*, 2000).

Pewarnaan Kinyoun-Gabbet meskipun dapat membedakan *Mycobacterium tuberculosis* intraseluler, akan tetapi metode pewarnaan ini belum dapat digunakan untuk membedakan antara *Mycobacterium tuberculosis* yang telah difagositosis oleh makrofag (intraseluler) dengan *Mycobacterium tuberculosis* yang belum difagositosis oleh / menempel pada makrofag

(ekstraseluler) (Bishayi *et al.*, 2000). Dalam penelitian ini, dengan pengecatan Acridine Orange hal tersebut dapat dibedakan.

Kalau diikuti dari waktu ke waktu, pada beberapa eksperimen terdapat kenaikan jumlah makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* sementara pada kelompok kontrol jumlah tersebut tidak meningkat. Sedangkan dari hasil analisis statistik dari rerata makrofag yang mengandung *Mycobacterium tuberculosis* antara waktu inkubasi digunakan $p < 0,005$, hasilnya lebih besar, berarti tidak ada perbedaan bermakna dibandingkan dengan kelompok kontrol. Hal ini menunjukkan bahwa makrofag yang distimulasi dengan Andrographolide efek aktifasinya masih dipertahankan sampai waktu percobaan 72 jam. Hal ini dimungkinkan karena pada penelitian ini saat waktu proses fagositosis hanya 1 jam dan setelah itu semua kuman yang tidak terfagositosis dibuang dengan cara sumuran dicuci dengan PBS. Tetapi dalam penelitian ini terbukti makrofag masih mempertahankan *Mycobacterium tuberculosis* yang terfagosit hingga 72 jam waktu inkubasi.

6.2 Penghitungan jumlah koloni *Mycobacterium tuberculosis* yang tumbuh pada media padat Middlebrook 7H10 antara makrofag yang distimulasi dengan Andrographolide dan tanpa Andrographolide

Dari Tabel 5.2 dan grafik pada Gambar 5.9 dapat dilihat bahwa rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* pada kelompok eksperimen jauh

lebih rendah daripada kelompok kontrol, baik pada saat segera setelah selesai infeksi maupun setelah inkubasi 24 jam dan 72 jam. Sedangkan dari hasil analisis statistik dari rerata jumlah CFU/ml *Mycobacterium tuberculosis* antara kelompok eksperimen dibandingkan dengan kelompok kontrol digunakan $p < 0,005$ hasilnya lebih kecil berarti ada perbedaan bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa makrofag yang distimulasi dengan Andrographolide mempunyai daya bunuh intraseluler lebih tinggi daripada kelompok kontrol.

Pada penelitian ini daya bunuh intraseluler makrofag setelah waktu inkubasi tertentu untuk daya bunuh intraseluler didasarkan pada perhitungan jumlah koloni yang masih dapat tumbuh setelah makrofag dilisis dan ditanam pada media Middlebrook 7H10. Koloni yang dapat tumbuh setelah 1 minggu dihitung dan dilaporkan sebagai CFU/ml (*Colony Forming Units*).

Andrographolide adalah suatu diterpenoid lactone mempunyai rumus molekul $C_{20}H_{30}O_5$ dengan berat molekul 350,45. Andrographolide merupakan komponen terbanyak dari *Andrographis paniculata* (Lu *et al.*, 1981) yang disari dari tanaman *Andrographis paniculata*. Sel makrofag yang terinfeksi juga mengeluarkan IL-12 yang mengontrol infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. IL-12 mengatur respon imun Th-1 dengan memproduksi IFN- γ dan menghambat IL-10 dan IL-4 (Ulrich and Kaufman, 2004).

IFN- γ , yang mengaktivasi makrofag dengan cara menginduksi enzim *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) sehingga meningkatkan produksi *Reactive Nitrogen Intermediate* (RNI) yang diperlukan untuk membunuh

Mycobacterium tuberculosis dan melindungi hospes terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis* (De Vries, 1994; Flynn, 2004; Chan, 2002; Passmore *et al.*, 2001). Selain itu, juga terbentuk molekul efektor oksidatif. Walaupun stress oksidatif dapat mengurangi pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, namun tidak mampu mengeliminasi semua pathogen, dikarenakan *Mycobacterium tuberculosis* memproduksi peroksidase/ *phosphonitric reductase*.

Penelitian yang dilakukan oleh Mertaniasih dkk (2005) pada kultur makrofag menyatakan ada peningkatan produksi IL-12 pada supernatan kultur makrofag pada pemberian Andrographolide, baik kultur makrofag tanpa intraseluler *Mycobacterium tuberculosis* maupun yang terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, juga kultur makrofag dari individu sehat maupun yang dari penderita sama ada peningkatan IL-12 secara bermakna.

Respon Th-2 CD4 tidak protektif terhadap eliminasi *Mycobacterium tuberculosis*. Andrographolide akan menyebabkan meningkatnya IFN- γ pada subset Th-1. IFN- γ ini akan mengaktifkan makrofag dan menghasilkan IL-12. Makrofag yang aktif akan memproduksi IL-12 yang mengatur respon imun Th-1 dengan memproduksi IFN- γ dan menghambat IL-10 dan IL-4 (Boom *et al.*, 2003; Ulrich and Kaufman, 2004). Sehingga dalam hal ini ada efek saling mendukung dalam pengaktifan makrofag.

IFN- γ pada akhirnya akan menginduksi sintesis enzim-enzim yang dapat mengakibatkan *respiratory burst* dimana akan digunakan makrofag untuk membunuh bahan-bahan yang difagositnya. Bahan-bahan yang dihasilkan

makrofag antara lain: NO, H₂O₂ dan O₂⁻ (Lucy *et al.*, 2002). IFN- γ , nitric oxide dan TNF- α merupakan mediator yang sangat potensial untuk mengontrol pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* (Carranza *et al.*, 2006).

Mycobacterium tuberculosis bisa bertahan dalam makrofag melalui pembatasan fusi phagosome-lysosome. Apabila ekspresi Mannose receptornya diblok maka fusi phagosome –lysosome terhambat (Kang *et al.*, 2002; Vergne *et al.*, 2005). *Mycobacterium tuberculosis* adalah patogen intraseluler yang mampu bertahan pada awal fagosom. Makrofag yang teraktifasi akan memproduksi oksigen reaktif dan nitrogen intermediate. Populasi Th-1 akan memproduksi IFN- γ . IFN- γ bersinergi dengan TNF- α dalam aktifasi makrofag (Kaufmann, 2002; Ottenhoff *et al.*, 2005).

Mycobacterium tuberculosis menghambat IFN- γ yang diperantarai oleh aksi antimikobakterial dengan mengadopsi berbagai macam mekanisme. IFN- γ terikat menuju reseptor *Mycobacterium tuberculosis* dan akan memerintahkan untuk menginisiasi / memicu timbulnya signal. Apabila reseptor IFN- γ tidak ada maka modulasi signal tidak akan terjadi (Singhal *et al.*, 2007).

Metode penghitungan *Mycobacterium tuberculosis* sebagai CFU/ml merupakan metode yang tidak mahal tetapi membutuhkan waktu yang lama. Kendalanya adalah faktor keberadaan *Mycobacterium tuberculosis* ekstraseluler, dimana *Mycobacterium tuberculosis* yang hanya menempel di dinding permukaan sel makrofag (ekstraseluler) juga akan dapat tumbuh pada media padat Middlebrook 7H10 (Leijh *et al.*, 1986), tetapi hal tersebut diupayakan seminimal mungkin dengan melakukan beberapa kali pembilasan sel makrofag dengan

menggunakan PBS. Kalaupun masih ada *Mycobacterium tuberculosis ekstraseluler* hal tersebut bisa diminimalisasi karena dalam penelitian ini ada kelompok kontrol.

Dalam penelitian ini apabila diikuti dari waktu ke waktu rerata CFU/ml pada kelompok eksperimen lebih rendah daripada kelompok kontrol sampai waktu inkubasi 24 jam tetapi pada waktu inkubasi 72 jam rerata CFU/ml sudah naik. Hal ini menunjukkan perlu booster pada pemakaian terhadap penderita.

Hasil tersebut didukung oleh pendapat Leijh *et al.*, (1986) yang menyatakan bahwa penentuan proses *killing* intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis (in vitro)* dapat dilakukan dalam periode waktu yang sangat singkat setelah terjadinya fagositosis (*ingesti*) *tuberculosis*. Oleh karena itu, untuk memperoleh hasil yang optimal mengenai kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, sebaiknya penentuan proses *killing* intraseluler terhadap *Mycobacterium tuberculosis (in vitro)* dilakukan dalam periode waktu yang singkat.

Hal tersebut didukung pula oleh pendapat Rousseau *et al.*, (2004) bahwa pada penelitiannya dimana pada kultur makrofag yang produksi RNInya tidak dihambat sudah terjadi multiplikasi mulai hari pertama dan multiplikasinya lebih tinggi lagi apabila produksi RNInya dihambat (Rousseau *et al.*, 2004).

6.3 Pengaruh Andrographolide terhadap kemampuan daya bunuh intraseluler makrofag terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Dari sub bab 6.1 dan 6.2 yang berdasarkan penggabungan data-data pada Tabel 5.1 dan grafik pada Gambar 5.8 dengan data-data pada Tabel 5.2 dan grafik pada Gambar 5.9 dapat diinterpretasikan bahwa pemberian atau stimulasi makrofag dengan Andrographolide dapat menaikkan fungsi-fungsi penting dari makrofag dalam menanggulangi infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis*, yaitu meningkatkan daya fagositosis serta daya bunuh intraseluler terhadap kuman *tuberculosis*.

Penelitian ini, dilakukan secara invitro pada kultur makrofag yang telah dimurnikan, meskipun pemurnian belum sempurna. Dalam tubuh penderita (*in vivo*), terdapat interaksi antara berbagai elemen respon imun antara lain sel T.

Dalam penelitian ini untuk setiap kali ulangan diperlukan 14 sumuran, 6 sumuran untuk kelompok eksperimen (3 sumuran makrofagnya dilisis dan 3 sumuran dicat dengan Acridine Orange) dengan Andrographolide dan 6 sumuran untuk kelompok kontrol tanpa Andrographolide. Serta 2 sumuran lagi untuk diamati pada mikroskop inverted pada saat maturasi monosit menjadi makrofag, diamati sampai jumlah *confluent*. Hal ini dilakukan untuk menghindari kontak dengan udara luar terlalu lama sehingga kontaminasi bisa diminimalisasi. Pada saat 2 kali optimasi isolasi PBMC dengan 10 ml darah, pelet (*monocytes recovered*) yang diperoleh sedikit dan hanya cukup untuk 8 sumuran (*Nunc tissue culture-24 well plate*). Karena diperlukan 14 sumuran maka volume darah yang

dibutuhkan ± 20 ml. Penelitian yang dilakukan Almeida *et al.*, (2000) menyatakan bahwa dari 20 ml darah bisa diperoleh monocyts 4×10^6 dan dari 40 ml darah dapat diperoleh monosit $7,2 \times 10^6$ serta dari relawan yang berbeda dengan volume darah yang sama bisa didapat monosit yang berbeda (Almeida *et al.*, 2000).

Defibrinasi darah menggunakan gelas beads agar plateletnya terpisah. Defibrinasi dilakukan dalam erlenmeyer agar mudah mengocoknya. Gelas beads dan erlenmeyer sebelumnya telah disterilisasi agar tidak terjadi kontaminan pada kultur. Hal yang perlu diperhatikan pada isolasi PBMC bahwa platelet dapat juga berikatan dengan monosit membentuk *clumps* (Weyrich *et al.*, 1996). Tetapi platelet dapat dihilangkan dengan mudah dengan penggoyangan secara pelan-pelan (Almeida *et al.*, 2000).

Selain dengan defibrinasi bisa juga darah diberi antikoagulan. Pada proses isolasi PBMC darah yang digunakan bisa menggunakan antikoagulan Heparin (Passmore *et al.*, 2001). Menurut Gandasoebrata (1995) seperti dikutip oleh Rachmawati (2005) bahwa Heparin berdaya seperti antitrombin, tidak berpengaruh terhadap bentuk eritrosit dan leukosit. Tetapi menurut Mertaniasih (2005), penggunaan gelas beads untuk defibrinasi pada proses isolasi PBMC ternyata viabilitas sel monositnya lebih besar daripada penggunaan heparin, pada penghitungan dengan *trypan blue exclusion* hasilnya $>95\%$ viable (Mertaniasih dkk., 2005).

Isolasi PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) dalam penelitian ini menggunakan metode *density gradient centrifugation* dengan Ficoll Histopaque (Sigma Chemicals, St Louis, MO) (Bennet S, Breit SN., 1994) menggunakan sentrifuse *swinging bucket rotor*. Ficoll adalah polimer molekul tinggi yang

berasal dari sakarosa dan epichlorhydrin (Rantam, 2003). Berat jenis dari Ficoll – Hypaque adalah 1,070 g/ml. Penggunaan Percoll gradien (BJ=1,064 g/ml) bisa menghasilkan 90 % monosit, tetapi dalam penelitian ini peneliti menggunakan Ficoll-Hypaque disamping mudah diperoleh juga dalam penelitian ini masih diharap adanya limpocyte. Dalam isolasi PBMC untuk mendapatkan *buffy coat* seperti Gambar 5.2 pada saat sentrifugasi dipasang *brake off* agar lapisan *buffy coat* yang terbentuk tidak rusak. Sedangkan untuk mendapatkan pelet pada saat sentrifugasi dipasang *brake on*. Suhu yang digunakan dalam proses isolasi adalah suhu ruang, dimana hal tersebut sesuai juga dengan pendapat Almeida (2000) bahwa suhu adalah bagian yang kritis pada isolasi PBMC dimana suhu ruang yaitu antara 25⁰C-35⁰C, apabila suhu diturunkan akan terjadi agregasi monosit secara spontan.

Menurut Rantam (2003) dalam buku metode imunologi menyatakan *buffy coat* adalah terdiri dari sel mononuklear yang terletak pada lapisan bagian paling atas dari eritrosit. Sel mononuklear antara lain; monosit, makrofag, limfosit T, limfosit B. Dalam *buffy coat* masih ada trombosit. Untuk menghilangkan trombosit bisa dicuci dengan PBS/5 mM EDTA atau PBS, kemudian disentrifugasi dengan temperatur 4⁰C selama 10 menit dengan kecepatan 1600, 1400, 1200 U/min (Rantam, 2003). Dalam penelitian ini *buffy coat* dicuci dengan PBS 3 kali sehingga diharapkan bebas dari kontaminasi trombosit.

Pencucian selain untuk menghilangkan kontaminasi trombosit juga diharapkan limpositnya berkurang. Menurut Almeida *et al.*, (2000) setelah dicuci 3 kali masih mengandung sekitar 40 % limpocite dan pencucian 5 kali masih menyisakan sekitar 30 % limpocite. Menurut Rantam (2003) untuk mendapatkan

monosit murni atau limposit murni perlu dilakukan teknik khusus. Karena dalam penelitian ini kehadiran limposit masih diperlukan maka teknik khusus tersebut tidak dilakukan. Pengecatan Giemsa bertujuan untuk menghitung jumlah monosit, sedangkan pewarnaan *trypan blue* digunakan untuk menguji viable dari sel (Yong Jun Li, 2002; Mertaniasih dkk, 2005).

Dalam proses maturasi monosit menjadi menjadi makrofag diperlukan medium pertumbuhan. Medium pertumbuhan yang digunakan adalah media (RPMI)-1640.

Pada proses penyiapan media RPMI digunakan aquadest steril dan pelarutannya cukup digoyang pelan-pelan. Penggunaan aquades steril bertujuan untuk meminimalisasi adanya kontaminasi bakteri dan pelarutannya digoyang pelan-pelan agar media tidak rusak. Pengaturan pH menggunakan HCl dengan konsentrasi 1 Normal dan larutan NaOH 1 Normal, pH yang terlalu asam dinaikkan dengan penambahan NaOH dan pH yang terlalu basa diturunkan dengan penambahan HCl. Media tersebut kemudian disterilisasi dengan filter membran (*positive pressure recommended*), kalau menggunakan autoklaf media akan rusak.

Serum golongan darah AB yang diperoleh dari PMI UTD Surabaya sebagian dipanaskan dalam waterbath suhu 56⁰C selama 30 menit. Tujuan dari pemanasan adalah untuk menonaktifkan komplemennya / HI-PHS (*Heat Inactivated Pooled Human Serum*). Komplemen yang masih aktif akan mempengaruhi maturasi monosit menjadi makrofag (Hussain *et al.*, 2000) Serum dalam media RPMI berfungsi sebagai suplemen.

Maturasi monosit-monosit menjadi makrofag dilakukan dalam *24 well tissue culture*. Setelah *buffy coat* diresuspensi dengan media RPMI-1640, 200 μ L resuspensi diambil dan diletakkan pada tengah coverslip kemudian dibiarkan selama 1 jam pada suhu 37⁰C dan kadar CO₂ 5%. Resuspensi sel makrofag tidak langsung ditambah media, hal ini untuk memberi kesempatan sel-sel monocyte melekat kuat pada coverslip. Apabila langsung diberi media ternyata sebagian besar monositnya bergerombol kepinggir coverslip. Setelah 1 jam kemudian diberi media RPMI 1640 yang telah ditambah 10 % serum donor golongan darah AB dari PMI Surabaya yang telah diinaktivasi / HI-PHS (*Heat Inactivated Pooled Human Serum*). Proses maturasi monocyte menjadi makrofag dilakukan dalam inkubator CO₂ dengan kadar 5 % dan suhu 37⁰C. Inkubator CO₂ yang digunakan sebelumnya disterilisasi dengan meletakkan campuran formaldehyde dengan KMnO₄, sebab kontaminsi dalam inkubator pada saat inkubasi cukup besar. Dalam penelitian ini pada hari kelima dan keenam sel sudah matur (*tampak confluen*). Sedangkan menurut Rachmawati (2005) dalam penelitian yang dilakukan dengan penambahan 10 % serum sel matur pada hari ketujuh. Hasil penelitian Mertaniasih (2005) sel matur pada hari keenam dan ketujuh. Hasil yang agak berbeda dilaporkan oleh Yong *et al.*, (2002) menyatakan bahwa sel monosit matur menjadi makrofag pada hari ketiga sampai ke empat. Hanya saja dalam penelitian ini Yong-Jun Li (2002) memberikan suplemen 20 % serum pada kultur.

Gugus lakton akan berikatan dengan rantai karbohidrat dari protein transmembran pada permukaan sel T, akibatnya sel T helper menjadi aktif untuk

selanjutnya mensekresikan sitokin yang dapat mengaktifasi sel lain seperti makrofag dan neutrofil.

Karena dalam kultur makrofag dalam penelitian ini juga mengandung limposit maka pada saat dilakukan aktifasi dengan makrofag akan menyebabkan limposit T helper menjadi aktif dan mensekresikan sitokin.

Penelitian yang dilakukan oleh (Widyawaruyanti dkk., 1999) terhadap kultur subset T helper-1 mencit ternyata Andrographolide mempengaruhi sekresi limfokin terutama IFN- γ dan TNF- α . Andrographolide dapat meningkatkan IFN- γ dan menekan TNF- α .

Dalam setiap respon imun, limfosit T CD4 Th-1 maupun Th-2 akan terangsang (Fenton and Vermeulen, 1996; Flynn and Chan, 2001), akan tetapi dalam pertahanan tubuh terhadap invasi dengan bakteri intraseluler seperti *Mycobacterium tuberculosis*, peranan limfosit T CD4 Th-1 lebih dominan (Flynn and Chan, 2001; Chan, 2002; Ulrich and Kaufman, 2004).

Makrofag adalah sel paradigma yang mengacu pada *Mycobacterium tuberculosis*. Makrofag yang terinfeksi *tuberculosis* dapat mengalami apoptosis (O'Sullivan MP *et al.*, 2007). Makrofag alveolar memainkan peranan penting dalam mengeliminasi partikel yang masuk melalui udara serta organisme lain dan dapat dipertimbangkan bahwa populasi sel tunggal akan berinteraksi dengan tuberkel basilus. Makrofag dapat diambil dari aliran darah dan ini dapat memperbaiki infeksi beberapa house.

Interaksi dari bacilus dengan makrofag dapat melalui reseptor seluler antara lain reseptor fc, complemen, mannose, protein permukaan, CD 14, CD 43

Ini tidak diketahui jika bakteri berinteraksi dengan 1 atau lebih reseptor ini selama infeksi *invivo*. Hasil penelitian secara *invitro* menyarankan bahwa respon makrofag bergantung pada tipe reseptor dengan bakteri yg berinteraksi.

Interaksi dengan fc reseptor meningkatkan produksi ROI dan penggabungan dari bakteri yang mengandung fagosom dengan lisosom. Hal yang berlainan interaksi dari bakteri dengan komplemen reseptor 3 (CR3) mencegah terjadinya *respiratory burst* dan menghalangi maturasi dari fagosom yang berinteraksi dengan bakteri jadi mencegah penggabungan dengan lisosom. Interaksi dengan mikobakteria dengan anggota dari famili TLR telah dipelajari. TLR 2 dan TLR 4 dapat teraktifasi oleh beberapa komponen *Mycobacterium tuberculosis* diantaranya lipoprotein dengan berat molekul 19 kda dan lipoarabinomanan yang akan menyebabkan makrofag aktif melalui TLR 2 dan menyebabkan terjadinya produksi IL 12 dan memicu pembentukan oksida nitrit atau INOS (Bocchino *et al.*, 2005; Pando *et al.*, 2007).

Reseptor dengan bakteri yang berinteraksi ini dapat diobservasi bahwa kolesterol seluler yang hadir pada membran sel makrofag adalah molekul yang penting untuk internalisasi dari bakteri. Ini dipercaya bahwa kolesterol seluler bekerja sebagai sebuah kait yang berhubungan langsung dengan bakteri dan sebagai stabilisator interaksi dengan membran makrofag selain itu bakteri dapat diinternalisasi secara efisien. Setelah bakteri masuk kedalam makrofag mereka secara umum memilih lokasi didalam fagosom mikobakteria. Struktur ini mengacu dari membran plasma dan hadir pada reseptor sel permukaan. Hal yang berlainan terhadap fagositosis normal selama terjadinya fagosomal adalah dapat didegradasi selama penggabungan dengan lisosom dan mikobakterium

menghambat proses ini. Penghambatan ini bergantung pada proses aktif yang diinduksi oleh *Mycobacterium tuberculosis* yang viabel sejak bacilus mati dapat ditemukan dengan mudah dalam kompartemen lisosom. Disamping memiliki sebuah morfologi yang berbeda fakuola didalam bakteri yang hadir pada kompartemen endosomal di awal merupakan marker seperti RAB 5 dan RAB 15 gtp-ase dan tidak termasuk molekul RAB 7 (Pando *et al.*, 2007).

Sebuah penemuan yang biasanya konsisten dengan sebuah blok dari sebuah proses maturasi dari endosom awal sampai dengan akhir. Karakteristik yang lain dari fagosom mikobakterial adalah asidifikasi yang terbatas atau dibatasi. Secara normal bahan ditransportasikan melalui rute endosom yang ditemukan sebagai medium asidik menuju aksi dari pompa proton secara vesikuler yang melibatkan adenosin tripospat pada akhir proses endosome. Ini disarankan bahwa pengurangan asidifikasi adalah hasil dari sebuah konsentrasi yang rendah atp-ase dalam pagosom mikobakterial.

Perlindungan dari ROI didemonstrasikan pada model percobaan yang berbeda dan memiliki fungsi yang mirip yang dapat disarankan untuk molekul ini dalam tuberkulosis pada manusia. Hal yang berlainan aturan yang dimainkan oleh ROI selama infeksi tidak dijelaskan secara lengkap, ini diketahui bahwa hidrogen peroksida yang diproduksi oleh makrofag dapat teraktifasi oleh sitokin yang memiliki aktifitas mikrobakterisidal.

Mycobacterium tuberculosis adalah contoh yang paling baik dari bakteri intraseluler yang dapat bertahan selama jangka waktu yang lama terhadap house menyebabkan sebuah infeksi laten yang dinamakan infeksi asimtomatik yg kronik tanpa kerusakan jaringan.

Infeksi oleh bakteri intraseluler yang lain respon imun secara protektif yang utama adalah *sel mediated* dibandingkan *antibodi mediated*. *Mycobacterium tuberculosis* yang berada didalam makrofag dan relatif resisten terhadap mekanisme mikrobisidal bahwa dapat dieliminasi secara efisien oleh fagositik bakteri yang lain. Ini adalah bagian terhadap kemampuan dari tuberkel bacilus untuk terikat kepada aktivasi makrofag oleh interferon- γ dan interleukin 12.

Sejak bacilus tuberkel masuk dalam sebuah kompartemen dari makrofag, antigen mereka hadir oleh MHC kelas II terhadap limposit T CD4+. Sel ini memainkan peranan yang penting dalam melawa *Mycobacterium tuberculosis* dan ketika mereka tidak hadir pertumbuhan dari bacilus tidak dapat dikendalikan. Hal ini seperti kasus yang disebabkan oleh inveksi HIV.

Fungsi utama dari CD 4+ adalah produksi dari sitokin meliputi interferon γ , makrofag yang aktif dan memicu penghancuran basilus. Baru-baru ini, fungsi utama terhadap pada sel, sebagai contoh menolong untuk mengembangkan response T cell CD8+. Jalur yang sama, sel CD4+ mungkin berpartisipasi dalam induksi dari apoptosis sel yang terinfeksi dan reduksi dari viabilitas bakteri melalui CD 95 yang terikat pada sistem ligand.

Partisipasi dari sel CD8+ dalam mengendalikan infeksi adalah dapat dikenali dengan baik. Mencit yang mengalami defisiensi dalam molekul seperti CD8 alfa, transporter yang berhubungan dengan prosesing antigen (TAP) dan perforin, adalah ditunjukkan lebih tahan terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dibandingkan dengan binatang yang memproduksi molekul ini. Mekanisme yang

digunakan oleh sel ini untuk pengendalian dari TB terlihat memproduksi cytokin yang utama dan bakteri yang lisis (Pando *et al.*, 2007).

Pada paru-paru tikus yang terinfeksi, sel CD8⁺ ditunjukkan memiliki kemampuan untuk mensekresikan IFN- γ melalui aktivasi dari reseptor T-cell atau oleh interaksi dengan sel dendritik yang terinfeksi. Fungsi yang disebabkan oleh IFN- γ adalah makrofag yang aktif dan menyebabkan kerusakan pada bakteri. Sebagai tambahan, sel CD8⁺ dibuktikan oleh lisis sel yang terinfeksi secara efisien dan dalam pengurangan jumlah dari bakteri yang intraseluler. Mekanisme dari pengendalian bakteri yang terlihat memiliki hubungan dengan eksositosis yang meliputi perforin dan granzyme. Granulysin yang ditemukan dalam granula T-CD8⁺ adalah molekul yang bertanggung jawab terhadap pembasmian bakteri.

Pada model eksperimen *Mycobacterium tuberculosis* dengan murine, respon pertahanan memiliki sebuah tipe Th-1 dari pola cytokin, sebagaimana yang didemonstrasikan oleh manipulasi sistem imun melalui kehilangan genetik atau pengelolaan antibodi monoklonal secara spesifik. Pola sitokin yang sama untuk pertahanan pada manusia disebabkan anak-anak dengan kekurangan reseptor untuk interferon- γ atau IL-12 penyebab penyakit tuberkulosis. Sebagai tambahan untuk cytokin tipe Th-1, TNF- α adalah biasanya esensial untuk imunitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis* pada tikus sebagaimana pada manusia. Observasi ini menyarankan bahwa sebuah aturan untuk NO, karena TNF- α memicu munculnya NO dari sel yang teraktifasi IFN- γ . Sebagai fakta, ekspresi INOS adalah esensial untuk mengendalikan infeksi pada tikus dan biasanya dieskpresikan secara tinggi pada lesi tuberkulosis pada manusia.

Penggunaan teknologi signal transduksi menemukan bahwa Andrographolide memiliki hubungan dengan siklus hidup sebuah sel. Hubungan ini didasarkan pada pengembangan kanker atau infeksi pada virus seperti HIV. Andrographolide dapat memicu fungsi sistem imun seperti memproduksi sel darah putih, mengeluarkan interferon dan mengaktifkan sistim limpa. Sistem limpa adalah bagian penting dari sistem imun. Dalam sistem yang lain seperti sistem vaskuler dapat membawa sebuah cairan yang berasal dari limpa. Limpa dapat membawa keluar produk dari metabolisme seluler dan biasanya beraksi pada sebuah pemberhentian / terminal untuk menginfasi bakteri dan virus.

Andrographolide adalah sebuah zat yang dapat memicu timbulnya respon imun dan lebih efektif ketika dikombinasikan dengan stimulator imun seperti Echinacea, Zinc dan vitamin C.

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa disposisi Andrographolide terdapat pada berbagai organ pada tubuh. Konsentrasi yang tinggi Andrographolide terdapat pada CNS *central nervous system* (otak dan spinal cord) dan organ lain seperti usus, liver, jantung, paru-paru dan ginjal. Andrographolide memiliki waktu paruh relatif pendek yaitu kira-kira 2 jam.

Andrographolide dapat disekresikan dari tubuh melalui urin dan saluran *gastrointestinal*. Pada beberapa penelitian 80 % Andrographolide dapat dibuang dari tubuh selama 8 jam, dan dapat diseksresikan lebih dari 90 % selama 48 jam. Distribusi yang luas dari Andrographolida pada jaringan dan organ, memiliki reaksi sebagai stimulasi dan meregulasi membuat Andrographolide ideal sebagai kandidat dalam mencegah dan pengobatan pada berbagai penyakit dan kondisi.

Salah satu komponen dari Andrographolide adalah mencegah penularan virus dari satu sel ke sel lain dan menghentikan penyebaran penyakit dengan mengembangkan modifikasi transduksi sinyal seluler. Andrographolide mungkin melakukan penghambatan pada enzim yang memberikan fasilitas terhadap transfer fosfat. Fosfat adalah molekul yang merupakan tempat sebagai penyimpanan energi bagi sel. Selama siklus sel, fosfat dapat dibuat dan energi dapat diproduksi. Energi ini dapat digunakan untuk pengaturan siklus sel dan fungsi berbagai macam seluler selama reproduksi sel. Andrographolide dapat bergabung dengan kunci enzim yang berinteraksi dengan replikasi virus.

Andrographolide dapat menghambat enzim dan mendukung fungsi imun secara normal. Sebuah hipotesis untuk mekanisme dari aksi Andrographolide dalam AIDS bahwa ekstrak tumbuhan dapat menginduksi apoptosis atau kematian sel yang terprogram. Dalam proses ini, sel akan pecah menuju partikel yang lebih kecil kemudian akan dimakan oleh sel sistem imun.

Penelitian dengan menggunakan tikus di China menunjukkan bahwa Andrographolide, neoandrographolide, dan dehydroandrographolide dapat menurunkan demam yang diproduksi oleh berbagai macam agen yang menyebabkan demam seperti bakteri endotoksin (bahan kimia yang toksik yang dikeluarkan oleh bakteri), *pneumococcus*, *hemolytic streptococcus*, *typhoid*, *paratyphoid*, dan bahan kimia 2,4-dinitrophenol.

Penelitian yang lain juga menunjukkan bahwa ekstrak Andrographolide dievaluasi sebagai aktifitas antimalarial. Andrographolide juga digunakan untuk pengobatan tonsil, infeksi pada saluran pernafasan dan tuberkulosis. Pada sebuah penelitian Andrographolide digunakan untuk 129 kasus tonsil yang akut. 65 %

pasien memberikan respon terhadap pemberian Andrographolide. Peneliti yang sama menggunakan Andrographolide untuk mengobati 49 pasien pneumonia, 35 kasus menunjukkan perubahan yang positif dan 9 pasien dapat disembuhkan. Pada penelitian yang lain, Andrographolide digunakan untuk mengobati 111 dengan pneumonia dan 20 dengan bronkitis kronik dan infeksi paru-paru. Efektifitas dari pemberian Andrographolide adalah sebesar 91 %, 72 % pada pasien dengan gejala demam selama 3 hari dan 40 % pada pasien dengan infeksi selama 1 minggu.

Tuberkulosis adalah biasanya diberikan dengan antibiotik rifampin. Ketika digunakan tanpa pemberian Andrographolide, pemberian rifampin menyebabkan 22,5 % meninggal. Pada penelitian larutan yang disuntikkan 2,5 % Andrographolide per 50 s/d 80 mg/kg berat badan tiap hari selama 2 bulan menunjukkan hasil yang berbeda. Dari 70 kasus tuberkulosis meningitis, 30 % pasien dapat diobati dengan angka kematian sebesar 8,6 %. Kombinasi dari Andrographolide dan rifampin dapat menurunkan 2,6 kali angka kematian Tuberkulosis.

Penelitian pada tikus menunjukkan bahwa Andrographolide adalah sebuah stimulator yang berpotensi pada sistem imun dengan 2 cara : pertama respon terhadap antigen yang spesifik : antibodi dapat dibuat untuk menyerang mikroba, kedua respon imun yang non spesifik : sel makrofag memakan dan menghancurkan benda asing. Andrographolide mengaktifkan kedua respon efektif dalam melawan berbagai variasi infeksius dan onkogenik (agen penyebab kanker).

<http://www.bloodrootproducts.com/>

Hal tersebut menambah keyakinan bahwa penggunaan Andrographolide akan sangat berguna dalam menanggulangi dan mencegah infeksi kuman *Mycobacterium tuberculosis*.