

DISERTASI

**EFEK EKSTRAK ANDALIMAN (*ZANTHOXYLUM ACANTHOPODIUM DC*)
TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN CAMP DAN BAKTERIAL LOAD
PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*) BALB C YANG DIINFEKSI
*GARDNERELLA VAGINALIS***

***THE EFFECT OF ANDALIMAN (*ZANTHOXYLUM ACANTHOPODIUM DC*)
EXTRACT ON mRNA GENE CAMP EXPRESSION AND BACTERIAL LOAD
OF MICE (*MUS MUSCULUS*) BALB C BEING INFECTED
BY *GARDNERELLA VAGINALIS****

**(Lingkup Pencegahan dan Penanggulangan Kasus Infeksi Saluran Reproduksi
(ISR) Termasuk Infeksi Menular Seksual (IMS-HIV AIDS))**

**LENNY IRMAWATY SIRAIT
(NPM: PO200314412)**



**PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN
SEKOLAH PASCASARJANA
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2018**

**EFEK EKSTRAK ANDALIMAN (*ZANTHOXYLUM ACANTHOPODIUM DC.*)
TERHADAP EKSPRESI mRNA GEN CAMP DAN BAKTERIAL LOAD
PADA MENCIT (*MUS MUSCULUS*) BALB C YANG DIINFEKSI
*GARDNERELLA VAGINALIS***

Disertasi

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Mencapai Gelar Doktor

Program Studi

Ilmu Kedokteran

Disusun dan Diajukan Oleh

LENNY IRMAWATY SIRAIT

Kepada

PROGRAM STUDI S3 ILMU KEDOKTERAN

SEKOLAH PASCA SARJANA

UNIVERSITAS HASANUDDIN

MAKASSAR

2018

PERNYATAAN KEASLIAN DISERTASI

Saya yang bertanda tangan di bawah ini

Nama : Lenny Irmawaty Sirait

Nomor Mahasiswa : P0200314412

Program Studi : S3 Kedokteran Sekolah Pascasarjana UNHAS

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa disertasi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pemikiran orang lain. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan disertasi ini hasil karya orang lain, saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Makassar, Agustus 2018

Yang menyatakan

Lenny Irmawaty Sirait

DAFTAR TIM PENGUJI

- Promotor** : **Prof. dr.Muh.Nasrum Massi, Ph.D**
- Co-Promotor** : **Prof.Dr.dr.Syahrul Rauf, Sp.OG (K)**
- Co-Promotor** : **Prof.dr.Rosdiana Natzir, Ph.D, Sp.Biok**
- Anggota** : **Prof.Dr.drh.Dondin Sajuthi, MST., Ph.D**
Prof.dr. Mochammad Hatta, Ph.D, Sp.MK (K)
Dr.dr.Ilhamjaya Patellongi, M.Kes
Dr.dr. Gatot Lawrence, Sp.PA (K), FESC
Dr.dr. Khaeruddin Djawad, Sp.KK (K)
Dr.dr. A. Mardiah Tahir, Sp.OG (K)

PRAKATA

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kehadirat Allah yang maha Besar yang mempunyai kehendak atas segala ciptaanNya terlebih atas kehendakNya membawa penulis pada penyelesaian penulisan disertasi dengan judul “**Efek Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* Dc.) Terhadap Ekspresi mRNA Gen Catelicidin Antimikrobal Peptide (CAMP) Dan Bakterial Load Pada Mencit (*Mus Musculus*) Balb C Yang Diinfeksi *Gardnerella Vaginalis***”. Disertasi ini merupakan salah satu syarat untuk mencapai gelar Doktor di Program Studi S3 Ilmu Kedokteran, Universitas Hasanuddin.

Pada kesempatan ini perkenankan saya menyampaikan rasa hormat dan terimakasih yang sebesar-besarnya sebagai perwujudan penghargaan yang tulus kepada Orangtua **St.Posman Sirait** dan **Tiomina Sinaga** yang telah mendidik dan memperlengkapi penulis dalam kehidupan jasmani serta rohani dan atas restu beliau jua lah penulis sampai pada tahap ini. Sehat dan umur panjang Tuhan anugerahkan atas mereka. Amiin. Kepada **Kemenristekdikti** yang telah memberikan kesempatan menempuh pendidikan pasca sarjana melalui dana Pendidikan (BPPDN) dan juga kepada Yayasan Medistra Indonesia yang memberikan bantuan dana pendidikan melalui **bapak Usman Ompusunggu SE** dan **Ibu Vermona Marbun MKM**.

Penyelesaian disertasi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, untuk itu perkenankan penulis menyampaikan ungkapan terimakasih yang tulus dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada yang terhormat **Prof.dr.Muh Nasrum Massi, Ph.D**, selaku promotor yang memberikan banyak inspirasi, arahan dan masukan sejak awal proposal, proses penelitian hingga akhir untuk penyempurnaan disertasi ini, kepada yang terhormat **Prof.Dr.dr.Syahrul Rauf, Sp.OG (K)** dan

Prof.dr.Rosdiana Natzir, Ph.D selaku Co-Promotor yang telah banyak memberikan arahan dan motivasi hingga penulis dapat menyelesaikan disertasi ini.

Terimakasih kepada tim penguji **Prof.dr.Mochammad Hatta, Ph.D., SpMK (K); Dr.dr. Ilhamjaya Pattelongi, M.Kes** banyak inspirasi, arahan dan masukan sejak awal proposal, proses penelitian hingga akhir penulisan disertasi ini; **Prof.Dr.drh.Dondin Sajuthi, MST., Ph.D** selaku penguji eksternal yang telah memberikan arahan dan masukan serta ilmu terkait hewan coba hingga memperkenalkan penulis mengikuti pelatihan di Primata IPB Bogor; **Dr.dr.Khairuddin Djawad, Sp.KK (K), Dr.dr.Gatot Lawrence, Sp.PA (K), FESC** yang telah memberikan ide, dukungan dan arahan terhadap hasil penelitian serta pembuatan daftar pustaka dan rujukan dalam disertasi ini.

Pada kesempatan ini penulis juga menyampaikan ungkapan terimakasih yang dalam dan tulus kepada suami **Dedi Suprpto Hutapea, S.Kom**, anak-anakku **Leddy Quinnsya Febrinawati Hutapea** dan **Fransly Adriano Hutapea** sumber inspirasiku, penyemangat ku dan hidup ku. Dukungan doa dan pengorbanan waktu yang telah diberikan dengan ikhlas turut membantu penyelesaian disertasi ini, serta orangtua **Todung Hutapea dan Tianggur Marusi Simorangkir**. Terkhusus pula kepada **Kakak dan Adik-adikku** atas dukungan yang senantiasa diberikan selama proses pendidikan. Kesehatan dan umur yang panjang Tuhan anugerahkan atas mereka dan kiranya proses ini menjadi motivasi buat pengembangan diri dan cita-cita.

Terimakasih atas dukungan dan motivasi Dekan Fakultas Kedokteran **Universitas Kristen Indonesia (UKI) Dr.dr.Marwito Wiyanto, M.Biomed., AIFM; Dr.dr.Carmen Siagian, MS, Sp.GK** dan kebersamaan mahasiswa S3 UKI angkatan 2014 **Dr.drg.Emma Kamelia, M.Biomed; Dr.Marni br.Karo, M.Kes; Dr.dr.Tigor**

Simanjuntak, Sp.Og; Dr.dr.Robert Sirait, Sp.A; Dr.dr.Bambang S, Sp.THT; dr.Titus Tambaip, M.Kes; Tetty Rina Aritonang, M.Keb, Sri Rahayu, SST., Mars. Ucapan terimakasih yang tulus juga kepada staf laboratorium Mikrorobiologi, Biofarma, Immunologi dan Bomolekuler, Universitas Hasanuddin Makassar serta tim Farmasi yang telah banyak membantu dalam proses penelitian sehingga proses pendidikan doktoral dapat terselesaikan.

Melalui kesempatan ini juga penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang setinggi-tingginya:

1. **Prof.Dr.Dwia Aries Tina Pulubuhu, MA** selaku rektor Universitas Hasanuddin Makassar yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Doktor di Universitas Hasanuddin;
2. **Kopertis Wilayah III DKI Jakarta** yang telah merekomendasikan penulis dalam perolehan beasiswa pendidikan pasca sarjana (BPPDN);
3. **Prof.dr.Budu, Ph.D, Sp.M(K), M.Med. Ed** selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk mengikuti pendidikan Doktor;
4. **Prof.dr.Mochammad Hatta, PhD., SpMK (K)** selaku Ketua Program Studi S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan motivasi demi kelancaran penyelesaian pendidikan Doktor;
5. **Dr.Hardjito, M.Si** selaku Ketua STIKes Medistra Indonesia periode 2012-2017 yang telah memberikan izin dan rekomendasi mengikuti pendidikan Doktor serta doa dan motivasi terus menerus untuk menyelesaikan pendidikan Doktoral;
6. Seluruh staf dan dosen S3 Ilmu Kedokteran Universitas Hasanuddin yang telah memberikan bekal ilmu yang sangat bermanfaat bagi penulis;

7. Tim dosen dan staf STIKes Medistra Indonesia, terimakasih doa dan motivasi yang telah diberikan kepada penulis dalam proses penyelesaian pendidikan Doktor di Universitas Hasanuddin;
8. Semua pihak yang ikut serta membantu kelancaran proses pendidikan dan penulisan disertasi ini;

Kiranya Tuhan Yang Maha Kuasa membalaskan berlipat ganda atas semua bimbingan, arahan, doa dan motivasi yang diberikan kepada penulis. Semoga disertasi ini bermanfaat bagi masyarakat dan terlebih menjadi sumber rujukan bagi para pembaca. Amin

Makassar, Agustus 2018

Penulis

Lenny Irmawaty Sirait

ABSTRAK

ABSTRACT

DAFTAR ISI

HALAMAN SAMPUL	i
LEMBAR PERSETUJUAN	ii
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN KEASLIAN	iv
DAFTAR PENGUJI	v
PRAKATA	vi
ABSTRAK	ix
ABSTRACT	x
DAFTAR ISI	xi
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
BAB I. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Pertanyaan Penelitian	8
1.4 Tujuan penelitian	9
1. Tujuan Umum	9
2. Tujuan Khusus	9
1.5 Manfaat Penelitian	11
1. Bidang Akademik	11
2. Manfaat Praktis	11
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	12
2.1 Tinjauan <i>Gardnerella vaginalis</i> (GV)	12
2.1.1 Patogenitas Gardnerella vaginalis	13
2.1.2 Mekanisme infeksi oleh GV	14
2.1.3 Faktor Risiko terjadinya infeksi dan komplikasi	19
2.1.4 Diagnosis	21
2.1.5 Penanganan Patogenitas Gardnerella vaginalis	24
2.2 Tinjauan Buah Andaliman (<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC)	26
2.2.1 Kandungan Kimia	30
2.2.2 Aktivitas Buah Andaliman (<i>Zanthoxylum acanthopodium</i> DC)	36
2.3 Sistem kekebalan tubuh	45

2.3.1	Definisi	45
2.3.2	Traktus genitalis wanita	46
2.3.3	Sistem imunitas	47
2.3.4	Protein antimikrobal (Antimicrobial Peptide)	49
2.3.5	Gen CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide)	49
2.4	Kerangka Teori	55
2.5	Kerangka konsep	56
2.6	Hipotesis	56
2.7	Definisi Operasional	57
BAB III. METODE PENELITIAN		60
3.1	Jenis dan Disain penelitian	60
3.2	Waktu dan Tempat Penelitian	60
3.3	Subyek Penelitian	60
3.4	Penatalaksanaan Penelitian Pada Hewan Coba	62
3.5	Alur Penelitian	63
3.6	Preliminary Studi	63
3.7	Main Study	70
3.7.1	Bahan dan Peralatan	70
3.7.2	Protokol Penelitian	77
3.8	Analisis Data	84
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN		86
4.1	Hasil Penelitian	86
4.1.1	Hasil Fitokimia Secara Kualitatif Ekstrak Maserasi Buah Andaliman	86
4.1.2	Hasil Ekspresi mRNA dan Bacterial Load pada Pada Kelompok Preventif dan Kuratif	87
1.	Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC)	88
a.	Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) terhadap Ekspresi mRNA gen CAMP	88
b.	Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) terhadap Jumlah Bakteri	91
c.	Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) terhadap Jumlah koloni	92
2.	Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum	94

Acanthopodium DC)	
a. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) terhadap ekspresi mRNA CAMP	94
b. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) terhadap Jumlah Bakteri	97
c. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) terhadap Jumlah Koloni	99
4.1.3 Hubungan antara Jumlah Bakteri dan Koloni dengan mRNA gen CAMP	100
4.2 Pembahasan	103
BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN	123
5.1 Kesimpulan	123
5.2 Saran	124
DAFTAR PUSTAKA	125
LAMPIRAN	133

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1	Buah Andaliman (<i>Zanthoxylum acanthopodium DC</i>)	6
Gambar 2	Organ Reproduksi Wanita	14
Gambar 3	Patogenesis GV	15
Gambar 4	Mekanisme Gardnerella menjadi bacterial vaginosis	17
Gambar 5	<i>Clue cells</i> , Sel epitel vagina normal, dan <i>Laktobacillus</i>	18
Gambar 6	Sekret Vagina pada <i>Bacterial vaginosis</i>	22
Gambar 7	<i>Fishy</i>	odor 22
Gambar 8	<i>Whift test</i>	22
Gambar 9	Clue	cells 24
Gambar 10	Struktur Pohon, Cabang, dan Daun Andaliman	29
Gambar 11	Struktur Cabang dan ranting yang berduri, Bunga, dan buah Andaliman	29
Gambar 12	Profil buah andaliman segar setelah dipanen	30
Gambar 13	Profil buah andaliman kering	30
Gambar 14	Mekanisme Biosintesa Senyawa Terpenoid	35
Gambar 15	Respon Imunitas Innate dan Adaptive	47
Gambar 16	Komponen pertahanan kulit dan mukosa	47
Gambar 17	Respon Antimikrobial	49
Gambar 18	Catelicidin AMP	50
Gambar 19	Kerangka Teori	55
Gambar 20	Kerangka Konsep	56
Gambar 21	Alur Penelitian	63
Gambar 22	Hasil Uji Tumbuh Bakteri Gardnerella vaginalis pada vagina Mencit	65
Gambar 23	Hasil uji ELISA	66
Gambar 24	Pengemulsi Ekstrak buah Andaliman	68
Gambar 25	Hasil uji coba Dosis Andaliman	69
Gambar 26	Pemberian makan pada mencit (lavage)	71
Gambar 27	Inokulasi Gardnerella vaginalis intra vaginal	72
Gambar 28	Masa adaptasi hewan coba Balb-C	72
Gambar 29	Pengambilan darah melalui ekor	74
Gambar 30	Pengambilan sekret vagina Mencit	77
Gambar 31	Tampilan preparat sebelum inokulasi GV (H0) dan sesudah inokulasi GV (H1)	83
Gambar 32	Tampilan PCA sebelum inokulasi GV (H0) dan sesudah inokulasi GV (H1)	84
Gambar 33	Tampilan preparat koloni sesudah inokulasi GV (H1)	84
Gambar 34	Efek Prefentif	
	Grafik 1 Box Plot Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Pemberian Andaliman	89
Gambar 35	Grafik 2 Box Plot Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah inokulasi gardnerella vaginalis pasca pemberian andaliman	90

Gambar 36	Grafik 3 Box Plot perubahan jumlah bakteri setelah inokulasi.....	92
Gambar 37	Grafik 4 Box Plot perubahan jumlah koloni setelah inokulasi pasca pemberian andaliman.....	94
Gambar 38	Efek Kuratif Grafik 5 Box Plot Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Inokulasi <i>Gardnerella vaginalis</i>	95
Gambar 39	Grafik 6 <i>Box Plot</i> Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Pemberian Terapi Andaliman Pasca Inokulasi <i>Gardnerella vaginalis</i>	96
Gambar 40	Grafik 7 Box Plot Perubahan Jumlah kuman Setelah Pemberian Terapi Andaliman Pasca Inokulasi <i>Gardnerella vaginalis</i>	98
Gambar 41	Grafik 8 Box Plot Perubahan jumlah koloni Setelah Pemberian Terapi Andaliman Pasca Inokulasi <i>Gardnerella vaginalis</i>	100
Gambar 42	Grafik 9 Korelasi Perubahan Jumlah Kuman dengan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Pasca Terapi	101
Gambar 43	Grafik 10 Korelasi Perubahan Jumlah Koloni dengan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Pasca Terapi	102

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Komponen Minyak Buah Andaliman Segar dan Kering Angin dengan Teknik Kromatografi Gas	30
Tabel 2	Jenis senyawa terpenoid	35
Tabel 3	Efek Prefentif Andaliman Perbedaan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Pemberian Andaliman Antara Ketiga Kelompok	88
Tabel 4	Perbedaan Perubahan Ekspresi Mrna Camp 3 Hari Setelah Infeksi Gardarnella Vaginalis Antara Ketiga Kelompok	89
Tabel 5	Perbedaan Perubahan Jumlah Bakteri Setelah Infeksi Gardarnella Antara Ketiga Kelompok	91
Tabel 6	Perbedaan Perubahan Jumlah Koloni Setelah Infeksi Gardarnella Antara Ketiga Kelompok	93
Tabel 7	Efek Kuratif Andaliman Perbedaan Perubahan Ekspresi Mrna Camp Setelah Infeksi Gardarnella Antara Ketiga Kelompok	95
Tabel 8	Perbedaan Perubahan Ekspresi Mrna Camp Setelah Pemberian Terapi Pasca Infeksi Gardarnella Antara Ketiga Kelompok	96
Tabel 9	Perbedaan Perubahan Jumlah Kuman Setelah Pemberian Terapi Pasca Infeksi Gardarnella Antara Ketiga Kelompok	97
Tabel 10	Perbedaan Perubahan Jumlah Koloni Setelah Pemberian Terapi Pasca Infeksi Gardarnella Antara Ketiga Kelompok	99
Tabel 11	Korelasi Perubahan Jumlah Bakteri Dan Koloni Dengan Perubahan Ekspresi Mrna Gen Camp Sesudah Pemberian Terapi	101

DAFTAR SINGKATAN

IMS	: Infeksi Menular Seksual
ISR	: Infeksi Saluran Reproduksi
GV	: Gardnerella Vaginalis
BV	: Bacterial Vaginosis
WHO	: World Health Organization
HIV	: Human Immunology Virus
PSK	: Pekerja Seks Komersial
AMP	: Antimicrobial Peptide
mRNA	: messenger-RNA
CAMP	: Cathelicidin Antimicrobial Peptide
URJ	: Unit Rawat Jalan
AIDS	: Acquired Immune Deficiency Syndrome
BB	: berat badan
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
IUD	: Intra Uterine Device
CFU	: Colony Forming Unit
PCA	: Plate Count Agar
GCMS	: Gas Chromatography Spectrometri Mass
Na-CMC	: Carboxymethyl cellulose
RT-PCR	: Reverse Trankriptase-Polymerase Chain Reaction
VLF	: Vaginal Lavage Fluid

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Gardnerella vaginalis (GV) merupakan golongan bakteri penyebab Infeksi Saluran Reproduksi/ Infeksi Menular Seksual (ISR/IMS). GV erat hubungannya dengan *Bacterial vaginosis* (Dukes & Gardner 1960) dapat diisolasi pada sekitar 95% wanita dengan *Bacterial vaginosis* (BV), 40-50% pada wanita tanpa gejala vaginitis dan atau pada penyebab vaginitis lainnya. GV termasuk bakteri anaerob fakultatif dan merupakan spesies utama penyebab infeksi vaginal non spesifik (*Bacterial vaginosis*). IMS masih menjadi salah satu masalah kesehatan masyarakat yang utama karena mempengaruhi angka kesakitan bahkan kematian ibu hamil, bersalin, nifas, neonatus dan bayi serta perempuan pada umumnya. IMS dapat merusak dinding vagina atau leher rahim, biasanya tanpa tanda-tanda infeksi. Berdasarkan data WHO tercatat 78,5 juta kasus baru ISR/IMS per tahun (Aditama 2011). IMS merupakan infeksi yang sebagian besar menular lewat hubungan seksual dengan pasangan yang sudah terinfeksi BV. BV erat hubungannya dengan kejadian Gonococcal, Chlamydial, dan Trichomonal (Brotman et al. 2010) serta dapat meningkatkan risiko terinfeksi HIV sebanyak tiga kali lipat atau lebih (Cohen et al. 2012); (Oo et al. 2009).

Lactobacillus spp merupakan mikrobiota vagina yang dominan dan berada dalam kondisi yang konsisten dari waktu ke waktu. Aktivitas

seksual (*Vaginal sex*) dapat mempengaruhi komposisi mikrobiota vagina wanita muda yaitu meningkatkan keragaman GV dengan atau tanpa BV, dan jika terjadi transmisi seksual berpotensi menjadi patogen (Vodstrcil et al. 2017). Vagina yang merupakan pintu masuk traktus genitalis dilapisi oleh epitel skuamosa non-keratinisasi dan memproduksi suatu glikoprotein hidrofilik yang disebut glikokaliks. Trauma fisik dan kimiawi serta infeksi ulseratif dapat menyebabkan rusaknya epitel serta perubahan ekosistem vagina sehingga menjadi pintu masuk mikroorganisme patogen. GV dan bakteri anaerob lainnya dapat berada dalam konsentrasi tinggi pada traktus genitalis sehingga *Lactobasillus Spp* penghasil H₂O₂ berkurang dan menyebabkan BV (Teixeira et al. 2012).

Kejadian infeksi BV merupakan penyakit infeksi terbanyak di bagian obstetri ginekologi (Schwebke et al. 2014). Di Indonesia, prevalensi BV terus meningkat pada kelompok umur 41-45 tahun (54,5%), mahasiswa/pelajar (45,7%) dan paritas >5 (50%). Di sebagian wilayah Jawa Barat dan DKI Jakarta kejadian BV sebesar 30,7% diantaranya usia 15-25 tahun (26,8%), 26 – 40 tahun (59,1%), > 40 tahun (14%). Status pernikahan belum menikah (16,9%), menikah 1x (76,4%), dan menikah > 1x (6,7%) (Ocviyanti et al. 2010). Jumlah kasus baru BV di URJ Kesehatan Kulit dan kelamin RSUD Dr. Soetomo Surabaya adalah 35 pasien dari 33.201 (0,1%) dengan kelompok usia terbanyak 25-44 tahun sebesar 26 (74,3%) pasien dan 31 pasien (88,6%) sudah menikah. Keluhan utama terbanyak berupa duh tubuh vagina tanpa keluhan

subjektif yaitu sebanyak 16 (45,7%) pasien. Duh tubuh vagina terbanyak berbentuk serosa pada 25 (71,4%) pasien. Pada pemeriksaan laboratorium ditemukan clue cell pada 100% kasus. Obat yang paling banyak diberikan berupa metronidazol (Pujiastuti & Mustiatutik 2011). Karim & Barakbah (2014) menyatakan kasus baru BV sebanyak 33 pasien, rentang usia terbanyak 25- 44 tahun (57,6%), sebagian besar menikah (84,8%), keluhan utama terbanyak duh tubuh vagina tanpa keluhan subjektif lain (42,4%), sifat keluhan terbanyak adalah keluhan yang berulang (54,5%). Pasangan seksual terbanyak yaitu suami (60,6%). Riwayat *vaginal douching* pada 10 pasien (30,3%). Bentuk duh terbanyak adalah serous (75,8%). Didapatkan *Whiff test* positif dan pH > 4,5 pada 9,1%. Ditemukan *clue cell* pada semua sediaan mikroskopis (100%). Terapi terbanyak yang diberikan adalah metronidazol (81,8%). Prevalensi BV pada WPS di Tangerang sebesar 69,31% (131 dari 189). Faktor risiko berupa jumlah pasangan seks dalam satu minggu terakhir, bilas vagina yang dilakukan sendiri dan / atau petugas kesehatan, dan kelompok usia yang lebih muda (Astriningrum et al. 2015). Prevalensi BV meningkat dihubungkan dengan merokok, obesitas, hormonal, antibiotik, stress, riwayat obstetri dan riwayat abortus termasuk penggunaan alat kontrasepsi, pasangan seksual lebih dari satu, hubungan seksual yang baru dilakukan, dan pembilasan setelah menstruasi (*douching*), pekerja seks komersial (PSK) dan atau terlibat dengan PSK (Bautista et al. 2016).

Kegagalan menemukan dan mengobati ISR/IMS pada stadium dini dapat menimbulkan komplikasi serius antara lain: infertilitas pada laki-laki dan perempuan, kehamilan ektopik, infeksi daerah pelvis, kanker organ reproduksi, jika terjadi pada wanita hamil menyebabkan kelahiran prematur dan lahir mati pada bayi, serta infeksi pada neonatus dan bayi. Komplikasi pada kehamilan dan nifas selain persalinan prematur, dapat terjadi korioamnionitis, amnionitis, dan endometritis postpartum (Selastri, A., Sjahril, R., Soraya n.d.).

GV merupakan bakteri anaerob fakultatif yang artinya tetap hidup walaupun terdapat oksigen sehingga merupakan bakteri patogen yang sangat kuat dan bertahan hidup dalam vagina. Pengobatan bakteri patogen dalam vagina banyak dilakukan menggunakan antibiotik (Boris et al. 1998), namun bakteri ini dapat kembali hidup dan mengalami hiperpopulasi menggantikan flora normal vagina sehingga keluhan noda putih hingga kekuningan, bau, dan terasa gatal pada daerah kemaluan kembali menyerang perempuan atau mengalami “kambuh” (Yuniarti et al. 2016);(Monahan et al. 2010). Masalah baru penggunaan antibiotik pun terjadi yaitu resistensi. Diperlukan upaya preventif yaitu dengan meningkatkan imunitas dan atau kuratif penggunaan tanaman antibakteri sebagai penanganan aktif terhadap bakteri pathogen (Zahra et al. 2010).

Sudah waktunya mempelajari lebih dalam secara bersamaan tentang patogen GV, mikrobiota vagina sehat, bakteriofag, dan respon imun host (Yevgeniy Turovskiy, Katia Sutyak Noll, 2012). Traktus genitalis

memiliki sistem pertahanan terhadap invasi mikroorganisme dari lingkungan luar terutama patogen menular seksual baik imun bawaan maupun adaptif. Ulseratif menjadi jalan masuk mikroorganisme pathogen dan menjadi faktor risiko utama transmisi infeksi menular seksual dan HIV. Infeksi merupakan keadaan jaringan tubuh yang terpapar mikroorganisme (bakteri). Perjalanan infeksi dimulai jika ada jalur masuk (*port d'entry*), setelah melewati masa inkubasi maka penderita akan mengalami fase akut. Setelah fase akut, beberapa jenis infeksi dapat sembuh sendiri (*self limiting diseases*), beberapa sembuh dengan intervensi antibiotika sedangkan lainnya tidur (*dormant*) dan menjadi fase kronis yang sewaktu-waktu dapat aktif kembali. Imunitas bawaan dipicu setelah invasi mikroorganisme (Cauci et al. 1998). Paparan mikroorganisme pada permukaan tubuh, akan merangsang tubuh untuk melakukan penolakan terhadap agen infeksius sehingga muncullah tanda-tanda peradangan. Reaksi radang ini merupakan mekanisme pertahanan tubuh agar kerusakan tidak bertambah luas. Protein antimikrobal (AMP) merupakan peptida pertahanan hospes memiliki komponen aktif pada respon imun bawaan (Yarbrough et al. 2015); peptida-peptida ini mempunyai aktivitas mikrobisidal spektrum luas yang poten dan kemungkinan dapat dipakai sebagai terapi. AMP mampu membunuh bakteri Gram positif dan Gram negatif (termasuk strain yang resisten terhadap antibiotik konvensional), *envelope virus* dan jamur (Sumi et al. 2015). Peptida antimikrobal yang penting diantaranya adalah katelisinidin (Strzałkowska & Jo 2012).

Pada keadaan normal, paparan mikroorganisme patogen terhadap tubuh dapat dilawan oleh sistem pertahanan tubuh (sistem imun). Hal ini berhubungan dengan peran yang ditunjukkan oleh fungsi dan jumlah sel imun. Saat fungsi dan jumlah sel imun kurang memadai, paparan mikroorganisme patogen dapat menimbulkan berbagai penyakit terutama terkait dengan penyakit infeksi. Salah satu cara mempertahankan sistem imun adalah dengan pemberian imunomodulator, terutama zat yang meningkatkan sistem imun atau imunostimulator diantaranya menggunakan ekstrak tumbuhan yang mengandung flavonoid dan terpenoid diantaranya buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC).



Gambar 1. Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC)

Andaliman adalah tanaman rempah dikonsumsi masyarakat terutama masyarakat Sumatera Utara sebagai bumbu masakan layaknya merica sehingga dijuluki “merica batak”. Metabolit sekunder yang terkandung dalam buah andaliman diantaranya alkaloid, saponin, tannin, flavonoid, triterpenoid dan steroid. Kandungan fenolik yang terkandung

dalam buah andaliman dikenal sebagai immunomodulator, antiinflamasi, dan juga antibakteri. Penelitian tentang potensi andaliman asal Sumatera Utara antibakteri banyak dilakukan, namun masih sebatas bakteri pangan dengan metode invitro. Potensi antibakteri buah andaliman sebagai bakterisid bakteri pangan, sudah saatnya dikembangkan dalam kesehatan langsung pada tubuh host. Pengembangan buah andaliman sebagai antibakteri dipandang perlu bidang kesehatan reproduksi khususnya lingkup penanggulangan ISR/IMS termasuk HIV/AIDS. Bidan merupakan profesi kesehatan yang melayani di tingkat primer dan temuan kejadian infeksi ini terjadi di tingkat pelayanan tersebut. Oleh karena itu peneliti menganggap pentingnya melakukan penelitian ini sebagai bentuk tugas dan tanggung jawab mengembangkan asuhan komplementer menggunakan bahan buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) pada bakteri GV secara invivo dan dikemas dengan judul disertasi **“Efek Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap Ekspresi mRNA gen CAMP dan Bakterial Load pada Mencit (*Mus Musculus*) Balb c yang diinfeksi Bakteri *Gardnerella vaginalis*”**.

1.2 Rumusan masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, bahwa Infeksi Saluran Reproduksi/ Infeksi Menular Seksual (ISR/IMS) mempengaruhi angka kesakitan bahkan kematian ibu hamil, bersalin, nifas, neonatus dan bayi serta perempuan pada umumnya. IMS dapat merusak dinding vagina atau leher

rahim tanpa tanda-tanda infeksi. Berdasarkan data WHO tercatat 78,5 juta kasus baru ISR/IMS per tahun (Aditama 2011). *Gardnerella vaginalis* (GV) merupakan penyebab utama bakterial vaginosis, yaitu salah satu IMS yang terjadi akibat hiperpopulasi bakteri anaerob. Pengobatan infeksi GV hingga saat ini adalah terapi antibiotik, namun masalah baru terjadi diantaranya resistensi obat. Di sisi lain terdapat bahan alami yang telah diketahui sebagai antibakteri yaitu Andaliman. Andaliman merupakan tanaman rempah yang secara empirik kearifan lokal telah digunakan untuk bakteri patogen pangan, namun pemanfaatannya di dunia kesehatan khususnya reproduksi manusia belum pernah diketahui. Oleh karena itu, diperlukan penelitian untuk mengetahui efek Andaliman terhadap bakteri patogen host (bakteri saluran urogenitalia) diantaranya GV secara *invivo* sekaligus memperkenalkan Andaliman kepada masyarakat.

1.3 Pertanyaan Penelitian

1. Bagaimana efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 dan 7 hari sebelum induksi *Gardnerella vaginalis* terhadap ekspresi mRNA gen CAMP?
2. Bagaimana efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 dan 7 hari sebelum induksi *Gardnerella vaginalis* terhadap bakterial load?
3. Bagaimana efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 7 hari setelah induksi *Gardnerella*

vaginalis terhadap bacterial load dan bagaimana perbandingannya dengan efek metronidazole?

4. Bagaimana efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari terhadap ekspresi mRNA CAMP pada kondisi tidak terinfeksi?
5. Bagaimana efek pemberian ekstrak buah andaliman selama 7 hari setelah iinduksi *Gardnerella vaginalis* terhadap ekspresi mRNA gen CAMP?
6. Bagaimana korelasi antara perubahan bacterial load dengan perubahan ekspresi mRNA setelah terapi Andaliman?

1.4 Tujuan Penelitian

1.4.1 Tujuan Umum

Diketuainya efek ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium dc*) terhadap ekspresi mRNA gen CAMP dan bacterial load pada mencit (*Mus musculus*) Balb c yang diinduksi *Gardnerella vaginalis*.

1.4.2 Tujuan Khusus

- a. Diketuainya efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 hari terhadap ekspresi mRNA gen CAMP dan membandingkannya dengan efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari

selama 7 hari pada balb c sebelum dan sesudah induksi *Gardnerella vaginalis* transvaginal.

- b. Diketuainya efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 hari terhadap bakterial load dan membandingkannya dengan efek pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 7 hari pada balb c sebelum dan sesudah induksi *Gardnerella vaginalis* transvaginal.
- c. Diketuainya ekspresi mRNA gen CAMP setelah induksi *Gardnerella vaginalis* transvaginal pada balb c sebelum dan sesudah pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 7 hari dan perbandingannya dengan pemberian metronidazole 0,01mg dua kali sehari dosis 0,1 ml/ 10 gram Bb selama 7 hari.
- d. Diketuainya bakterial load setelah induksi *Gardnerella vaginalis* transvaginal pada balb c sebelum dan sesudah pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 7 hari dan perbandingannya dengan pemberian metronidazole 0,01mg dua kali sehari dosis 0,1 ml/ 10 gram Bb selama 7 hari..
- e. Diketuainya korelasi antara perubahan bakterial load dengan ekspresi mRNA gen CAMP setelah terapi ekstrak Andaliman.

1.5 Manfaat Penelitian

1.5.1 Bidang Akademik

- a. Memberikan informasi ilmiah tentang mekanisme biomolekuler setelah pemberian ekstrak buah andaliman terhadap ekspresi mRNA gen CAMP dan bacterial load pada infeksi *Gardnerella vaginalis*.
- b. Memberikan data yang dapat digunakan pada penelitian lanjutan buah andaliman sebagai antibakteri, anti inflamasi, dan immunomodulator pada infeksi bakteri *Gardnerella vaginalis*.

1.5.2 Manfaat Praktis

- a. Bermanfaat sebagai literatur dalam bidang kesehatan reproduksi khususnya literature penggunaan bahan tanaman buah andaliman untuk penatalaksanaan infeksi vulvovaginitis bakterialis.
- b. Dapat mendukung aplikasi asuhan komplementer penggunaan bahan tanaman sebagai obat-obatan herbal sehingga menjadi solusi pengobatan bakteri terutama bagi pasien dengan vulvovaginitis bakterialis.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Umum *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis (GV) adalah bakteri penyebab infeksi saluran urogenital (STD) merupakan kondisi penting diperhatikan di klinisi perempuan dan laki-laki (Numanović et al. 2008); (R.S et al. 2008). Bakteri ini ditemukan oleh Hermann L. Gardner dan Dukes pada tahun 1955. Organisme ini mula-mula dikenal sebagai *Haemophilus vaginalis* dan *Corynebacterium vaginale* (Dukes & Gardner 1960); (Greenwood, J.R., Pickett 1979) kemudian diubah menjadi genus *Gardnerella* atas dasar penyelidikan terhadap fenotip dan asam dioksi-ribonukleat (Greenwood, J.R., Pickett 1980)(Piot et al. 1982). Klasifikasi ilmiah: Kerajaan Bakteri; Filum Actinobacteria; Kelas Acuty'tinobacteria; Order Bifidobakteriales; Keluarga Bifidobacteriaceae; Genus Gardnerella; Spesies G. vaginalis; Nama binomial Gardnerella vaginalis.

GV merupakan salah satu dari spesies Haemophilus, tumbuh, berukuran kecil dengan diameter 1-1,5 m, sirkuler, koloni abu-abu, dengan sel clue, yaitu sel epitel yang menyelimuti bakteri, tidak membentuk spora, bakteri non-motil, dan tidak mempunyai kapsul. Pada tahun 1953, Leopold merupakan orang yang pertama kali melaporkan kuman batang gram negatif pleomorfik yang *non-motil*, tidak berkapsul, dan diisolasi dari saluran reproduksi wanita yang menderita servicitis. GV memiliki dinding sel Gram-positif, namun oleh karena dinding sel sangat tipis, dapat muncul

baik Gram-positif atau Gram-negatif di bawah mikroskop. Hal ini terkait dengan mikroskopis sel-sel epitel yang tertutup bakteri.

2.1.1 Patogenitas *Gardnerella vaginalis*

GV menghasilkan pori-pori yang membentuk toksin (vaginolysin) hanya mempengaruhi manusia dan hidup pada sel epitel vagina (Gelber et al. 2008); (Rottini et al. 1990). Perkembangan bakteri anaerob terjadi pada tempat yang sedikit atau sama sekali tidak mengandung oksigen. Kuman ini bersifat fakultatif, dengan produksi akhir utama pada fermentasi berupa asam asetat. Proses pertumbuhannya membutuhkan tiamin, riboflavin, niasin, asam folat, biotin, purin, dan pirimidin. GV tergolong ke dalam bakteri anaerob fakultatif yaitu bakteri yang dapat menggunakan oksigen jika tersedia (Schwebke et al. 2014).

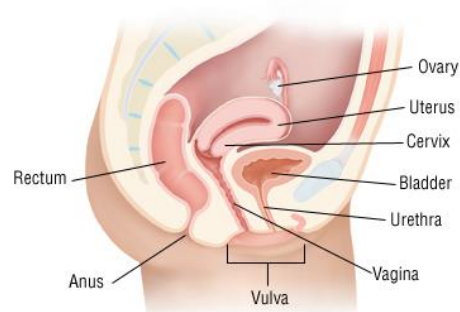
Gardnerella dapat terisolasi dari saluran genital, urin, darah, dan faring; merupakan bakteri yang erat hubungannya dengan BV; serta merupakan species utama penyebab BV. Menggunakan media kultur yang lebih sensitif, GV dapat diisolasi sekitar >90% pada wanita tanpa tanda-tanda infeksi vagina (Piot et al. 1982). Gardner and Dukes (1955) pertama kali berpendapat bahwa GV berinteraksi dengan bakteri anaerob untuk menyebabkan BV. GV secara seksual ditransmisikan oleh *coccobacillus* koloni abu-abu pada agar coklat, merupakan organisme yang jelas secara serologi dan diisolasi dari saluran genitourinari wanita normal. Tes katalase, oksidase, reduksi nitrat, indole, dan urease semuanya negatif.

Bakteri anaerob di saluran genitalia wanita menyebabkan abses panggul, penyakit radang panggul, peradangan dinding rahim (endometritis) serta infeksi panggul yang diikuti keguguran atau persalinan prematur.

Analisis mikrobiologi telah menunjukkan GV menjadi organisme penyebab yang paling sering terdeteksi (> 98%) dari kasus BV. Selama pertumbuhan di media cair, GV menghasilkan asam amino yang meningkatkan pertumbuhan *Prevotella bivia*. Selain merupakan spesies yang paling lazim dan ganas, GV juga merupakan bagian dari mikrobiota vagina pada wanita sehat. GV merupakan salah satu kuman penyebab *Sexually Transmitted Disease* oleh karena:

- 1) Walaupun telah sembuh dari penyakit namun jika partner sexual tidak diterapi, maka akan menyebabkan reinfeksi.
- 2) GV dapat diisolasi pada > 90% partner sexual perempuan yang terinfeksi.
- 3) GV jarang ditemukan pada perempuan yang virgin.

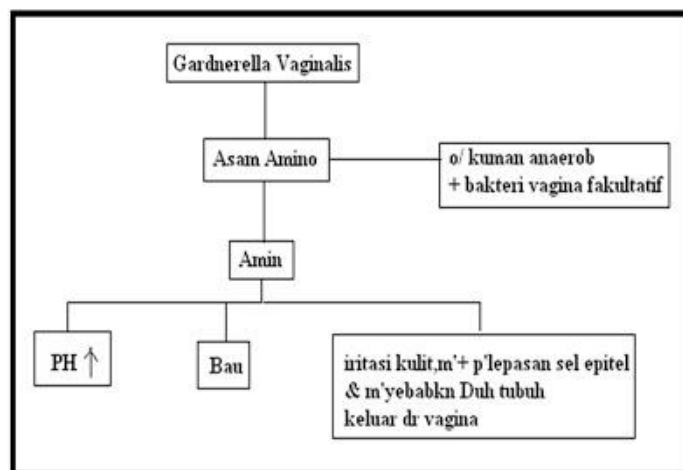
2.1.2.Mekanisme infeksi oleh GV



Gambar 2 Organ Reproduksi Wanita

Vagina merupakan organ reproduksi yang sangat rentan terhadap infeksi. Ekosistem vagina normal mengandung mikroorganisme sebanyak 10^5 - 10^6 /gr sekresi vagina; flora bakteri yang predominan adalah *Lactobacillus spp* (95%), disamping itu terdapat pula sejumlah kecil (5%) variasi bakteri aerob maupun anaerob. Pada infeksi BV terdapat peningkatan sejumlah mikroorganisme yang besar yaitu mencapai 10^9 - 10^{11} /gr sekresi vagina.

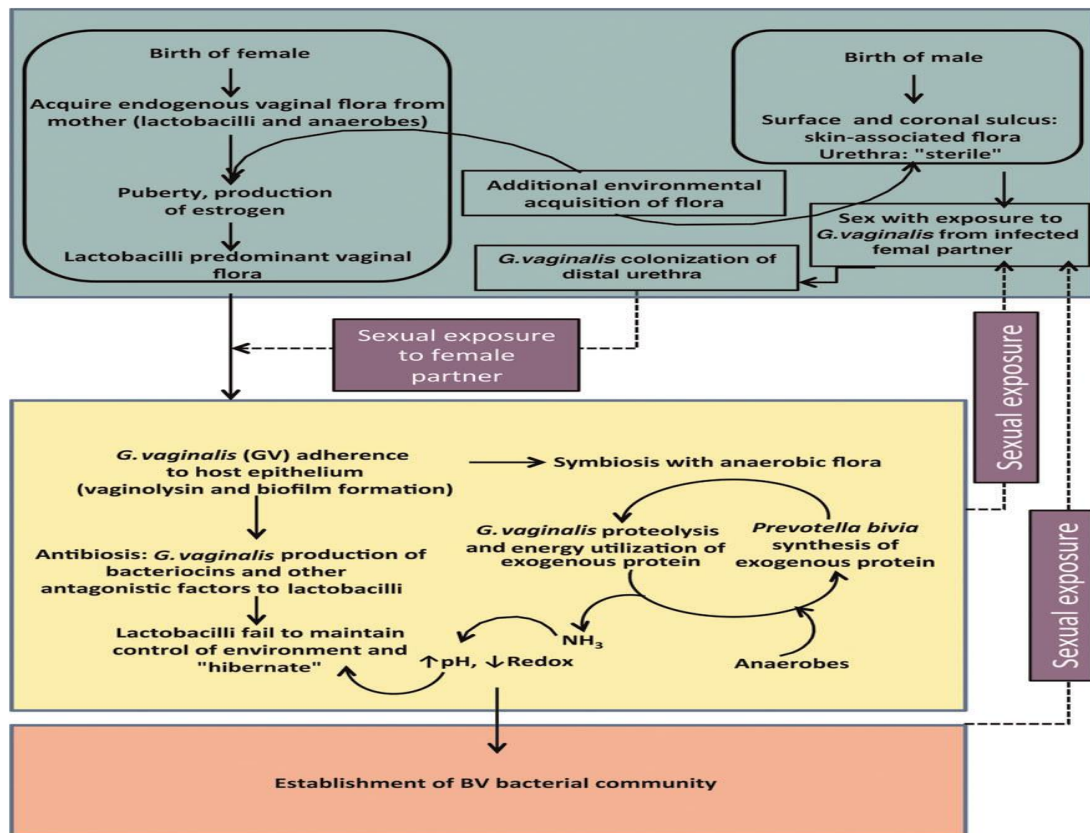
Trauma fisik dan kimiawi serta infeksi ulseratif dapat menyebabkan rusaknya epitel sehingga merupakan jalan masuk mikroorganisme patogen. Rusaknya lapisan epitelial dan kondisi ektopi serviks merupakan faktor risiko utama transmisi infeksi menular seksual. Infeksi vagina diantaranya adalah infeksi vagina nonspesifik yaitu infeksi yang disebabkan oleh bakteri dan kuman-kuman yang tidak dapat ditentukan jenisnya. Pada infeksi nonspesifik, jenis yang paling sering ditemui adalah *Bacterial vaginosis* akibat GV dan *Mycoplasma hominis*.



Gambar 3 PatogenesisGV

Pada vaginitis nonspesifik sering ditemukan GV dalam sekret vagina disertai peningkatan kuman *Bacteroides sp.* dan *Peptococcus sp.* GV mengisi penuh sel epitel vagina dengan membentuk bentukan khas (*clue cell*). GV menghasilkan asam amino yang diubah menjadi senyawa amin yang menimbulkan bau amis seperti ikan. Cairan vagina tampak berwarna keabu-abuan, pH sekret vagina > 4,5. Setelah sembuh akan terjadi pengurangan yang bermakna atau menghilangnya GV dan kuman anaerob, sehingga Criswell dkk, berpendapat GV merupakan penyebab terjadinya vaginitis. Analisis asam lemak dalam cairan vagina dengan *gasliquid chromatography* menunjukkan bahwa pada wanita dengan vaginitis nonspesifik perbandingan antara suksinat dan laktat naik menjadi lebih besar atau sama dengan 0,4 bila dibandingkan dengan wanita normal atau dengan pasien yang menderita vaginitis oleh penyebab yang lain (Christy N. Marrsa, Susan M. Knobela, Wen Qin Zhua, Stephanie D. Sweetb & Chaudhryb 2013).

GV berinteraksi dengan bakteri anaerob menyebabkan *bacterial vaginosis*. GV mengalami hiperpopulasi sehingga menggantikan flora normal vagina dari yang tadinya bersifat asam menjadi basa. Di dalam pH yang alkalis GV melekat erat pada sel epitel vagina yang lepas dan berbentuk *clue cells*. Secara mikroskopik *clue cells* tampak sebagai sel epitel yang sarat dengan kuman, terlihat granular dengan pinggiran sel yang hampir tidak kelihatan (Catlint 1992); (Schwebke et al. 2014)

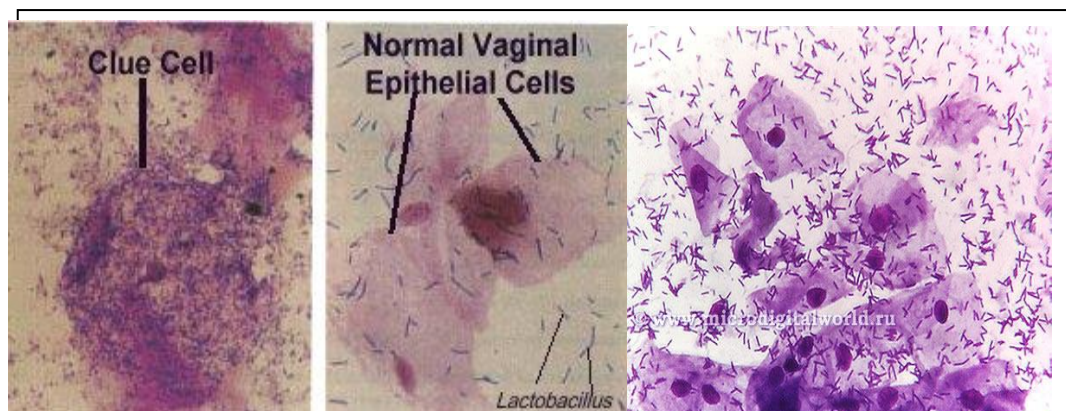


Gambar 4. Dijelaskan pada gambar bahwa Gardnerella vaginalis bukan flora normal vagina dari sejak lahir tetapi diperoleh dari aktivitas seksual bersama pasangan seksual yang terinfeksi. Gardnerella vaginalis merupakan patogen yang ganas yang melekat pada epitel vagina dan berhasil menguasai bahkan melumpuhkan flora normal vagina. Hasil infeksi *G. vaginalis* meningkatkan pH dan penurunan oksidasi reduksi dan mendukung pertumbuhan anaerob dan penekanan lactobacilli. (Schwebke et al. 2014)

Lactobacillus spp merupakan flora normal vagina yang memproduksi *Hydrogen peroxide* (H_2O_2). H_2O_2 bekerja menghasilkan asam laktat yang menciptakan pH rendah (<4,5) dan menghambat pertumbuhan kuman anaerob baik melalui efek toksik dari H_2O_2 maupun melalui reaksi ion halide dengan peroksidase pada serviks yang merupakan bagian dari sistem anti bakteri H_2O_2 halide-peroksidase sehingga membantu mencegah infeksi pada vagina maupun serviks (Nguyen et al. 2014).

Terjadi simbiosis antara GV sebagai pembentuk asam amino dan kuman anaerob beserta bakteri fakultatif dalam vagina yang mengubah

asam amino menjadi amin sehingga menaikkan pH sekret vagina sampai suasana yang sesuai bagi pertumbuhan GV. Beberapa amin diketahui menyebabkan iritasi kulit dan menambah pelepasan sel epitel dan menyebabkan duh tubuh berbau tidak sedap yang keluar dari vagina. Basil-basil anaerob yang menyertai bakterial vaginosis diantaranya *Bacteroides bivins*, *B. Capilosus* dan *B. disiens* yang dapat diisolasi dari infeksi genitalia. GV melekat pada sel-sel epitel vagina in vitro, kemudian menambahkan deskuamasi sel epitel vagina sehingga terjadi perlekatan duh tubuh pada dinding vagina. Organisme ini tidak invasif dan respon inflamasi lokal yang terbatas dapat dibuktikan dengan sedikitnya jumlah leukosit dalam sekret vagina dan dengan pemeriksaan histopatologis. Timbulnya bakterial vaginosis ada hubungannya dengan aktivitas seksual atau pernah menderita infeksi *Trichomonas* (Brotman et al. 2010).



Gambar 5. *Clue cells*, Sel epitel vagina normal, dan *Laktobacillus*

2.1.3. Faktor Risiko terjadinya infeksi dan komplikasi

Wanita seksual aktif merupakan karier GV lebih tinggi dibandingkan dengan wanita yang belum pernah berhubungan seksual sebelumnya. Wanita heteroseksual merupakan faktor predisposisi infeksi melalui frekuensi hubungan seksual yang tinggi, jumlah pasangan seksual yang banyak, penggunaan IUD dan kontrasepsi hormonal, penyakit diabetes mellitus, antibiotika, darah haid, cairan sperma, penyemprotan cairan ke dalam vagina (*douching*), dan gangguan hormon seperti saat pubertas, kehamilan, atau menopause.

Infeksi BV merupakan faktor predisposisi terhadap penyakit HIV, Herpes simplex tipe II, Chlamydia trachomatis, trichomoniasis, dan gonorrhea (Yang et al. 2015); (Valore et al. 2006a);(Brotman et al. 2010), meningkatkan risiko penularan HIV pada pasangan seks pria (Cohen et al. 2012)(Pebody et al. 2011); (Atashili et al. 2009).Meskipun *Bacterial vaginosis* terkait dapat ditemukan di alat kelamin pria, pengobatan mitra seks pria belum bermanfaat dalam mencegah kekambuhan BV, (Wilson & Barratt 1986); (Wira et al. 2011)(Nguyen et al. 2014).

BV langsung tertuju kepada sejumlah komplikasi obstetrik yaitu keguguran, lahir mati, perdarahan, persalinan prematur, ketuban pecah dini, infeksi cairan ketuban, endometritis pasca persalinan dan kejadian infeksi daerah operasi (IDO). Persalinan preterm pada wanita hamil dengan *Bacterial vaginosis* 3-8 kali lebih tinggi dibandingkan wanita hamil dengan flora normal. Selain itu wanita hamil dengan *Bacterial vaginosis*

juga mempunyai risiko lebih tinggi untuk terserang amnionitis, post partum endometritis, ketuban pecah dini, dan berat bayi lahir rendah (Tanphaichitr et al. 2016).

2.1.4 Diagnosis

2.1.4.1 Anamnesis

Beberapa anamnesis yang diajukan kepada pasien untuk dapat menegakkan diagnosis antara lain:

1. Onset: untuk mengetahui sejak kapan gejala seperti ini dialami dan apakah ini merupakan gejala berulang atau pertama kalinya.
2. Warna dan konsistensi: warna sekret dan konsistensi dapat menjadi petunjuk patogen penyebab timbulnya gejala.
3. Gejala lain: bau amis, rasa gatal pada daerah trigonum genitalia, terdapat nanah ataupun darah, rasa panas pada saat buang air kecil dan nyeri abdomen. Hal ini untuk mengkaji apakah penyebaran penyakit mencapai organ urinarius atau viseral.
4. Siklus haid: sekret vagina mengalami peningkatan pada saat ovulasi dan akhir masa menstruasi.
5. Pada pemeriksaan didapatkan jumlah duh tubuh vagina tidak banyak, berwarna putih, keabu-abuan, homogen, cair, dan biasanya melekat pada dinding vagina.
6. Pada vulva atau vagina jarang atau tidak ditemukan inflamasi.

7. Aktivitas seksual: penyakit kelamin menular melalui aktivitas seksual yang tidak sehat.
8. Perilaku menjaga kebersihan organ genitalia: perilaku ketidaktepatan saat membersihkan organ genitalia merupakan satu faktor yang dapat memicu meningkatnya penyakit kelamin.
9. Riwayat penyakit sebelumnya dan penggunaan obat antibiotik.

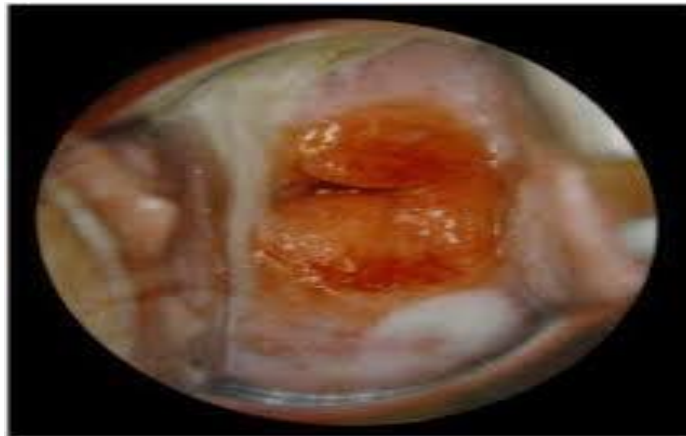
2.1.4.2 Pemeriksaan Penunjang

Pemeriksaan mikroskopik: Sediaan apus vagina yang diwarnai dengan pewarnaan gram ditemukan sel epitel vagina yang ditutupi bakteri batang sehingga batas sel menjadi kabur (clue cells).

2.1.4.3 Kriteria Amsel untuk diagnosis BV

Kriteria diagnosis yang dikenal adalah kriteria Amsel dan pewarnaan Gram (kriteria Nugent dan kriteria Spiegel). Diagnosa *Bacterial vaginosis* atas dasar Kriteria Amsel et al. (1983), konfirmasi diagnosis ditegakkan bila ditemukan 3 dari 4 kriteria,

1. Sekret vagina homogen, tipis, putih keabua-abuan, dan melekat pada dinding vagina.

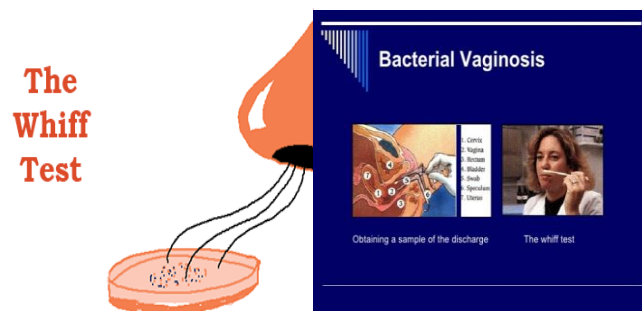


Gambar 6 Sekret Vagina pada *Bacterial vaginosis*

2. Bau khas “fishy odor” dengan *Whiff test*, yaitu pemeriksaan dengan penambahan KOH 10% pada sekret vagina. *Whiff test* dinyatakan positif bila ditemukan bau amis atau bau amin. Bau disebabkan oleh pelepasan amin terutama putresin, kadaverin, dan asam organik hasil alkalisasi bakteri anaerob.



Gambar 7 Fishy odor

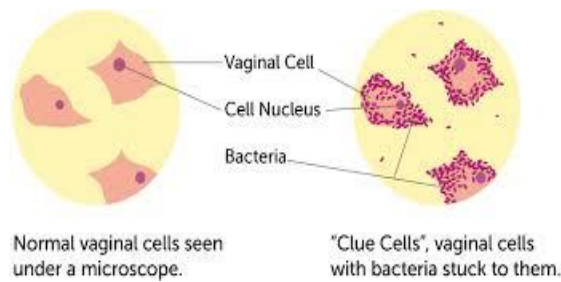


Gambar 8 Whiff test

3. pH vagina > 4,5. pH vagina mudah ditentukan dengan menggunakan nitrazine paper/kertas lakmus (interval 4,0 – 7,0).
4. Ditemukan clue cell pada pemeriksaan mikroskopik. Adanya *clue cells* \geq 20% dari seluruh jumlah sel epitel vagina per lapangan pandang. *Clue cell* adalah sel epitel yang dikelilingi oleh bakteri. Pemeriksaan dengan meneteskan larutan NaCl pada mikroskop slide yang ditetesi cairan keputihan.

Identifikasi *clue cell* pada preparat basah saline:

- 1) Jumlahnya dihitung berdasarkan jumlah rata-rata dari 5 area pada satu lapang pandang.
- 2) *clue cell* merupakan epitel vagina yang terlepas dimana pada permukaan sel-sel ini terdapat bintik-bintik keabuan, penuh dengan GV dan merupakan gejala patognomonis dari *Bacterial vaginosis*.
- 3) *clue cell* merupakan sel epitel vagina yang ditutupi oleh berbagai bakteri vagina sehingga memberikan gambaran granular dengan batas sel yang kabur karena melekatnya bakteri batang atau kokus yang kecil.
- 4) *clue cell* memiliki tepi yang ireguler dan sitoplasmanya dipenuhi dengan bakteri dan memberikan gambaran granular.



Gambar 9 *Clue cells*

2.1.5 Penanganan Patogenitas *Gardnerella vaginalis*

Pengobatan GV yang sering diberikan adalah Antibiotika Metronidazole atau clindamycin peroral 2 x 300 mg/ hari selama 7 hari atau lokal dan ini merupakan tererapi yang efektif, namun angka kekambuhan juga cukup tinggi. Regimen medikamentosa umum adalah Metronidazol 500 mg 2 dd 1 (setiap 12 jam) selama 7 hari. Komplikasi Meningkatnya kepekaan terhadap IMS termasuk infeksi HIV dan komplikasi pada ibu hamil terutama trimester I. Pemberian golongan ini sering sekali bersifat subyektif yaitu penanganan keluhan keputihan yang sering dikeluhkan oleh pasien dan tanpa pewarnaan gram pada sekret vagina.

2.1.6 Pemeriksaan Bakterial Load

Bakterial load adalah kuantitas bakteri yang dapat diukur dalam suatu objek, organisme, atau kompartemen organisme. Kurang dari 30 koloni tidak dapat diterima karena alasan statistik (terlalu sedikit mungkin tidak mewakili sampel), dan lebih dari 300 koloni di piring cenderung menghasilkan koloni yang terlalu dekat satu sama lain dibedakan sebagai

unit pembentuk koloni yang berbeda (CFU). Banyak prosedur dalam biologi dan kedokteran mengharuskan sel dihitung. Pada hampir semua kesempatan, yang dihitung sebenarnya adalah konsentrasi sel (misalnya: 5.000 sel per mililiter). Dalam dunia kedokteran, konsentrasi berbagai sel darah, seperti sel darah merah atau sel darah putih, dapat memberikan informasi penting mengenai kesehatan seseorang. Demikian pula, konsentrasi bakteri, virus, dan patogen lain dalam darah atau cairan tubuh dapat mengungkapkan informasi tentang perkembangan penyakit infeksi dan tentang bagaimana sistem kekebalan seseorang berhubungan dengan infeksi. Mengetahui konsentrasi sel adalah penting dalam percobaan biologi molekuler untuk menyesuaikan jumlah reagen dan bahan kimia yang diterapkan pada percobaan. Pemahaman tentang satuan dalam menghitung sel mikroba khususnya sel bakteri adalah sangat penting. Perhitungan sel bakteri pada cawan dapat digunakan satuan CFU/ml atau mg. CFU singkatan dari Colony Forming Unit yang artinya unit-unit atau satuan pembentuk koloni.

Unit pembentuk koloni (CFU, cfu, Cfu) adalah unit yang digunakan untuk memperkirakan jumlah bakteri yang hidup atau sel jamur dalam sampel. Menghitung dengan unit pembentuk koloni membutuhkan pembiakan mikroba dan hanya menghitung sel yang layak, berbeda dengan pemeriksaan mikroskopik yang menghitung semua sel, hidup atau mati. Tampilan visual dari koloni dalam kultur sel membutuhkan pertumbuhan yang signifikan, dan ketika menghitung koloni tidak pasti

apakah koloni muncul dari satu sel atau sekelompok sel. Asumsinya adalah masing-masing sel bakteri terpisah dari yang lain dan akan berkembang menjadi satu koloni diskrit (CFU). Dengan demikian, jumlah koloni memberikan jumlah bakteri yang dapat tumbuh di bawah kondisi inkubasi yang digunakan. Serangkaian pengenceran yang luas (misalnya, 10^{-4} hingga 10^{-10}) biasanya dilapisikarena jumlah bakteri yang tepat biasanya tidak diketahui. Akurasi yang lebih besar dicapai oleh plating duplikat atau rangkap tiga dari masing-masing pengenceran.

Metode penghitungan langsung termasuk hitungan mikroskopis menggunakan hemositometer atau ruang penghitungan. Mengukur jumlah sel menyelaraskan volume kultur sel pada cawan petri dengan media pertumbuhan, yang juga dikenal sebagai pelat bergaris. Jika sel-sel didistribusikan di piring dengan benar, secara umum dapat diasumsikan bahwa setiap sel akan menimbulkan satu koloni. Koloni kemudian dapat dihitung berdasarkan volume yang diketahui tersebar di piring, konsentrasi sel dapat dihitung. Jumlah koloni bakteri yang terbuat dari pelapisan bakteri secara plating berguna untuk memperkirakan kekuatan infeksi bakteri.

2.2 Tinjauan Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC)

Andaliman merupakan genus *Zanthoxylum* dan merupakan genus yang belum pernah diteliti sebagai immunostimulan dan antibakteri saluran genitalia. Secara tradisional buah *Zanthoxylum* memiliki beberapa

aktivitas biologis seperti larvasida, anti inflamasi, analgesik, antioksidan, antibiotik, hepatoprotektif, antiplasmodial, sitotoksik, antiproliferatif, antelmintik, antivirus, antikonvulsan dan antijamur (Negi et al. 2011); (Gupta & Mandi 2013);(Waheed et al. 2011).Secara tradisional, buah digunakan sebagai makanan untuk mengobati pencernaan, mengobati asma dan bronkitis, menghilangkan rasa sakit, mengobati penyakit jantung, penyakit mulut, gigi dan tenggorokan, juga untuk mengatasi diare.Kulit akar dan daun digunakan untuk menyembuhkan sakit perut, sakit gigi, batuk, dan penyakit kelamin, rematik dan sakit pinggang(Negi et al. 2011).

Andaliman dikenal dengan jenis *Zanthoxylum acanthopodium* DC tanaman yang tumbuh di ketinggian Danau Toba salah satunya di Desa Buttumalasang Sumatera Utara – Indonesia. Secara empirik buah andaliman digunakan sebagai rempah makanan tradisional masyarakat Sumatera Utara diantaranya masakan “naniura” yaitu berbahan baku ikan yang diolah hanya menggunakan andaliman dan asam selama 24 jam dan juga masakan“naniarsik” (Hasairin 2014) serta untuk mengobati pencernaan, asma dan bronkitis, penyakit mulut, gigi dan tenggorokan, luka, kudis serta untuk mengatasi diare (Devi, Rao & Bidalia 2015); (Devi, Rao, Bidalia, et al. 2015). Andaliman adalah tanaman perdu dan memiliki klasifikasi menurut Hsuan Keng (1978) dalam (Wijaya 1999):

Dunia	: <i>Plantae</i>	Ordo	: Geraniales
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>	Famili	: <i>Rutaceae</i>

Sub divisi : *Angiospermae* Marga : *Zanthoxylum*
Kelas : *Dicotyledoneae*
Jenis : *Zanthoxylum acanthopodium DC*

Tanaman andaliman terdiri dari daun dan buah. Buah Andaliman banyak digunakan sebagai rempah, dikenal dengan sebutan “intir-intir (Simalungun), Andaliman (Toba dan Mandailing), Syarnyar (Tapanuli Selatan), Tuba (Karo), nama asing (*Sichuan pepper* atau *Indonesian lemon pepper*). Tanaman ini banyak ditemukan di daerah Sumatera Utara dan merupakan rempah terbanyak hingga dikenal sebagai “merica batak” karena bentuknya mirip dengan merica. Di dunia, tanaman Andaliman tersebar antara lain di daerah Himalaya subtropis, India utara, Nepal, Pakistan Timur, Myanmar, Tibet, Thailand, dan China (Wijaya 1999).

Tanaman Andaliman dideskripsikan sebagai berikut: termasuk dalam family Rutacea (keluarga jeruk-jerukan), tanaman semak, pohon kecil dengan percabangan yang banyak dan rendah, setiap cabang (batang dan ranting) ditumbuhi duri. Daun tersebar, bertangkai, majemuk menyirip beranak daun gasal, panjang 5-20 cm dan lebar 3-15 cm, terdapat kelenjar minyak. Bunga majemuk terbatas, anak payung menggarpu majemuk, kecil-kecil; dasar bunga rata atau bentuk kerucut; kelopak 5-7 bebas, panjang 1-2 cm, warna kuning pucat; berkelamin dua, benang sari 5-6 duduk pada dasar bunga, kepala sari kemerahan, putik 3-4, bakal buah apokarp, bakal buah menumpang. Buah berbentuk bulat,

diameter 2-3 mm, muda hijau, tua merah, tiap buah satu biji, kulit keras, warna hitam berkilat(Wijaya 1999); (Siregar 2012); (Siregar 2003).



Gambar 10. Struktur Pohon, Cabang, dan Daun Andaliman



Sumber: Lenny Irmawaty, 2017

Gambar 11. Struktur Cabang dan ranting yang berduri, Bunga, dan buah Andaliman



Sumber: Lenny Irmawaty, 2017

Gambar 12. Profil buah andaliman segar setelah dipanen dan andaliman kering

2.2.1 Kandungan Kimia

Spesies dari *Zanthoxylum* umumnya mempunyai rasa pedas dan getir yang makin menyengat bila buah telah matang sempurna. Sebagian besar komponen volatil dari genus *Zanthoxylumacanthopodium* adalah terpenoid dan komponen yang paling banyak dalam minyak atsiri adalah geranil asetat (35%), sedangkan komponen lainnya adalah senyawa limonen, sitronelal, dan linalol.

Tabel 2.1
Komponen Minyak Buah Andaliman Segar dan Kering Angin
dengan Teknik Kromatografi Gas

Komponen	Buah Segar (%)	Buah Kering Angin (%)
Geranil asetat	30,15	33,44
Sitronelal	17,29	15,50
Geraniol	12,70	14,75
Geranial	9,35	11,50
Mirsen	8,20	4,15
Linalool	7,10	7,28
Limonen	5,45	2,26

Sumber: Sintha Suhirman dan Ma'mun (2007)

Komponen volatil dalam aroma buah andaliman telah dikarakterisasi oleh Wijaya, Hadiprodjo, dan Apriyantono (2001). Berdasarkan hasil identifikasi minyak atsiri dalam andaliman

dengan GC-MS terdeteksi sebanyak 24 komponen volatil dengan mayoritas terdiri dari monoterpen teroksigenasi. Sitronelal adalah komponen kunci aroma andaliman yang intensitas aromanya paling tinggi. Sitronelal memberikan aroma sitrus, kuat, hangat. Limonen yang juga salah satu komponen kunci aroma andaliman memberikan aroma kulit jeruk dan manis. Komponen lainnya pembawa aroma pada andaliman meliputi linalol, geraniol, geranial, dan geranil asetat. Senyawa glikosida flavon baru berhasil diisolasi dari buah andaliman yang tumbuh di India. Senyawa 7-O- α -D-glukosil-3,8-dihidroksi-2-(3-hidroksi-4-metoksifenil)-5-metoksi-4H benzopiran-4-n diperoleh dari ekstrak metanol serbuk kering buah andaliman dan merupakan flavon yang pertama kali dilaporkan dari genus *Zanthoxylum*.

Fitokimia. Senyawa fitokimia merupakan zat atau senyawa kimia metabolit sekunder dari tiap tanaman. Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui secara kualitatif adanya golongan senyawa aktif dalam tumbuhan yang diharapkan dapat berperan sebagai senyawa antibakteri. Senyawa metabolit sekunder merupakan senyawa kimia yang umumnya mempunyai kemampuan bioaktivitas dan berfungsi sebagai pelindung tumbuhan tersebut dari gangguan hama penyakit untuk tumbuhan itu sendiri atau lingkungannya. Senyawa-senyawa kimia yang merupakan hasil metabolisme sekunder pada Andaliman dapat diklasifikasikan dalam beberapa golongan senyawa bahan alam yaitu steroid, terpenoid, dan fenolik (tanin dan flavanoid).

1. Steroid

Steroid adalah senyawa organik lemak sterol tidak terhidrolisis yang dapat dihasilkan dari reaksi penurunan dari terpena atau skualena. Steroid merupakan kelompok senyawa yang penting dengan struktur dasar sterana jenuh.

2. Terpenoid

Terpenoid merupakan komponen-komponen tumbuhan yang mempunyai bau dan dapat diisolasi dari bahan nabati dengan penyulingan yang disebut minyak atsiri. Minyak atsiri yang berasal dari bunga pada awalnya dikenal dari penentuan struktur secara sederhana, yaitu dengan perbandingan atom hidrogen dan atom karbon dari senyawa terpenoid yaitu 8:5 dan dengan perbandingan tersebut dapat dikatakan bahwa senyawa tersebut adalah golongan terpenoid.

Minyak atsiri bukanlah senyawa murni akan tetapi merupakan campuran senyawa organik yang kadang kala terdiri dari lebih besar dari 25 senyawa atau komponen yang berlainan. Sebagian besar komponen minyak atsiri adalah senyawa yang hanya mengandung karbon, dan hidrogen atau karbon, hidrogen dan oksigen yang tidak bersifat aromatik yang secara umum disebut terpenoid.

Fraksi yang paling mudah menguap biasanya terdiri dari golongan terpenoid yang mengandung 10 atom karbon. Fraksi yang mempunyai titik didih lebih tinggi terdiri dari terpenoid yang mengandung 15 atom

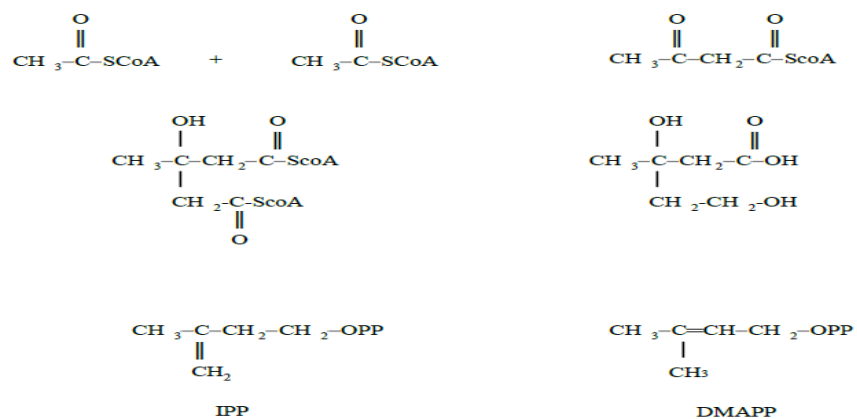
karbon. Sebagian besar terpenoid mempunyai kerangka karbon yang dibangun oleh dua atau lebih unit C-5 yang disebut isopren. Klasifikasi terpenoid ditentukan dari unit isopren atau unit C-5 penyusun senyawa tersebut. Terpenoid merupakan bentuk senyawa dengan keragaman struktur yang besar dalam produk alami yang diturunkan dari unit isoprena (C₅) yang bergandengan dalam model kepala ke ekor (head-to-tail), sedangkan unit isoprena diturunkan dari metabolisme asam asetat oleh jalur asam mevalonat (*mevalonic acid* : MVA). Secara umum biosintesa dari terpenoid terjadi dengan 3 reaksi dasar yaitu:

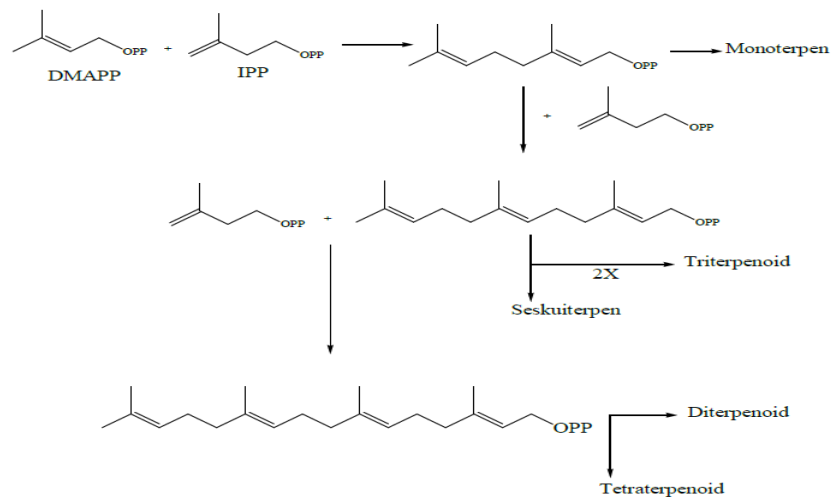
- 1) Pembentukan isopren aktif berasal dari asam asetat melalui asam mevalonat.
- 2) Penggabungan kepala dan ekor dua unit isopren akan membentuk mono-, seskui-, di-, sester-, dan poli-terpenoid.
- 3) Penggabungan ekor dan ekor dari unit C-15 atau C-20 menghasilkan triterpenoid dan steroid.

Mekanisme dari tahap-tahap reaksi biosintesa terpenoid adalah asam asetat setelah diaktifkan oleh koenzim A melakukan kondensasi jenis Claisen menghasilkan asam asetoasetat. Senyawa yang dihasilkan ini dengan asetil koenzim A melakukan kondensasi jenis aldol menghasilkan rantai karbon bercabang sebagaimana ditemukan pada asam mevalinat. reaksi-reaksi berikutnya adalah fosforilasi, eliminasi asam fosfat dan dekarboksilasi menghasilkan Isopentenil pirofosfat (IPP) yang selanjutnya berisomerisasi menjadi Dimetil alil pirofosfat

(DMAPP) oleh enzim isomerase. IPP sebagai unit isopren aktif bergabung secara kepala ke ekor dengan DMAPP dan penggabungan ini merupakan langkah pertama dari polimerisasi isopren untuk menghasilkan terpenoid. Penggabungan ini terjadi karena serangan elektron dari ikatan rangkap IPP terhadap atom karbon dari DMAPP yang kekurangan elektron diikuti oleh penyingkiran ion pirofosfat yang menghasilkan Geranyl pirofosfat (GPP) yaitu senyawa antara bagi semua senyawa monoterpenoid.

Penggabungan selanjutnya antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme yang sama menghasilkan Farnesil pirofosfat (FPP) yang merupakan senyawa antara bagi semua senyawa seskuiterpenoid. Senyawa diterpenoid diturunkan dari Geranyl-geranyl Pirofosfat (GGPP) yang berasal dari kondensasi antara satu unit IPP dan GPP dengan mekanisme yang sama.





Gambar 14 Mekanisme Biosintesa Senyawa Terpenoid

Berdasarkan mekanisme tersebut maka senyawa terpenoid dapat dikelompokkan sebagai berikut :

Tabel 2.2
Jenis Senyawa Terpenoid

No	Jenis Senyawa	Jumlah Atom Karbon	Sumber
1	Monoterpenoid	10	Minyak atsiri
2	Sesquiterpenoid	15	Minyak atsiri
3	Diterpenoid	20	Resin pinus
4	Triterpenoid	30	Damar
5	Tetraterpenoid	40	Zat warna karoten
6	Politerpenoid	> 40	Karet alam

3. Fenolik

Fenolik merupakan senyawa yang mengandung fenol (senyawa turunan fenol) yang secara kimiawi telah diubah untuk mengurangi kemampuannya dalam mengiritasi kulit dan meningkatkan aktivitas antibakterinya. Aktivitas antimikroba senyawa fenolik adalah dengan

merusak lipid pada membran plasma mikroorganisme sehingga menyebabkan isi sel keluar .

2.2.2 Aktivitas Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC)

Pemanfaatan Andaliman tidak lagi hanya sekedar bumbu masakan tradisional dan sebagai pengawet pangan namun telah diperhitungkan sebagai obat dan suplemen serta pestisida nabati. Andaliman telah diketahui mengandung senyawa aromatic dengan rasa pedas dan getir yang khas serta hangat menjadi sumber senyawa aromatic dan minyak essensial yang memiliki aktivitas antimikroba (antijamur, antibakteri) anti serangga, antioksidan, dan antitumor (Siregar 2012). Beberapa penelitian telah membuktikan efek terpenoid andaliman sebagai antioksidan dan antimikrobia (Wijaya 1999); (Parhusip, A., Yasn, S., Elisabeth 2003); (Parhusip 2004a); (Parhusip 2004b); (Jn 2005); (Parhusip, Adolf, Betty Sri Laksmi 2005); (Parhusip 2006) (Miftakhurohmah., Suhirman, S. 2009). Minyak atsiri daun andaliman menghambat pertumbuhan jamur *Botryodiplodia theobromae* dan *Colletotrichum gloeosporioies* (Devi, Rao & Bidalia 2015); (Babu et al. 2007). Sebagai antioksidan: aktivitas antioksidan ekstrak buah andaliman dibuktikan stabil terhadap berbagai kondisi suhu dan pH (Tensiska et al. 2003); (Gultom 2011); (Kristanty & Im 2012); (Kristanty & Suriawati 2014); (Wijaya et al. 2001); Aktivitas antiradikal ekstrak etanol buah andaliman dengan konsentrasi 200 ppm menunjukkan daya inhibisi sebesar 61,81% (Suryanto et al. 2004); juga

mempunyai efek immunostimulan: Ekstrak buah andaliman dapat meningkatkan ketahanan sel terhadap toksisitas paraquat yang diberikan dalam kultur sel dan mampu meningkatkan jumlah sel limfosit hidup dan menurunkan jumlah radikal bebas dengan cukup nyata (Wijaya 1999); (Widiastuti 2000), Aktivitas ekstrak etanol buah andaliman sebagai antiinflamasi dimana ekstrak etanol buah andaliman mampu menghambat *Tumor Necrosis Factor*, *Interleukin-6*, dan siklooksigenase yang berperan penting dalam proses inflamasi (Yanti et al. 2011), antidiabetikum (Babu et al. 2007); (Gultom 2011), dan mempunyai efek kemoterapi untuk kanker payudara (Masyithah et al. 2015); citotoxic sel kanker payudara (Kristanty & Suriawati 2014). Uji efek perlakuan ekstrak buah andaliman terhadap fertilitas dan perkembangan embrio mencit yang menunjukkan ekstrak buah andaliman bersifat antifertil (Sabri 2007); (Sarah & Sabri 2012), dan cardioprotektif (Sihotang et al. 2016). Menggunakan dosis tinggi pada mencit dapat menyebabkan perubahan histopatologi hati (Prasetiawan E, Sabri E 2012) dan menyebabkan kemunduran pergerakan (Moektiwardoyo et al. 2014).

1. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Buah Andaliman

Aktivitas antimikroba suatu senyawa kimia ditentukan oleh konsentrasi dan sifat dari bahan yang digunakan. Umumnya hampir semua senyawa kimia pada konsentrasi yang sangat tinggi dapat bersifat racun. Zat antimikroba melakukan aktivitasnya melalui beberapa mekanisme yaitu:

- 1) Mengganggu sintesis dinding sel

Zat antibakteri mengganggu sintesis dinding sel bakteri sehingga dinding sel yang terbentuk menjadi kurang sempurna dan tidak tahan terhadap tekanan osmotis dan menyebabkan pecahnya sel.

2) Mengganggu sintesis membran sel

Zat antibakteri dapat mengganggu sintesis molekul lipoprotein membran sel bakteri sehingga membran menjadi lebih permeabel yang menyebabkan keluarnya zat-zat penting dari sel.

3) Mengganggu sintesis protein sel

Zat antibakteri dapat berikatan dengan sub unit ribosom bakteri, sehingga menghambat sintesis asam-asam amino dan menghasilkan protein yang inaktif.

4) Mengganggu sintesis asam nukleat

5) Antagonisme saingan

Perkembangbiakan mikroba dapat diamati secara langsung dan mikroba disebut mati jika tidak dapat berkebang biak. Hal ini merupakan salah satu aktivitas anti mikroba yang dapat diamati.

Bakteri merupakan mikroba prokariotik uniseluler, berkembang biak secara aseksual dengan pembelahan sel. Semua bakteri memiliki struktur sel yang relatif sederhana. Berdasarkan komposisi dan struktur dinding sel, maka bakteri dibagi ke dalam dua golongan yaitu bakteri gram positif dan bakteri gram negatif. Bakteri gram positif memiliki dinding sel yang terdiri atas lapisan peptidoglikan yang tebal dan asam teikoat yang mengandung alkohol (gliserol atau ribitol). Ada dua asam teikoat, yaitu

asam lipoteikoat yang merentang di lapisan peptidoglikon dan terikat pada membran plasma, dan asam teikoat dinding yang terikat pada lapisan peptidoglikon. Sedangkan dinding sel bakteri gram negatif mengandung satu atau beberapa lapis peptidoglikon dan membran luar (*outer membrane*). Peptidoglikon terikat pada membran luar dan periplasma terdapat diantara membran plasma dan membran luar.

Senyawa antibakteri yang terkandung dalam metabolit skunder bekerja menghambat salah satu langkah dalam biosintesis peptidoglikon dan menyebabkan dinding sel bakteri yang tumbuh menjadi lemah sehingga sel akan mengalami lisis. Komponen sitronella dan geraniol dikenal bersifat antijamur dan antibakteri (Devi, Rao & Bidalia 2015). Ekstrak buah Andaliman mampu menghambat pertumbuhan berbagai mikroba yang bersifat patogen dan merusak bahan pangan seperti *Eschericia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, dan *Pseudomonas fluorescens*, dan *Aspergillus flavus* (Miftakhurohmah., Suhirman, S. 2009)

Tabel 2.3
Aktivitas Antimikroba Serbuk Buah Andaliman

Mikroba	Serbuk buah andaliman 4 % (w/v)		Serbuk buah andaliman 5 % (w/v)		Kontrol positif (amoxilin) 2 % (w/v)	
	mm	mm/g bhn	Mm	mm/g bhn	mm	mm/g bhn
E. coli	1,20	500,00	4,00	1333,30	34,00	28333,30
S. typhimurium	2,70	1125,00	7,90	2633,30	37,80	31500,00
B. cereus	2,30	958,30	3,50	1166,70	20,40	17000,00
S. aureus	0,00	0,00	2,00	666,70	50,00	41666,70
B. stearothermophilus	0,00	0,00	0,00	0,00	30,40	25333,30
P. fluorescens	1,10	458,30	3,50	1166,70	34,00	28333,30

Sumber: Ardiansyah (2001)

Keterangan:

- a. Serbuk buah andaliman 4% atau 5% w/v: Konsentrasi serbuk andaliman dalam pelarut 4 % atau 5 % (weight/volume).
- b. Aktivitas antimikroba (mm/g bahan) = $\frac{\text{volume ekstrak} \times \text{d.p. (mm)}}{\text{Bobot total ekstrak (g)} \times \text{volume uji} \times \text{Bobot ekstrak uji (g)} \times \text{Bobot bahan awal (g)}}$
- c. dp (diameter penghambatan) = selisih diameter penghambatan sampel (serbuk andaliman) dengan diameter penghambatan kontrol negatif.

2. Aktivitas Immunostimulan Andaliman

Imunostimulan merupakan senyawa yang dapat meningkatkan respon imun tubuh. Imunostimulan bekerja secara non spesifik dan dapat meningkatkan respon imun spesifik dan non spesifik. Imunostimulan dapat mempengaruhi system komplemen, granulosit, makrofag, limfosit T, dan limfosit B. Imunostimulan diperoleh dari tanaman khususnya golongan terpenoid dan fenolik yang memiliki bobot molekul kecil. Penelitian sebelumnya (Widiastuti 2000) mengungkapkan bahwa aktivitas antioksidan andaliman hasil ekstraksi secara soxhlet lebih tinggi dari a-tokoferol namun masih sedikit lebih rendah dibandingkan BHT, dengan faktor protektif a-tokoferol, andaliman, BHT berturut-turut: 3.99, 4.34 dan 4.73. Pengujian aktivitas immunostimulan secara in vitro dilakukan pada ekstrak soxhlet, maserasi dan ekstrak aquades, yang didasarkan pada konsentrasi dosis perhari yang mungkin dikonsumsi orang.

Pengembangan dilakukan menjadi 5 taraf konsentrasi yaitu 500 mg/L, 1000 mg/L, 4000 mg/L, 8333 mg/L dan 10000 mg/L. Pengujian aktivitas immunostimulan dilakukan dengan pengujian pada sel limfosit yaitu pengukuran aktivitas proliferasi dan jumlah radikal bebas, serta pada makrofag dengan pengukuran produksi radikal bebas. Aktivitas proliferasi limfosit diukur dengan menghitung jumlah sel limfosit yang hidup dan mati menggunakan *tryphan blue* dan hemasitometer setelah dikultur dengan penambahan ekstrak andaliman atau sansho. Jumlah sel yang bertahan hidup tertinggi terdapat pada sampel andaliman yang diperoleh dengan ekstraksi soxhlet (AIB1) pada konsentrasi 4000 mg/L sebanyak 3.63×10^6 sel/ml. Pengukuran jumlah radikal bebas dilakukan dengan metode fluoresens menggunakan spektrofлуorometer dan senyawa dihidrorhodamin 1,2,3 sebagai sumber fluoresens. Sampel andaliman, soxhlet (AIB1) pada konsentrasi 4000 mg/L mampu menurunkan radikal bebas terendah sebesar 71.90 mM yang berbeda nyata ($\alpha 0.05$) dengan kontrol (114.81 mM).

Pengukuran produksi radikal bebas makrofag kecil dilakukan dengan menggunakan metode fluoresens. Sampel yang menghasilkan jumlah radikal bebas tertinggi adalah sampel sansho yang diekstraksi secara maserasi pada konsentrasi 10000 mg/L sebesar 41.97 mM yang lebih tinggi dari LPS (lipopolisakarida) (29.51 mM) dan kontrol (23.66 mM). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa ekstrak andaliman dan sansho dapat menurunkan jumlah radikal bebas pada sel limfosit akibat

serangan paraquat, ekstrak andaliman dan sansho juga mampu meningkatkan produksi radikal bebas makrofag yang digunakan dalam proses fagositosis sehingga dapat dikatakan andaliman dan sansho mempunyai aktivitas antioksidan dan immunostimulan.

Andaliman merupakan bahan alam yang dapat dipergunakan sebagai antibakteri dan immunostimulan. Tanaman andaliman mengandung senyawa metabolit sekunder diproduksi oleh tumbuhan salah satunya untuk mempertahankan diri dari kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan seperti suhu, iklim, maupun gangguan hama dan penyakit tanaman (Lenny 2006). Senyawa metabolit sekunder ini dikelompokkan menjadi beberapa golongan berdasarkan struktur kimianya yaitu alkaloid, flavonoid, steroid, tanin, saponin, antrakuinon dan terpenoid. Dari uji fitokimia yang dilakukan oleh (Tensiska et al. 2003) buah andaliman positif mengandung senyawa flavonoid dan polifenol.

Wijaya (1999) menyatakan buah andaliman mempunyai sifat immunostimulan. Ekstraksi soxhlet buah andaliman konsentrasi 400 ppm dinyatakan mampu meningkatkan jumlah sel limfosit hidup dan menurunkan jumlah radikal bebas dengan nyata. Efek ekstrak andaliman terhadap makrofag mencit mampu meningkatkan produksi radikal bebas yang dihasilkan oleh makrofag. Produksi radikal bebas bersifat bakterisidal oleh makrofag berpengaruh positif terhadap tubuh artinya kemampuan penahanan terhadap mikroorganisme patogen semakin efektif. Leukosit diperlukan untuk pertahanan imunitas seluler dan humoral terhadap zat-

zat asing. Hematopoiesis, pembentukan leukosit dan perkembangan leukosit terus terjadi sejak dalam pertumbuhan janin dan manusia harus produksi $3,7 \times 10^{11}$ leukosit setiap hari untuk pertahanan di ambang tetap. Ekstrak buah andaliman mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *Gardnerella Vaginalis* (GV) yang digunakan untuk memicu peningkatan system imun sehingga GV tidak mengalami peningkatan pertumbuhan pada hewan coba mencit Balb c dengan pemberian ekstrak etanol buah andaliman. GV adalah bakteri pathogen vagina bersifat anaerob fakultatif dan merupakan penyebab utama bakterial vaginosis (BV). Kandungan metabolit sekunder buah andaliman (*zanthoxylum acanthopodium* DC) merupakan senyawa flavonoid seperti halnya pada daun tempuyung yang dapat bekerja terhadap limfokin (interferon γ) yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit melakukan respon fagositosis serta dapat memacu proliferasi limfosit, meningkatkan jumlah sel T dan meningkatkan sekresi IL-2 yaitu salah satu sitokin yang berperan dalam proliferasi sel limfosit (Sukmayadi, 2014).

Limfosit merupakan sel yang paling dominan salah satu sitokin yang berperan dalam proliferasi sel limfosit. Limfosit merupakan sel yang paling dominan dalam organ dan jaringan system imun, jumlahnya 65%-85% dari total limfosit dalam darah. Limfosit dalam tubuh berperan dalam system imun spesifik seluler (sel berperan dalam system imun spesifik seluler (sel T) untuk pertahanan terhadap bakteri yang hidup intraseluler, virus, jamur, parasit, dan termasuk keganasan. Limfosit merupakan bagian

sel darah putih yang sangat banyak terdiri dari sel T dan sel B naif maupun aktif. Ketika antigen dideteksi oleh sel dendritik yaitu sel yang berfungsi untuk mengenali antigen (*antigen presenting cell*), sel T dan sel B naif yang terdapat di sumsum tulang akan masuk ke dalam organ limfoid sekunder seperti kelenjarsel T dan sel B naif yang terdapat di sumsum tulang akan masuk ke dalam organ limfoid sekunder seperti kelenjar getah bening dan limfa lalu teraktifasi oleh antigen tersebut menjadi getah bening dan limfa lalu teraktifasi oleh antigen tersebut menjadi sel efektor dan sel memori, selanjutnya sel aktif bermigrasi ke jaringan sel efektor dan sel memori, selanjutnya sel aktif bermigrasi ke jaringan perifer yang menjadi tempat terjadinya infeksi. Selain itu terdapat pula *null cell* (20%) dari limfosit perifer. *Null cell* merupakan limfosit merupakan limfosit yang tidak memiliki karakter sel T dan sel B serta *cluster of differentiation* atau antibody permukaan namun mempunyai peranan dalam proses pemusnahan sel yang dilakukan oleh antibody. Perkembangan limfosit berlangsung melalui beberapa tahap yaitu fagositosis yang berlangsung (4-20 jam setelah infeksi), kemudian transportasi antigen melalui sel dendritik menuju kelenjar getah bening yang berlangsung dalam 1-8 hari, lalu aktivasi limfosit naif (4-8 hari) selanjutnya diferensiasi limfosit yang berlangsung (3-13 hari) serta limfosit efektor dan memori yang diaktifkan setelah lebih dari 9-10 hari (Bratawidjaja, 2012).

3. Efek Antiinflamasi

Infeksi merupakan keadaan dimana jaringan tubuh terpapar mikroorganisme baik oleh bakteri, virus, jamur maupun parasit. Tubuh yang terinfeksi dalam perjalanannya akan mengalami proses peradangan. Paparan mikroorganisme pada permukaan tubuh akan merangsang tubuh melakukan penolakan terhadap agen infeksius tersebut dan terjadilah tanda-tanda peradangan. Reaksi radang ini merupakan mekanisme pertahanan tubuh agar kerusakan tidak bertambah luas. Antiinflamasi ekstrak buah andaliman sebelumnya diteliti oleh Yanti, dkk (2011) bahwa zanthoxylum acanthopodium DC secara signifikan menghambat biomarker inflamasi Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-6, inducible Nitric Oxyde Synthase (iNOS), Cyclooxygenase (COX)-2 dan Matrix Metalloproteinase (MMP)-9, dalam lipopolysaccharide (LPS)- yang diinduksi makrofag dengan Western blot, gelatin zymography and Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Zanthoxylum acanthopodium DC tidak mempunyai efek toksisitas terhadap makrofag dan ditemukan memblokir ekspresi mRNA (TNF)- α , (IL)-6, iNOS, COX-2, dan MMP-9.

2.3 Sistem Kekebalan Tubuh

2.3.1. Definisi

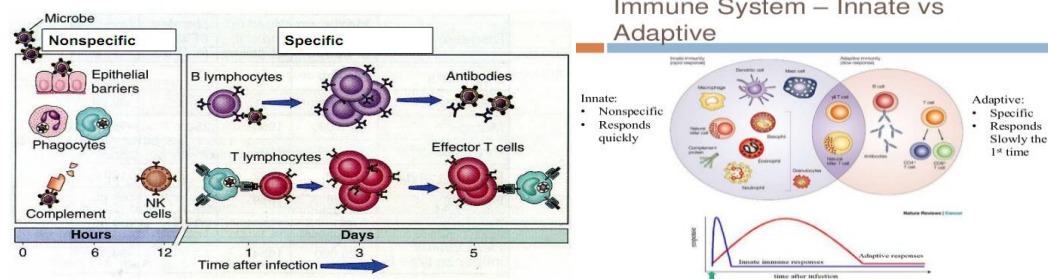
Imunitas adalah sistem pertahanan terhadap suatu penyakit atau serangan infeksi dari mikroorganisme atau substansi asing. Sistem imunitas merupakan gabungan dari sel/molekul/jaringan yang berperanan

dalam pertahanan tubuh terhadap infeksi. Fungsi sistem imunitas diantaranya: (1) menghancurkan mikroorganisme/substansi asing dalam tubuh, (2) menghilangkan sel mati untuk perbaikan jaringan, (3) mengenali dan menghilangkan jaringan abnormal. Respon imunitas merupakan reaksi yang diperlihatkan oleh sel/molekul/bahan lainnya terhadap mikroba.

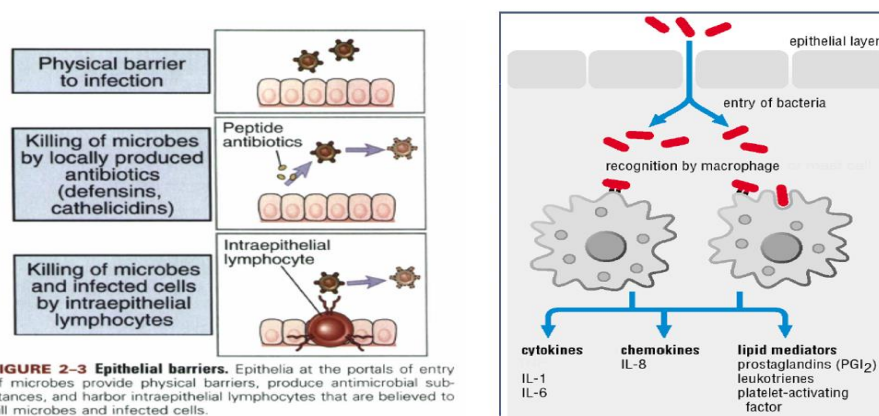
2.3.2 Traktus genitalis wanita

Vagina merupakan pintu masuk traktus genitalis wanita dengan 3 lapisan yaitu lapisan mukosa, muskularis, dan adventisia. Lapisan mukosa berikatan kuat dengan lapisan muskularis. Struktur dan imunologi porsi serviks atau ekto serviks sama dengan vagina. Permukaan lumen vagina dilapisi epitel skuamosa non-keratinisasi dan memproduksi suatu glikoprotein hidrofilik yang disebut glikokaliks (Pudjiati 2010). Proliferasi dan maturasi sel epitelial dipengaruhi oleh regulasi hormonal; disaat kadar estrogen mencapai puncak, ketebalannya maksimum dan sel-selnya mensekresi glikogen yang akan dimetabolisme oleh *Lactobacillus spp* menjadi asam laktat untuk menciptakan pH vagina dalam kondisi asam (pH 3,5-5) yang berfungsi menghambat pertumbuhan mikroorganisme patogen

2.3.3 Sistem imunitas



Gambar 15 Respon Imunitas Innate dan Adaptive



Gambar 16. Komponen pertahanan kulit dan mukosa

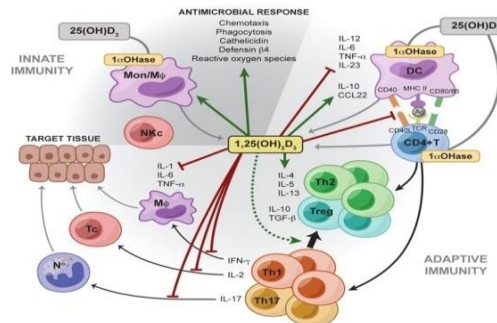
Segala macam mikroorganisme yang menginvasi vertebrata akan berhadapan dengan imunitas *innate* sebagai pertahanan pertama yang terjadi beberapa menit setelah infeksi. Imunitas adaptif akan timbul apabila pertahanan pertama tidak mampu mengeliminasi patogen yang masuk. Mamalia rentan terhadap infeksi patogen. Patogen pada awalnya mengadakan kontak dengan host, selanjutnya menyebabkan infeksi dan sakit pada host. Satu patogen dengan yang lain mempunyai perbedaan struktur yang sangat besar pada molekul permukaan dan cara melakukan infeksi, sehingga diperlukan strategi yang berbeda dalam tubuh host untuk melakukan sistem pertahanan. Garis pertama pertahanan tubuh telah

tersedia dan siap menghalang dan menolak invader setiap saat. Permukaan sel-sel epitel menyebabkan patogen tetap berada di luar dan sulit mengadakan penetrasi.

Secara normal, respon imunitas didapat muncul 5-6 hari setelah paparan antigen. Sel-sel dalam system imunitas yang bertanggung jawab terhadap reaksi dan pelepasan molekul terlarut adalah limfosit (B & T), sel fagosit (sel dendritik, makrofag, neutrofil), dan sel lain seperti basofil dan sel mast. Molekul yang dilepaskan oleh sel-sel ini adalah antibody, sitokin (interleukin dan interferon), komplemen dan berbagai mediator inflamasi.

Imunomodulator adalah suatu cara untuk mengembalikan dan memperbaiki system imun yang fungsinya terganggu atau untuk menekan yang fungsinya berlebihan. Immunostimulasi disebut juga imunopotensiasi adalah cara memperbaiki fungsi system imun dengan menggunakan bahan yang merangsang system tersebut. Biological Response Modifiers (BRMs) adalah bahan-bahan yang dapat merubah meningkatkan respon imun. Immunomodulator pada infeksi bakteri akan menstimuli respon imun dengan cara merangsang produksi antibody, aktivasi, dan proliferasi sel T dan makrofag, dan aktivasi sel NK yang nantinya berfungsi sebagai sel yang dapat melisis sel yang terinfeksi dengan daya toksisitasnya untuk membunuh bakteri di dalamnya.

2.3.4 Protein antimikrobal (Antimicrobial Peptide)



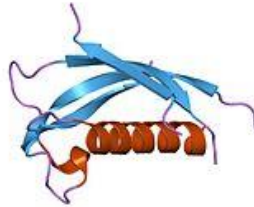
Gambar 17 Respon Antimikrobal

Protein antimikrobal (AMP) disebut juga peptida pertahanan hospes, merupakan komponen aktif pada respon imun bawaan; peptida-peptida tersebut mempunyai aktivitas mikrobisidal spektrum luas yang poten dan kemungkinan dapat dipakai sebagai terapi. AMP mampu membunuh bakteri Gram positif dan Gram negatif (termasuk strain yang resisten terhadap antibiotik konvensional), *envelope virus* dan jamur.

2.3.5 Gen CAMP (Cathelicidin Antimicrobial Peptide)

Peptida antimikrobal yang penting diantaranya katelisinidin. Katelisinidin diekspresikan oleh neutrofil dan berbagai macam epitel, termasuk kulit. Cara kerja katelisinidin yaitu toksisitas secara langsung pada mikroorganisme yang menyebar secara luas dan mengaktifasi berbagai respon leukosit dan tipe sel lainnya yang memicu penghancuran mikroba. Peptida antimikroba terkait Cathelicidin ditemukan pada lisosom makrofag dan leukosit polimorfonuklear (PMN), dan Keratinosit. Cathelicidins

berperan penting dalam pertahanan kekebalan bawaan mamalia melawan infeksi bakteri invasif.



Gambar 18. Cathelicidin AMP

Cathelicidins kecil, kationik, peptida antimikroba yang ditemukan pada manusia dan spesies lainnya, termasuk hewan ternak (sapi, kuda, babi, domba, kambing, ayam, kelinci dan beberapa spesies ikan). Peptida yang diaktifkan secara proteolitik ini adalah bagian dari sistem kekebalan tubuh bawaan dari banyak vertebrata. Peptida ini menunjukkan spektrum aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri, virus dan jamur yang diselimuti. Selain mengerahkan efek antimikroba langsung, katoda juga bisa memicu respons pertahanan spesifik pada inang. Peran mereka dalam berbagai kondisi patofisiologis telah dipelajari pada tikus dan manusia, namun ada sedikit informasi tentang situs dan aktivitas ekspresinya pada ternak(Strzałkowska & Jo 2012)

Satu-satunya gen katelisin yang diekspresi, yaitu CRAMP. Salah satu produk gen CRAMP, yaitu *human cationic antimicrobial peptide-18* (hCAP-18) diekspresikan oleh sel mast, subpopulasi monosit dan limfosit, serta sel epitel vagina, serviks, traktus urinarius, dan epididimis. Studi pada tikus menunjukkan bahwa hCAP berperan penting pada proteksi

terhadap infeksi bakteri dalam traktus urinarius. Komponen keluarga cathelicidin telah ditemukan di manusia, monyet, tikus, kelinci, marmut, panda, babi, sapi, kodok, domba, kambing, ayam, dan kuda. Cathelicidins saat ini diidentifikasi meliputi:

1. Manusia: HCAP-18 / LL-37
2. Rhesus Monyet: RL-37
3. Tikus: kram-1/2, (-cathelicidin terkait Antimicrobial Peptide ^[6])
4. Tikus: rCRAMP
5. Kelinci: CAP-18
6. Guinea Pig: CAP-11
7. Babi: PR-39, Prophenin, pmap-23,36,37
8. Sapi: BMAP-27,28,34 (Bovine Myeloid antimikroba Peptida); Bac5, Bac7
9. Katak: cathelicidin-AL (ditemukan di *Amolops loloensis*)
10. Ayam: Empat cathelicidins, fowlicidins 1,2,3 dan cathelicidin Beta-1

Endogen anti-mikroba peptida LL-37 / HCAP-18 adalah sebuah molekul efektor dari sistem pertahanan tuan rumah bawaan di permukaan tubuh. Selain kegiatan anti-mikroba yang langsung, peptida berinteraksi dengan jenis sel yang berbeda. Sel dendritik (DC) memainkan peran sentral dalam pertahanan tuan rumah mukosa. HCAP-18 adalah satu-satunya anggota manusia dari keluarga antibakteri dan endotoksin mengikat protein yang dikenal sebagai cathelicidins. Domain antibakteri dan endotoksin mengikat berada di asam amino 37 C-terminal dari protein (LL-

37) dan ini diyakini mengeluarkan dari penetral N-terminus oleh protease dari butiran positif peroksidase. Dalam neutrofil manusia, peroksidase butiran negatif positif dan peroksidase dapat dibagi lagi menjadi subset granula yang berbeda dalam kandungan protein dan kemampuan untuk exocytosed. Untuk menentukan lokalisasi HCAP-18, kami melakukan mikroskop resolusi tinggi immuno-elektron dan fraksinasi subselular di Percoll kepadatan gradien. Biosintesis HCAP-18 diselidiki dalam sel terisolasi sumsum tulang manusia. HCAP-18 ditemukan colocalize dan comobilize dengan laktoferin, tapi tidak dengan gelatinase di fraksi subselular. Hal ini dikonfirmasi oleh mikroskop elektron. HCAP-18 disintesis pada tahap yang sama pematangan sel myeloid sebagai laktoferin, dan efisien ditargetkan untuk butiran. Seperti peroksidase negatif granula ini metaloproteinase matriks, kolagenase dan gelatinase, HCAP-18 juga disimpan dalam bentuk yang belum diolah. HCAP-18 adalah protein utama butiran tertentu di mana itu hadir dalam rasio molar yang sama dengan laktoferin.

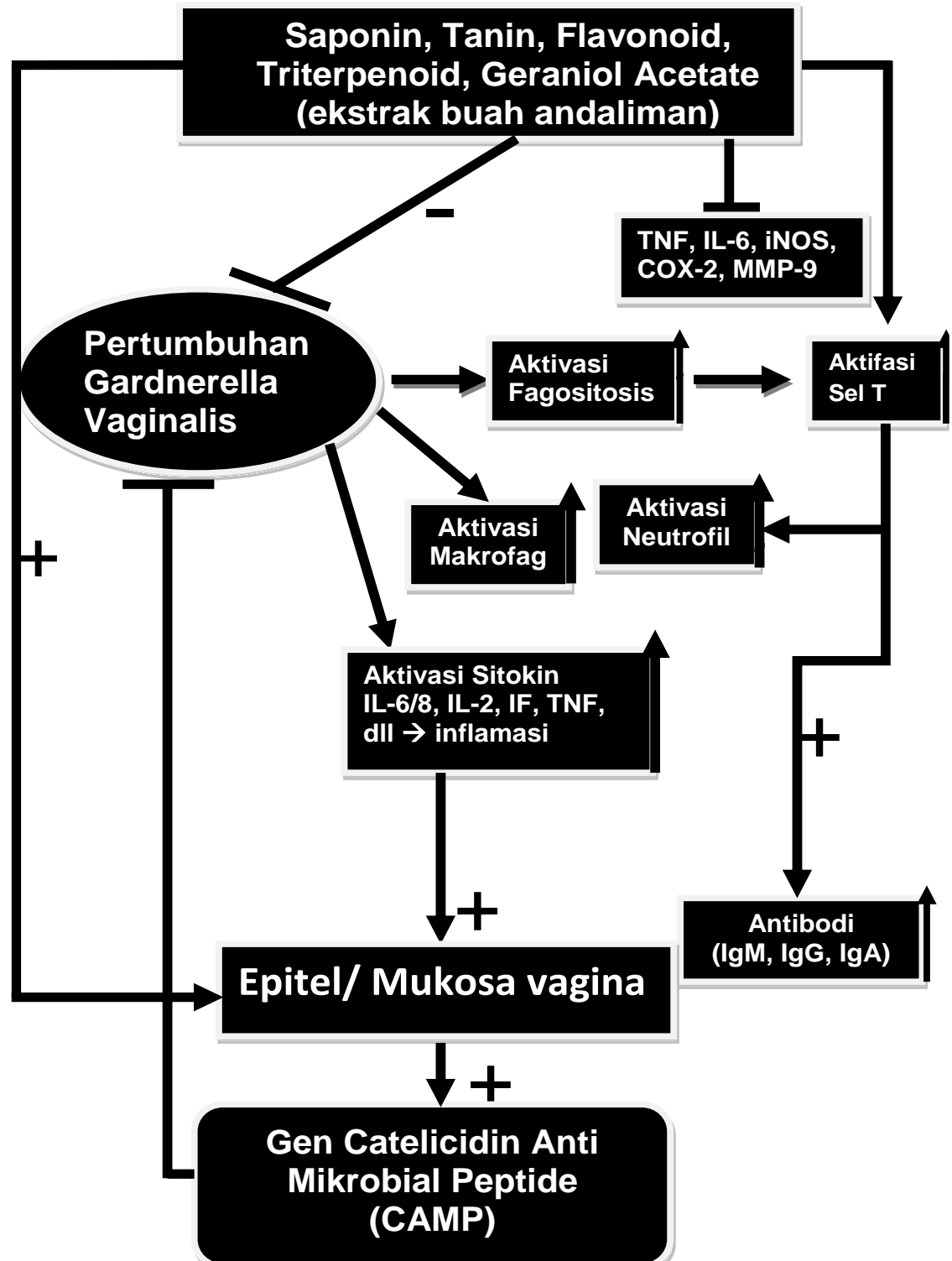
Peptida antimikrobia tidak saja membunuh bakteri, tetapi juga berfungsi sebagai imunomodulator, dan mampu mengubah ekspresi gen hospes; juga mampu menginduksi produksi kemokin dan/atau bertindak sebagai kemokin, menghambat produksi sitokin proinflamasi, dan memodulasi respon sel dendritik dan sel-sel sistem imun adaptif.

Bakteri vaginosis adalah kondisi umum yang terkait dengan peningkatan risiko penyakit menular seksual, termasuk infeksi virus

kekebalan tubuh manusia. Ditemukan bahwa cairan lavage vagina dari wanita dengan vaginosis bakteri kurang pada polipeptida antimikroba dan aktivitas antimikroba. Tidak seperti pada kandidiasis vulvovaginal, atensi kemokin interleukin-8 neutrofil (IL-8) tidak meningkat pada vaginosis bakteri, terhitung pada konsentrasi rendah defensin yang diturunkan dari neutrofil dalam cairan vagina. Dalam budaya organotipik epitel vagina manusia yang mengandung sel dendritik, pengobatan dengan *Lactobacillus jensenii*, penghuni vagina yang khas, menginduksi sintesis mRNA IL-8 dan mRNA β -defensin-2 epitel manusia, namun patogen vaginosis bakteri khas *Gardnerella vaginalis*. imunostimulan normal pada vaginosis bakteri dikaitkan dengan defisiensi faktor bawaan, dan kekurangan ekspresi CAMP dapat mempengaruhi individu terhadap penyakit menular seksual. VLF dari wanita dengan BV kekurangan AMP dan aktivitas antimikroba dibandingkan dengan VLF dari wanita sehat atau wanita dengan VVC. Kekurangan ini bukan hanya karena pengenceran tetapi mencerminkan komposisi yang berubah dengan konsentrasi peptida kationik kecil yang berkurang yang bermigrasi dengan cepat. Analisis kuantitatif menguatkan hasil ini, di mana hampir semua AMP dua sampai empat kali lipat lebih rendah pada cairan BV dibandingkan dengan cairan VVC. AMP vagina berasal dari berbagai jenis sel. Defensins 1 sampai 3 (HNP) berasal dari neutrofil, β -defensin HBD-2 diinduksi oleh peradangan pada sel epitel, dan SLPI sebagian besar disekresikan ke dalam lendir leher rahim. Pengamatan kami terhadap penurunan di ketiga komponen

tersebut menunjukkan bahwa BV dikaitkan dengan penurunan beberapa jalur imun bawaan lokal. Aktivitas antimikroba BV VLF (vaginal lavage fluid) juga jauh berkurang. Berdasarkan penelitian sebelumnya, aktivitas antimikroba cairan vagina bergantung terutama pada kandungan asam laktatnya dengan kontribusi lebih kecil dari AMP, dan kedua faktor ini berkurang pada BV. Mengurangi konsentrasi polipeptida kationik, termasuk SLPI, juga diharapkan dapat menurunkan ketahanan terhadap penularan HIV (Valore et al. 2006b)

2.4 Kerangka Teori

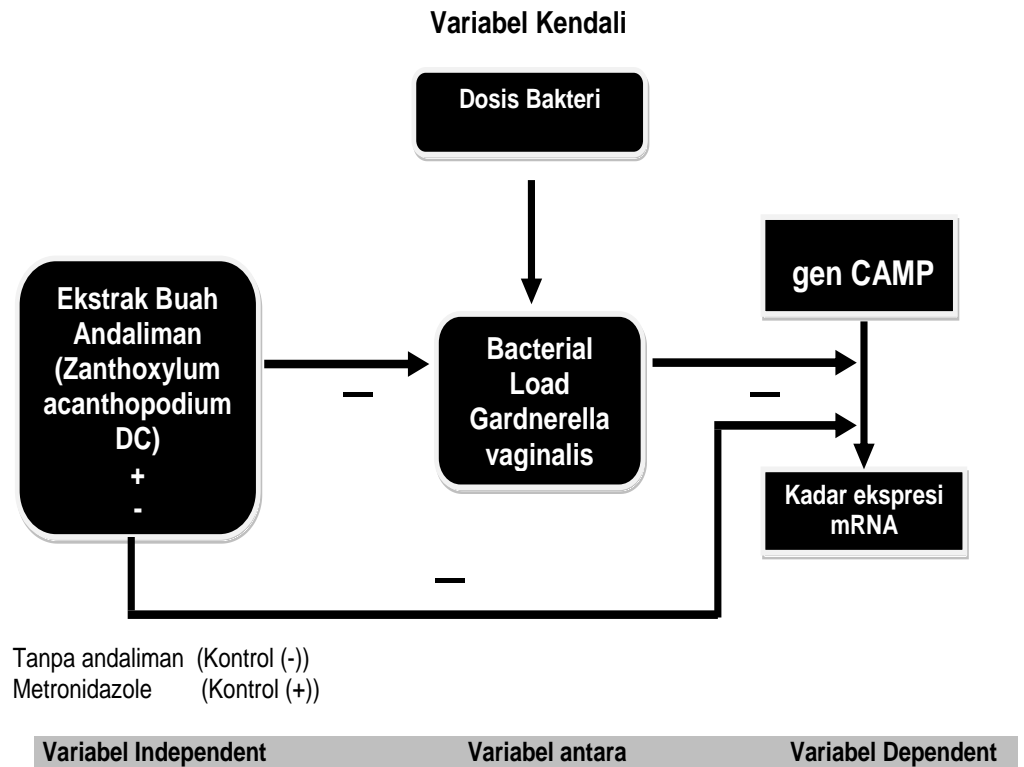


Gambar 19. Kerangka Teori

Imunitas bawaan dipicu setelah invasi mikroorganisme (Cauci et al. 1998).

2.3 Kerangka

Konsep



Gambar 20. Kerangka Konsep

2.4 Hipotesis

1. Pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 dan 7 hari sebelum induksi *Gardnerella vaginalis* dapat menekan ekspresi mRNA gen CAMP.
2. Pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 dan 7 hari sebelum induksi *Gardnerella vaginalis* dapat menekan bacterial load.

3. Pemberian ekstrak buah andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 7 hari setelah induksi *Gardnerella vaginalis* dapat menekan bakterial load.
4. Pemberian ekstrak buah andaliman selama 7 hari setelah induksi *Gardnerella vaginalis* dapat menekan ekspresi mRNA gen CAMP.
5. Terdapat korelasi antara perubahan bakterial load dengan perubahan ekspresi mRNA setelah terapi Andaliman.

2.5 Definisi Operasional

1. Kelompok preventif adalah kelompok perlakuan ekstrak buah andaliman sebelum induksi GV.
2. Kelompok kuratif adalah kelompok perlakuan ekstrak buah andaliman sesudah induksi GV.
3. Kontrol negatif adalah kelompok penelitian tidak mendapat perlakuan pengobatan ataupun ekstrak buah andaliman dan hanya mendapat CMC 1%.
4. Kontrol positif adalah kelompok penelitian yang mendapat perlakuan pengobatan standar *Gardnerella vaginalis* yaitu metronidazole.
5. Pemberian andaliman sebelum induksi *Gardnerella vaginalis* adalah perlakuan pemberian ekstrak andaliman dosis 2% pada dua kelompok yang berbeda yaitu selama 5 hari dan 7 hari, kemudian dilakukan inokulasi bakteri GV transvaginal 3×10^{-4} dosis 10 μ l hari

ke-6 untuk kelompok andaliman 5 hari dan hari ke-8 untuk kelompok andaliman 7 hari.

6. Pemberian andaliman sesudah induksi *Gardnerella vaginalis* adalah melakukan inokulasi bakteri GV transvaginal 3×10^{-4} dosis 10 μ l di hari ke-0, kemudian perlakuan pemberian ekstrak andaliman hari ke-1 sampai dengan hari ke-7.
7. mRNA gen CAMP adalah melihat ekspresi mRNA gen catelicidin antimikrobal peptide yaitu gen penanda adanya bakteri patogen dan merubah ekosistem vagina. Alat ukur real-time PCR menggunakan sampel darah ekor.
8. Real-time PCR
Real time PCR adalah Real Time-RT PCR dimana PCR dilakukan secara Real Time menggunakan enzim *Reverse Transcriptase* secara langsung pada waktu yang bersamaan. pada real-time PCR tahap deteksi dan tahap penggandaan materi genetik dilakukan secara bersamaan (simultan).
9. Bakterial load
Bakterial load adalah menghitung bakteri secara langsung dan tidak langsung diukur dengan cara mikroskopik dan kultur.
10. Mikroskopik adalah menghitung SEL bakteri dengan ciri basil kecil secara langsung untuk menentukan jumlah sel bakteri baik yang mati maupun yang hidup menggunakan apusan gram dilihat di bawah mikroskop pembesaran 1000x dan menghitung sel bakteri

morfotipe *Gardnerella vaginalis* per 10 lapangan pandang pembacaan blinding oleh 3 orang di waktu yang bersamaan.

11. Kultur adalah menghitung bakteri secara tidak langsung dengan cara ditumbuhkan dalam medium melalui pengenceran 10^{-3} dan menghitung koloni yang tumbuh pada medium dilakukan pembacaan blinding oleh 3 orang di waktu yang bersamaan.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis dan Desain Penelitian

Jenis penelitian eksperimental laboratorik menggunakan desain *Pre-Post Test Control Group Design* yaitu menganalisaefek eksperimen sebelum dan sesudah perlakuan secara *invivo*.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Animal, Laboratorium Mikrobiologi, serta Laboratorium Biomolekuler dan Imunologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin Makassar, sedangkan proses ekstraksi dan uji fitokimia buah Andaliman dilaksanakan di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO), Jln.Tentara Pelajar, No.3A Kota Bogor, Jawa Barat dan Laboratorium Labkesda DKI Jakarta. Penelitian berlangsung sejak bulan November 2016 s.d Juni 2017.

3.3 Subjek Penelitian

Subjek menggunakan hewan coba mencit putih (*Mus musculus*) strain Balb c untuk uji preliminary berasal dari Laboratorium Animal Biofarma Surabaya dan untuk penelitian berasal dari PT.INDOANILAB (Fasilitas Pengembangbiakan Hewan Laboratorium) Bogor. Syarat hewan coba yaitu: Balb c betina, sehat, dewasa (umur 8-12 minggu), berat badan

18-20gram, nullipara, tidak sedang bunting, dan vagina tidak sedang terinfeksi. Mencit strain ini digunakan dalam penelitian dikarenakan mencit mewakili hewan dari kelas mamalia, sistem reproduksi menyerupai manusia, vagina mencit dewasa dilapisi sel epitelial dan telah mensekresi mucus (Gilbert et al. 2013),(Hoffmann et al. 2012), (Hawk et al. n.d.2005).

Subjek berjumlah 24 ekor dan dibagi ke dalam enam kelompok perlakuan, masing-masing kelompok terdiri atas 4 ekor. Perhitungan jumlah subjek untuk masing-masing kelompok menggunakan rumus feeder yaitu:

$$(t-1) (n-1) \geq 15$$

Ket: t = kelompok perlakuan; n = jumlah sampel per kelompok perlakuan

$$\rightarrow (t-1) (n-1) \geq 15$$

$$\rightarrow (6-1) (n-1) \geq 15$$

$$\rightarrow 5(n-1) \geq 15$$

$$\rightarrow 5n-5 \geq 15$$

$$\rightarrow 5n \geq 20$$

$$\rightarrow n \geq 4$$

Jumlah subjek per kandang adalah 4 ekor sebagai ulangan dan total perlakuan adalah 24 ekor.

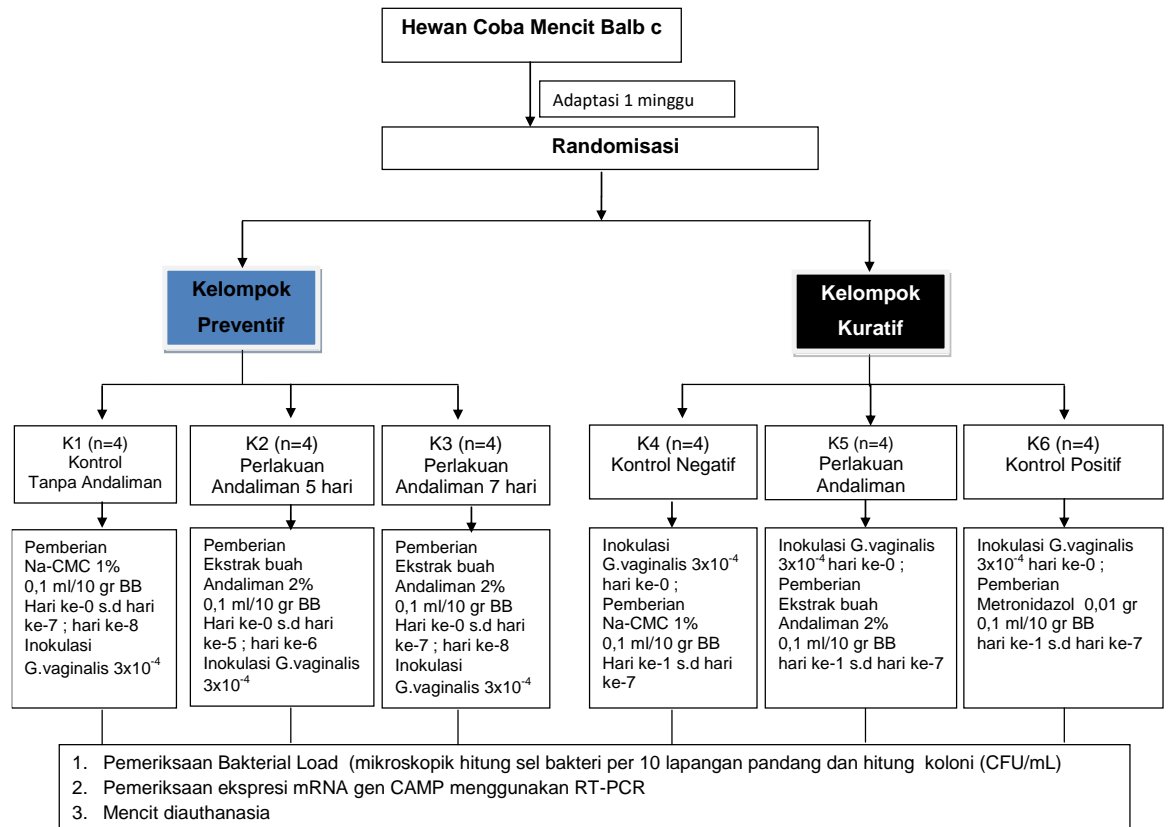
3.4 Penatalaksanaan Penelitian Pada Hewan Coba

Hewan coba diadaptasikan di Laboratorium animal FK UNHAS selama tujuh hari dalam kandang standar dan diberi pakan yang sesuai standar laboratorium secara tanpa batas (*ad libitum*). Setelah adaptasi, dilakukan penimbangan untuk mendapatkan rata-rata bobot awalnya kemudian dikelompokkan secara acak (random) ke dalam enam kandang (6 kelompok) masing-masing kelompok terdiri dari empat ulangan (4 ekor) dengan berat badan tidak lebih 20%. Pada setiap kelompok diberi penandaan hewan coba menggunakan larutan asam pikrat 10% dalam alkohol pada kepala, punggung, ekor, dan kaki kanan depan. Perlakuan hewan coba adalah diinfeksi bakteri GV dengan cara inokulasi intra vaginal dan pemberian CMC+Aquabidest, CMC+ekstrak buah Andaliman, dan CMC+Metronidazole.

Perlakuan terdiri atas tiga kelompok preventif yaitu K1 tanpa Andaliman (diberikan CMC+Aquabidest selama 7 hari kemudian diinfeksi GV), K2 perlakuan Andaliman 5 hari (diberikan ekstrak buah Andaliman selama 5 hari kemudian diinfeksi GV), dan K3 perlakuan Andaliman 7 hari (diberikan ekstrak buah Andaliman selama 7 hari kemudian diinfeksi GV); serta tiga kelompok kuratif yaitu: K1 kontrol negatif (diinfeksi GV kemudian diberikan CMC+Aquabidest selama 7 hari), K2 perlakuan Andaliman (diinfeksi GV kemudian diberikan ekstrak buah Andaliman selama 7 hari), dan K3 kontrol positif (diinfeksi GV kemudian diberikan metronidazole selama 7 hari).

3.5 Alur Penelitian

Alur penelitian digambarkan sebagai berikut:



3.6 Preliminary Studi

Penelitian ini didahului dengan *preliminary study* yaitu melakukan uji konsentasi dan dosis serta uji tumbuh bakteri *Gardnerella vaginalis* pada vagina mencit menggunakan Plate Count Agar (hitung koloni cfu/ml) dan ELISA yang dilaksanakan pada tahun 2016; sedangkan uji dosis ekstrak buah Andaliman dilaksanakan pada bulan November 2016.

Uji Konsentrasi dan Dosis Gardnerella vaginalis serta Uji Tumbuh Bakteri pada Hewan Coba BALB C.

Hewan coba Balb c betina dan dewasa (umur 8–12 minggu) berasal dari laboratorium biofarma Surabaya. Pemberian makan dan minum *ad libitum*. Adaptasi hewan coba selama 7 hari di laboratorium animal FK UNHAS kemudian hewan ditimbang untuk mendapatkan rata-rata bobot awalnya. Hewan coba terdiri atas 3 ekor dilakukan penandaan untuk membedakan masing-masing dosis menggunakan larutan asam pikrat 10% dalam alkohol pada kepala, punggung, dan ekor.

Gardnerella vaginalis berasal dari laboratorium mikrobiologi FK UNHAS dilakukan pembagian tiga dosis konsentrasi yaitu 3×10^{-6} , 3×10^{-5} , dan 3×10^{-4} (Hoffmann et al. 2012). Menginfeksi mencit Balb c dilakukan dengan cara inokulasi GV intravaginal masing-masing 10 μ l dengan konsentrasi 3×10^{-6} , konsentrasi 3×10^{-5} , dan konsentrasi 3×10^{-4} . Sebelum dilakukan inokulasi (H0) dilakukan pengambilan swab vagina dan dilanjutkan pada H1 \pm 18-24 jam pasca infeksi. Setelah inokulasi, dilakukan observasi 3 kali sehari terhadap status kesehatan mencit (pergerakan, pernafasan, aktivitas makan, bulu, dan lain-lain) dan setiap hari dilakukan pemantauan berat badan selama 5 hari setelah infeksi.

Uji tumbuh bakteri *Gardnerella vaginalis* pada vagina mencit dilakukan menggunakan sampel sekret vagina yang diambil menggunakan *cotton buds*. Hasil uji ditampilkan sebagai berikut:



Gambar 22
Hasil Uji Tumbuh Bakteri *Gardnerella vaginalis* pada vagina Mencit

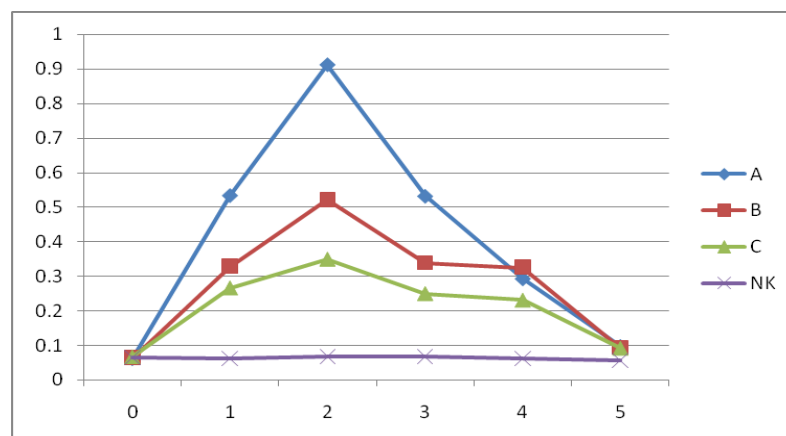
Keterangan:

1. Tampilan PCA sekret vagina mencit sebelum inokulasi *Gardnerella vaginalis* intravaginal (H0)
2. Tampilan PCA sekret vagina mencit 18-24 jam pasca inokulasi *Gardnerellavaginalis* intravaginal (H1) konsentrasi $3 \times 10^{-4} = 21$ cfu/ml
3. Tampilan PCA sekret vagina mencit 18-24 jam pasca inokulasi *Gardnerellavaginalis* intravaginal (H1) konsentrasi $3 \times 10^{-5} = 106$ cfu/ml
4. Tampilan PCA sekret vagina mencit 18-24 jam pasca inokulasi *Gardnerellavaginalis* intravaginal (H1) konsentrasi $3 \times 10^{-6} =$ koloni padat (± 10000 cfu/ml).

Sebelum inokulasi GV intravaginal (H0) menunjukkan tidak terdapat pertumbuhan koloni, artinya ekosistem vagina mencit tidak mengalami pertumbuhan bakteri patogen. Setelah 18-24 jam pasca inokulasi GV intravaginal (H1) dengan konsentrasi 3×10^{-4} menunjukkan pertumbuhan koloni 21 cfu/ml, artinya terdapat perubahan ekosistem vagina mencit dan terjadi pertumbuhan bakteri patogen. Selanjutnya pada konsentrasi 3×10^{-5} menunjukkan pertumbuhan koloni 106 cfu/ml, artinya terdapat perubahan ekosistem vagina mencit dan terjadi pertumbuhan bakteri patogen yang meningkat lebih banyak dari konsentrasi 3×10^{-4} . Pada konsentrasi 3×10^{-6} menunjukkan pertumbuhan koloni yang padat ± 10000 cfu/ml. Artinya terdapat perubahan ekosistem vagina mencit dan terjadi pertumbuhan bakteri patogen yang terlalu meningkat lebih banyak dari konsentrasi 3×10^{-4} dan 3×10^{-5} . Pertumbuhan koloni menunjukkan terjadinya infeksi

pada host (mencit balb c) dan berdasarkan hasil uji tumbuh bakteri bahwa konsentrasi 3×10^{-4} dapat digunakan sebagai dosis *Gardnerella vaginalis* dalam penelitian selanjutnya.

Uji tumbuh bakteri GV dengan pemeriksaan Elisa pada ketiga hewan coba baik pada konsentrasi 3×10^{-6} , 3×10^{-5} , dan 3×10^{-4} menggunakan sampel darah (serum) yang diambil dari bagian ekor. Primary antibodies menggunakan anti GV, quantity 0,2 milligrams (mg), *isotype* IgG2a, *product number* ABCA0055473. Hasil Elisa ditampilkan pada gambar berikut:



Gambar23
Hasil uji ELISA

Keterangan:

NK = kontrol

A = 10^{-6}

B = 10^{-5}

C = 10^{-4}

Grafik uji Elisa menunjukkan peningkatan IgG pasca inokulasi GV pada konsentrasi 10^{-6} , 10^{-5} , maupun 10^{-4} hingga hari

keduakemudi diikuti penurunan IgG, artinya terjadi infeksi pada host (mencit).

Hasil pengamatan selama uji coba menunjukkan bahwa hewan coba yang diinfeksi GV konsentrasi 3×10^{-5} mengalami penurunan berat badan 30 gram (hari I) menjadi 28 gram (hari II) dan menjadi 26,3 gram (hari III) serta mengalami abortus. Hewan coba yang diinfeksi GV konsentrasi 3×10^{-6} berat badan tetap 27,5 gram namun menunjukkan sekret vagina yang banyak pada hari III; dan hewan coba yang diinfeksi GV konsentrasi 3×10^{-4} tidak mengalami penurunan berat badan (30 g) dan tidak terjadi penumpukan sekret vagina.

Pembuatan Sediaan Uji dan Uji Coba Dosis Ekstrak Buah Andaliman

Pembuatan Sediaan Uji (Ekstrak Buah Andaliman)

Peralatan untuk pembuatan ekstrak terdiri atas: oven khusus (alat pengering tanaman obat), timbangan analitik, grinder dengan kehalusan 3-4 mm, ethanol 96%, dandang stainless, mixer/ pengaduk, corong, kertas saring, dan rotavator.

Andaliman segar diperoleh dari Buttumalasang, yaitu daerah ketinggian di Parapat (Danau Toba) Kab.Simalungun, Sumatera Utara. Buah Andaliman segar sebanyak 2500 gram dikeringkan di bawah sinar matahari menjadi 1800 gram kemudian dibawa ke BALITRO untuk proses pengeringan lebih lanjut hingga pembuatan sediaan uji. Pembuatan sediaan uji (ekstrak) dimulai dari proses pengeringan menggunakan oven selama 5 hari menjadi simplisia (buah Andaliman kering). Simplisia

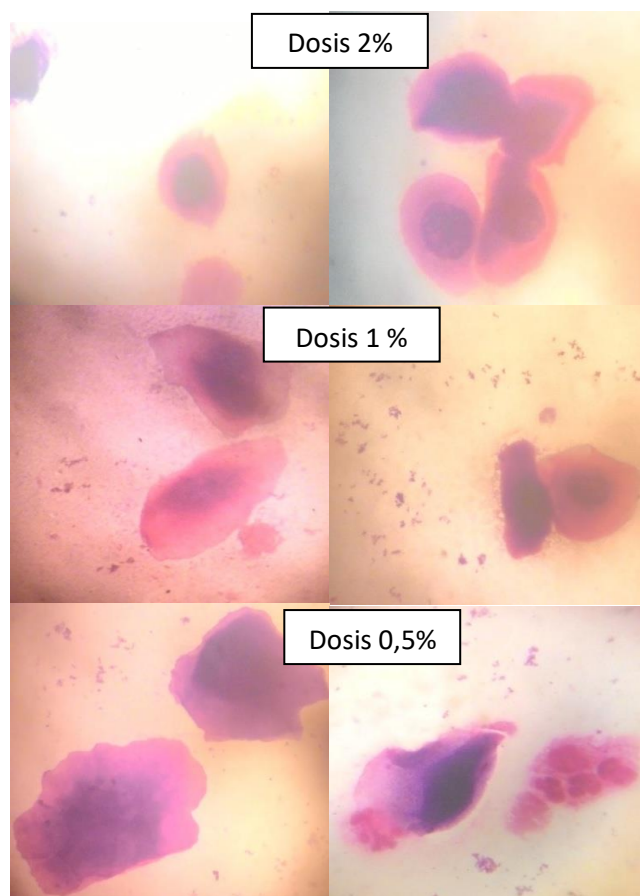
sebanyak 1500 gram dihaluskan menggunakan greender dengan kehalusan 3-4 mm menjadi serbuk kasar, selanjutnya direndam di dalam dandang stainless menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 7500 ml (konsentrasi 1 : 5 liter) dan dimaserasi (dimixer/ diaduk) selama 3 jam kemudian dibiarkan terendam selama 24 jam. Tahap selanjutnya dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring untuk memisahkan residu dan filtrat. Hasil filtrat dimasukkan ke dalam rotavator dan dirotavator atau evaporasi untuk memisahkan pelarut hingga diperoleh ekstrak kental buah Andaliman (sediaan ekstrak etanol buah Andaliman rendemen 7%). Rendemen adalah persentasi bobot produk akhir dibandingkan terhadap bobot awal, dalam hal ini rendemen merupakan kadar komponen yang terekstraksi (terbawa oleh pelarut) sesuai dengan tingkat kepolaran di dalam serbuk buah andaliman yang dinyatakan dengan persen.

Ekstrak etanol buah Andaliman rendemen 7% tidak larut dalam air, maka untuk memperoleh campuran yang homogen digunakan pengemulsi yaitu Na-CMC (*carboxymethyl cellulose*) konsentrasi 1%. Selanjutnya sediaan uji dibuat ke dalam dosis sesuai kebutuhan penelitian (Roy A. Sparringa 2014).



Uji Coba Dosis Ekstrak Buah Andaliman

Uji coba dosis ekstrak buah Andaliman mengacu kepada penelitian sebelumnya (Moektiwardoyo et al.2014). Uji coba dosis ekstrak Andaliman dilakukan pada 3 kelompok dosis yaitu dosis 0,5%, dosis 1%, dan dosis 2%. Menggunakan Balb-C yang diinfeksi bakteri GV konsentrasi 3×10^{-4} . Hasil uji coba dosis ditampilkan pada gambar berikut:



Gambar 25
Hasil uji coba Dosis Andaliman

Sumber: Lenny Irmawaty, 2016

Keterangan:

Hasil pemeriksaan mikroskopik sampel sekret vagina mencit, preparat uji coba dosis 2% lebih bersih dibandingkan uji coba dosis 0,5% dan dosis 1%. Keenam hewan coba uji dosis tidak mengalami kemunduran kesehatan.

3.7 Main Study

3.7.1 Bahan dan peralatan

a. Sediaan Uji

- 1) Na-CMC 1% (dalam 100 ml air + 1 gram CMC). Pemberian ke mencit 1 kali sehari sebanyak 0,1ml/10 gram BB.
- 2) Metronidazole 500mg dosis dewasa dengan berat badan 68kg. Dikonversi ke BB mencit yaitu 0,01 gr dilarutkan menggunakan CMC 10ml diberikan 2 kali sehari sebanyak 0,1ml/10 gr BB.
- 3) Ekstrak Andaliman

Bahan untuk membuat ekstrak yaitu buah Andaliman segar diperoleh dari Buttumalasang, daerah ketinggian di Parapat (Danau Toba) Kab.Simalungun, Sumatera Utara. Buah Andaliman segar maupun kering \selalu digunakan masyarakat terutama (masyarakat asal Sumatra Utara) sebagai rempah untuk memasak ikan, daging, dan bahkan sebagai rempah campuran sambal yang terbukti sebagai pengawet makanan. Telah diteliti efek antioksidan dan antibakteri secara in vitro terhadap bakteri pangan, namun belum pernah ada kajian secara in vivo efek Andaliman sebagai antibakteri penyebab infeksi terhadap host. Buah Andaliman memiliki kelebihan karena selalu tersedia oleh alam, digunakan dan dikonsumsi sehari-hari di masyarakat dan tidak pernah dilaporkan adanya efek samping pasca konsumsi Andaliman.

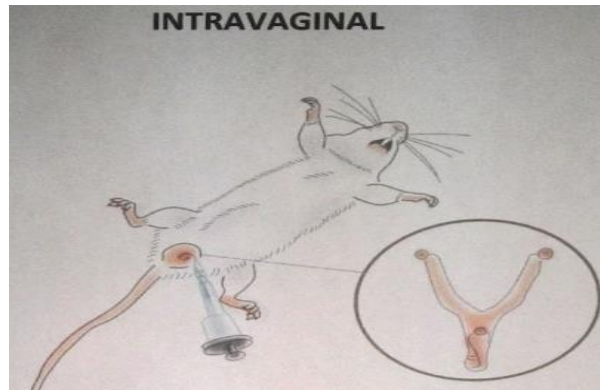
Untuk kepentingan penelitian, Buah Andaliman kering diekstraksi dengan metode Maserasi menggunakan pelarut Etanol 96%. Setelah dalam bentuk ekstrak (rendemen 7%) dilakukan analisis (uji fitokimia) di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO), Jln.Tentara Pelajar, No.3A Kota Bogor, Jawa Barat. Dosis Andaliman ditentukan yaitu 2% yaitu 0,2 gram ekstrak + 10 ml na-cmc 1% diberikan 1 kali sehari sebanyak 0,1 ml/ 10 gram BB (Uji coba dosis ekstrak buah Andaliman Lenny, 2016).



Gambar 26 Pemberian makan pada mencit (lavage)

b. *Gardnerella vaginalis*

Bakteri ini diperoleh dari laboratorium Mikrobiologi FK UNHAS Makassar yang disimpan dalam suhu -80° dengan konsentrasi 3×10^{-4} . *Gardnerella vaginalis* di inokulasikan secara intravaginal sebanyak 10 μ g (Sirait et al. 2017). Peralatan yang digunakan: sarung tangan, masker, mikropipet BanchMate 10 μ l, dan tip.



Gambar 27. Inokulasi *Gardnerella vaginalis* transvaginal

c. Hewan Coba

Hewan coba *Balb-C* betina, sehat, umur 8-12 minggu, berat 18-20 gram berasal dari PT. INDOANILAB (Fasilitas Pengembangbiakan Hewan Laboratorium) Bogor diadaptasikan selama 7 hari di laboratorium animal FK UNHAS dengan kandang standar dan pemberian pakan yang sesuai standar laboratorium secara tanpa batas (*ad libitum*).



Gambar 28. Masa adaptasi hewan coba Balb-C

Peralatan yang digunakan: kandang hewan coba, timbangan digital, pakan, dan alat minum. Peralatan untuk pemberian perlakuan: sonde lambung, gelas ukur 100 cc, pengaduk, sarung tangan, masker.

d. Sampel (Darah dan Sekret Vagina)

1) Sampel Darah

Sampel darah diperlukan untuk pemeriksaan RT-PCR mengetahui ekspresi mRNA gen CAMP. Peralatan yang diperlukan: mikropipet 1,5 cc, Spuit 1 cc, kapas alkohol, mesin real time PCR, tissue, perlengkapan ekstrak darah, dan lain-lain. Pemeriksaan RT-PCR: Sequences Used with SYBR Green Analysis

Primer Name	Sequence (5'-3')
CRAMP Forward:	GCCGCTGATTCTTTTGACAT,
CRAMP Reverse:	GCCAAGGCAGGCCTACTACT
Glycerol-dehyde-3-phosphate dehydrogenase/ GAPDH Forward:	GACCACAGTCCATGCCATCA,
GAPDH Reverse:	CATCACGCCACAGTTTCC.

Ekstraksi RNA total qualitative reverse traskriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), dan elektroforesis gel agarose yang telah dibuat sebelumnya. Seluruh sel dari yang ditreatment maupun kontrol di homogenized dan sampel RNA total diekstraksi sesuai petunjuk dan protocol. Pada akhir pengukuran, disajikan dalam bentuk kurva. Hasil diverifikasi oleh analisis ekektrofoesis gel agarosa. Penilaian ambang siklus dikalkulasi dengan software standar (Applied Biosystems). Primer untuk RT-PCR didesain menggunakan software oligo (Biorad CFX

manager). Level dari ekspresi gen GAPDH digunakan sebagai kontrol. Tahapan pemeriksaan adalah sebagai berikut:

Pengambilan darah dilakukan pada ekor mencit, seperti pada gambar berikut:



Sampel darah diambil sebanyak 0,1 ml selanjutnya dimasukkan ke dalam tube yang mempunyai penutup berupa sekrup yang telah berisi L6 (buffer lisis).

a. Preparasi DNA/ ekstraksi DNA:

Reagen yang digunakan adalah suspensi diatom, larutan L6, larutan L2 (buffer pencuci) dan TE buffer elusi. Diatom *SIO₂* (*silicon dioxide*) memiliki kontur besar sehingga DNA-RNA dapat masuk pada sela dan akan mengikat DNA. Diatom divortex kemudian memasukkan diatom sebanyak 40 μ ke dalam tube yang berisi sampel + L6, goyangkan selama 15 detik selanjutnya masukkan alat rotater selama 15 detik dan disentrifus 13.000 rpm selama 15 detik untuk tujuan memisahkan kemudian cuci menggunakan L2 (1

ml). Prinsipnya penambahan pencuci-vortex-sentrifus 13.000 rpm-cuci buang pencucinya (disebut 1 kali pencucian) dan pencucian dilakukan sebanyak 2 kali. Selanjutnya cuci menggunakan etanol (1 ml) sebanyak 2 kali dengan prinsip yang sama dengan L2. Terakhir cuci menggunakan aseton (500 μ) sebanyak 1x dengan tujuan untuk pengeringan, selanjutnya masukkan ke dalam heater block untuk mengeringkan selama 15-20 detik. Sambil menunggu proses pengeringan, mempersiapkan blok sampel pada tube mini dan memberi stiker nama. Setelah pengeringan selesai, tambahkan TRIS EDTA (TE) 100 μ l dengan tujuan untuk mengikat DNA keluar dari diatom. Tahap berikutnya inkubasi selama 10 menit di atas heater block, kemudian sentrifus 13.000 rpm selama 3 menit, kemudian ambil supernatannya menggunakan mikropipet perlahan-lahan jangan sampai endapannya terambil, setiap pengambilan sampel selalu mengganti tip tube, supernatant masukkan ke tube mini, tutup, dan beri kode label nama. Masukkan ke dalam kantong plastic dimana setiap kantong plastic berisi sampel 1 kelompok kemudian seluruh sampel disimpan pada suhu -20°C .

b. Protokol Realtime PCR

Alat: mesin RT-PCR, rak biasa berisi gel di bawahnya. Reagen: master mix, primer CRAMP dengan forward dan reverse, free water dan template. Total mRNA diisolasi dari sampel darah yang diperoleh dengan protocol menggunakan metode Boom. Kuantitatif real-time

polymerase chain reaction menggunakan BRILLIANT SYBR green QPCR master mix (Stratagene, La Jolla, CA) dengan mengikuti instruksi produk. Primer CRAMP disintesis menggunakan Macrogen (Korea).

Parameter siklus termal adalah 30 detik pada suhu 95°C dan 40 siklus denaturasi pada suhu 95°C selama 10 detik kemudian annealing 60°C selama 15 detik dan ekstensi pada suhu 72°C selama 40 detik. Semua pemeriksaan real-time PCR diulang 3 kali dan data dianalisis dengan system deteksi instrument Mx4000 menggunakan metode perbandingan ambang batas siklus (*using the comparative threshold cycle method*). Kurva standar dibuat dan merupakan indikasi efisiensi amplifikasi yang baik (90-100%).

2) Sampel Sekret Vagina

Sampel sekret vagina diperlukan untuk pemeriksaan bacterial load (hitung koloni dan hitung kuman per lapangan pandang). Peralatan yang diperlukan: sarung tangan, masker, objek glass, label, cotton bud, NaCl 0,9% steril, tabung reaksi steril, rak tabung, lampu spiritus, kelengkapan pewarnaan gram, minyak emersi, mikroskop, pipet volume 1 cc dan 10cc, bekker glass 100 ml, gelas ukur 1000 ml, kelengkapan membuat media PCA, timbangan, Erlenmeyer, petri deas (cawan petri) steril, incubator, vortex, dan

lain-lain. Pengambilan sekret vagina dilakukan menggunakan cotton bud seperti pada gambar berikut:



Gambar 30. Pengambilan sekret vagina Mencit

3.7.2 Protokol Penelitian

a. Perlakuan pada Subyek

Hewan coba yang digunakan adalah Balb-C betina, nullipara, tidak sedang bunting dan sehat artinya vagina tidak sedang terinfeksi bakteri patogen (*Gardnerella vaginalis*). Hewan Coba Balb-C berasal dari PT. INDOANILAB (Fasilitas Pengembangbiakan Hewan Laboratorium) Bogor diadaptasikan di laboratorium Animal FK Unhas Makassar selama 7 hari pada kandang dengan suhu ruangan serta pencahayaan sesuai standar diberi pakan yang sesuai standar laboratorium secara tanpa batas (*ad libitum*). Hari ke delapan, dilakukan penimbangan hewan coba kemudian dibagi ke dalam 6 kandang (6 kelompok) secara acak (random) dengan rerataan berat badan tidak lebih dari 20% masing-masing kelompok terdiri dari 4 ekor sebagai ulangan.

Kelompok preventif terdiri atas 3 kelompok dan kelompok kuratif terdiri atas 3 kelompok. Pada setiap kelompok diberi penandaan hewan coba menggunakan larutan asam pikrat 10% dalam alkohol pada kepala, punggung, ekor, dan kaki kanan depan. Selama perlakuan, hewan coba tetap diberikan pakan standar *ad libitum*.

Kelompok preventif (perlakuan sebelum infeksi)

- 1) K1: kelompok tanpa Andaliman yaitu pemberian CMC1% dosis 0,1 ml/10 gram BB/hari selama 7 hari secara gavage, hari ke-8 inokulasi *Gardnerella vaginalis* intravaginal 10 µg konsentrasi 3×10^{-4} .
- 2) K2 :kelompok Andaliman 5 hari yaitu pemberian ekstrak Andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari secara gavage selama 5 hari, hari ke-6 inokulasi *Gardnerella vaginalis* intravaginal 10 µg konsentrasi 3×10^{-4} .
- 3) K3 :kelompok Andaliman 7 hari yaitu pemberian ekstrak Andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari secara gavage selama 7 hari, hari ke-8 inokulasi GV intravaginal 10 µg konsentrasi 3×10^{-4} .

Kelompok kuratif (perlakuan sesudah infeksi)

- 4) K4 :kelompok kontrol negatif yaitu hari ke-0 inokulasi GV intravaginal 10 µg konsentrasi 3×10^{-4} , Hari ke-1 pemberian CMC 1% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari secara gavage selama 7 hari.
- 5) K5 : kelompok Andaliman yaitu hari ke-0 inokulasi GV intravaginal 10 µg konsentrasi 3×10^{-4} , hari ke-1 pemberian ekstrak Andaliman 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari secara gavage selama 7 hari.

- 6) K6 : kelompok kontrol positif yaitu hari ke-0inokulasi GVintravaginal 10 µg konsentrasi 3×10^{-4} , hari ke-1 diberikan metronidazole 0,01mg 2 kali sehari dengan dosis 0,1 ml/ 10 gram BB secara gavage selama 7 hari.

Pengambilan Sampel Darah (untuk Pengukuran Ekspresi mRNA gen CAMP) dan Sampel Sekret vagina (untuk Diagnosis Memicit terinfeksi atau tidak dan Pengukuran Bakterial Load)

Kelompok preventif masing-masing dilakukan 3 kali yaitu:

- 1) K1 dan K3 : sebelum perlakuan (H0) dilakukan; hari ke-8 (H8 pasca CMC, sebelum infeksi); dan hari ke-11 (H11 pasca CMC, 3 hari pasca infeksi)
- 2) K2 :sebelum perlakuan (H0); hari ke-6 (H6 pasca andaliman, sebelum infeksi); dan hari ke-9 (H9 pasca Andaliman dan 3 hari pasca infeksi).
- 3) K4, K5, K6 : sebelum perlakuan (H0); hari ke-1 (H1 pasca infeksi, sebelum cmc/andaliman/metronidazole); dan hari ke-8 (H9 pasca infeksi, H8 pasca andaliman).

Pengambilan Sampel Sekret vagina untuk Diagnosis Memicit terinfeksi atau tidak dan Pengukuran Bakterial Load (hitung koloni dan hitung kuman per lapangan pandang)

Pengambilan sekret vagina untuk kelompok preventif dan kuratif masing-masing dilakukan 3 kali yaitu:

- 1) K1, K2, K3, K4, K5, K6 : sebelum perlakuan (H0) dilakukan pengambilan sekret vagina untuk mendiagnosis mencit sehat (tidak terinfeksi *Gardnerella vaginalis*), hal ini dibuktikan dengan metode kultur dan mikroskopik.
- 2) Pengambilan sampel sekret vagina berikutnya adalah untuk mengukur pertumbuhan bakteri *Gardnerella vaginalis* yaitu: K1 dan K3 pada hari ke-9 dan hari ke-11; K2 pada hari ke-7 dan hari ke-9; K4, K5, K6 pada hari ke-1 dan ke-8.

b. Randomisasi

Sebelum hewan coba Balb-C digunakan sebagai subjek penelitian, terlebih dahulu diamati tampilan morfologi yaitu sekret vagina bebas kuman dan ataupun koloni. Metode smear dilakukan dengan cara cotton bud dibilas dengan NaCl 0,9% steril dan dimasukkan kedalam vagina mencit betina dengan sudut $\pm 45^\circ$ dan diputar sebanyak 2-3 putaran dan dibuat preparat apusan. Preparat apusan difiksasi di atas api spritus dan dilakukan pengecatan gram, kemudian dikeringanginkan. Preparat diamati morfologi sel epitel dengan menggunakan mikroskop perbesaran 1000x.

Setelah inokulasi *G* intravaginal dengan konsentrasi 3×10^{-4} sebanyak 10 μg dilakukan Uji tumbuh untuk memastikan bahwa mencit Balb-C terinfeksi menggunakan *Pour Plate Metode* dan dilanjutkan dengan uji mikroskopik koloni serta mikroskopik per lapangan

pandang. Pemeriksaan mikroskopik pengambilan sampel sekret vagina menggunakan metode swab untuk kemudian pembuatan preparat dengan pengecatan Gram dan pemeriksaan hitung kuman dengan kriteria Spiegel. Pemeriksaan preparat dilakukan oleh tiga orang pemeriksa secara *blinding* pada waktu yang berbeda (Hamil & Juan 2008). Setiap morfotipe bakteri diamati pada pemeriksaan di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 1000 kali (dari rerata 10 lapangan pandang)GV: Kuman bentuk batang kecil Gram Variabel.

Pour Plate Metode menggunakan Medium *plate count agar* (PCA) dapat berfungsi sebagai medium untuk menumbuhkan mikrobia. Untuk penggunaannya, PCA instant sebanyak 22,5 gram untuk 1 Liter aquades. Berdasarkan komposisinya, PCA termasuk ke dalam medium semisintetik, yaitu medium yang komponen dasarnya sebagian diketahui dan sebagian lagi tidak diketahui secara pasti. PCA berwarna putih keabuan, berbentuk granula dan merk yang digunakan adalah Merck. Sebelum dipanaskan tidak larut sepenuhnya dalam air, tetapi masih terlihat serbuk-serbuknya, berwarna kuning dan terlihat keruh. Setelah dipanaskan serbuk media larut seluruhnya dalam air, berwarna kuning. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan menggunakan metode Total Plate Count (metode hitung cawan) secara duplo. Proses perhitungan bakteri metode cawan menyatakan bahwa:

1. Beberapa koloni yang bergabung menjadi satu merupakan kumpulan koloni yang besar, dimana jumlah koloni diragukan dapat dihitung sebagai satu koloni.
2. Satu deretan rantai koloni yang terlihat sebagai satu garis tebal dihitung satu koloni.

Pada dasarnya, sel tersebar homogen pada sampel setelah dilakukan pengenceran berseri. Pengenceran digunakan karena untuk menumbuhkan koloni bakteri pada media yang terbatas tidak memungkinkan untuk dilakukan perhitungan bakteri yang berjumlah puluhan ribu (Kadri, A 2015). Prinsip dari metode ini adalah jika jasad renik yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat dan dihitung langsung tanpa menggunakan mikroskop. Sebaiknya jumlah koloni mikroba yang tumbuh dan dapat dihitung antara 30-300 koloni. Satuan yang digunakan untuk menyatakan jumlah koloni adalah cfu/mL (*colony forming units*) (Kadri, A 2015).

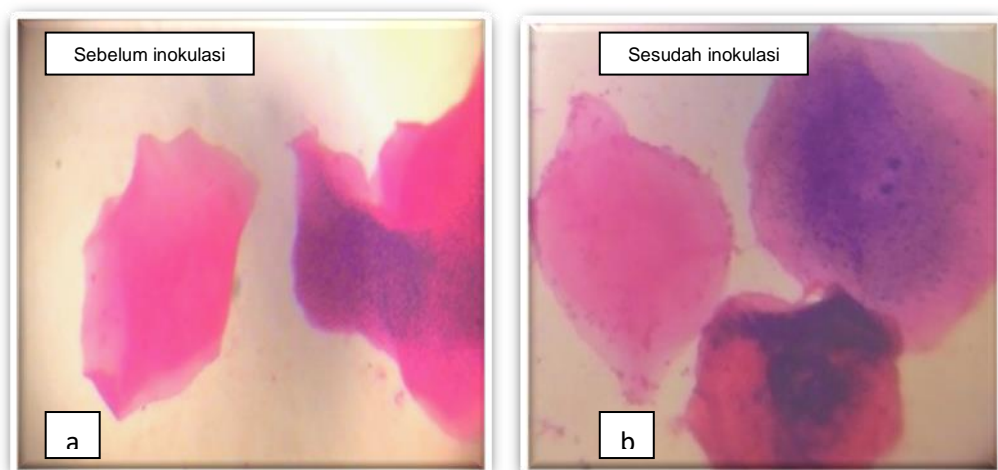
Tiap koloni mengandung jutaan sel. Koloni diidentifikasi dengan pengecatan gram dan diamati di bawah mikroskop untuk mengidentifikasi jenis bakteri (spesies) yang tumbuh.

Langkah pengecatan Gram koloni:

1. Koloni diletakkan di atas obyek glass dan dikeringkan
2. Diwarnai dengan crystal violet.

3. Fiksasi dengan iodine akan menstabilkan crystal violet staining. Bakteri akan menyisakan warna merah (purple) atau biru.
4. Ekstraksi dengan alkohol. Bakteri akan kehilangan warna jika gram negatif dan warna akan tetap jika gram positif.
5. Counterstaining dengan sefranin. Pewarnaan crystal violet akan tetap jika Gram positif dan berwarna purple namun jika gram negative, pewarnaan crystal violet akan luntur dan berwarna pink/ biru.

Mikroskopik diamati gram positif/ negatif, morfologi, susunan (tunggal/ berantai/ berpasangan), dan besar sel. GV: Kuman bentuk batang kecil Gram Variabel. Hasil uji menggunakan kedua metode menunjukkan bahwa terjadi pertumbuhan bakteri *Gardnerella vaginalis* pada vagina Balb-C, ditunjukkan pada gambar 31, 32, dan 33.

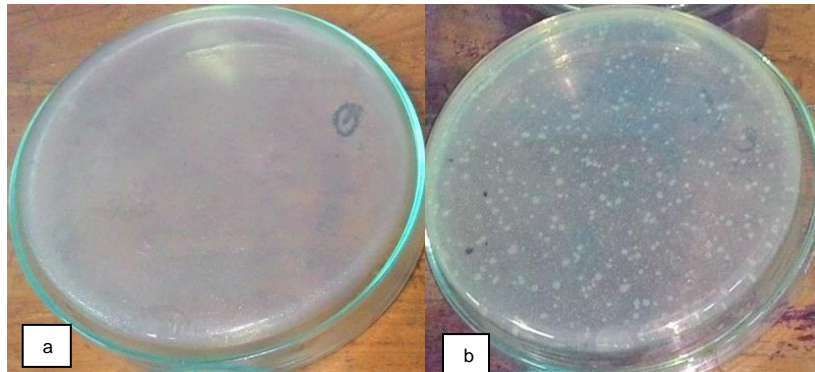


Gambar 31
Tampilan preparat sebelum inokulasi GV (H0) dan sesudah inokulasi GV (H1)

Keterangan:

- a. Tampilan preparat sebelum inokulasi menunjukkan epitel vagina yang bersih

- b. Tampilan preparat sesudah inokulasi menunjukkan epitel vagina yang dipenuhi bakteri *Gardnerella vaginalis* (*clue cells*).

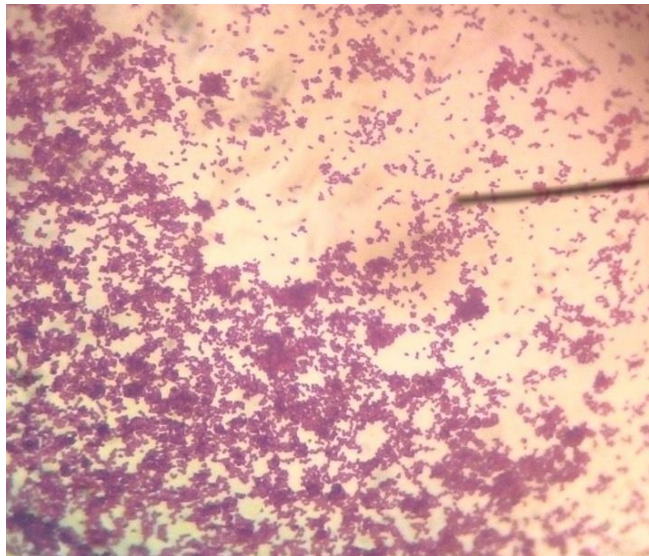


Gambar 32

Tampilan PCA sebelum inokulasi GV (H0) dan sesudah inokulasi GV (H1)

Keterangan:

- a. Tampilan plate sebelum inokulasi yang bersih
- b. Tampilan plate sesudah inokulasi dipenuhi koloni.



Gambar 33

Tampilan preparat koloni sesudah inokulasi GV (H1)

Keterangan:

Tampak cocobacil gram negatif pada tampilan preparat koloni, Artinya terdapat pertumbuhan koloni pada PCA yang menyerupai ciri-ciri *Gardnerella vaginalis*.

3.8. Analisis Statistik

Data diuji distribusi dan homogenitas variansnya. Bila data terdistribusi normal dan variansnya homogen, maka dilakukan uji *one way* Anova. Bila hasil analisis menunjukkan perbedaan yang bermakna, maka dilanjutkan dengan uji *post hoc*. Namun bila syarat uji parametrik tidak terpenuhi, maka data dianalisis dengan uji non-parametrik yang sebanding, yaitu uji Kruskal-Wallis, yang dilanjutkan dengan uji Mann-Whitney bila terdapat perbedaan yang bermakna.

BAB IV

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

4.1.1. Hasil Uji Fitokimia Metoda Kualitatif, Uji Kuantitatif untuk Penetapan Kadar, dan Uji GCMSD Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC).

Buah andaliman segar diperoleh dari Desa Buttumalasang, Kec.Parapat (Danau Toba), Kab. Simalungun, Sumatera Utara. Buah Andaliman segar dikeringkan dan dilakukan ekstraksi metode maserasi dan menghasilkan ekstrak buah andaliman dalam bentuk rendemen 7%. Kandungan metabolit skunder yang terkandung dalam buah andaliman diketahui dengan tiga jenis pengujian yang dilakukan di Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITRO), Jln.Tentara Pelajar, No.3A Kota Bogor, Jawa Barat dan di Laboratorium Kesehatan Daerah (Labkesda) DKI Jakarta. Jenis pengujian yaitu: 1) pengujian jenis fitokimia metode uji kualitatif merupakan pengujian yang bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa metabolit sekunder dalam suatu sampel (bahan/ ekstrak buah andaliman). Hasil uji fitokimia ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* Dc) metode kualitatif ditemukan kandungan senyawa aktif alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, triterpenoid, dan steroid. 2) Pengujian kuantitatif untuk penetapan kadar senyawa fitokimia tanin, saponin, dan flavonoid yang terkandung dalam ekstrak buah andaliman menggunakan metode pengujian TLC Scanner diperoleh

kadar saponin (1,81%), menggunakan metode pengujian spektrofometri diperoleh kadar tanin (1,28%) dan kadar flavonoid sebagai quersetin (1,11%). 3) Pengujian untuk menganalisis jumlah senyawa secara kuantitatif dan menganalisis struktur molekul yaitu metode uji GCMSD (Gas Chromatography Spectrometri Mass) – data yang diperoleh dibandingkan terhadap database library pada alat. Pemeriksaan dilakukan menggunakan 2 mg ekstrak buah andaliman rendemen 7% diperoleh hasil sbb: Geraniol acetate (26,51%), Oleic Acid (24,81%), Neoherculin (10,92%), Guaniol (6,40%), Sesamin (4,21%), Hexadecanoic Acid (3,85%), Eugenol (1,78%), Endo-2-Chloro-3-Methylenenorbornane (1,23%), Cis-salvene (1,14%), dan Caryophyllene (1,09%).

4.1.2 Hasil Ekspresi mRNA dan Bacterial Load pada Pada Kelompok Preventif dan Kuratif

Diperoleh data mengenai ekspresi mRNA gen CAMP sampel darah, bacterial load (jumlah bakteri dan jumlah koloni) dari sampel sekret vagina pada penelitian *invivo* menggunakan hewan coba mencit umur 8-12 minggu yang terbagi ke dalam kelompok preventif dan kuratif. Pada kelompok preventif terdiri dari 2 kelompok perlakuan (diberi ekstrak buah Andaliman) untuk 5 hari dan 7 hari pada masing-masing 4 mencit dan 4 ekor mencit untuk kelompok kontrol (tanpa Andaliman). Pada kelompok kuratif terdiri dari 1 kelompok perlakuan (diberi Andaliman selama 7 hari), 2 kelompok kontrol, masing-masing 4 mencit untuk kontrol negatif (tanpa

diberi Andaliman dan Metrodidazole) dan 4 ekor mencit untuk kontrol positif (diberi Metronidazole selama 7 hari). Hasil analisis statistik ditampilkan dengan sistematika sebagai berikut:

1. Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC)

Efek preventif andaliman dinilai dari ekspresi mRNA gen CAMP dan bacterial load (jumlah bakteri dan jumlah koloni) setelah pemberian andaliman sebelum inokulasi *Gardnerella vaginalis*.

a. Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap Ekspresi mRNA gen CAMP

Efek preventif Andaliman terhadap ekspresi mRNA gen CAMP dianalisis dengan paired t test antara nilai ekspresi mRNA gen CAMP sebelum Andaliman dan sesudah Andaliman selama 5 dan 7 hari serta sesudah inokulasi bakteri selama 3 hari; pada masing-masing kelompok preventif. Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 3 dan 4.

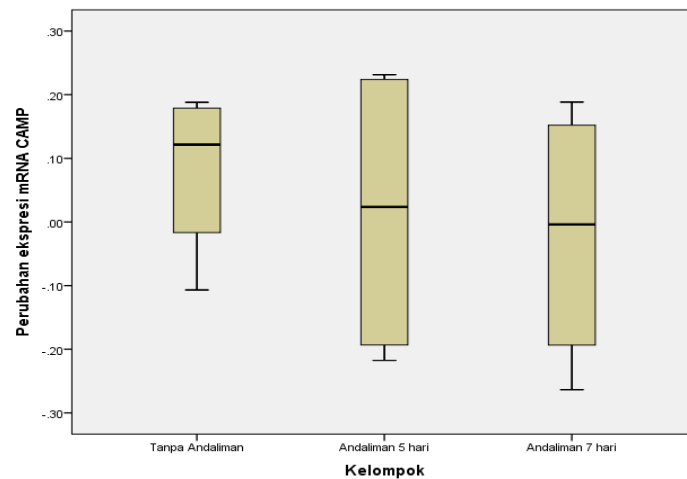
Tabel 3
Perbedaan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP
Setelah Pemberian Andaliman 2% antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Ekspresi mRNA gen CAMP			P
	Sebelum	Sesudah	Perubahan	
Tanpa Andaliman	5,17(0,39) ^a	5,25(0,14) ^a	0,08 ^a	0,316
Andaliman 5 hari	5,09(1,30) ^a	5,10(0,12) ^a	0,02 ^a	0,907
Andaliman 7 hari	5,08(0,22) ^a	5,06(0,05) ^a	0,02 ^a	0,856

Sumber: data primer 2017; n = 12

Dari tabel 3 dapat dilihat bahwa tidak terjadi perubahan ekspresi mRNA gen CAMP yang bermakna setelah pemberian Andaliman, baik

yang diberikan selama 5 hari maupun yang diberikan selama 7 hari, maupun kelompok kontrol (tanpa andaliman).



Grafik 1.
Box Plot Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Pemberian Andaliman

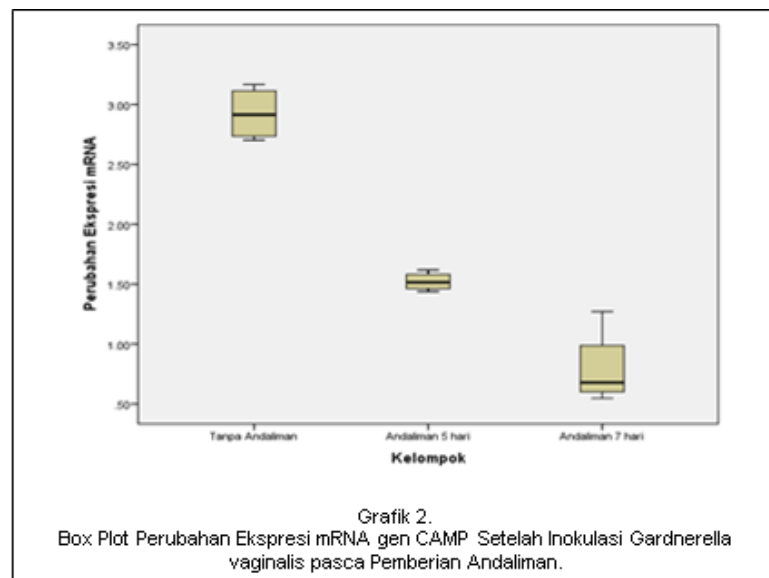
Dari grafik 1 juga dapat dilihat bahwa rerata besarnya perubahan ekspresi mRNA gen CAMP setelah pemberian andaliman sangat kecil dan hampir sama antara kelompok yang diberi andaliman 5 hari, 7 hari, dan kontrol. Artinya, pemberian andaliman tidak mempengaruhi ekspresi mRNA gen CAMP.

Tabel 4
Perbedaan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP 3 hari Setelah Infeksi *Gardnerella vaginalis* 3×10^{-4} $10 \mu\text{l}$ antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Ekspresi mRNA CAMP			P
	Sesudah	Hari ke-3 Infeksi	Perubahan	
Tanpa Andaliman	5,25(0,14) ^a	8,18(0,09) ^d	2,93 ^d	<0,001
Andaliman 5 hari	5,10(0,12) ^a	6,62(0,14) ^c	1,52 ^c	<0,001
Andaliman 7 hari	5,06(0,05) ^a	5,86(0,34) ^b	0,79 ^b	0,016

Sumber: Data Primer, 2017

Dari tabel 4 dapat dilihat pada kelompok kontrol (tanpa Andaliman) terjadi peningkatan ekspresi mRNA CAMP yang bermakna ($p < 0,05$) sebesar 2,93 dari 5,25 (0,14) menjadi 8,18 (0,09); sedangkan pada kelompok Andaliman 5 hari hanya meningkat sebesar 1,52 dan pada kelompok andaliman 7 hari, sebesar 0,79. Besarnya peningkatan ini, berbeda secara bermakna ($p < 0,05$).



Dari grafik 2 juga dapat dilihat bahwa rerata besarnya peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP setelah inokulasi berbeda antara ketiga kelompok. Kenaikan ekspresi mRNA gen CAMP pada kontrol (tanpa andaliman) lebih tinggi daripada kelompok andaliman 5 hari dan kelompok andaliman 7 hari lebih rendah dari kelompok andaliman 5 hari. Artinya, andaliman yang diberikan selama 5 dan 7 hari sebelum inokulasi *Gardnerella vaginalis* mempunyai efek terhadap ekspresi mRNA CAMP, yaitu menekan kenaikan mRNA gen CAMP tiga hari

setelah inokulasi *Gardnerella vaginalis*. Efek pemberian selama 7 hari lebih kuat daripada pemberian selama 5 hari.

b. Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap Jumlah Bakteri

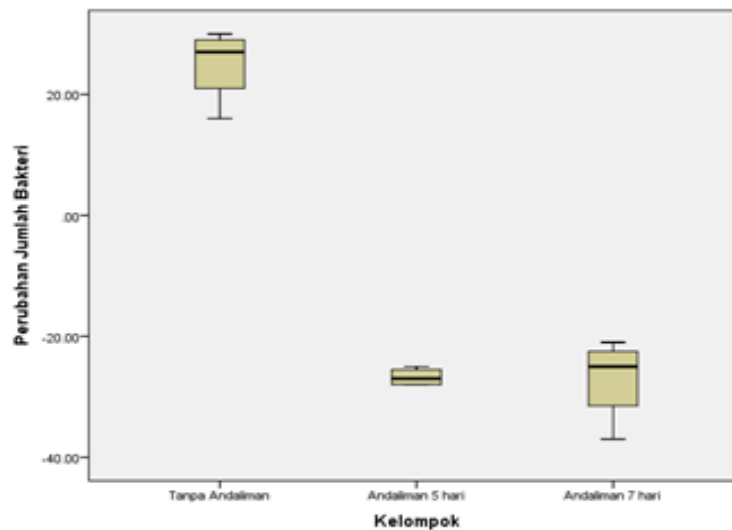
Efek preventif Andaliman terhadap jumlah bakteri *Gardnerella vaginalis* dianalisis dengan paired t test antara jumlah bakteri hari pertama sesudah inokulasi dan hari ke-3 sesudah inokulasi; pada masing-masing kelompok preventif. Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 5 dan grafik 3.

Tabel 5
Perbedaan Perubahan Jumlah Bakteri
Setelah Infeksi *Gardnerella vaginalis* antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Jumlah Bakteri			P
	Hari ke-1	Hari ke-3	Perubahan	
Tanpa Andaliman	48,3(6,8) ^p	73,3(1,9) ^c	25,0 ^x	0,004
Andaliman 5 hari	41,0(6,1) ^p	14,3(4,6) ^b	-26,8 ^y	<0,001
Andaliman 7 hari	34,5(5,2) ^q	7,5(2,1) ^a	-27,0 ^y	<0,001

Sumber: Data Primer, 2017. Ket. Mikroskopik per 10 lapangan pandang secara blinding

Dari tabel 5 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol terjadi kenaikan jumlah bakteri secara bermakna ($p < 0,05$) sebesar 25,0; sedangkan pada kelompok andaliman 5 hari dan 7 hari terjadi penurunan jumlah bakteri secara bermakna ($p < 0,05$); masing-masing sebesar 26,8 dan 27,0.



Grafik 3.

Box Plot Perubahan Jumlah Bakteri Setelah Inokulasi

Dari grafik 3 juga dapat dilihat bahwa setelah inokulasi terjadi peningkatan (rerata kenaikan positif) jumlah bakteri pada kelompok kontrol (tanpa andaliman), sedangkan pada kelompok Andaliman justru menurun (rerata kenaikan negatif). Rerata penurunan pada kelompok andaliman 5 hari tidak berbeda dengan kelompok andaliman 7 hari. Ini berarti bahwa pemberian andaliman sebelum inokulasi dapat menekan pertumbuhan bakteri setelah inokulasi. Efek pemberian andaliman selama 5 hari dan selama 7 hari tidak berbeda bermakna ($p > 0,05$).

c. Efek Preventif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap Jumlah koloni

Efek preventif Andaliman terhadap jumlah koloni dianalisis dengan paired t test antara jumlah koloni hari pertama sesudah inokulasi dan hari ke-3 sesudah inokulasi *Gardnerella vaginalis*; pada masing-masing

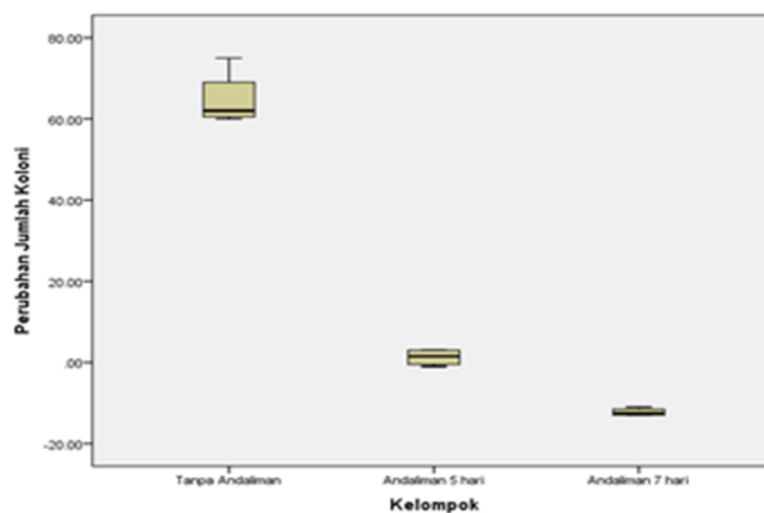
kelompok preventif. Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 6 dan grafik 4.

Tabel 6
Perbedaan Perubahan Jumlah Koloni
Setelah Infeksi Gardnerella vaginalis antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Jumlah Koloni			P
	Hari ke-1	Hari ke-3	Perubahan	
Tanpa Andaliman	45,00(3,74) ^p	100,75(4,65) ^c	54,75 ^x	<0,001
Andaliman 5 hari	22,50(1,29) ^q	23,75(1,71) ^b	1,25 ^y	0,312
Andaliman 7 hari	18,50(1,91) ^q	6,25(2,22) ^a	-12,25 ^z	<0,000

Sumber: Data Primer, 2017

Dari tabel 6 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol terjadi kenaikan jumlah koloni secara bermakna ($p < 0,05$) sebesar 54,75; sedangkan pada kelompok andaliman 5 hari hanya terjadi kenaikan sebesar 1,25 tetapi tidak bermakna ($p > 0,05$). Sementara pada kelompok andaliman 7 hari justru menurun secara bermakna ($p < 0,05$) sebesar 12,25.



Grafik 4.

Box Plot Perubahan Jumlah Koloni Setelah Inokulasi Pasca Pemberian Andaliman

Dari grafik 4 juga dapat dilihat bahwa setelah inokulasi terjadi peningkatan (rerata kenaikan positif) jumlah koloni pada kelompok kontrol (tanpa andaliman), sedangkan pada kelompok andaliman 7 hari justru menurun (rerata kenaikan negatif). Artinya, efek andaliman yang diberi selama 7 hari sebelum inokulasi dapat menurunkan pertumbuhan koloni (menurunkan jumlah koloni).

2. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC)

Efek kuratif Andaliman dinilai dari ekspresi mRNA gen CAMP dan bacterial load (jumlah bakteri dan jumlah koloni) setelah pemberian Andaliman selama 7 hari pasca inokulasi *Gardnerella vaginalis*.

a. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap ekspresi mRNA CAMP

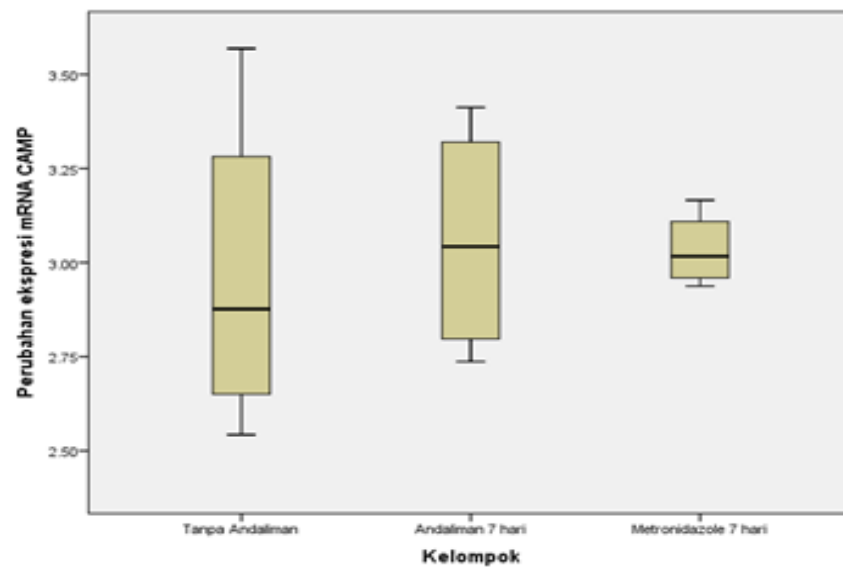
Efek kuratif Andaliman terhadap ekspresi mRNA gen CAMP dianalisis dengan paired t test antara nilai ekspresi mRNA gen CAMP sebelum inokulasi dan sesudah 1 hari inokulasi (tabel 6 dan grafik 5). Efek kuratif Andaliman dianalisis dengan cara yang sama antara nilai ekspresi mRNA gen CAMP sebelum dan sesudah diberi Andaliman selama 7 hari. Demikian halnya pada kelompok kontrol negatif (tanpa andaliman dan metronidazole) dan kontrol positif (diberi metronidazole selama 7 hari). Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 7 dan grafik 5.

Tabel 7
Perbedaan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP
Pasca Infeksi *Gardnerella vaginalis* antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Ekspresi mRNA gen CAMP			P
	Sebelum	Sesudah	Perubahan	
Kontrol negative	5,19(0,19) ^a	8,15(0,29) ^b	2,97 ^p	0,001
Andaliman 2%	5,11(0,17) ^a	8,17(0,19) ^b	3,06 ^p	<0,001
Kontrol positif	5,13(0,14) ^a	8,17(0,12) ^b	3,03 ^p	<0,001

Sumber: Data Primer, 2017

Dari tabel 7 dapat dilihat bahwa terjadi peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP yang bermakna ($p < 0,05$) pada ketiga kelompok setelah 1 hari pasca inokulasi; masing-masing sebesar 2,97 pada kontrol negatif; 3,06 pada kelompok andaliman dan 3,03 pada kelompok metronidazole.



Grafik 5.
 Box Plot Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Inokulasi *Gardnerella vaginalis*

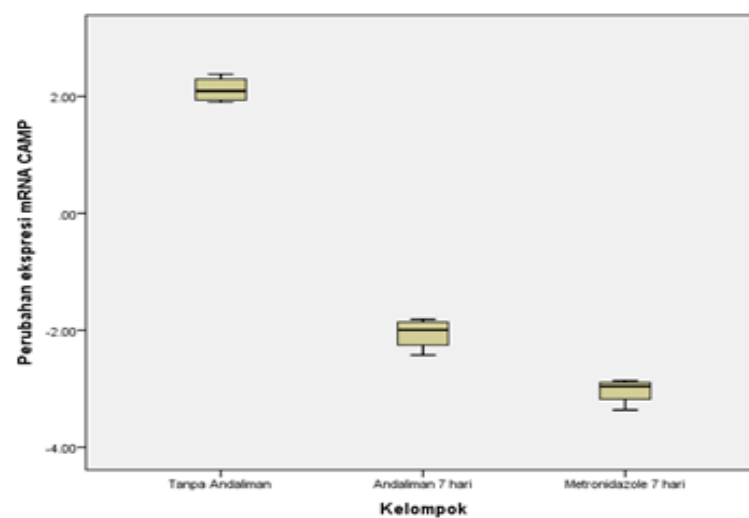
Dari grafik 5 juga dapat dilihat bahwa setelah inokulasi *Gardnerella vaginalis* terjadi peningkatan (rerata kenaikan positif) ekspresi mRNA gen CAMP pada ketiga kelompok.

Tabel 8
Perbedaan Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Pemberian Terapi Pasca Infeksi *Gardnerella vaginalis* antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Ekspresi mRNA CAMP			P
	Hari ke-1	Hari ke-8	Perubahan	
Kontrol negative	8,15(0,29) ^c	10,27(0,41) ^d	2,12 ^p	<0,001
Andaliman 2%	8,17(0,19) ^c	6,11(0,17) ^b	-2,06 ^q	0,001
Kontrol positif	8,17(0,12) ^c	5,13(0,11) ^a	-3,04 ^r	<0,001

Sumber: Data Primer, 2017

Dari tabel 8 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol negatif terjadi peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP yang bermakna ($p < 0,05$) sebesar 2,12; sebaliknya pada kelompok yang diberi Andaliman setelah infeksi, terjadi penurunan bermakna ($p < 0,05$) sebesar 2,06; dan pada kelompok kontrol positif juga terjadi penurunan bermakna ($p < 0,05$) sebesar 3,04.



Grafik 6. Box Plot Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Setelah Pemberian Terapi Andaliman Pasca Inokulasi *Gardnerella vaginalis*

Dari grafik 6 juga dapat dilihat bahwa setelah pemberian terapi Andaliman selama 7 hari pasca inokulasi *Gardnerella vaginalis* terjadi penurunan ekspresi mRNA; berbeda dengan kelompok kontrol negatif (tanpa andaliman dan metronidazole), ekspresi mRNA gen CAMP meningkat. Ekspresi mRNA gen CAMP kelompok kontrol positif (metronidazole selama 7 hari) menurun lebih besar daripada kelompok andaliman 7 hari. Artinya, pemberian Andaliman selama 7 hari pasca infeksi dapat menurunkan ekspresi mRNA gen CAMP. Metronidazole selama 7 hari lebih kuat efeknya daripada andaliman selama 7 hari.

b. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap Jumlah Bakteri

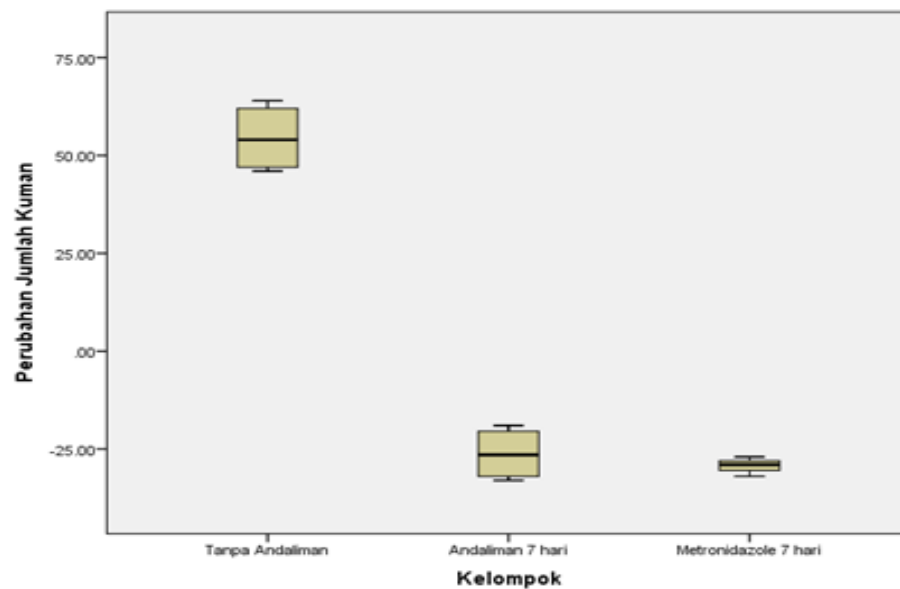
Efek kuratif Andaliman dianalisis dengan paired t test antara jumlah bakteri sebelum dan sesudah diberi andaliman selama 7 hari. Demikian halnya pada kelompok kontrol negatif (tanpa Andaliman dan tanpa Metronidazole) dan kontrol positif (diberi Metronidazole selama 7 hari). Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 9 dan grafik 7.

Tabel 9
Perbedaan Perubahan Jumlah Bakteri Setelah Pemberian Terapi Pasca Infeksi *Gardnerella vaginalis* antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Jumlah Bakteri			P
	Sebelum	Sesudah	Perubahan	
Kontrol negative	42,50(6,2) ^p	97,0(8,0) ^c	54,5 ^x	<0,001
Andaliman 2%	42,0(6,7) ^p	15,8(3,0) ^a	-26,3 ^y	<0,001
Kontrol positif	40,3(1,7) ^p	11,0(2,3) ^a	-29,3 ^y	<0,001

Sumber: Data Primer, 2017. Ket: Mikroskopik per 10 lapangan pandang secara blinding

Dari tabel 9 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol negatif terjadi peningkatan jumlah bakteri yang bermakna ($p < 0,05$) sebesar 54,5; sedangkan pada kelompok kontrol positif (Metronidazole) dan kelompok Andaliman selama 7 hari terjadi penurunan secara bermakna ($p < 0,05$) masing-masing sebesar 29,3 dan 26,3.



Grafik 7. Box Plot Perubahan Jumlah Kuman Setelah Pemberian Terapi Andaliman Pasca Inokulasi *Gardnerella vaginalis*

Dari grafik 7 dapat dilihat bahwa setelah pemberian terapi andaliman selama 7 hari pasca inokulasi *Gardnerella vaginalis* terjadi penurunan jumlah bakteri; berbeda dengan kelompok kontrol negatif (tanpa andaliman dan metronidazole), justru jumlah bakteri meningkat. Kelompok kontrol positif (metronidazole selama 7 hari) jumlah bakteri menurun sama besar daripada kelompok Andaliman 7 hari. Efek Andaliman tidak berbeda bermakna dengan efek Metronidazole.

c. Efek Kuratif Ekstrak Etanol Buah Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) terhadap Jumlah Koloni

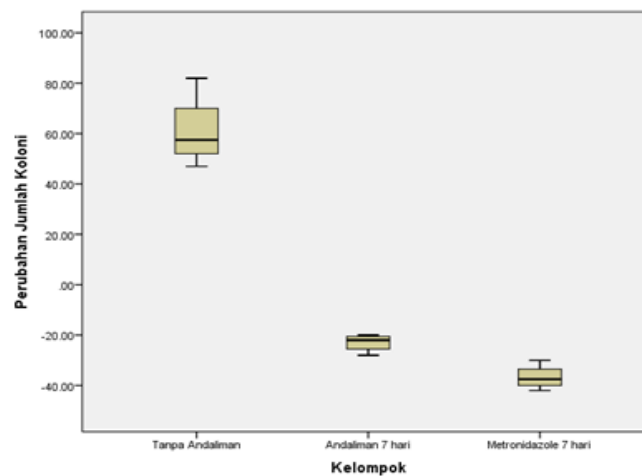
Efek kuratif Andaliman dianalisis dengan paired t test antara jumlah koloni sebelum dan sesudah diberi Andaliman selama 7 hari. Demikian halnya pada kelompok kontrol negatif (tanpa Andaliman dan Metronidazole) dan kontrol positif (diberi Metronidazole selama 7 hari). Ringkasan hasilnya dapat dilihat pada tabel 10 dan grafik 8.

Tabel 10
Perbedaan Perubahan Jumlah Koloni Setelah Pemberian Terapi Pasca Infeksi *Gardnerella vaginalis* antara Ketiga Kelompok

Kelompok	Jumlah Koloni			P
	Sebelum	Sesudah	Perubahan	
Kontrol negative	44,00(3,37) ^p	105,50(13,64) ^c	81,00 ^x	<0,001
Andaliman 2%	44,25(2,63) ^p	21,28(2,87) ^b	-23,00 ^y	<0,001
Kontrol positif	43,25(3,86) ^p	6,50(1,29) ^a	-36,65 ^z	<0,001

Sumber: Data Primer, 2017

Dari tabel 10 dapat dilihat bahwa pada kelompok kontrol negatif (tanpa andaliman dan metronidazole) terjadi peningkatan jumlah koloni yang bermakna ($p < 0,05$) sebesar 81,00; sedangkan pada kelompok kontrol positif (Metronidazole) dan Andaliman selama 7 hari justru menurun secara bermakna ($p < 0,05$) masing-masing sebesar 36,65 dan 23,00.



Grafik 8. Box Plot Perubahan Jumlah Koloni Setelah Pemberian Terapi Andaliman Pasca Inokulasi *Gardnerella vaginalis*

Dari grafik 8 dapat juga dilihat bahwa setelah pemberian terapi Andaliman selama 7 hari pasca inokulasi *Gardnerella vaginalis* terjadi penurunan jumlah koloni; berbeda dengan kelompok kontrol negatif (tanpa andaliman dan metronidazole), justru jumlah koloni meningkat. Kelompok kontrol positif (metronidazole selama 7 hari) menurun lebih besar daripada kelompok andaliman 7 hari. Efek andaliman tidak berbeda bermakna dengan efek metronidazole.

4.1.3 Hubungan antara Jumlah Bakteri dan Koloni dengan mRNA gen CAMP

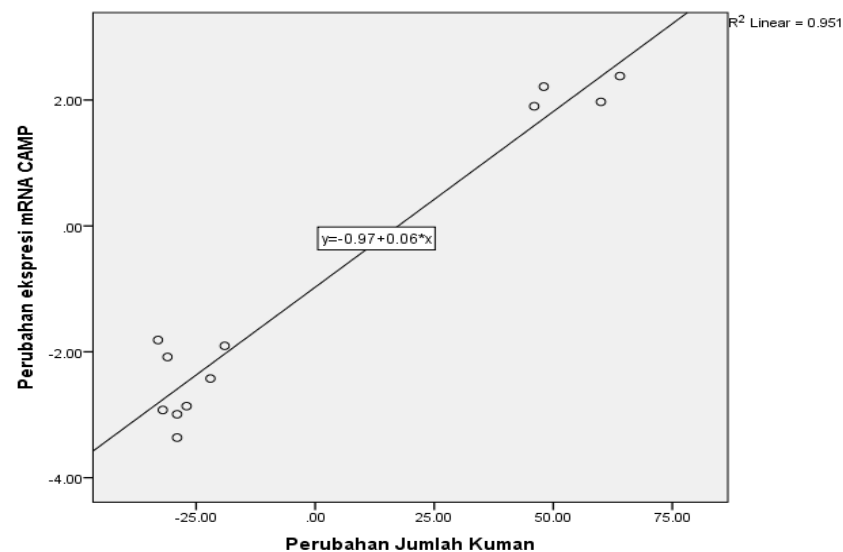
Untuk menilai hubungan antara jumlah bakteri dan koloni dengan ekspresi mRNA gen CAMP dilakukan uji korelasi Pearson antara perubahan jumlah bakteri dengan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP pasca terapi andaliman atau metronidazole atau tanpa terapi andaliman maupun metronidazole (tabel 11, grafik 9 dan 10).

Tabel 11
Korelasi Perubahan Jumlah Bakteri Dan Koloni Dengan
Perubahan Ekspresi mRNA gen CAMP Sesudah Pemberian
Terapi

Variabel	Ekspresi mRNA CAMP	
	Koefisien korelasi	Kemaknaan
Jumlah Bakteri	r=0,975	p<0,001
Jumlah Koloni	r=0,974	p<0,001

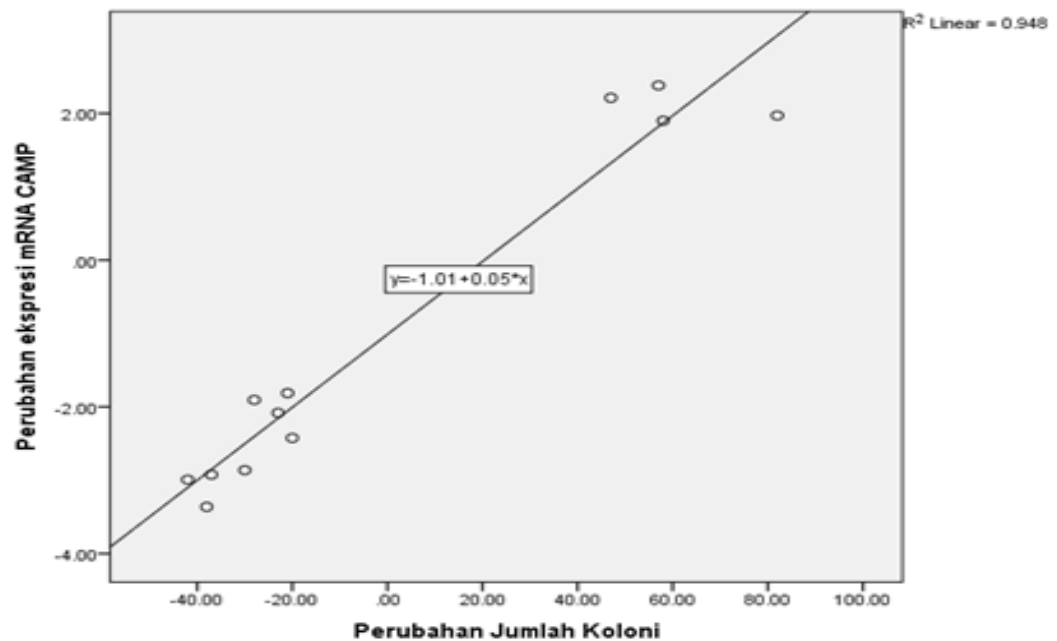
Sumber: Data Primer, 2017

Dari tabel 11 dapat dilihat bahwa perubahan jumlah bakteri berkorelasi dengan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP. Semakin besar penurunan jumlah bakteri setelah terapi, semakin besar penurunan ekspresi mRNA gen CAMP dengan koefisien korelasi sebesar $r= 0,975$ ($p<0,05$). Begitupula perubahan jumlah koloni dengan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP. Semakin besar penurunan jumlah koloni, semakin besar penurunan ekspresi mRNA gen CAMP dengan koefisien korelasi sebesar $r=0,974$ ($p<0,05$).



Grafik 9. Korelasi Perubahan Jumlah Kuman Dengan Perubahan Ekspresi mRNA CAMP Pasca Terapi

Dari grafik 9 dapat dilihat korelasi linier antara perubahan jumlah bakteri dengan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP pasca terapi. Semakin besar perubahan jumlah bakteri, semakin besar perubahan ekspresi mRNA gen CAMP.



Grafik 10. Korelasi Perubahan Jumlah Koloni Dengan Perubahan Ekspresi mRNA CAMP Pasca Terapi

Dari grafik 10 dapat dilihat korelasi linier antara perubahan jumlah koloni dengan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP pasca terapi. Semakin besar perubahan jumlah koloni, semakin besar perubahan ekspresi mRNA gen CAMP.

4.2. Pembahasan Hasil Penelitian

4.2.1 Efek Pemberian Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 5 hari dan 7 hari sebelum infeksi *Gardnerella vaginalis* terhadap ekspresi mRNA gen CAMP dan Bakterial Load pada balb c.

Pada kelompok preventif pemberian andaliman selama 5 hari dan 7 hari sebelum infeksi GV tidak memberikan efek terhadap perubahan ekspresi mRNA gen CAMP. Hal ini terlihat pada hasil penelitian bahwa tidak ada perbedaan kadar mRNA gen CAMP baik pada kelompok kontrol (tanpa andaliman) maupun kelompok perlakuan sebelum dan sesudah pemberian ekstrak buah andaliman (Lihat Bab hasil tabel 3 dan grafik 1). Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak buah andaliman tidak berpotensi meningkatkan ataupun menurunkan ekspresi mRNA gen CAMP. Ekspresi mRNA Gen CAMP meningkat setelah infeksi GV hari ke-3 (lihat bab hasil tabel 4 grafik 2). Dapat dikatakan bahwa kondisi tubuh tidak terinfeksi maka gen CAMP tidak diekspresikan oleh system imun (Bals, et al, 1999).

Ekspresi mRNA gen CAMP mengalami perubahan signifikan setelah infeksi GV. Hasil penelitian ini sejalan dengan pernyataan (Nilson, et al, 1999) bahwa CAMP/ LL-37 secara signifikan diinduksi dalam saluran genital wanita yang didiagnosis positif terinfeksi bakteri. Perubahan ekspresi mRNA gen CAMP yang terjadi berbeda bermakna antara kelompok kontrol, kelompok perlakuan 5 hari, dan kelompok perlakuan 7 hari. mRNA yang diekspresikan gen CAMP mengalami peningkatan

signifikan pada kelompok tanpa andaliman, sebaliknya mengalami penurunan signifikan pada kelompok Andaliman 5 hari dan lebih rendah pada kelompok andaliman 7 hari. Hasil penelitian ini menyatakan bahwa pemberian andaliman selama 5 hari dan atau 7 hari sebelum infeksi GV memberikan efek menekan kenaikan ekspresi mRNA gen CAMP, lebih kuat efek andaliman pada pemberian selama 7 hari.

Peningkatan dan penurunan ekspresi mRNA gen CAMP sejalan dengan perubahan bacterial load pada hari ke-1 dan hari ke-3 pasca inokulasi GV. Ekspresi mRNA gen CAMP meningkat seiring dengan peningkatan bacterial load dan sebaliknya. Bacterial load diidentifikasi menggunakan mikroskopik dan kultur. Secara mikroskopik untuk menghitung jumlah sel bakteri dengan ciri basil kecil per 10 lapangan pandang dan metoda kultur untuk menghitung jumlah koloni yang tumbuh pada cawan petri (lihat lampiran). Jumlah sel bakteri dan jumlah koloni sama-sama mengalami perubahan penurunan di hari ketiga infeksi pada kelompok perlakuan andaliman dan mengalami peningkatan signifikan pada kelompok tanpa andaliman (lihat bab hasil tabel 5,6 dan grafik 3,4). Perubahan penurunan berbeda pada kelompok andaliman 7 hari lebih rendah dibandingkan kelompok andaliman 5 hari. Hal ini menyatakan bahwa pemberian ekstrak buah andaliman selama 5 hari dan 7 hari sebelum infeksi memberikan efek terhadap penurunan bacterial load (jumlah sel bakteri dan jumlah koloni), namun lebih kuat efek pemberian selama 7 hari. Walaupun terdapat keterbatasan penelitian dalam hal

perhitungan blinding baik hitung sel bakteri per 10 lapangan pandang (mikroskopik) maupun hitung koloni (cfu/ml), namun hasil penelitian ini dapat dijadikan dasar pemikiran penurunan bakterial load di hari ketiga pasca infeksi. Hal ini mendukung pernyataan bahwa pemberian andaliman sebelum induksi/ invasif bakteri ke dalam tubuh merupakan intervensi yang dapat dilakukan sehingga proses inflamasi-infeksi yang disebabkan pertumbuhan bakteri pathogen berbahaya dapat dikendalikan.

Penurunan bakterial load pada kedua kelompok perlakuan andaliman 5 hari dan andaliman 7 hari diperkuat oleh kandungan metabolit skunder buah andaliman alkaloid, saponin, tanin, flavonoid, triterpenoid, steroid yang mampu menekan pertumbuhan bakteri pathogen walaupun pemberian sebelum invasive bakteri (secara preventif). Penurunan bakterial load diikuti penurunan ekspresi mRNA gen CAMP dan sebaliknya peningkatan bakterial load diikuti peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP terlihat jelas pada kelompok kontrol (tanpa andaliman). Artinya bahwa mRNA gen CAMP akan diekspresikan jika tubuh mengalami invasive bakteri dimana kadar ekspresinya akan terus meningkat jika jumlah bakteri semakin banyak di saluran genitalia dan atau terjadi infeksi. Berbeda pada kelompok perlakuan andaliman, bakteri dapat dikendalikan sehingga gen CAMP dapat mengendalikan ekspresi mRNA. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh karena bakteri pathogen GV yang sangat kuat

Metabolik skunder yang terkandung dalam ekstrak buah andaliman mendukung sel-sel hidup dengan cara menutrisi, bekerja dengan fungsi tubuh sehingga tubuh dapat sembuh dan mengatur dirinya. Tubuh berusaha menuju homeostasis sepanjang terdapat sel-sel hidup dan nutrisi. Enzim-enzim yang terkandung dalam buah andaliman akan berinteraksi dengan enzim tubuh dan membiarkan tubuh melakukan pekerjaannya (Baratawidjaja, 2011). Perpaduan metabolik sekunder yang dikandung tanaman bekerja sama melindungi tumbuhan, dan jika dikonsumsi oleh mamalia tetap berkoordinasi menghasilkan efek bagi tubuh. Flavonoid dilaporkan mampu memodulasi mediator inflamasi yang diproduksi oleh makrofag mencit yang sedang terinfeksi. Makrofag yang terinfeksi bakteri menghasilkan spektrum luas sitokin inflamasi dan chemokines. Dua hari pasca infeksi ditandai dengan produksi yang signifikan IL-6, TNF, dan IL-8. Sitokin inflamasi dan kemokin berperan untuk perekrutan dan kemostran dari neutrofil dan leukosit lainnya. Neutrofil memiliki kemampuan untuk hancurkan EBs yang mudah diakses, dan ketika direkrut dalam jumlah besar dilepaskan molekul matrix metalloprotease (MMPs) dan neutrofil elastase yang telah terbukti berkontribusi dalam kerusakan jaringan. Efek fenolik oleh ekstrak buah andaliman diantaranya flavonoid, triterpenoid dan steroid yang menutrisi sel-sel hidup dan bekerja memberi perlawanan pada antigen termasuk pathogen penyebab infeksi (Yilma, 2013). System kekebalan dapat membentuk berbagai macam sel dan molekul yang dapat mengenali dan

menghilangkan mikroorganisme dalam jumlah besar dan bahan-bahan lain yang berbahaya. Pada penelitian ini dapat dikatakan bahwa ekstrak andaliman bekerja langsung pada bakteri dan atau juga meng-aktifkan sel-sel imunitas bekerja sama menekan pertumbuhan bakteri sehingga diperlukan penelitian yang melibatkan sitokin, kemokin dan penanda lainnya sehingga dapat dipelajari lebih jelas terkait efek preventif andaliman terhadap infeksi bakteri.

Dikatakan bahwa Cathelicidin diekspresikan oleh neutrofil dan berbagai macam epitel dengan cara kerja toksisitas langsung pada mikroorganisme yang menyebar secara luas dan mengaktifasi berbagai respon leukosit dan tipe sel lainnya yang memicu penghancuran mikroba. Cathelicidin ditemukan pada lisosom makrofag, leukosit polimorfonuklear (PMN) dan keratinosit. Ekspresi mRNA Gen CAMP merupakan penanda invasive mikroorganisme ke dalam tubuh, berperan penting dalam pertahanan kekebalan bawaan mamalia melawan infeksi bakteri invasif. Peptide ini menunjukkan spektrum aktivitas antimikroba yang luas terhadap bakteri, virus, dan jamur. Selain aktivitas mikrobisida, CAMP/ LL-37 juga memodulasi respon imun, termasuk menginduksi produksi sitokin/ kemokin pada sel fibroblast / epitel dan rekrutmen sel-sel inflamasi. Cathelicidin Antimicrobial Peptide yang disingkat dengan CAMP merupakan peptida antimikroba kationik dan memiliki aktivitas anti bakteri spektrum luas dan memiliki efek imunomodulator. Peptida cathelicidin salah satu dari beberapa keluarga peptida antimikroba yang ditemukan di neutrofil

dan epitel sebagai komponen pertahanan awal mamalia terhadap infeksi. Semua anggota keluarga cathelicidin disintesis dan disimpan dalam sel sebagai protein dua domain. Ini terbagi atas permintaan untuk menghasilkan protein cathelin dan peptida antimikroba. Baik bagian katelin dan peptida C-terminal mengerahkan aktivitas biologis yang terhubung dengan perlindungan tuan rumah. Ulasan ini menyajikan gambaran struktur dan biologi katelicidin dan membahas perkembangan terbaru dalam penelitian catelicidin dengan penekanan pada sifat fungsional dan peran dalam pertahanan tuan rumah dari cathelicidin manusia hCAP18 / LL-37. Teori ini belum dapat dibuktikan dalam penelitian ini, terlihat dari pertumbuhan bakteri GV pada vagina mencit, terjadi peningkatan bacterial load dan ekspresi mRNA gen CAMP pada kelompok kontrol yang menandakan bahwa proses infeksi terus berlangsung. Hal ini memerlukan pembuktian lebih lanjut dimungkinkan replikasi *Gardnerella vaginalis* yang terlalu cepat ataupun ekspresi faktor host.

4.2.2 Efek Pemberian Ekstrak Buah Andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) 2% dosis 0,1 ml/ 10 gram BB/ hari selama 7 hari terhadap Ekspresi mRNA gen CAMP dan Bacterial Load pada balb c yang terinfeksi *Gardnerella vaginalis* transvaginal dan perbandingannya dengan efek metronidazole.

Pada kelompok kuratif juga ditemukan bahwa terjadi perubahan ekspresi mRNA gen CAMP hari ke-1 pasca infeksi. Perubahan ekspresi

mengalami peningkatan signifikan pada kelompok kontrol negative, kelompok perlakuan andaliman, dan kelompok kontrol positif dengan kadar yang sama pada ketiga kelompok (lihat bab hasil Tabel 7 dan grafik 5).

Seperti dikemukakan sebelumnya bahwa peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP terjadi pada kondisi tubuh yang mengalami invasive bakteri. Dosis bakteri yang di-inokulasikan sama pada ketiga kelompok, dan peningkatan kadar ekspresi pun sama. Perubahan kedua terjadi yaitu setelah pemberian therapy andaliman dan metronidazole. Therapy andaliman dan metronidazole selama 7 hari memberikan efek menurunkan ekspresi mRNA gen CAMP. Efek pemberian ekstrak buah andaliman tidak jauh berbeda dengan efek pemberian metronidazole. Perbedaan perubahan pada kelompok kontrol positif (metronidazole) lebih rendah dibandingkan pemberian ekstrak buah andaliman. Artinya bahwa ekstrak buah andaliman memiliki potensi yang mendekati efek metronidazole menekan ekspresi mRNA gen CAMP. Perbedaan perubahan signifikan pada kelompok kontrol negative bahwa ekspresi mRNA gen CAMP terus mengalami peningkatan (lihat bab hasil tabel 8 dan grafik 6). Hasil penelitian menunjukkan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP sejalan dengan perubahan bacterial load. Terjadi penurunan bacterial load pada kelompok kontrol positif (pemberian metronidazole) dan pada kelompok pemberian andaliman 2% dosis 0,1ml/ 10kg BB/ hari selama 7 hari baik jumlah sel bakteri per 10 lapangan pandang, maupun

jumlah koloni yang tumbuh pada cawan petri. Penurunan bakterial load diikuti penurunan ekspresi mRNA gen CAMP. Sedangkan pada kelompok kontrol negative (tanpa andaliman dan metronidazole) terjadi peningkatan bakterial load diikuti peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP. (lihat bab hasil tabel 9, grafik 7 dan tabel 10, grafik 8). Penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak buah andaliman berpotensi antibakteri dan bekerja sebagai bakterisid atau bakteriostatik layaknya metronidazole.

Diketahui dengan pasti bahwa catelicidin antimikrobal peptide diekspresikan dalam jumlah besar oleh epitel/ mukosa. Sistem kekebalan bawaan memberikan respon cepat untuk mengusir serangan dari banyak agen infeksi termasuk bakteri, virus, jamur dan parasit. Komponen utama dari sistem ini adalah kombinasi beragam peptida antimikroba kationik yang mencakup defisiensi α dan β -defensin dan katoda. Mayoritas propeptida CAMP disimpan dalam butiran neutrofil spesifik dan dilepaskan dan diaktifkan di tempat infeksi mikroba. Teori ini persis dibuktikan pada penelitian ini baik preventif maupun kuratif bahwa hari ke-1 pasca inokulasi GV terjadi peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP yang signifikan baik pada kelompok kontrol negative, perlakuan, maupun kelompok kontrol positif. Peningkatan ekspresi mRNA sebagai penanda invasi bakteri ke dalam tubuh dan dalam kadar yang tinggi. CAMP disintesis dan disekresikan dalam jumlah yang signifikan pada jaringan yang terkena mikroba lingkungan termasuk epitel skuamosa pada mulut, lidah, kerongkongan, paru-paru, usus, leher rahim dan vagina. System

imunitas mukosa merupakan bagian system imunitas yang penting dan berlawanan sifatnya dari system imunitas yang lain. System imunitas mukosa lebih bersifat menekan imunitas oleh karena mukosa langsung berhubungan dengan lingkungan luar dan berhadapan dengan banyak antigen yang terdiri dari bakteri komensal, antigen makanan dan virus dalam jumlah yang besar dibandingkan dengan system sistemik. Antigen-antigen tersebut secepat mungkin dicegah agar tidak menempel pada mukosa dengan pengikatan oleh IgA, barrier fisik, kimiawi dan enzim-enzim mukosa. Antigen yang telah menembus mukosa juga dieliminasi dan reaksi imun yang terjadi diatur oleh sel-sel regulator. Hal ini untuk mencegah terjadinya respons imun yang berlebihan yang akhirnya merugikan oleh karena adanya paparan antigen yang sangat banyak. Sekali bakteri GV menginfeksi mukosa vaginal mencit, mukosa genital kaya akan substansi seperti defensin. Respon imunitas tidak terkendali pada kelompok kontrol (tanpa andaliman dan metronidazole) hal ini dimungkinkan oleh patomekanisme infeksi oleh bakteri pathogen ganas *gardnerella vaginalis*. Bakteri anaerob fakultatif GV membentuk toksin (vagynolisin) melekat dan merusak epitel vagina serta dengan cepat berhasil menguasai bahkan melumpuhkan flora normal vagina. Hasil infeksi GV meningkatkan pH an penurunan oksidasi reduksi dan mendukung pertumbuhan anaerob dan penekanan lactobacilli (Schwebke et.al. 2014). Terlihat bahwa kenaikan bacterial load dan ekspresi mRNA gen CAMP dapat dikendalikan tubuh yang sebelumnya diberikan ekstrak

andaliman selama 7 hari (preventif) dan pada kelompok kuratif dikendalikan dengan pemberian terapi baik oleh andaliman maupun metronidazole. Pengendalian ekspresi ini sebagai kerja sel epitel dan mukosa dan efek antibakteri buah andaliman sehingga tubuh dapat menekan peningkatan ekspresi mRNA gen CAMP. Hasil penelitian ini memberikan pesan bahwa invasive bakteri GV mampu melumpuhkan system imunitas sehingga ekosistem vagina dikendalikan oleh patogenitas GV dan bakteri anaerob lainnya menyebabkan infeksi. Oleh karena itu, tubuh memerlukan tindakan preventif dan kuratif salah satunya penggunaan efek tanaman. Terlihat pada kelompok perlakuan andaliman dan kontrol positif bahwa bacterial load dan ekspresi mRNA gen CAMP dapat dikendalikan dan mengalami perubahan penurunan.

Hasil penelitian ini didukung oleh kandungan ekstrak buah andaliman yang merupakan senyawa antibakteri yaitu saponin, tanin, flavonoid, terpenoid, alkaloid, dan steroid. Mekanisme antibakteri senyawa fenolik dan terpenoid adalah merusak struktur dinding sel, mengganggu kerja transport aktif dan kekuatan proton di dalam membran sitoplasma bakteri. Senyawa tersebut akan mendenaturasi dan menginaktifkan protein seperti enzim. Oleh karena itu, dinding sel bakteri akan mengalami kerusakan karena terjadinya penurunan permeabilitas yang memungkinkan terganggunya transport ion-ion organik penting yang akan masuk ke sel bakteri, sehingga dapat mengakibatkan terganggunya

metabolisme atau matinya sel bakteri (Welmince Bota, 2015 urnal.ftumj.ac.id/index.php/semnastek).

Senyawa Saponin dapat merusak membran sitoplasma. Kerusakan pada membran sitoplasma mengakibatkan penurunan permeabilitas membran sel, dan transportasi zat yang tidak terkontrol ke dalam sel akan terlepas dari sel. Zat yang ada di dalam sel seperti enzim ion organik, asam amino dan nutrisi keluar dari sel. Ketika sel melepaskan enzim bersama dengan zat-zat seperti air dan nutrisi menyebabkan terhambatnya metabolisme yang berakibat menurunnya ATP yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel, sehingga menghambat pertumbuhan sel bakteri dan menyebabkan kematian sel. Saponin bisa diharapkan menembus dinding sel. Kemudian mekanisme yang sama diterapkan yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel bakteri. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tannin memiliki aktifitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba juga menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel (Cowan, 1994). Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.

Flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membrane sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Cowan, 1999 ; Nuria et al., 2009 ; Bobbarala, 2012). Selain berperan dalam inhibisi pada sintesis DNA – RNA dengan interkalasi atau ikatan hidrogen dengan penumpukan basa asam nukleat, flavonoid juga berperan dalam menghambat metabolisme energi dengan cara yang mirip dengan menghambat sistem respirasi, karena dibutuhkan energi yang cukup untuk penyerapan aktif berbagai metabolit dan untuk biosintesis makromolekul. Flavonoid juga dapat merusak membran sitoplasma, yang dapat menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menonaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan aktif ke dalam sel, sehingga menyebabkan kematian bakteri.

Efek preventif andaliman terhadap bakteri dan efek kuratif sama-sama sebagai antibakteri GV. Buah andaliman sebagai antibakteri berbeda dengan antibiotik. Andaliman sebagai tanaman dapat digunakan sebelum invasive bakteri dan ataupun sesudah invasive bakteri. Obat herbal terfokus pada penyebab sakit dan butuh waktu menyatu dalam metabolisme tubuh beberapa hari hingga beberapa minggu. Obat tradisional menghasilkan efek samping yang kecil dan bahan mudah didapat, bahkan dapat menetralsir efek samping dari zat aktif yang membahayakan tubuh. Metabolik skunder yang terkandung dalam ekstrak

buah andaliman mendukung sel-sel hidup dengan cara menutrisi, bekerja dengan fungsi tubuh sehingga tubuh dapat sembuh dan mengatur dirinya. Tubuh berusaha menuju homeostasis sepanjang terdapat sel-sel hidup dan nutrisi. Enzim-enzim yang terkandung dalam buah andaliman akan berinteraksi dengan enzim tubuh dan membiarkan tubuh melakukan pekerjaannya (Baratawidjaja, 2011). Sel epitel yang sehat jika diberikan ekstrak buah andaliman akan mengkondisikan gen CAMP stabil. Diketahui dengan jelas efek samping penggunaan metronidazole dan bukan untuk pemberian pra infeksi.

Gen CAMP/ LL-37 secara signifikan diinduksi dalam saluran genital wanita yang didiagnosis positif terinfeksi bakteri. Gen CAMP adalah salah satu protein antimikrobal yang disekresi oleh traktus genitalis; diekspresikan oleh sel mast, subpopulasi monosit dan limfosit, serta sel epitel vagina, serviks, traktus urinarius, dan epididimis. GV adalah patogen yang ganas hidup melekat dan merusak epitel vagina yang memerlukan tindakan baik preventif maupun kuratif. Pernyataan ini sejalan dengan penelitian sebelumnya bahwa konsentrasi total hCAP18/ LL-37 meningkat pada sekresi servikovaskuler dari wanita dengan vaginosis bakteri. Peningkatan hCAP18 / LL-37 mungkin sebagai respons terhadap perubahan flora bakteri, untuk melindungi saluran genital dengan membunuh bakteri secara langsung, atau melalui modulasi pertahanan kekebalan bawaan. Polipeptida antimikroba telah menunjukkan normalisasi setelah pengobatan vaginosis bakteri yang menunjukkan bahwa

perubahan terjadi sebagai tindakan pelindung untuk menanggapi vaginosis bakteri, dan bukan menjadi penyebabnya (Frew et al. 2014).

CAMP disintesis dan disekresikan dalam jumlah yang signifikan pada jaringan yang terkena mikroba lingkungan termasuk epitel skuamosa pada mulut, lidah, kerongkongan, paru-paru, usus, leher rahim dan vagina. Selain itu, CAMP ditemukan pada tingkat signifikan dalam plasma. Ini memiliki beberapa aktivitas penting termasuk bactericidal, anti-sepsis, chemoattraction, dan promosi angiogenesis dan penyembuhan luka. Tikus yang kekurangan CAMP rentan terhadap infeksi kulit dan penyakit defisiensi imun utama manusia termasuk sindrom Kostmann dan defisiensi granul spesifik kekurangan ekspresi CAMP yang menunjukkan peran penting dalam pertahanan inang (Gombart et al. n.d., 2005). BV ditandai dengan pergeseran mikroba dari lactobacilli yang dominan ke lingkungan anaerobik campuran. Anaerob ini berukuran lebih kecil dan jauh lebih banyak daripada lactobacilli, yang menyebabkan area permukaan bakteri meningkat. Sebagian besar AMP memerlukan konsentrasi ambang batas untuk gangguan yang efektif pada membran mikroba dan aktivitas antimikroba yang dihasilkan. diduga bahwa AMP kationik dapat dikeluarkan dari fase fluida dengan mengikat luas permukaan membran bakteri anionik. Mikroba dapat secara langsung menginduksi AMP dan sitokin oleh interaksi makromolekul khas mereka ("pola") dengan reseptor Toll dan sistem pengenalan "pola" lainnya. *G. vaginalis* adalah bakteri gram positif, seperti yang ditunjukkan oleh studi

ultrastruktural dan kurangnya lipopolisakarida, namun kandungan peptidoglikalnya sangat rendah. Karakteristik ini dapat berkontribusi pada kemampuannya untuk menghindari pemicu respons inflamasi yang disebabkan oleh mikroba lain yang menyebabkan infeksi vagina, seperti *Candida albicans*. Juga disarankan agar *G. vaginalis* dapat secara aktif menekan peradangan, namun mekanisme spesifik yang terlibat masih spekulatif. Secara *in vivo*, flora BV nampaknya kurang stimulasi daripada flora normal untuk produksi mediator imun bawaan, dan perbedaan ini direplikasi secara *in vitro* ketika epitel vagina organotipik terpapar pada agen BV *G. vaginalis* dibandingkan dengan *L. jensenii*. Dengan mengurangi rangsangan kekebalan bawaan, BV dapat menghasilkan keadaan immunosupresi lokal yang dapat meningkatkan kerentanan terhadap HIV dan penyakit menular seksual lainnya. Efek CAMP sebagai antimicrobial spectrum luas tidak dapat berinteraksi tunggal pada infeksi patogen GV sehingga memerlukan intervensi antibakteri.

4.2.3 Hubungan antara bacterial load dengan mRNA gen CAMP

Perubahan bacterial load berkorelasi dengan perubahan ekspresi mRNA gen CAMP. Semakin besar penurunan jumlah bakteri setelah terapi, semakin besar penurunan ekspresi mRNA gen CAMP dengan koefisien korelasi sebesar $r = 0,975$. Geraniol acetate (26,51%), Oleic Acid (24,81%) dst adalah kandungan tertinggi ekstrak buah andaliman yang merupakan kelompok triterpenoid. Geraniol merupakan komposisi kimia

dari minyak esensial diselidiki untuk aktivitas antimikroba. Komposisi kimia dari minyak esensial dicapai diperoleh dengan analisis GC-MS. Minyak esensial yang mengandung geraniol (33,2%), **menunjukkan penghambatan terkuat** terhadap strain multi-resisten *A. baumannii*, *K. pneumoniae* dan *S. aureus*, dengan nilai MIC 4.1, 2.05 dan 4.1 mg / ml, masing-masing. (Antonio Rosato, et al 2018); Aktivitas antibakteri dari oleic acid mungkin disebabkan dengan kemampuan senyawa ini untuk mengganggu membran dari sel bakteri dan menyebabkan lisis sel, menjadi menghambat serapan bakteri, atau membentuk peroksida dan radikal bebas lainnya yang menghambat pertumbuhan bakteri. Penambahan molekul potassium ke oleic acid dapat meningkatkan aktivitas bakterisida dari senyawa-senyawa ini (Hinton, Jr.* And Ingram, 2000). Geraniol acetat dibuktikan juga memiliki aktivitas antibakteri oleh Inouye, et al (2001). Formulasi antimikroba yang mengandung minyak geranium, geraniol dan terpineol menunjukkan aktivitas antibakteri dan antijamur yang kuat. Singh, D., Kumar, T R S., Gupta, V., K Chaturvedi, P (2013).

Senyawa aktif antibakteri atau isolat diperoleh diduga merupakan senyawa triterpenoid. Mekanisme antibakteri senyawa triterpenoid umumnya terjadi melalui pengrusakan membran sel bakteri karena sifat senyawa triterpenoid cenderung lipofilik. Kerusakan membran sel dapat terjadi ketika senyawa aktif antibakteri bereaksi dengan sisi aktif dari membran atau dengan melarutkan konstituen lipid dan meningkatkan

permeabilitasnya. Membran sel bakteri terdiri dari fosfolipid dan molekul protein. Akibat peningkatan permeabilitas, senyawa antibakteri dapat masuk ke dalam sel. Ketika di dalam sel, senyawa tersebut dapat melisis membran sel atau mengkoagulasi sitoplasma dari sel bakteri tersebut. Gangguan pada membran sel mengakibatkan terganggunya proses-proses metabolisme dalam membran sel seperti penyerapan nutrisi, produksi energi dan transport elektron. Sifat toksik ekstrak diduga karena adanya senyawa metabolit sekunder, terutama golongan flavonoid. Gugus hidroksil pada flavonoid mampu berikatan dengan protein integral membran sel sehingga mengganggu transpor aktif Na^+ dan K^+ dan Dinding sel bakteri Gram negatif lebih banyak mengandung lipid, sedikit peptidoglikan serta membran luar yang terdiri dari fosfolipid (lapisan dalam) dan lipopolisakarida (lapisan luar) sehingga bersifat nonpolar. Mekanisme kerja senyawa terpenoid sebagai zat antibakteri diduga melibatkan kerusakan membran oleh senyawa lipofilik. Terpenoid dapat bereaksi dengan porin (protein transmembran) pada membrane luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat dan merusak porin, mengurangi permeabilitas dinding sel bakteri sehingga sel bakteri kekurangan nutrisi, pertumbuhan bakteri terhambat atau mati. Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai respon terhadap infeksi mikroba sehingga efektif sebagai zat antibakteri yang ampuh melawan berbagai mikroorganisme. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh kemampuan flavonoid untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler dan

protein terlarut dan membentuk kompleks dengan dinding sel bakteri. Flavonoid lipofilik juga dapat mengganggu membran mikroba. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Ekstrak total dan fraksi etil asetat yang mengandung flavonoid menghasilkan daya antibakteri yang lebih besar dibanding fraksi lain. Senyawa alkaloid bersifat antibakteri, diduga dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri.

Mekanisme aksi flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan mendenaturasi protein dalam sitoplasma sel bakteri dan merusak membran. Flavonoid dapat merusak membran sitoplasma, yang dapat menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menonaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan aktif ke dalam sel, sehingga menyebabkan kematian bakteri. Selain itu, senyawa Saponin dapat merusak membran sitoplasma. Kerusakan pada membran sitoplasma mengakibatkan penurunan permeabilitas membran sel, dan transportasi zat yang tidak terkontrol ke dalam sel dan terlepas dari sel. Zat yang ada di dalam sel seperti enzim ion organik, asam amino dan nutrisi bisa keluar dari sel. Ketika sel melepaskan enzim bersama dengan zat-zat seperti air dan nutrisi dapat menyebabkan terhambatnya metabolisme yang berakibat menurunnya ATP yang dibutuhkan untuk pertumbuhan dan proliferasi sel, kemudian menghambat pertumbuhan sel

bakteri dan menyebabkan kematian sel. Saponin bisa diharapkan menembus dinding sel. Kemudian mekanisme yang sama diterapkan yang menyebabkan penghambatan pertumbuhan sel bakteri. Alkaloid adalah golongan senyawa yang ditemukan pada jamur, memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme dengan mengganggu komponen peptidoglycan dari lapisan dinding sel bakteri dari sel yang tidak sepenuhnya terbentuk, gangguan sintesis peptidoglycan sehingga pembentukan sel tidak sempurna. Situasi ini menyebabkan sel-sel bakteri rentan terhadap lisis, baik fisik atau osmotik dan menyebabkan kematian sel.

Aktivitas antimikroba potensial ditunjukkan oleh minyak geranium, geraniol, dan terpineol. Komponen minyak ini aktif terhadap bakteri patogen Gram-positif dan Gram-negatif. Formulasi antimikroba yang mengandung minyak geranium, geraniol dan terpineol menunjukkan aktivitas antibakteri dan antijamur yang kuat (Singh, D, et al, 2013). Senyawa alkaloid memiliki peran yang sangat besar di dalam bidang kedokteran. Senyawa yang pertama kali diisolasi secara murni adalah morfin. Berbagai obat penting terutama obat syaraf adalah alkaloid. Berbagai doping, bahan obat narkotik, kopi dikonsumsi sehari-hari oleh manusia mengandung alkaloid yakni kafein, coklat adalah alkaloid teobromin. Sebanyak 3000 minyak essensial yang penting untuk kesehatan. Minyak essensial penting melengkapi dan mensintesis sebagai alternatif antibakteri oleh karena senyawa ini tidak menyebabkan efek

samping yang signifikan. Minyak essensial memberikan efek menghambat mikroorganisme. Beberapa penulis banyak menyoroti monoterpen, senyawa ini menggambarkan efek antibakteri merusak struktur lipid bilayers mikro-organisme. Telah dipelajari aktivitas monoterpen terhadap lima bakteri pathogen yang diisolasi dari genitourinaria yang tidak responsif terhadap terapi antibiotik diantaranya *Gardnerella vaginalis*.

BAB V

PENUTUP

5.1 Simpulan

Efek ekstrak buah andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) tidak langsung menurunkan ekspresi mRNA dari gen CAMP tetapi melalui penurunan bakterial load baik pada pemakaian sebelum infeksi GV (preventif) maupun pemakaian sesudah infeksi (kuratif) dengan bukti sebagai berikut:

1. Sebelum pemberian infeksi, andaliman ditemukan tidak terbukti berefek pada mRNA gen CAMP.
2. Setelah pemberian infeksi, andaliman menurunkan bakteri dan diikuti oleh penurunan ekspresi mRNA gen CAMP.
3. Korelasi antara penurunan bakterial load (-), semakin menurun bakterial load maka semakin menurun ekspresi mRNA gen CAMP.

Ekstrak Buah andaliman memberikan efek sebagai antibakteri GV pada mencit balb/c. Antibakteri yaitu menekan bakterial load diikuti penurunan ekspresi mRNA gen CAMP. Tidak jauh berbeda dengan efek metronidazole yang bersifat bakterisid terhadap *gardnerella vaginalis*. Semakin besar penurunan bakterial load, maka semakin besar penurunan ekspresi gen CAMP..

5.2 Saran

- 5.2.1 Perlunya penelitian lanjutan efek bakterisid atau bakterisidal ekstrak buah andaliman terhadap bakteri *Gardnerella vaginalis*.
- 5.2.2 Perlunya dilakukan penelitian lanjutan secara uji klinis terkait dengan efek buah andaliman sebagai antibakteri khususnya yang disebabkan oleh *gardnerella vaginalis* yaitu pada kasus bakterial vaginosis
- 5.2.3 Implementasi asuhan kebidanan pada pelayanan kesehatan reproduksi perempuan pemanfaatan buah andaliman sebagai herbal tradisional yang berpotensi antiinflamasi, immunomodulator dan antibakteri
- 5.2.4 Pengembangan buah andaliman menjadi herbal tradisional sebagai antiinflamasi, immunomodulator dan antibakteri

DAFTAR PUSTAKA

- Aditama, T.Y., 2011. *Pedoman Nasional Penanganan Infeksi Menular Seksual*, Kementerian Kesehatan RI, Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit Dan Penyehatan Lingkungan.
- Antonio Rosato, et all. 2018. Journal of essential oil.
- Artini P.E.U.D, Astuti, K.W, Marditiani.N.K.Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Rimpang bangle (Zingiber Purpureum Roeb).2013.Jurnal Farmasi Udayana.
- Arthur Hinton, Jr.* And Kimberly D. Ingram, 2000, use Of Oleic Acid To Reduce The Population Of The Bacterial Flora Of Poultry Skin .
- Astriningrum, R. Et Al., 2015. Vaginosis Bakterial Sesuai Kriteria Amsel. *Departemen Ilmu Kesehatan Kulit Dan Kelamin FK Universitas Indonesia/RSUPN Dr. Cipto Mangunkusumo, Jakarta, (71)*, Pp.54–60.
- Atashili, J. Et Al., 2009. Bacterial Vaginosis And HIV Acquisition: A Meta-Analysis Of Published Studies. *Aids, 22(12)*, Pp.1493–1501.
- Babu, B.R. Et Al., 2007. Note A New Flavone Glycoside From *Zanthoxylum Acanthopodium* DC. , 46(May), Pp.872–874.
- Bautista, C.T. Et Al., 2016. Bacterial Vaginosis : A Synthesis Of The Literature On Etiology , Prevalence , Risk Factors , And Relationship With Chlamydia And Gonorrhoea Infections. *Military Medical Research*, Pp.1–10. Available At: [Http://Dx.Doi.Org/10.1186/S40779-016-0074-5](http://dx.doi.org/10.1186/S40779-016-0074-5).
- Boris, J. Et Al., 1998. Six Years Observation After Successful Treatment Of Bacterial Vaginosis. *Infectious Diseases In Obstetrics And Gynecology*, 302(August 1997), Pp.297–302.
- Brotman, R.M. Et Al., 2010. Bacterial Vaginosis Assessed By Gram Stain And Diminished Colonization Resistance To Incident Gonococcal, Chlamydial, And Trichomonal Genital Infection. *The Journal Of Infectious Diseases*, 202(12), Pp.1907–1915. Available At: [Https://Academic.Oup.Com/Jid/Article-Lookup/Doi/10.1086/657320](https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/657320).
- Catlint, B.W., 1992. *Gardnerella Vaginalis*: Characteristics , Clinical Considerations , And Controversies. , 5(3), Pp.213–237.
- Cauci, S. Et Al., 1998. Immunoglobulin A Response Against *Gardnerella*

Vaginalis Hemolysin And Sialidase Activity In Bacterial Vaginosis. *American Journal Of Obstetrics And Gynecology*, 178(3), Pp.511–515.

Christy N. Marrsa, Susan M. Knobela, Wen Qin Zhua, Stephanie D. Sweetb, A.R. & Chaudhryb, And D.J.A., 2013. Evidence For Gardnerella Vaginalis Uptake And Internalization By Squamous Vaginal Epithelial Cells: Implications For The Pathogenesis Of Bacterial Vaginosis. *Microbes Infect . Author Manuscript; Available In PMC*, 14(6), Pp.500–508.

Cohen, C.R. Et Al., 2012. Bacterial Vaginosis Associated With Increased Risk Of Female-To-Male HIV-1 Transmission: A Prospective Cohort Analysis Among African Couples. *Plos Medicine*, 9(6), P.18.

Devi, O.Z., Rao, K.S., Bidalia, A., Et Al., 2015. GC-MS Analysis Of Phytocomponents And Antifungal Activities Of Zanthoxylum Acanthopodium DC . Collected From Manipur , India. *European Journal Of Medicinal Plants*, 10(May 2014), Pp.1–9.

Devi, O.Z., Rao, K.S. & Bidalia, A., 2015. Title Of The Article: Characterization Of Chemical Constituents In Zanthoxylum Acanthopodium D.C. Leaf Using Gc-Ms. *Indo American Journal Of Pharmaceutical Research*, 5(5).

Dukes, C.D. & Gardner, H.L., 1960. Identification Of Haemophilus Vaginalis1. , (Figure 1).

Frew, L. Et Al., 2014. Human Cathelicidin Production By The Cervix. *Plos One*, 9(4), Pp.1–10.

Gelber, S.E. Et Al., 2008. Functional And Phylogenetic Characterization Of Vaginolysin , The Human-Specific Cytolysin From Gardnerella Vaginalis □ †. *Journal Of Bacteriology*, 190(11), Pp.3896–3903.

Gilbert, N.M., Lewis, W.G. & Lewis, A.L., 2013. Clinical Features Of Bacterial Vaginosis In A Murine Model Of Vaginal Infection With Gardnerella Vaginalis. *Plos One*, 8(3). Available At: [Www.Plosone.Org](http://www.plosone.org).

Gombart, A.F., Borregaard, N. & Koeffler, H.P., 2005. Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide (CAMP) Gene Is A Direct Target Of The Vitamin D Receptor And Is Strongly Up-Regulated In Myeloid Cells By 1 , 25- Dihydroxyvitamin D 3. *The FASEB Journal*, (14), Pp.1067–1077.

- Greenwood, J.R., Pickett, M., 1979. Salient Features Of Haemophilus Vaginalis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 9(2), Pp.200–204.
- Gultom, S., 2011. Flavonoid Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) Sebagai Antioksidan Dan Inhibitor A-Glukosidase.
- Gupta, D. Das & Mandi, S. Sen, 2013. Species Specific AFLP Markers For Authentication Of Zanthoxylum Acanthopodium & Zanthoxylum Oxyphyllum. *Journal Of Medicinal Plants Studies*, 1, Pp.1–9.
- Hamil, P.I.B.U. & Juan, A., 2008. Artikel Karya Tulis Ilmiah Reliabilitas Eksterna Pemeriksaan Smear Vagina Dengan Kriteria Spiegel Dalam Mendiagnosis. , Pp.1–23.
- Hasairin, A., 2014. Variasi , Keunikan Dan Ragam Makanan Adat Etnis Batak Toba Suatu Kajian Prospek Etnobotani. *JURNAL Pengabdian Kepada Masyarakat*, 20, Pp.21–26.
- Haugh, L.B. Et Al., 1981. An Improved to Measure tele-Methylhistamine. *Journal of Pharmacologycal*
- Hawk, C.T. Et Al., *Formulary For Laboratory Animals Compiled By,*
- Hoffmann, R. Et Al., 2012. Oncocin Derivative Onc72 Is Highly Active Against Escherichia Coli In A Systemic Septicaemia Infection Mouse Model. , (June), Pp.2445–2451.
- Inouye, S., Takizawa, T., Yamaguchi, H. 2001. Antibacterial activity of essential oils and thair Major Constituents againts respiratory tract pathogen by gaseous Contact. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.
- Jn, A., 2005. Pengaruh Ekstrak Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodlum DC) Terhadap Kerusakan Sel Bacillus Cereus. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 3(1), Pp.85–96.
- Kadri, A, D., 2015. Perbedaan Cara Penyebaran Suspensi Terhadap Jumlah Bakteri Pada Media Eosin Methylene Blue Agar (Difference Method To Total Bacteria Spreading In Suspension Emba. *Indonesia Medicus Veterinus*, 4(3), Pp.205–212.
- Karim, A. & Barakbah, J., 2014. Studi Retrospektif: Vaginosis Bakterial (Retrospective Study : Bacterial Vaginosis). *Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit Dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga/Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo*

Surabaya, 5.

- Kristanty, R.E. & Im, A.M.U.N., 2012. Isolation Of Antioxidant And Xanthine Oxidase Inhibitor From N -Butanol Extract Of Andaliman Fruit (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC). *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2(3), Pp.376–389.
- Kristanty, R.E. & Suriawati, J., 2014. Cytotoxic And Antioxidant Activity Of Petroleum Extract Of Andaliman Fruits (*Z Anthoxylum Acanthopodium* DC). *International Journal Of Pharm Tech Research CODEN (USA): IJPRIF*, 6(3), Pp.1064–1069.
- Lenny, S., 2006. Senyawa Flavonoida , Fenilpropanoida, Dan Alkaloida. *USU Repository*.
- Marlinda, M., Sangi, MS., Wuntu, AD. Analisis Senyawa Metabolit Sekunder dan Uji Toksisitas Ekstrak Etanol Biji Buah Alpukat (*Persea americana* mill). *Journal mipa Unsrat online* 1 (1) 24-28.
- Masyithah, C., Hadisahputra, S. & Ilyas, S., 2015. Combinational Effects Of Ethylacetate Extract Of *Zanthoxylum Acanthopodium* DC. With Doxorubicinon MCF7 Breast Cancer Cells. *International Journal Of Pharmtech Research*, 7(4), Pp.651–653.
- Meutia, Y.R., Wardayanie, NIA, Rienoviar, Mahardini, T., Wirayan., I. 2015. Pengaruh suhu dan waktu maserasi terhadap komponen volatil yang terlibat pada ekstraksi andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) *warta IHP/ Journal of agro-based industry* vol.32 (No.1) 07, 9-15.
- Miftakhurohmah., Suhirman, S., B., 2009. Potensi Andaliman Sebagai Sumber Antioksidan Dan Antimikroba Alami. *Warta Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Industri*, 15(2), Pp.8–10.
- Moektiwardoyo, M., Muchtaridi, M. & Halimah, E.L.I., 2014. (*Zanthoxylum Acanthopodium* Dc) Essential Oil On Mice. *International Journal Of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, 6(2).
- Monahan, K.C., Steinberg, L. & Mulvey, E.P., 2010. Eludation Of The Molecular *Mecanism* Of Action Of The Natural Antimicrobial Peptide Subtilosin Againts The Bacterial Vaginosis-Associated Pathogen *Gardnerella Vaginalis*. *Human Development*, 45(6), Pp.1654–1668.
- Muzafri et.al.2018. The Extraction of Antimicrobials Component of andaliman (*Zanthoxylum acanthopodium* DC) and its aplication on Catfish (*Pangasius Sutch*) Fillet. Open acces .IOP Conference Serie Earth and Environmental Science.

- Negi, J.S. Et Al., 2011. Chemical Constituents And Biological Activities Of The Genus *Zanthoxylum*: A Review. *African Journal Of Pure And Applied Chemistry*, 5(12), Pp.412–416.
- Nguyen, P. V. Et Al., 2014. Innate And Adaptive Immune Responses In Male And Female Reproductive Tracts In Homeostasis And Following HIV Infection. *Cellular And Molecular Immunology*, 11(5), Pp.410–427. Available At: [Http://Dx.Doi.Org/10.1038/Cmi.2014.41](http://dx.doi.org/10.1038/Cmi.2014.41).
- Numanović, F. Et Al., 2008. Importance Of Isolation And Biotypization Of *Gardnerella Vaginalis* In Diagnosis Of Bacterial Vaginosis. *Bosnian Journal Of Basic Medical Science*, 8(3), Pp.270–276.
- Ocviyanti, D. Et Al., 2010. Risk Factors For Bacterial Vaginosis Among Indonesian Women. *Med J Indones*, P.130.
- Oo, O., Ri, A. & Ft, O., 2009. The Effects Of Antimicrobial Therapy On Bacterial Vaginosis In Non-Pregnant Women (Review) The Effects Of Antimicrobial Therapy On Bacterial Vaginosis In Non-Pregnant Women. *The Cochrane Collaboration*, (3), Pp.3–5.
- Parhusip, A., Yasn, S., Elisabeth, Y., 2003. Kajian Metode Ekstraksi Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) Terhadap Mikroba Patogen Dan Perusak Pangan. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 1(1), Pp.112–123.
- Parhusip, Adolf, Betty Sri Laksmi, Dkk, 2005. Pengaruh Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) Terhadap Ermeabilitas Dan Hidrofobisitas *Bacillus Cereus*. *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, XVI(1).
- Parhusip, A., 2004a. Aktifitas Antibakteri Ekstrak Andaliman Pada Fase Pertumbuhan Bakteri Patogen (Antibacterial Activity From Andaliman Extract During Growth Phase Of Pathogenic Bacteria). *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 2(1), Pp.41–53.
- Parhusip, A., 2004b. Pengaruh Ekstrak Andaliman Terhadap Hidrofobisitas Bakteri *B. Cereus*, *S. Aureus* Dan *S. Typhimurium*. *Jurnal Ilmu Dan Teknologi Pangan*, 2(2), Pp.23–32.
- Parhusip, A.J.N., 2006. Kajian Mekanisme Antibakteri Ekstrak Andaliman (*Zanthoxylum Acanthopodium* DC) Terhadap Bakteri Patogen Pangan.
- Pebody, R. Et Al., 2011. Vaginosis Bakteri Meningkatkan Risiko

Perempuan Untuk Menularkan HIV.

Piot, P. Et Al., 1982. Identification Of Gardnerella (Haemophilus) Vaginalis. *Journal Of Clinical Microbiology*, 15(1), Pp.19–24.

Prasetiawan E, Sabri E, I.S., 2012. Gambaran Histologis Hepar Mencit (Mus Musculus L.) Strain DDW Setelah Pemberian Ekstrak N-Heksan Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC.) Selama Masa Pra Implantasi Dan Pasca Implantasi.

Pudjiati, S.R., 2010. Mechanism Of Host Defense In Genital Area. , Pp.22–36.

Pujiastuti, A.T. & Mustiatutik, D., 2011. Studi Retrospektif: Vaginosis Bakterial (A Retrospective Study: Bacterial Vaginosis). *Departemen/Staf Medik Fungsional Ilmu Kesehatan Kulit Dan Kelamin Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Rumah Sakit Umum Daerah Dr. Soetomo, Jl. Mayjen Prof. Dr. Moestopo No. 6-8 Surabaya 60131, Indonesia*, Pp.127–133.

R.S, P.L.W. Et Al., 2008. Case Reports Gardnerella Vaginalis Bacteremia In A Previously Healthy Man : Case Report And Characterization Of The Isolate □. *Journal Of Clinical Microbiology*, 46(2), Pp.804–806.

Rottini, G. Et Al., 1990. Identification And Partial Characterization Of A Cytolytic Toxin Produced By Gardnerella Vaginalis. *Infection And Immunity*, 58(11), Pp.3751–3758.

Romero I, Gonzalez, D.L.G., Ruiz, R.A., Morales MT. 2015. Validation of SPME-GCMS Method for the Analysis of virgin olive oil volatile responsible for sensory defects *Talanta* 134, 394-401.

Roy A. Sparringa, 2014. Peraturan Kepala Badan Pengawas Obat Dan Makanan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2014 Tentang Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik Secara In Vivo.

Sabri, E., 2007. Efek Perlakuan Ekstrak Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium) Pada Tahap Praimplantasi Terhadap Fertilitas Dan Perkembangan Embrio Mencit (Mus Musculus). *Jurnal Biologi Sumatera*, 2(2), Pp.28–32.

Sarah, M. & Sabri, E., 2012. Kelainan Perkembangan Kraniofacial Fetus Mencit (Mus Musculus L .) Strain DDW Setelah Pemberian Ekstrak N- Heksan Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC .).

Schwebke, J.R., Muzny, C.A. & Josey, W.E., 2014. Role Of Gardnerella

Vaginalis In The Pathogenesis Of Bacterial Vaginosis : A Conceptual Model. *The Journal Of Infectious Diseases*, 210.

Selastrri, A., Sjahril, R., Soraya, D., Faktor Risiko Mobilincus Sp Penyebab Bacterial Vaginosis Pada Perempuan Di Makassar.

Samuelsson, R., Nilson, C., Bulvall, Jan. 2006. Biomass and Bioenergi 30 (11) 923-928 Sampling and CTC, ms as a method for analysis of Volatil Organic Compounds (VOC) Emitted during oven drying of Biomass Matherials.

Siahaan, T.S.R., 2013. Potensi Ekstrak Andaliman Zanthoxylum Acanthopodium DC Sebagai Alternatif Inhibitor Korosi Baja. *Repository.Upi.Edu*, Pp.34–39.

Singh, D., Kumar, T R S., Gupta, V., K Chaturvedi, P (2013). Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulations, *Indian Journal of experimental Biology (IJEB)*, Vol 50 (10) 2012.

Sihotang, Y., Silalahi, J. & Anjelisa, P., 2016. Cardioprotective Effect Of Ethylacetate Extract Of Zanthoxylum Acanthopodium Dc . Against Doxorubicin- Induced Cardiotoxicity In Rats. *International Journal Of Pharmtech*, 9(4), Pp.249–253.

Sirait, L.I. Et Al., 2017. Animal Modeling Try Strain Balb / C Mice With Gardnerella Vaginalis. *Internasional Journal Of Sciences: Basic And Applied Research (IJSBAR)*, 4531, Pp.261–267.

Siregar, B. Lamria, 2012. Potensi Andaliman.Pdf. In *Majalah Ilmiah Media UNIKA*. Sumatera Utara: Niversitas Katolik Santo Thomas, Pp. 124–132.

Siregar, B.L., 2003. Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC .) In North Sumatra : Description And Germination. *Hayati*, 10(1), Pp.38–41.

Strzałkowska, N. & Jo, A., 2012. Cathelicidins : Family Of Antimicrobial Peptides . A Review. *Mol Biol Rep*, Pp.10957–10970.

Sumi, C.D. Et Al., 2015. Antimicrobial Peptides Of The Genus *Bacillus* : A New Era For Antibiotics. *Canadian Journal Of Microbiology*, 61(2), Pp.93–103. Available At: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/cjm-2014-0613>.

Suryanto, E. Et Al., 2004. Antiradical Activity Of Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC) Fruit Extract.

- Tanphaichitr, N. Et Al., 2016. Potential Use Of Antimicrobial Peptides As Vaginal Spermicides/Microbicides. *Pharmaceuticals*, 9(1).
- Teixeira, G.S. Et Al., 2012. Characteristics Of Lactobacillus And Gardnerella Vaginalis From Women With Or Without Bacterial Vaginosis And Their Relationships In Gnotobiotic Mice. *Journal Of Medical Microbiology*, 61(May), Pp.1074–1081.
- Tensiska, Wijaya, C.H. & Andarwulan, N., 2003. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium Dc) Dalam Beberapa Sistem Pangan Dan Kestabilan Aktivasnya Terhadap Kondisi Suhu Dan Ph [Antioxidative Activity Of Andaliman Fruit Extract (Z . Acanthopodium DC .) On Several F. *Journal Teknol. Dan Industri Pangan*, XIV(1).
- Valore, E. V, Wiley, D.J. & Ganz, T., 2006a. Reversible Deficiency Of Antimicrobial Polypeptides In Bacterial Vaginosis. , 74(10), Pp.5693–5702.
- Valore, E. V, Wiley, D.J. & Ganz, T., 2006b. Reversible Deficiency Of Antimicrobial Polypeptides In Bacterial Vaginosis. *Infection And Immunity, American Society For Microbiology*, 74(10), Pp.5693–5702.
- Vodstrcil, L.A. Et Al., 2017. The Influence Of Sexual Activity On The Vaginal Microbiota And Gardnerella Vaginalis Clade Diversity In Young Women. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/Journal.Pone.0171856, Pp.1–15.
- Waheed, A. Et Al., 2011. Studies On The Components Of Essential Oil Of Zanthoxylum Armatum By GC-MS. *American Journal Of Analytical Chemistry*, 2(May), Pp.258–261.
- Widiastuti, B., 2000. Aktivitas Antioksidan Dan Immunostimulan Ekstrak Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium Dc.).
- Wijaya, C., 1999. Telaah Ringkas Rempah-Rempah Tradisional Andaliman, Rempah Tradisional Sumatera Utara Dengan Aktivitas Antioksidan Dan Antimikroba.
- Wijaya, C. Hann., Hadiprodjo, I.T. & Apriyantono, A., 2001. Komponen Volatil Dan Karakterisasi Komponen Kunci Aroma Buah Andaliman (Zanthoxylum Acanthopodium DC.). *Jurnal Teknologi Dan Industri Pangan*, XII(2).

- Wilson, J. & Barratt, A., 1986. *An Unusual Case Of Gardnerella Vaginalis Septicaemia Red Cell Morphology At High Altitude*,
- Wira, C., Patel, M. & Ghosh, M., 2011. Innate Immunity In The Human Female Reproductive Tract: Endocrine Regulation Of Endogenous Antimicrobial Protection Against HIV And Other Sexually Transmitted Infections. , 65(3). Available At: [Http://Onlinelibrary.Wiley.Com/Doi/10.1111/J.1600-0897.2011.00970.X/Full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0897.2011.00970.x/full).
- Yang, G. Et Al., 2015. The Etiology Of Vaginal Symptoms In Rural Haiti. *Int J STD AIDS*, 344(6188), Pp.1173–1178.
- Yanti Et Al., 2011. Lemon Pepper Fruit Extract (Zanthoxylum Acanthopodium DC.) Suppresses The Expression Of Inflammatory Mediators In Lipopolysaccharide-Induced Macrophages In Vitro. *American Journal Of Biochemistry And Biotechnology*, 7(4), Pp.190–195.
- Yarbrough, V.L., Winkle, S. & Herbst-Kralovetz, M.M., 2015. Antimicrobial Peptides In The Female Reproductive Tract: A Critical Component Of The Mucosal Immune Barrier With Physiological And Clinical Implications. *Human Reproduction Update*, 21(3), Pp.353–377.
- Yilma, A.N., Sigh, SR., Moricil.L., Dennis V.A. 2013. Flavonoid Naringenin: A Potential Immunomodulator for Chlamydia Trachomatis Inflammation. Hindawi Publishing Corporation Mediators of Inflammation, Volume 2013. article ID 102457.
- Yevgeniy Turovskiy, Katia Sutyak Noll, And M.L.C., 2012. THE ETIOLOGY OF BACTERIAL VAGINOSIS. *NIH Public Access Author Manuscript J Appl Microbiol.*, 110(5), Pp.1105–1128.
- Yuniarti, L. Et Al., 2016. GARDNERELLA VAGINALIS ATCC 14018 RESISTANT TO METRONIDAZOL AND SOURSOP LEAVES (ANNONA MURICATA LINN) PREPARATION. *European Journal Of Pharmaceutical And Medical Research*, 3(3), Pp.1–9.
- Zahra, A., Fateme, G. & Mohamadreza, A., 2010. Comparison Of The Effectiveness Of Vitamin C Vaginal Tablet With Metronidazole Vaginal Gel In The Treatment Of Bacterial Vaginosis. *African Journal Of Pharmacy And Pharmacology*, 4(July), Pp.484–489.

Perhitungan Mean ekspresi mRNA CAMP

GROUP Kuratif	Sampel	Ekspresi	Mean	Sampel	Ekspresi	Mean	Sampel	Ekspresi	Mean
Negatif Kontrol	A01	4,90761	5,185082	B01	8,47666	8,151218	D01	10,85693	10,26762
	A02	5,30044		B02	7,84312		D02	10,05601	
	A03	5,21581		B03	7,97389		D03	9,94533	
	A04	5,31647		B04	8,31121		D04	10,21220	
Perlakuan	A06	5,20641	5,109652	B06	8,06373	8,168341	D06	6,15819	6,112244
	A07	5,02838		B07	8,44080		D07	6,01669	
	A08	4,91721		B08	8,14557		D08	6,33315	
	A10	5,28661		B10	8,02326		D10	5,94094	
Positif Kontrol	A11	5,29590	5,134826	B11	8,34829	8,169223	D11	4,98511	5,133902
	A12	5,14123		B12	8,07897		D12	5,21672	
	A24	5,13736		B24	8,11867		D24	5,12701	
	A05	4,96481		B05	8,13095		D05	5,20677	
GROUP PREVENTIF	Sampel	Ekspresi	Mean	Sampel	Ekspresi	Mean	Sampel	Ekspresi	Mean
Kontrol	A23	5,17068	5,173514	B23	5,35864	5,254603	D23	8,06100	8,1798
	A09	5,21253		B09	5,38230		D09	8,15237	
	A25	5,12067		B25	5,19401		D25	8,25484	
	A21	5,19019		B21	5,08346		D21	8,25100	
Andaliman 5 hari	A17	5,18679	5,086114	B17	4,96934	5,101425	D17	6,45501	6,623029
	A13	4,94013		B13	5,15659		D13	6,59470	
	A14	5,20481		B14	5,03561		D14	6,65356	
	A15	5,01273		B15	5,24416		D15	6,78884	
Andaliman 7 hari	A16	5,23976	5,085	B16	5,11631	5,064271	D16	5,66274	5,857853
	A18	4,98435		B18	5,10001		D18	6,37158	
	A19	4,82766		B19	5,01615		D19	5,67080	
	A20	5,28823		B20	5,02462		D20	5,72630	

Perhitungan Mean Coloni Count (kultur)

GROUP Kuratif	Sampel	KC	Mean	Sampel	KC	Mean	Sampel	KC	Mean
Negatif Kontrol	A01	0	0	B01	45	44	D01	102	105
	A02	0		B02	48		D02	95	
	A03	0		B03	43		D03	125	
	A04	0		B04	40		D04	98	
Perlakuan	A06	0	0	B06	47	44,25	D06	19	21,25
	A07	0		B07	42		D07	22	
	A08	0		B08	46		D08	25	
	A10	0		B10	42		D10	19	
Positif Kontrol	A11	0	0	B11	45	43,25	D11	7	6,5
	A12	0		B12	38		D12	8	
	A24	0		B24	47		D24	5	
	A05	0		B05	43		D05	6	
GROUP PREVENTIF	Sampel	KC	Mean	Sampel	KC	Mean	Sampel	KC	Mean
Kontrol	A23	0	0	B23	44	45	D23	105	109,75
	A09	0		B09	50		D09	110	
	A25	0		B25	45		D25	108	
	A21	0		B21	41		D21	116	
Andaliman 5 hari	A17	0	0	B17	23	22,5	D17	26	23,75
	A13	0		B13	24		D13	23	
	A14	0		B14	22		D14	22	
	A15	0		B15	21		D15	24	
Andaliman 7 hari	A16	0	0	B16	18	18,5	D16	5	6,25
	A18	0		B18	16		D18	4	
	A19	0		B19	20		D19	9	
	A20	0		B20	20		D20	7	

Hasil hitung Bacterial

Kelompok	No	Sampel	H0	H1-a	b	c	Rata-rata	Mean kelp	H2-a	b	c	Rata-rata	Mean kelp
Kontrol Negatif	1	1	0	43	40	49	44	42	98	103	123	108	96,92
	2	2	0	43	40	40	41		97	88	83	89	
	3	3	0	38	36	31	35		116	81	87	95	
	4	4	0	44	49	56	50		35	70	182	96	
Andaliman 2%	1	6	0	39	34	34	36	42	21	15	15	17	15,67
	2	7	0	45	30	33	37		19	11	15	15	
	3	8	0	58	55	48	45		13	13	10	12	
	4	10	0	49	49	45	50		21	16	19	19	
Kontrol Positif	1	11	0	45	35	32	42	40	18	13	9	13	11
	2	12	0	40	50	44	40		19	10	10	13	
	3	24	0	32	30	31	38		10	8	8	9	
	4	5	0	52	35	40	41		8	8	11	9	

Kelompok	No	Sampel	H0	H1-a	b	c	Rata-	Mean	H2-a	b	c	Rata-	Mean
----------	----	--------	----	------	---	---	-------	------	------	---	---	-------	------

							rata	kelp				rata	kelp
Kontrol Negatif	1	23	0	23	89	21	44	48	169	173	175	172	99
	2	9	0	40	59	51	50		87	71	71	76	
	3	25	0	42	42	42	42		69	69	78	72	
	4	21	0	64	76	32	57		72	73	75	73	
Andaliman 5 hari	1	17	0	40	40	26	35	41	10	10	10	10	14,25
	2	13	0	34	39	72	48		21	20	20	20	
	3	14	0	47	39	45	44		20	14	14	16	
	4	15	0	39	39	33	37		12	10	10	11	
Andaliman 7 hari	1	16	0	39	39	23	34	34,58	7	10	7	8	7,58
	2	18	0	39	39	48	42		7	4	4	5	
	3	19	0	34	31	29	31		9	4	9	7	
	4	20	0	25	32	37	31		9	12	9	10	

Plate1	
Sample	ER Mean
A01	4,90761
B01	8,47666
D01	10,85693
A02	5,30044
B02	7,84312
D02	10,05601
A03	5,21581
B03	7,97389
D03	9,94533
A04	5,31647
B04	8,31121
D04	10,21220
A06	5,20641
B06	8,06373
D06	6,15819
A07	5,02838
B07	8,44080
D07	6,01669

Plate2	
Sample	ER Mean
A08	4,91721
B08	8,14557
D08	6,33315
A10	5,28661
B10	8,02326
D10	5,94094
A05	4,96481
B05	8,13095
D05	5,20677
A11	5,29590
B11	8,34829
D11	4,98511
A12	5,14123
B12	8,07897
D12	5,21672
A24	5,13736
B24	8,11867
D24	5,12701

Plate3	
Sample	ER Mean
A09	5,21253
B09	5,38230
D09	8,15237
A21	5,19019
B21	5,08346
D21	8,25100
A23	5,17068
B23	5,35864
D23	8,06100
A25	5,12067
B25	5,19401
D25	8,25484
A13	4,94013
B13	5,15659
D13	6,59470
A14	5,20481
B14	5,03561
D14	6,65356

Plate4	
Sample	ER Mean
A15	5,01273
B15	5,24416
D15	6,78884
A17	5,18679
B17	4,96934
D17	6,45501
A16	5,23976
B16	5,11631
D16	5,66274
A18	4,98435
B18	5,10001
D18	6,37158
A19	4,82766
B19	5,01615
D19	5,67080
A20	5,28823
B20	5,02462
D20	5,72630

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Template	Log Template	Slope (dR)	Exp. mRNA
A01	SYBR	GAPDH	Std-01	Standard	23,17	23,15	0,059	1,98E+01	1,297	1,99E+01	0,0585947	50,00000	1,69897	-3,377	14,0925783
A02	SYBR	GAPDH	Std-01	Standard	23,08	23,15	0,059	1,99E+01	1,299	1,99E+01	0,0585947	50,00000	1,69897	-3,377	14,1825783
A03	SYBR	GAPDH	Std-01	Standard	23,19	23,15	0,059	1,98E+01	1,297	1,99E+01	0,0585947	50,00000	1,69897	-3,377	14,0725783
A04	SYBR	CAM	Unkn-01	A01	32,51	32,36	0,248	1,05E+01	1,021	1,06E+01	0,2484619	49,94200	1,69847	-3,377	4,75428
A05	SYBR	CAM	Unkn-01	A01	32,07	32,36	0,248	1,09E+01	1,039	1,06E+01	0,2484619	49,94200	1,69847	-3,377	5,19428
A06	SYBR	CAM	Unkn-01	A01	32,49	32,36	0,248	1,05E+01	1,022	1,06E+01	0,2484619	49,94200	1,69847	-3,377	4,77428
A07	SYBR	CAM	Unkn-02	B01	28,81	28,81	0,135	1,42E+01	1,152	1,42E+01	0,1350309	49,07400	1,69085	-3,377	8,47999
A08	SYBR	CAM	Unkn-02	B01	28,95	28,81	0,135	1,41E+01	1,148	1,42E+01	0,1350309	49,07400	1,69085	-3,377	8,33999
A09	SYBR	CAM	Unkn-02	B01	28,68	28,81	0,135	1,43E+01	1,156	1,42E+01	0,1350309	49,07400	1,69085	-3,377	8,60999
A10	SYBR	CAM	Unkn-03	D01	26,91	26,40	0,439	1,61E+01	1,207	1,66E+01	0,4389001	50,07900	1,69966	-3,377	10,35026
A11	SYBR	CAM	Unkn-03	D01	26,16	26,40	0,439	1,68E+01	1,226	1,66E+01	0,4389001	50,07900	1,69966	-3,377	11,10026
A12	SYBR	CAM	Unkn-03	D01	26,14	26,40	0,439	1,69E+01	1,227	1,66E+01	0,4389001	50,07900	1,69966	-3,377	11,12026
B01	SYBR	GAPDH	Std-02	Standard	25,04	25,14	0,092	1,80E+01	1,254	1,79E+01	0,0916515	25,00000	1,39794	-3,377	13,23915659
B02	SYBR	GAPDH	Std-02	Standard	25,22	25,14	0,092	1,78E+01	1,250	1,79E+01	0,0916515	25,00000	1,39794	-3,377	13,05915659
B03	SYBR	GAPDH	Std-02	Standard	25,16	25,14	0,092	1,78E+01	1,251	1,79E+01	0,0916515	25,00000	1,39794	-3,377	13,11915659
B04	SYBR	CAM	Unkn-04	A02	31,85	31,97	0,132	1,12E+01	1,047	1,10E+01	0,1320353	49,84600	1,69763	-3,377	5,41710
B05	SYBR	CAM	Unkn-04	A02	32,11	31,97	0,132	1,09E+01	1,037	1,10E+01	0,1320353	49,84600	1,69763	-3,377	5,15710
B06	SYBR	CAM	Unkn-04	A02	31,94	31,97	0,132	1,11E+01	1,044	1,10E+01	0,1320353	49,84600	1,69763	-3,377	5,32710
B07	SYBR	CAM	Unkn-05	B02	29,29	29,43	0,203	1,37E+01	1,137	1,36E+01	0,2030599	49,75500	1,69684	-3,377	7,97978
B08	SYBR	CAM	Unkn-05	B02	29,33	29,43	0,203	1,37E+01	1,136	1,36E+01	0,2030599	49,75500	1,69684	-3,377	7,93978
B09	SYBR	CAM	Unkn-05	B02	29,66	29,43	0,203	1,33E+01	1,125	1,36E+01	0,2030599	49,75500	1,69684	-3,377	7,60978
B10	SYBR	CAM	Unkn-06	D02	27,36	27,22	0,132	1,56E+01	1,194	1,58E+01	0,1320353	49,65700	1,69598	-3,377	9,91267

B11	SYBR	CAM	Unkn-06	D02	27,1	27,22	0,132	1,59E+01	1,201	1,58E+01	$0,132035_3$	49,65700	1,69598	-3,377	10,17267
B12	SYBR	CAM	Unkn-06	D02	27,19	27,22	0,132	1,58E+01	1,199	1,58E+01	$0,132035_3$	49,65700	1,69598	-3,377	10,08267
C01	SYBR	GAPDH	Std-03	Standard	27,30	27,23	0,061	1,57E+01	1,196	1,58E+01	$0,060827_6$	12,50000	1,09691	-3,377	11,99573489
C02	SYBR	GAPDH	Std-03	Standard	27,19	27,23	0,061	1,58E+01	1,199	1,58E+01	$0,060827_6$	12,50000	1,09691	-3,377	12,10573489
C03	SYBR	GAPDH	Std-03	Standard	27,20	27,23	0,061	1,58E+01	1,199	1,58E+01	$0,060827_6$	12,50000	1,09691	-3,377	12,09573489
C04	SYBR	CAM	Unkn-07	A03	31,97	32,05	0,072	1,10E+01	1,043	1,10E+01	$0,072111$	49,89000	1,69801	-3,377	5,29581
C05	SYBR	CAM	Unkn-07	A03	32,07	32,05	0,072	1,09E+01	1,039	1,10E+01	$0,072111$	49,89000	1,69801	-3,377	5,19581
C06	SYBR	CAM	Unkn-07	A03	32,11	32,05	0,072	1,09E+01	1,037	1,10E+01	$0,072111$	49,89000	1,69801	-3,377	5,15581
C07	SYBR	CAM	Unkn-08	B03	29,43	29,30	0,125	1,36E+01	1,133	1,37E+01	$0,125299_6$	49,61600	1,69562	-3,377	7,84389
C08	SYBR	CAM	Unkn-08	B03	29,29	29,30	0,125	1,37E+01	1,137	1,37E+01	$0,125299_6$	49,61600	1,69562	-3,377	7,98389
C09	SYBR	CAM	Unkn-08	B03	29,18	29,30	0,125	1,38E+01	1,141	1,37E+01	$0,125299_6$	49,61600	1,69562	-3,377	8,09389
C10	SYBR	CAM	Unkn-09	D03	27,66	27,32	0,301	1,53E+01	1,186	1,57E+01	$0,301053_7$	49,79300	1,69717	-3,377	9,60866
C11	SYBR	CAM	Unkn-09	D03	27,08	27,32	0,301	1,59E+01	1,202	1,57E+01	$0,301053_7$	49,79300	1,69717	-3,377	10,18866
C12	SYBR	CAM	Unkn-09	D03	27,23	27,32	0,301	1,58E+01	1,198	1,57E+01	$0,301053_7$	49,79300	1,69717	-3,377	10,03866
D01	SYBR	GAPDH	Std-04	Standard	29,27	29,22	0,061	1,37E+01	1,138	1,38E+01	$0,061101$	6,25000	0,79588	-3,377	11,04231318
D02	SYBR	GAPDH	Std-04	Standard	29,23	29,22	0,061	1,38E+01	1,139	1,38E+01	$0,061101$	6,25000	0,79588	-3,377	11,08231318
D03	SYBR	GAPDH	Std-04	Standard	29,15	29,22	0,061	1,39E+01	1,141	1,38E+01	$0,061101$	6,25000	0,79588	-3,377	11,16231318
D04	SYBR	CAM	Unkn-10	A04	31,88	31,95	0,107	1,11E+01	1,046	1,11E+01	$0,106926_8$	49,98100	1,69880	-3,377	5,38314
D05	SYBR	CAM	Unkn-10	A04	31,89	31,95	0,107	1,11E+01	1,046	1,11E+01	$0,106926_8$	49,98100	1,69880	-3,377	5,37314
D06	SYBR	CAM	Unkn-10	A04	32,07	31,95	0,107	1,09E+01	1,039	1,11E+01	$0,106926_8$	49,98100	1,69880	-3,377	5,19314
D07	SYBR	CAM	Unkn-11	B04	29,05	28,95	0,085	1,40E+01	1,145	1,40E+01	$0,085049$	49,93300	1,69839	-3,377	8,21454
D08	SYBR	CAM	Unkn-11	B04	28,92	28,95	0,085	1,41E+01	1,149	1,40E+01	$0,085049$	49,93300	1,69839	-3,377	8,34454
D09	SYBR	CAM	Unkn-11	B04	28,89	28,95	0,085	1,41E+01	1,150	1,40E+01	$0,085049$	49,93300	1,69839	-3,377	8,37454
D10	SYBR	CAM	Unkn-12	D04	27,05	27,06	0,070	1,60E+01	1,203	1,59E+01	$0,070237_7$	49,78600	1,69711	-3,377	10,21887
D11	SYBR	CAM	Unkn-12	D04	27,13	27,06	0,070	1,59E+01	1,201	1,59E+01	$0,070237_7$	49,78600	1,69711	-3,377	10,13887
D12	SYBR	CAM	Unkn-12	D04	26,99	27,06	0,070	1,60E+01	1,204	1,59E+01	$0,070237_7$	49,78600	1,69711	-3,377	10,27887

G03	SYBR	NTC	Neg Ctrl	Negatif	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	Cq Mean	Cq Std. Dev	Starting Quantity (SQ)	Log Starting Quantity	SQ Mean	SQ Std. Dev	Temp			
A01	SYBR	GAPDH	Std-01	Standard	23,14	23,12	0,040	1,99E+01	1,298	1,99E+01	0,0404145	50,0			
A02	SYBR	GAPDH	Std-01	Standard	23,07	23,12	0,040	1,99E+01	1,300	1,99E+01	0,0404145	50,0			
A03	SYBR	GAPDH	Std-01	Standard	23,14	23,12	0,040	1,99E+01	1,298	1,99E+01	0,0404145	50,0			
A04	SYBR	CAM	Unkn-01	A08	32,45	32,32	0,135	1,06E+01	1,023	1,07E+01	0,1352775	50,4			
A05	SYBR	CAM	Unkn-01	A08	32,33	32,32	0,135	1,07E+01	1,028	1,07E+01	0,1352775	50,4			
A06	SYBR	CAM	Unkn-01	A08	32,18	32,32	0,135	1,08E+01	1,034	1,07E+01	0,1352775	50,4			
A07	SYBR	CAM	Unkn-02	B08	28,79	29,11	0,299	1,42E+01	1,153	1,39E+01	0,2990541	49,6			
A08	SYBR	CAM	Unkn-02	B08	29,38	29,11	0,299	1,36E+01	1,134	1,39E+01	0,2990541	49,6			
A09	SYBR	CAM	Unkn-02	B08	29,17	29,11	0,299	1,38E+01	1,141	1,39E+01	0,2990541	49,6			
A10	SYBR	CAM	Unkn-03	D08	31,08	30,90	0,155	1,19E+01	1,076	1,21E+01	0,1550269	50,4			
A11	SYBR	CAM	Unkn-03	D08	30,84	30,90	0,155	1,22E+01	1,085	1,21E+01	0,1550269	50,4			
A12	SYBR	CAM	Unkn-03	D08	30,79	30,90	0,155	1,22E+01	1,087	1,21E+01	0,1550269	50,4			
B01	SYBR	GAPDH	Std-02	Standard	25,00	25,11	0,105	1,80E+01	1,255	1,79E+01	0,1050397	25,0			
B02	SYBR	GAPDH	Std-02	Standard	25,21	25,11	0,105	1,78E+01	1,250	1,79E+01	0,1050397	25,0			
B03	SYBR	GAPDH	Std-02	Standard	25,11	25,11	0,105	1,79E+01	1,253	1,79E+01	0,1050397	25,0			
B04	SYBR	CAM	Unkn-04	A10	31,82	31,94	0,143	1,12E+01	1,048	1,11E+01	0,1429452	50,6			
B05	SYBR	CAM	Unkn-04	A10	32,1	31,94	0,143	1,09E+01	1,037	1,11E+01	0,1429452	50,6			
B06	SYBR	CAM	Unkn-04	A10	31,91	31,94	0,143	1,11E+01	1,045	1,11E+01	0,1429452	50,6			
B07	SYBR	CAM	Unkn-05	B10	29,27	29,22	0,138	1,37E+01	1,138	1,38E+01	0,1379613	50,3			
B08	SYBR	CAM	Unkn-05	B10	29,32	29,22	0,138	1,37E+01	1,136	1,38E+01	0,1379613	50,3			
B09	SYBR	CAM	Unkn-05	B10	29,06	29,22	0,138	1,39E+01	1,144	1,38E+01	0,1379613	50,3			
B10	SYBR	CAM	Unkn-06	D10	31,32	31,29	0,191	1,17E+01	1,067	1,17E+01	0,1913984	50,5			
B11	SYBR	CAM	Unkn-06	D10	31,09	31,29	0,191	1,19E+01	1,076	1,17E+01	0,1913984	50,5			
B12	SYBR	CAM	Unkn-06	D10	31,47	31,29	0,191	1,15E+01	1,062	1,17E+01	0,1913984	50,5			
C01	SYBR	GAPDH	Std-03	Standard	27,27	27,20	0,067	1,57E+01	1,197	1,58E+01	0,0665833	12,5			
C02	SYBR	GAPDH	Std-03	Standard	27,14	27,20	0,067	1,59E+01	1,200	1,58E+01	0,0665833	12,5			

C03	SYBR	GAPDH	Std-03	Standard	27,18	27,20	0,067	1,58E+01	1,199	1,58E+01	0,0665833	12,5
C04	SYBR	CAM	Unkn-07	A05	32,36	32,27	0,110	1,06E+01	1,027	1,07E+01	0,1096966	50,3
C05	SYBR	CAM	Unkn-07	A05	32,31	32,27	0,110	1,07E+01	1,029	1,07E+01	0,1096966	50,3
C06	SYBR	CAM	Unkn-07	A05	32,15	32,27	0,110	1,09E+01	1,035	1,07E+01	0,1096966	50,3
C07	SYBR	CAM	Unkn-08	B05	29,2	29,11	0,139	1,38E+01	1,140	1,39E+01	0,1389244	50,2
C08	SYBR	CAM	Unkn-08	B05	29,18	29,11	0,139	1,38E+01	1,141	1,39E+01	0,1389244	50,2
C09	SYBR	CAM	Unkn-08	B05	28,95	29,11	0,139	1,41E+01	1,148	1,39E+01	0,1389244	50,2
C10	SYBR	CAM	Unkn-09	D05	31,84	32,03	0,200	1,12E+01	1,048	1,10E+01	0,2003331	50,3
C11	SYBR	CAM	Unkn-09	D05	32,24	32,03	0,200	1,08E+01	1,032	1,10E+01	0,2003331	50,3
C12	SYBR	CAM	Unkn-09	D05	32,02	32,03	0,200	1,10E+01	1,041	1,10E+01	0,2003331	50,3
D01	SYBR	GAPDH	Std-04	Standard	29,24	29,18	0,074	1,38E+01	1,139	1,38E+01	0,0737111	6,2
D02	SYBR	GAPDH	Std-04	Standard	29,21	29,18	0,074	1,38E+01	1,140	1,38E+01	0,0737111	6,2
D03	SYBR	GAPDH	Std-04	Standard	29,10	29,18	0,074	1,39E+01	1,143	1,38E+01	0,0737111	6,2
D04	SYBR	CAM	Unkn-10	A11	31,85	31,94	0,210	1,12E+01	1,047	1,11E+01	0,21	50,4
D05	SYBR	CAM	Unkn-10	A11	31,79	31,94	0,210	1,12E+01	1,050	1,11E+01	0,21	50,4
D06	SYBR	CAM	Unkn-10	A11	32,18	31,94	0,210	1,08E+01	1,034	1,11E+01	0,21	50,4
D07	SYBR	CAM	Unkn-11	B11	28,64	28,89	0,245	1,44E+01	1,157	1,41E+01	0,245153	50,3
D08	SYBR	CAM	Unkn-11	B11	28,9	28,89	0,245	1,41E+01	1,149	1,41E+01	0,245153	50,3
D09	SYBR	CAM	Unkn-11	B11	29,13	28,89	0,245	1,39E+01	1,142	1,41E+01	0,245153	50,3
D10	SYBR	CAM	Unkn-12	D11	32,32	32,25	0,083	1,07E+01	1,029	1,07E+01	0,0832666	50,3
D11	SYBR	CAM	Unkn-12	D11	32,28	32,25	0,083	1,07E+01	1,030	1,07E+01	0,0832666	50,3
D12	SYBR	CAM	Unkn-12	D11	32,16	32,25	0,083	1,08E+01	1,035	1,07E+01	0,0832666	50,3
E01	SYBR	GAPDH	Std-05	Standard	31,04	31,04	0,145	1,20E+01	1,078	1,20E+01	0,1450287	3,1
E02	SYBR	GAPDH	Std-05	Standard	31,19	31,04	0,145	1,18E+01	1,072	1,20E+01	0,1450287	3,1
E03	SYBR	GAPDH	Std-05	Standard	30,90	31,04	0,145	1,21E+01	1,083	1,20E+01	0,1450287	3,1
E04	SYBR	CAM	Unkn-13	A12	32,12	32,09	0,055	1,09E+01	1,037	1,09E+01	0,0550757	50,4
E05	SYBR	CAM	Unkn-13	A12	32,03	32,09	0,055	1,10E+01	1,040	1,09E+01	0,0550757	50,4
E06	SYBR	CAM	Unkn-13	A12	32,13	32,09	0,055	1,09E+01	1,036	1,09E+01	0,0550757	50,4
E07	SYBR	CAM	Unkn-14	B12	29,27	29,17	0,179	1,37E+01	1,138	1,38E+01	0,1789786	50,1
E08	SYBR	CAM	Unkn-14	B12	28,96	29,17	0,179	1,40E+01	1,147	1,38E+01	0,1789786	50,1

E09	SYBR	CAM	Unkn-14	B12	29,27	29,17	0,179	1,37E+01	1,138	1,38E+01	0,1789786	50,1
E10	SYBR	CAM	Unkn-15	D12	32,07	32,03	0,173	1,09E+01	1,039	1,10E+01	0,1734935	50,0
E11	SYBR	CAM	Unkn-15	D12	31,84	32,03	0,173	1,12E+01	1,048	1,10E+01	0,1734935	50,0
E12	SYBR	CAM	Unkn-15	D12	32,18	32,03	0,173	1,08E+01	1,034	1,10E+01	0,1734935	50,0
F01	SYBR	GAPDH	Std-06	Standard	33,23	33,26	0,055	9,77E+00	0,990	9,74E+00	0,0550757	1,5
F02	SYBR	GAPDH	Std-06	Standard	33,22	33,26	0,055	9,78E+00	0,990	9,74E+00	0,0550757	1,5
F03	SYBR	GAPDH	Std-06	Standard	33,32	33,26	0,055	9,68E+00	0,986	9,74E+00	0,0550757	1,5
F04	SYBR	CAM	Unkn-16	A24	32,26	32,10	0,271	1,07E+01	1,031	1,09E+01	0,2713546	50,2
F05	SYBR	CAM	Unkn-16	A24	32,26	32,10	0,271	1,07E+01	1,031	1,09E+01	0,2713546	50,2
F06	SYBR	CAM	Unkn-16	A24	31,79	32,10	0,271	1,12E+01	1,050	1,09E+01	0,2713546	50,2
F07	SYBR	CAM	Unkn-17	B24	29,59	29,12	0,405	1,34E+01	1,127	1,39E+01	0,4052571	50,2
F08	SYBR	CAM	Unkn-17	B24	28,92	29,12	0,405	1,41E+01	1,149	1,39E+01	0,4052571	50,2
F09	SYBR	CAM	Unkn-17	B24	28,86	29,12	0,405	1,41E+01	1,150	1,39E+01	0,4052571	50,2
F10	SYBR	CAM	Unkn-18	D24	32,14	32,12	0,097	1,09E+01	1,036	1,09E+01	0,0971253	50,1
F11	SYBR	CAM	Unkn-18	D24	32,01	32,12	0,097	1,10E+01	1,041	1,09E+01	0,0971253	50,1
F12	SYBR	CAM	Unkn-18	D24	32,2	32,12	0,097	1,08E+01	1,033	1,09E+01	0,0971253	50,1
G01	SYBR	NTC	Neg Ctrl	Negatif	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N
G02	SYBR	NTC	Neg Ctrl	Negatif	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N
G03	SYBR	NTC	Neg Ctrl	Negatif	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N

File Name Lenny_CAM_Plate3.pcrd
 Created By User Romi
 Notes
 ID
 Run Started 04/27/2017 16:14:07 UTC
 Run Ended 04/27/2017 18:25:18 UTC
 Sample Vol 25
 Lid Temp 105
 Protocol File Name Lenny_CAM_Plate3.prcf

Plate Setup File Name Lenny_CAM_Plate3.pltd
Base Serial Number BR004129
Optical Head Serial Number 788BR04138
CFX Manager Version 3.1.1517.0823.

File Name Lenny_CAM_Plate4.pcrd
Created By User Romi
Notes
ID
Run Started 04/28/2016 09:58:38 UTC
Run Ended 04/28/2016 12:01:42 UTC
Sample Vol 25
Lid Temp 105
Protocol File Name Lenny_CAM_Plate4.prcf
Plate Setup File Name Lenny_CAM_Plate4.pltd
Base Serial Number BR004129
Optical Head Serial Number 788BR04138
CFX Manager Version 3.1.1517.0823.