

**DISERTASI**

**EFEK EKSTRAK N-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa*  
(Lour.) Hall. F. TERHADAP EKSPRESI NF-KB, KADAR IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10,  
SERTA PERBAIKAN KERUSAKAN JARINGAN PARU  
PADA INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

**(Studi Eksperimental Pada Hewan Model Mencit Balb/C)**



**ASNIA ZAINUDDIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2015**

**DISERTASI**

**EFEK EKSTRAK N-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa*  
(Lour.) Hall. F. TERHADAP EKSPRESI NF-KB, KADAR IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10,  
SERTA PERBAIKAN KERUSAKAN JARINGAN PARU  
PADA INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

**(Studi Eksperimental Pada Hewan Model Mencit Balb/C)**



**ASNIA ZAINUDDIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2015**

**DISERTASI**

**EFEK EKSTRAK N-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa*  
(Lour.) Hall. F.) TERHADAP EKSPRESI NF- $\kappa$ B, KADAR IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-  
10, SERTA PERBAIKAN KERUSAKAN JARINGAN PARU  
PADA INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

**(Studi Eksperimental Pada Hewan Model Mencit Balb/C)**



**ASNIA ZAINUDDIN**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2015**

**EFEK EKSTRAK N-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa*  
(Lour.) Hall.F.) TERHADAP EKSPRESI NF-kB, KADAR IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10,  
SERTA PERBAIKAN KERUSAKAN JARINGAN PARU  
PADA INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

**(Studi Eksperimental Pada Hewan Model Mencit Balb/C)**

**DISERTASI**

**Untuk Memperoleh Gelar Doktor  
Dalam Program Studi Ilmu Kedokteran Jenjang Doktor  
Pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Telah Dipertahankan Di hadapan  
Panitia Ujian Doktor Terbuka  
Pada hari : Kamis  
Tanggal : 4 Desember 2014  
Pukul : 10.00 – 12.00**

**Oleh:**

**ASNIA ZAINUDDIN  
090810070 D**

**PROGRAM STUDI ILMU KEDOKTERAN JENJANG DOKTOR  
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA  
2015**

**LEMBAR PENGESAHAN**

**EFEK EKSTRAK N-HEKSANA UMBI BIDARA UPAS (*Merremia mammosa*  
(Lour.) Hall. F.) TERHADAP EKSPRESI NF-kB, KADAR IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-  
10, SERTA PERBAIKAN KERUSAKAN JARINGAN PARU  
PADA INFEKSI *Mycobacterium tuberculosis***

(Studi Eksperimental Pada Hewan Model Mencit Balb/C)

TELAH DISETUJUI

TANGGAL 12 FEBRUARI 2015

Oleh :

Promotor

Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., SpMK.

NIP: 1957030719840322001

Kopromotor

Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., SpParK.

NIP: 1943102819720301001

**Disertasi ini telah diuji dan dinilai  
Oleh panitia penguji pada ujian akhir tahap I (Tertutup)  
Pada Tanggal 9 Oktober 2014**

**Panitia Penguji:**

- Ketua : 1. Prof. Dr. Soewarno, drh., MS.
- Anggota : 2. Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., SpMK.  
3. Prof. Dr. H. Yoes Prijatna Dachlan, dr., MSc., SpParK.  
4. Prof. Dr. Mangestuti Agil, MS., Apt.  
5. Prof. Dr. Sumarno dr., DMM., SpMK (K)  
6. Didik Handijatno, drh., MS., PhD.  
7. Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes

Ditetapkan dengan Surat Keputusan  
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Nomor : 434/UN3.1.1/KD/2014  
Tanggal : 29 September 2014

## UCAPAN TERIMA KASIH

Assalamu'alaikumWr. Wb.

Alhamdulillah Robbil 'Alamin, segala puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan naskah disertasi ini.

Disertasi ini dapat diselesaikan berkat dorongan, bimbingan, arahan, saran dan perbaikan dari banyak pihak. Oleh karena itu, dengan segala kerendahan hati, perkenankan penulis menghaturkan terimakasih yang tulus serta penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat:

Prof. Dr. Ni Made Mertaniasih, dr., MS., Sp.MK(K), selaku Promotor, atas arahan, dukungan, semangat, bimbingan kesabaran dan keikhlasan memberikan wawasan dan falsafah berfikir yang sangat bermanfaat selama proses penyusunan proposal, penelitian dan penyusunan naskah disertasi ini. Saya haturkan terimakasih yang tak terhingga.

Prof. Dr. Yoes Prijatna Dachlan, dr., M.Sc., Sp.Par(K), sebagai ko-promotor yang telah dan senantiasa dengan penuh perhatian dan kesabaran memberikan dorongan dan semangat serta meluangkan waktu untuk membimbing dan menjadi tumpuan untuk konsultasi tentang rencana hingga terselesaikannya disertasi ini.

Prof. Dr. Mangestuti Agil, Apt., M.S., yang telah bersedia membantu dalam penggunaan bahan alam ekstrak n-heksana umbi bidara upas, yang merupakan bagian dari proyek riset Beliau mengenai bidara upas, atas arahan, bimbingan dalam mempersiapkan sediaan bahan ekstrak untuk penelitian disertasi ini.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan pada Pemerintah Republik Indonesia melalui Menteri Pendidikan dan Kebudayaan yang telah memberikan dana beasiswa Bantuan Pendidikan Pasca Sarjana (BPPS), sehingga penulis dapat mengikuti Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga dan menyelesaikan disertasi.

Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada:

Rektor Universitas Airlangga Prof. Dr. Fasich, Apt. yang telah memberikan ijin dan berkenan menerima penulis sebagai mahasiswa Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.

Dekan Fakultas Kedokteran Prof. Dr. Agung Pranoto, dr., M.Kes., SpPD., KEMD., FINASIM dan segenap jajarannya yang telah memberikan izin dan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti Pendidikan Pendidikan Doktor pada Program Ilmu Kedokteran Pascasarjana Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Surabaya.

Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga Prof. Dr. Teddy Ontoseno, dr., Sp.A(K), Sp.JP., AKK. dan mantan Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Prof. Dr. Harjanto JM., dr., AIFM., atas nasehat dan perhatian yang diberikan untuk menyelesaikan pendidikan Doktor.

Direktur Program Pascasarjana Universitas Airlangga Prof. Dr. Hj. Sri Hajati, S.H., M.S., beserta seluruh pimpinan dan staf Program Pascasarjana Universitas Airlangga atas kesempatan dan fasilitas yang telah diberikan selama mengikuti Program Doktor di Universitas Airlangga.

Para penguji disertasi mulai dari ujian kualifikasi sampai ujian terbuka, yaitu: Prof. Muhammad Amin, dr., Sp.P(K); Prof. Dr. Kuntaman, dr., M.S., Sp.MK.; Prof. Dr. Ketut Suidiana, drs., M.Si.; Prof. Dr. Mangestuti Agil, M.S., Apt.; Prof. Dr. Sumarno dr., DMM. Sp.MK(K); Prof. Suwarno, drh., M.S., Didik Handijatno, drh., M.S., Ph.D.; dan Dr. Hari Basuki Notobroto, dr., M.Kes., yang telah memberikan saran dan perbaikan naskah disertasi.

Para guru besar dan dosen di Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, yang telah memberikan ilmu, bimbingan dan saran selama menempuh pendidikan Doktor.

Rektor Universitas Pattimura Prof. Dr. Thomas Pentury, M.Si. dan mantan Rektor Prof. B.J Tetelepta, M.Pd. yang telah memberikan izin dan tugas belajar kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga.



Dekan Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan (FKIP) Universitas Pattimura Dr. Theresia Laurens MPd., dan mantan dekan Drs. Patriks Rahabav MSi., dan segenap jajarannya yang telah memberi dukungan serta kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Program Doktor pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga.

Para staf yang telah membantu penelitian, Pak Sugeng, Mbak Agnes, Pak Heri, Pak Sujarwo. Para staf di bagian pendidikan Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Fakultas Universitas Airlangga.

Teman-teman angkatan 2008/2009 pendidikan Program Doktor Bidang Ilmu Kedokteran pada Program Pascasarjana Universitas Airlangga. Selama ini kita telah saling menemani, memotivasi, mengingatkan dan memberi masukan yang semuanya penulis rasakan selalu memberi nilai tambah dalam rangkaian penyusunan disertasi ini. Tanpa mengurangi rasa hormat saya, karena tidak dapat menyebutkan satu persatu, perkenankan saya mengucapkan terimakasih atas segala kebaikan yang telah terjalin selama ini.

Penulis sampaikan rasa hormat dan kasih sayang yang tak terhingga kepada: Ayahanda Zainuddin (Alm) dan ibunda Ny. Hj. Majah, yang telah mendidik dengan penuh kesabaran dan kasih sayang serta senantiasa mendoakan saya. Ayah dan Ibu mertua saya Ahmad Abdullah (Alm) dan Ny. Hj Wa Abu (Almh). Suami saya tercinta, Dr. Muntu Abdullah, S.E., M.Si., AK., yang hingga saat ini mendampingi saya menjalani kehidupan, memberikan dorongan dan menanamkan semangat untuk tidak pernah berhenti menuntut ilmu. Kepada anak-anaku tercinta Sukma Muthia Mutmainah, Nabilla Salsabila, dan Rafshemi Ahzan Abdullah, terimakasih atas begitu banyak rasa cinta dan pengorbanan yang telah kalian berikan selama ini mohon maaf atas berkurangnya waktu kebersamaan selama Ibu menyelesaikan pendidikan. Namun, Ibu selalu berdo'a agar kalian bertiga menjadi anak yang shaleh dan shalehah, berbakti kepada orang tua dan menjadi manusia yang bermanfaat. Aamiin....

Terimakasih penulis sampaikan kepada semua pihak yang telah membantu, memotivasi, mendukung hingga terselesaikannya disertasi ini. Semoga hasil penelitian ini bermanfaat bagi peningkatan kesejahteraan umat manusia khususnya bagi pengembangan dunia pendidikan dan kesehatan. Semoga Allah

SWT melimpahkan taufik dan hidayahNya kepada semua pihak yang telah membantu penyelesaian disertasi ini. Aamiin ya Rabbal Allamin.

Surabaya, Oktober 2014

Penulis



**RINGKASAN****Efek Ekstrak N-Heksana Umbi Bidara Upas (*Merremia Mammosa* (Lour.)  
Hall.F.) Terhadap Ekspresi NF-kB, Kadar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10,  
Serta Perbaikan Kerusakan Jaringan Paru  
Pada Infeksi *Mycobacterium Tuberculosis***

Tuberkulosis (TB) adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberkulosis sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan masyarakat yang serius di seluruh negara di dunia. Lebih dari 2 miliar orang atau sekitar sepertiga dari penduduk dunia terpapar *M. tuberculosis*, dengan gambaran klinik yang sangat bervariasi dari gejala ringan hingga TB berat. Dari sepertiga penduduk dunia yang terinfeksi *M. Tuberculosis*, hanya 5 sampai 10 % yang menjadi tuberkulosis. Hal ini menunjukkan bahwa system imun cukup efektif dalam melawan infeksi *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* dapat menghambat proses fagositosis dan berkembang biak dalam makrofag sehingga mengurangi fungsi fagositosis makrofag. Untuk itu perlu diupayakan pengobatan tuberkulosis dengan melibatkan system imun tubuh. Peningkatan respon imun tubuh meningkatkan pencapaian tujuan pengobatan penyakit tuberkulosis yang optimal.

Bidara upas (*Mirremia mammosa*) adalah salah satu tanaman obat tradisional Indonesia, yang berkhasiat sebagai obat penyakit infeksi dan inflamasi. Beberapa penelitian membuktikan bahwa *Mirremia mammosa* menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis* in vitro, meningkatkan fagositosis makrofag, proliferasi limfosit, produksi nitrit oksida (NO), dan produksi ROI makrofag pada mencit yang diinfeksi *Salmonella typhimurium*. Ekstrak n-heksana umbi bidara upas mengandung antara lain senyawa terpenoid. Manfaat senyawa terpenoid telah terbukti terhadap peningkatan respon imun, sebagai antiinflamasi, antibakterial, dan anti jamur. Penelitian pada hewan coba terbukti bahwa terpenoid dapat meningkatkan ekspresi NF-kB dan meningkatkan produksi IFN- $\gamma$ . Ekstrak n-heksana umbi bidara upas dapat menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis*.

Sistem imun pada infeksi *M. tuberculosis* diperankan oleh *cell mediated immunity* (immunitas selluler), yaitu limposit T dan makrofag. Pengaktifan respon imun seluler diawali oleh masuknya *M. tuberculosis* pada saluran nafas, selanjutnya masuk ke dalam alveolar makrofag. LAM sebagai salah satu ligand dari *Mycobacterium tuberculosis* dikenali oleh reseptor TLR-2 pada permukaan sel makrofag. Makrofag memberikan transmisi sinyal transduksi dan mensekresikan berbagai sitokin sebagai respons imunitas tubuh. Aktivasi signal transduksi melalui TLR-2 tersebut mengaktifkan NF-kB. Aktivasi NF-kB menyebabkan translokasi NF-kB aktif ke dalam inti sel. Di dalam inti, NF-kB menginduksi transkripsi gen yang mengontrol ekspresi berbagai kemokin, reseptor imun, beberapa molekul perlekatan pada permukaan sel, dan sitokin, antara lain adalah sitokin IL-12 dan TNF- $\alpha$ . Induksi IL-12 akan menstimulasi produksi sitokin proinflamasi antara lain IFN- $\gamma$  oleh sel Th1 dan menstimulasi sel Th2 untuk memproduksi sitokin antiinflamasi antara lain sitokin IL-10. Sitokin IFN- $\gamma$  menstimulasi ekspresi MHC-I dan MHC-II dan kostimulator APC. IFN- $\gamma$  meningkatkan diferensiasi sel CD4 ke subset sel Th1 dan mencegah proliferasi sel Th2. Selain itu sitokin IFN- $\gamma$  meningkatkan aktivasi makrofag kembali. Makrofag yang teraktivasi mengalami peningkatan sekresi molekul-molekul yang bersifat bakterisidal terhadap *M. tuberculosis* seperti peningkatan produksi *reactive oxygen intermedite* (ROI), *reactive nitrogen intermediate* (RNI) dan *Nitric Oxide* (NO) sehingga meningkatkan mekanisme efektor makrofag untuk membunuh *M. tuberculosis*. Peningkatan produksi ROI, RNI dan NO akan meningkatkan maturasi fagosom dan lisosom sehingga terjadi fusi fagolisosom yang menyebabkan peningkatan daya bunuh *M. tuberculosis* intaraseluler. Makrofag yang teraktivasi mengalami peningkatan ekspresi protein Nramp1. Peningkatan protein Nramp1 tersebut juga meningkatkan proses asidiffikasi dan fusi fagolisosom. Makrofag yang teraktivasi akan meningkatkan produksi enzim lisosom sebagai respons dari fagositosis. Bersamaan dengan maturasi fagosom, lisosom mengalami maturasi sehingga terbentuk enzim hidrolisa yaitu *acid phosphatase*, *cathepsin D*,  *$\beta$ -glucoronidase* yang berperan untuk mendegradasi *M. tuberculosis* di dalam fagolisosom. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag

tersebut akan meningkatkan apoptosis sel alveolar makrofag dan mencegah terjadinya nekrosis.

Respon imun penderita tuberkulosis mengalami depresi sel Th1 yang ditandai dengan rendahnya kadar IFN- $\gamma$  dan meningkatnya produksi IL-10, IL-4 dan TGF- $\beta$  sebagai sitokin profil dari Th2. Aktivasi NF-kB juga menginduksi produksi TNF- $\alpha$ . TNF- $\alpha$  mempunyai peran dikotom karena selain berperan sebagai kontrol terhadap infeksi *M. tuberculosis* juga berperan sebagai penyebab kerusakan jaringan paru yang berat bila ekspresinya terlalu tinggi. TNF- $\alpha$  berperan sinergis dengan IFN- $\gamma$ , merangsang produksi *intermediet nitrogen reaktif* (INR), meningkatkan fungsi bakterisidal makrofag, merangsang migrasi sel-sel imun ke tempat infeksi, dan kontribusi pada pembentukan granuloma yang mengontrol perkembangan penyakit.

Sitokin IL-10 dianggap sebagai sitokin penghambat respon Th1 untuk memproduksi sitokin IFN- $\gamma$ . IL-10 penting untuk keseimbangan yang memadai antara respons inflamasi dan immunopatologi tuberkulosis. Peningkatan kadar IL-10 mendukung kelangsungan hidup *M. tuberculosis* dalam tubuh inang. IL-10 menghambat sintesa sitokin oleh monosit dan menekan efek antimikroba makrofag. IL-10 juga menekan proliferasi sel Th1 dan produksi IL-12 sehingga menghambat produksi IFN- $\gamma$ . Secara alamiah, respon imun tubuh berusaha melakukan eliminasi terhadap patogen yang masuk ke dalam tubuh, khususnya melalui fagositosis makrofag. *M. tuberculosis* dapat menghambat proses fagositosis dan berkembang biak di dalam sel makrofag. Akibatnya kemampuan makrofag untuk mengeliminasi *M. tuberculosis* menurun. Agar pengobatan tuberkulosis lebih optimal, diperlukan terapi penunjang untuk menunjang terapi tuberkulosis yang sudah ada, antara lain dengan menggunakan tanaman obat yang mampu meningkatkan respons imun inang (imunoterapi).

Tujuan penelitian ini adalah menjelaskan efek dan mekanisme ekstrak n-heksana umbi bidara upas pada perbaikan kerusakan jaringan paru mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* berdasarkan peran NF-kB, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. menggunakan 32 ekor mencit Balb/c, umur 8-10 minggu, berat badan 20-25 gram. Enam ekor mencit disiapkan untuk kontrol normal (K0)

dan 26 ekor mencit diinfeksi dengan *M. tuberculosis* strain H37Rv secara intratrakea, dosis  $10^8$ CFU/ml dan volume pemberian 50  $\mu$ l, dipelihara selama 4 minggu. Pada hari ke-29, 2 ekor mencit dari 26 ekor mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* strain H37Rv, dikorbankan. Jaringan paru kiri diambil secara aseptik, dilakukan pewarnaan ZN guna membuktikan adanya infeksi *M. tuberculosis* pada hewan coba, dan jaringan paru kanan dilakukan pemeriksaan histopatologi dengan pewarnaan HE untuk melihat kerusakan jaringan pada paru mencit. Selanjutnya 24 ekor mencit yang telah terinfeksi *M.tuberculosis* dibagi menjadi empat kelompok secara random. Kelompok pertama (kontrol=K1) adalah kelompok mencit terinfeksi *M. tuberculosis* tanpa pemberian ekstrak umbi bidara upas, tetapi diberi larutan CMC-Na 0,5 % sebanyak 0,2 ml per oral satu kali sehari. Kelompok P1, P2, dan P3, adalah kelompok mencit terinfeksi *M. tuberculosis* dengan pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 1,5, 7,5, dan 37,5 mg/20gbb/oral/hari. Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dilakukan pada hari ke-29 setelah mencit diinfeksi *M. tuberculosis* dan diberikan selama 21 hari. Setiap kelompok perlakuan diterminasi pada hari ke-22 setelah pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas. Pengukuran kadar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 pada serum mencit menggunakan metode ELISA. Pengukuran ekspresi NF-kB pada jaringan paru mencit menggunakan metode pemeriksaan imunohistokimia dan pengukuran kerusakan jaringan paru menggunakan metode pewarnaan HE.

Hasil penelitian menunjukkan ekstrak n-heksana umbi bidara upas meningkatkan ekspresi NF-kB pada jaringan paru mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* secara signifikan pada  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ), seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 1,5, 7,5 dan, 37,5 mg/20gbb/oral/hari, menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan ekspresi NF-kB pada jaringan paru bila dibandingkan dengan kontrol. Ekspresi NF-kB karena pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas paling tinggi yaitu 10,3 terjadi pada kelompok dosis 37,5 mg/20gbb/oral/hari.

Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas meningkatkan kadar IFN- $\gamma$  pada serum mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* secara signifikan pada  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Pemberian ekstrak n-

heksana umbi bidara upas dosis 1,5, 7,5 dan 37,5 mg/20gbb/oral /hari, menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan kadar IFN- $\gamma$  serum mencit bila dibandingkan dengan kontrol. Kadar IFN- $\gamma$  paling tinggi yaitu 1314,910 pg/ml terjadi pada kelompok pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 37,5 mg/20gbb/oral /hari.

Hasil penelitian ini menyatakan pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas meningkatkan kadar TNF- $\alpha$  pada serum mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* secara signifikan pada  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 1,5, 7,5 dan 37,5 mg/20gbb/oral/hari, menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap peningkatan kadar TNF- $\alpha$  serum mencit bila dibandingkan dengan kontrol. Kadar TNF- $\alpha$  paling tinggi yaitu 128,321 pg/ml terjadi pada kelompok pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 37,5 mg/20gbb/oral/hari.

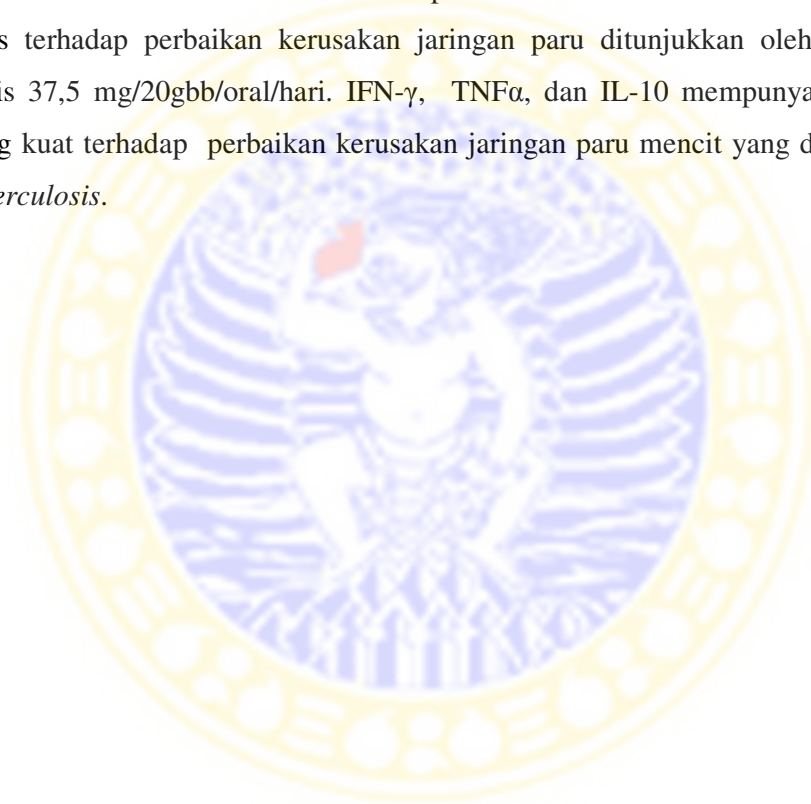
Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas menurunkan kadar IL-10 pada serum mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* secara signifikan pada  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 1,5, 7,5, 37,5 mg/20gbb/oral/hari, menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap penurunan kadar IL-10 serum mencit bila dibandingkan dengan kontrol. Kadar IL-10 paling rendah yaitu 23,175 pg/ml terjadi pada kelompok dosis 37,5 mg/20gbb/oral/hari, sedangkan kadar IL-10 tertinggi pada kelompok kontrol yaitu 42,199 pg/ml.

Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas secara signifikan menurunkan kerusakan jaringan paru mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis* pada  $p = 0,000$  ( $p < 0,05$ ) seiring dengan peningkatan dosis yang diberikan. Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dosis 1,5, 7,5, dan 37,5 mg/20gbb/oral/hari, menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap penurunan kerusakan jaringan paru mencit bila dibandingkan dengan kontrol. Kerusakan jaringan paru paling ringan dengan skor 9 terjadi pada kelompok dosis 37,5 mg/20gbb/oral/hari, sedangkan kerusakan jaringan paru paling berat terjadi pada kelompok kontrol dengan rata-rata skor kerusakan 18.

Uji korelasi menunjukkan korelasi positif antara pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas dengan ekspresi NF-kB, kadar IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ .

Korelasi negatif antara ekstrak n-heksana umbi bidara upas dengan penurunan kadar IL-10 dan tingkat kerusakan jaringan paru-paru.

Kesimpulan penelitian ini adalah ekstrak n-heksana umbi bidara upas mengandung bahan aktif yang mempunyai kemampuan meningkatkan ekspresi NF-kB, kadar IFN- $\gamma$  dan TNF- $\alpha$ , serta menurunkan kadar IL-10 dan tingkat kerusakan jaringan paru pada mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis*. Pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas mampu memperbaiki kerusakan jaringan paru melalui jalur mekanisme peningkatan ekspresi NF-kB, kadar IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , dan penurunan kadar IL-10. Efek terbaik pemberian ekstrak n-heksana umbi bidara upas terhadap perbaikan kerusakan jaringan paru ditunjukkan oleh kelompok dosis 37,5 mg/20gbb/oral/hari. IFN- $\gamma$ , TNF $\alpha$ , dan IL-10 mempunyai pengaruh yang kuat terhadap perbaikan kerusakan jaringan paru mencit yang diinfeksi *M. tuberculosis*.





## SUMMARY

### **Effects of N-Hexane Extract of Bidara Upas Tuber (*Merremia mammosa* (Lour.) Hall. F.) on NF-kB Expression, Levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10, and Lung Tissue Damage Repair in *Mycobacterium tuberculosis* Infection**

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by *Mycobacterium tuberculosis*. Until now, tuberculosis remains a serious public health problem in all countries in the world. More than 2 billion people, or about one-third of the world's population, are exposed to *M. tuberculosis* with the clinical picture varies from mild symptoms to severe TB. From a third of world population infected with *M. tuberculosis*, only 5 to 10% become suffering from tuberculosis. This indicates that immunity system is quite effective against infection with *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis* can inhibit phagocytosis and proliferate within macrophages, thereby reducing macrophage phagocytic function. It is necessary for the treatment of tuberculosis to involve immune system. Increasing the body's immune response increases the achievement of optimal tuberculosis treatment goals.

*Bidara upas* (*Mirremia mammosa*) is one of Indonesia's traditional medicinal plants that have medicinal properties for infections and inflammatory diseases. Several studies have shown that *Mirremia mammosa* inhibits the growth of *M. tuberculosis* in vitro, increases macrophage phagocytosis, lymphocyte proliferation, production of nitric oxide (NO), and macrophage ROI production in mice infected with *Salmonella typhimurium*. N-hexane extract of *bidara upas* tuber contains, among others, terpenoid compounds. The benefits of terpenoid compounds have been shown to enhance immune response, as anti-inflammatory, antibacterial, and antifungal. Animal studies proved that the terpenoids can increase NF-kB expression and increases IFN-  $\gamma$  production. N-hexane extract of *bidara upas* tuber can inhibit *M. tuberculosis* growth.

Immune system in infection with *M. tuberculosis* plays by cell mediated immunity (cellular immunity), namely T lymphocytes and macrophages. Activation of cellular immune response is initiated by the entry of *M. tuberculosis* in the airways, further into the alveolar macrophages. LAM, as one of the ligands

of *Mycobacterium tuberculosis*, is recognized by TLR-2 receptor on macrophage cell surface. Macrophages provide transmission signal transduction and secrete a variety of cytokines in the body's immune response. Activation of signal transduction through TLR-2 activates NF- $\kappa$ B. Activation of NF- $\kappa$ B results in translocation of active NF- $\kappa$ B into cell nucleus. In the nucleus, NF- $\kappa$ B induces the transcription of genes that control the expression of various chemokines, immune receptors, adhesion molecules on the cell surface, and cytokines, such as IL-12 and TNF- $\gamma$ . Induction of IL-12 stimulates the production of proinflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$ , by Th1 cells and stimulates Th2 cells to produce anti-inflammatory cytokines, such as IL-10. Cytokine IFN- $\gamma$  stimulates expression of MHC-I and MHC-II and APC costimulator. IFN- $\gamma$  increases CD4 cell differentiation into cell subsets Th1 and Th2 cells prevents proliferation. In addition, cytokines IFN- $\gamma$  re-increases macrophage activation. Activated macrophages increased secretion of various bactericidal molecules against *M. tuberculosis*, such as increased production of reactive oxygen intermediate (ROI), reactive nitrogen intermediates (RNI) and nitric oxide (NO), thereby increasing the effector mechanisms of macrophages to kill *M. tuberculosis*. Increased production of ROI, RNI and NO will increase the maturation of the phagosome and lysosome, resulting in phagolysosome fusion which leads to increased capacity to kill *M. tuberculosis* intracellularly. Activated macrophages increase protein expression of Nramp1. Increased Nramp1 protein is also increasing phagolysosome acidification and fusion processes. Activated macrophages will increase the production of lysosomal enzymes in response to phagocytosis. Along with the phagosome maturation, lysosomes undergo maturation to form the hydrolysis enzyme, the acid phosphatase, cathepsin D, and  $\beta$ -glucuronidase whose role is to degrade *M. tuberculosis* in phagolysosome. Increased activity of macrophage phagocytosis of will increase apoptotic alveolar macrophages cells apoptosis and prevent necrosis.

Tuberculosis patients have depressed Th1 cells marked as low levels of IFN-  $\gamma$  and increased production of IL-10, IL-4 and TGF- $\beta$  as a Th2 cytokine profile. Activation of NF- $\kappa$ B also induces the production of TNF- $\alpha$ . TNF-  $\gamma$  has a dichotomous role because, in addition to acting as the control of *M. tuberculosis*

infection, acts also as a cause of severe lung tissue damage when the expression is too high. TNF- $\alpha$  acts synergistically with IFN- $\gamma$ , stimulates the production of reactive nitrogen intermediates (INR), increased macrophage bactericidal function, stimulates migration of immune cells to the site of infection, and contributes to the formation of granulomas that control the disease progression.

Cytokine IL-10 is considered as cytokine that inhibits Th1 response for producing IFN- $\gamma$ . IL-10 is important for a proper balance between the inflammatory response and tuberculosis immunopathology. Increased level of IL-10 supports the survival of *M. tuberculosis* within the host body. IL-10 inhibits cytokine synthesis by monocytes and macrophages suppress the antimicrobial effect. IL-10 also suppresses Th1 cell proliferation and production of IL-12 to inhibit the production of IFN- $\gamma$ . Naturally, the immune response of the body attempts to eliminate pathogens that enter the body, in particular through macrophage phagocytosis. *M. tuberculosis* can inhibit phagocytosis and multiply in macrophages. As a result, the ability of macrophages to eliminate *M. tuberculosis* decreases. In order to optimize the treatment of tuberculosis, we require adjunctive therapy (immunotherapy) to support existing tuberculosis therapy, among others by using of medicinal plants that can enhance host immune response.

The purpose of this study was to describe the effect and mechanism of n-hexane extract of *bidara upas* tuber to repair damage of lung tissue in mice infected with *M. tuberculosis* based on the role of NF-kB, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10.

The method used in this study was an experimental laboratory using 32 Balb/c mice, 8-10 weeks of age, body weight of 20-25 grams. Six mice were prepared for normal control (K0) and 26 mice were infected with *M. tuberculosis* strain H37Rv in intratracheally, the dose was 108 CFU/ml, administration volume was 50  $\mu$ L, and maintained for 4 weeks. On day 29 we sacrificed two out of 26 mice infected with *M. tuberculosis* strain H37Rv. Left lung tissue was taken aseptically, subjected to ZN staining in order to prove the existence of *M. tuberculosis* infection, and the right lung tissue was histopathologically examined with HE staining to see the damage of the mice lung tissue. Furthermore, 24 mice that had been infected with *M. tuberculosis* were divided into four groups

randomly. The first group (control = K1) was a group of mice infected with *M. tuberculosis* without *bidara upas* tuber extract, but was given with a solution of 0.5% CMC-Na as much as 0.2 ml orally once a day. Groups P1, P2, and P3, were groups of mice infected with *M. tuberculosis* with n-hexane extract of *bidara upas* tuber in doses of 1.5, 7.5, and 37.5 mg/20g mm/oral/day. The n-hexane extract of *bidara upas* tubers was performed on day 29 after the mice were infected with *M. tuberculosis* and was given for 21 days. Each treatment group was terminated on day 22 after the administration of n-hexane extract of *bidara upas* tuber. Measurement of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 in the serum of mice was done using ELISA method. Measurement of the NF-kB expression in the lung tissue of mice used immunohistochemistry examination and measurement of lung tissue damage used HE staining method.

The results showed that n-hexane extract of *bidara upas* tuber increased NF-kB expression in the lung tissue of mice infected with *M. tuberculosis* significantly at  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ), along with an increase of the administered doses. The n-hexane extract of *bidara upas* tuber in doses of 1.5, 7.5 and 37.5 mg/20g mm/oral/day showed a significant difference in increasing expression of NF-kB in lung tissue when compared to that of controls. The highest expression of NF-kB, ie 10.3, was found in group receiving n-hexane extract of *bidara upas* tuber at a dose of 37.5 mg/20gbw/oral/day.

The n-hexane extract of *bidara upas* tuber increased IFN- $\gamma$  level in the serum of mice infected with *M. tuberculosis* significantly at  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) along with increasing doses given. The n-hexane extract of *bidara upas* tuber in doses 1.5, 7.5 and 37.5 mg/20gbw/oral/day, showed a significant difference to the levels of IFN- $\gamma$  serum of mice compared to that of control. Highest levels of IFN- $\gamma$ , 1314.910 pg/ml, was found in group receiving n-hexana extract *bidara upas* tuber at a dose of 37.5 mg/20gbw/oral/day.

The results of this study stated that the administration of n-hexane extract of *bidara upas* tuber increased levels of TNF- $\alpha$  in the serum of mice infected with *M. tuberculosis* significantly at  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) with increasing doses given. The n-hexane extract of *bidara upas* tuber in doses of 1.5, 7.5 and 37.5 mg/20gbw/oral/day showed a significant difference in increasing TNF- $\alpha$  level in

mice serum compared to that of controls. The highest TNF- $\alpha$  level, ie 128.321 pg/ml, was found in group receiving n-hexane extract of *bidara upas* tuber at a dose of 37.5 mg/20gbw/oral/day.

The n-hexane extract of *bidara upas* tuber lowered IL-10 level in the serum of mice infected with *M. tuberculosis* significantly at  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ), along with an increase in the dose given. The n-hexane extract of *bidara upas* tuber in doses of 1.5, 7.5, 37.5 mg/20gbw/oral/day, showed a significant difference in decreasing IL-10 serum levels compared to that of control. Lowest IL-10 levels, 23.175 pg/ml, occurred in the 37.5 mg dose group/20gbw/oral/day, while the highest IL-10 level was found in control group, as much as 42.199 pg/ml.

The n-hexane extract of *bidara upas* tubers significantly decreased damage of lung tissue of mice infected with *M. tuberculosis* at  $p = 0.000$  ( $p < 0.05$ ) along with increasing doses given. The n-hexane extract of *bidara upas* tuber in doses of 1.5, 7.5, and 37.5 mg/20gbw/oral/day, showed a significant difference in reducing lung tissue damage when compared to that in control mice. Lightest damage of lung tissue with a score of 9 occurred at a dose of 37.5 mg group/20gbw/oral/day, while the most severe lung tissue damage occurred in control group with an average damage score of 18.

Correlation test showed a positive correlation between the administration of n-hexane extract of *bidara upas* tuber with the expression of NF-kB, the levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , and the negative correlation between n-hexane extract of *bidara upas* tuber with decreased levels of IL-10 and the level of damage of the lung tissue.

The conclusion of this study is n-hexane extract of *bidara upas* tubers contains active ingredients that have the ability to increase the expression of NF-kB, the levels of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , as well as decrease IL-10 level and the level of damage to lung tissue in mice infected with *M. tuberculosis*. The n-hexane extract of *bidara upas* tuber is able to repair damage of lung tissue through the mechanism of increasing expression of NF-kB, the levels of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and decreased levels of IL-10. The best effect n-hexane extract of *bidara upas* tuber in repairing lung tissue damage was indicated in dose group 37.5

mg/20gbw/oral/day. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and IL-10 have strong influence in repairing lung tissue damage in mice infected with *M. tuberculosis*.

