

**Menggali Potensi Anti-tuberkulosis: Penilaian Konsentrasi Hambat
Minimum Ekstrak Etanol Daun Legundi (*Vitex trifolia L.*) melalui
Uji Microplate Resazurin (REMA) Secara *In-Vitro***



Oleh :

dr. Imas Putri Munthe

2208330004

**PROGRAM STUDI MAGISTER ILMU BIOMEDIS
FAKULTAS KEDOKTERAN DAN ILMU KESEHATAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA**

MEDAN 2025



MAJELIS PENDIDIKAN TINGGI, PENELITIAN & PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FAKULTAS KEDOKTERAN

an Gedung Arca No. 53 Medan 20217 Telp. (061) 7350163 – 733162 Ext.
20 Fax. (061) 7363488
Website : fk@umsu.ac.id

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

LEMBAR PERSETUJUAN PEMBIMBING

Nama : dr. Imas Putri Munthe
NPM : 2208330004
Prodi/ Bagian : : Magister Ilmu Biomedis
Judul Tesis : Mengali Potensi Antituberkulosis: Penilaian
Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak
Etanol Daun Legundi (*Vitex trifolia L.*)
melalui Uji Microplate Resazurin (REMA)
Secara *In-Vitro*

Disetujui untuk disampaikan kepada panitia ujian
Medan, 28 Juli 2024

Disetujui dan diketahui oleh

Pembimbing I

Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis,
M.Ked (PA), Sp.PA
NIDN : 01150777401

Pembimbing II

Dr. dr. Sri Rezeki Arbaningsih, Sp. P (K)
NIDK : 8803960018

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

Saya yang bertandatangan dibawah ini menyatakan bahwa tesis ini adalah hasil karya saya sendiri dan semua sumber baik yang dikutip maupun dirujuk telah saya nyatakan dengan benar.

Nama : Imas Putri Munthe
NPM : 2208330004
Judul Tesis : Menggali Potensi Anti-tuberkulosis: Penilaian
Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Etanol Daun
Legundi (*Vitex trifolia L.*) melalui Uji Microplate
Resazurin (REMA) Secara *In-Vitro*

Demikianlah pernyataan ini saya perbuat, untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Medan, 21 September 2025



Imas Putri Munthe

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa atas rahmat dan karunia-Nya sehingga tesis ini yang berjudul "Menggali Potensi Antituberkulosis: Penilaian Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Etanol Daun Legundi (*Vitex trifolia L.*) melalui Uji Microplate Resazurin (REMA) Secara *In-Vitro*" dapat diselesaikan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Magister di ilmu biomedis, Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.

Tesis ini merupakan hasil dari proses panjang yang penuh tantangan, pembelajaran, dan refleksi ilmiah. Dalam prosesnya, penulis menerima banyak dukungan, arahan, dan semangat dari berbagai pihak. Untuk itu, dengan segala hormat dan rasa terima kasih yang mendalam, penulis ingin menyampaikan apresiasi kepada:

1. dr. Siti Masliana Siregar, Sp.T.H.T.B.K.L., Subsp. Rino (K) selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara.
2. Dr. Emni Purwoningsih, M. Kes selaku Ketua Program Studi Magister Ilmu Biomedis dan dr. Isra Thirsty, M. Biomed selaku Sekretaris Program Studi Magister Ilmu Biomedis.
3. Assoc Prof. Dr. dr. Humairah Medina Liza Lubis, M.Ked (PA), Sp.PA, selaku dosen pembimbing utama, yang telah meluangkan waktu, tenaga, serta ilmu dalam membimbing dan mengarahkan saya selama penyusunan tesis ini. Kesabaran serta motivasi yang senantiasa diberikan sangat berarti bagi saya dalam menyelesaikan setiap tahapan penelitian, serta menjadi dorongan besar dalam menuntaskan program studi Magister Ilmu Biomedis ini dengan sebaik-baiknya.
4. Dr. dr. Sri Rezeki Arbaningsih, Sp. P, selaku dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, serta ilmu dalam membimbing dan mengarahkan saya selama penyusunan tesis ini. Kesabaran dan motivasi yang senantiasa

diberikan sangat berarti bagi saya dalam menyelesaikan setiap tahapan penelitian, serta menjadi motivasi bagi saya untuk menyelesaikan tesis ini.

5. Assoc. Prof Dr. dr. Nurfadly, MKT selaku Penguji I, yang telah memberikan banyak masukan, arahan, dan koreksi yang konstruktif dalam penyempurnaan penulisan tesis ini. Saran dan bimbingan yang diberikan sangat membantu saya dalam memperbaiki berbagai kekurangan dan menyelesaikan program studi ini dengan lebih baik.
6. dr. Pinta Pudiyanti Siregar, M, Sc., Ph. D selaku Penguji II, yang telah memberikan banyak masukan, arahan, dan koreksi yang konstruktif dalam penyempurnaan penulisan tesis ini. Saran dan bimbingan yang diberikan sangat membantu saya dalam memperbaiki berbagai kekurangan dan menyelesaikan program studi ini dengan lebih baik.
7. Teristimewa teruntuk kedua orang tua saya, Almh. Ibunda Nureni dan Alm. Ayahanda Awah Munthe yang sangat kucintai dan kusayangi. Saya mengucapkan terima kasih yang setulus-tulusnya kepada kedua orang tua saya tercinta atas doa, kasih sayang, dukungan moral, dan semangat yang tiada henti dalam setiap langkah perjalanan saya. Tanpa keikhlasan, pengorbanan, dan cinta tanpa syarat yang selalu mereka berikan, saya tidak akan mampu mencapai tahap ini dan menyelesaikan studi Magister Ilmu Biomedis ini dengan baik. Segala pencapaian ini saya persembahkan sebagai bentuk rasa hormat dan terima kasih yang mendalam kepada mereka.
8. Ketiga kakak saya, Menawastuny Munthe, S.E, M.M, Sri Hartati, S.E, Ayenni Munthe. Terimakasih atas segala dukungan, perhatian, dan semangat yang selalu diberikan selama proses studi ini. Terimakasih telah menjadi sumber motivasi yang berarti bagi saya dalam menghadapi berbagai tantangan, baik dalam penyusunan tesis maupun dalam menyelesaikan program Magister Ilmu Biomedis ini.
9. Teman seperjuangan saya dr. Karina dan dr. Nurlina Setiadi yang selalu hadir memberikan dukungan, semangat yang berarti selama proses studi dan

penyusunan tesis ini. Kehadiran mereka tidak hanya menjadi penguat di saat-saat sulit, tetapi juga menjadi pengingat bahwa perjuangan ini tidak saya lalui sendiri. Serta teman magister lainnya dr. T. Soraya, dr. Fathinia, dr. Zulfadhli, dan dr. Riyanda.

10. Pihak lain yang juga ikut serta banyak membantu dalam usaha memperoleh data yang saya perlukan, Lab Biokimia FK UMSU, Lab Mikrobiologi FK-KMK UGM.

Penulis menyadari bahwa tesis ini masih memiliki keterbatasan. Oleh karena itu, kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan di masa yang akan datang. Besar harapan penulis, karya ini dapat memberikan kontribusi, walau kecil, terhadap pengembangan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kesehatan.

Medan, 21 September 2025

Penulis

PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TESIS UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS

Sebagai sivitas akademika Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara, saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Imas Putri Munthe
NPM : 2208330004
Fakultas : Biomedis FK-IK UMSU

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara Hak Bebas Royalti Noneksklusif atas tesis saya yang berjudul: Menggali Potensi Anti-tuberkulosis: Penilaian Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak Etanol Daun Legundi (*Vitex trifolia L.*) melalui Uji Microplate Resazurin (REMA) Secara *In-Vitro*.

Beserta perangkat yang ada (jika diperlukan). Dengan Hak Bebas Royalti Noneksklusif ini Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara berhak menyimpan, mengalihmedia/formatkan, mengelola dalam bentuk pangkalan data (*database*), merawat dan mempublikasikan tugas akhir saya selama tetap mencantumkan nama saya sebagai penulis/pencipta dan sebagai pemilik Hak Cipta.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya.

Dibuat di : Medan Pada tanggal : .21 September 2025

Yang menyatakan



(Imas Putri Munthe)

Abstrak

Latar Belakang: Tuberkulosis merupakan salah satu dari sepuluh penyebab kematian terbesar di dunia dan menempati urutan kedua penyakit menular paling mematikan. Setiap tahunnya, sekitar 10 juta orang terinfeksi tuberkulosis dengan angka kematian mencapai 1,5 juta kasus, di mana 43% di antaranya berasal dari kawasan Asia Tenggara dan Indonesia menempati urutan kedua terbanyak. Upaya penanggulangan tuberkulosis terkendala oleh keterbatasan pengembangan obat baru selama lebih dari lima dekade. Uji *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), yang direkomendasikan WHO, menjadi metode alternatif dalam menentukan konsentrasi hambat minimum (MIC) dan resistensi obat *Mycobacterium tuberculosis*. Daun legundi (*Vitex trifolia L.*) diketahui mengandung senyawa bioaktif yang berpotensi memberikan aktivitas anti-tuberkulosis melalui mekanisme disrupsi membran sel bakteri dan denaturasi protein. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan untuk mengevaluasi aktivitas anti-tuberkulosis ekstrak etanol daun legundi terhadap *M. tuberculosis* secara *in vitro* melalui penentuan nilai MIC. **Metode:** Ekstrak etanol daun legundi diperoleh dengan maserasi etanol 96% dan diuji aktivitas antimikobakterinya terhadap *M. tuberculosis* H37Rv menggunakan metode *Resazurin Microtiter Assay* (REMA) diuji dalam tiga konsentrasi berbeda yaitu 2,5%; 1,25%; dan 0,625%. Rifampisin digunakan sebagai kontrol positif, dan nilai MIC ditetapkan sebagai konsentrasi terendah yang menghambat pertumbuhan bakteri. **Hasil:** Ekstrak etanol daun legundi menunjukkan aktivitas penghambatan pertumbuhan *M. tuberculosis* dengan nilai MIC sebesar 0,625%, sedangkan rifampisin memiliki konsentrasi hambat minimum sebesar 0,25 µg/mL. **Kesimpulan:** Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun legundi memiliki potensi sebagai anti-tuberkulosis.

Kata kunci: Tuberkulosis, *Vitex trifolia*, REMA, Anti-tuberkulosis, MIC.

Abstract

Background: Tuberculosis is one of the ten leading causes of death worldwide and ranks as the second most deadly infectious disease. Each year, approximately 10 million people are infected with tuberculosis, with 1.5 million deaths reported, of which 43% occur in Southeast Asia, where Indonesia ranks second highest. Tuberculosis control efforts remain limited due to the lack of new drug development for more than five decades. The Resazurin Microtiter Assay (REMA), recommended by WHO, serves as an alternative method for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Legundi (*Vitex trifolia* L.) leaves are known to contain bioactive compounds with potential anti-tuberculosis activity through mechanisms involving bacterial cell membrane disruption and protein denaturation. Therefore, this study aimed to evaluate the anti-tuberculosis activity of ethanol extract of legundi leaves against *M. tuberculosis* through in vitro determination of the MIC. **Methods:** The ethanol extract of legundi leaves was obtained by maceration using 96% ethanol and tested for antimycobacterial activity against *M. tuberculosis* H37Rv using the Resazurin Microtiter Assay (REMA) at three different concentrations: 2.5%, 1.25%, and 0.625%. Rifampicin was used as a positive control, and the MIC was defined as the lowest concentration that inhibited bacterial growth. **Results:** The ethanol extract of legundi leaves inhibited the growth of *M. tuberculosis* with an MIC value of 0.625%, whereas rifampicin showed an MIC of 0.25 µg/mL. **Conclusion:** These findings indicate that the ethanol extract of legundi leaves has potential as an anti-tuberculosis agent.

Keyword: Tuberculosis, *Vitex trifolia* L., Resazurin Microtiter Assay, Anti-tuberculosis, Minimum Inhibitory Concentration

Daftar Isi

Halaman Pernyataan Orisinalitas	i
Kata Pengantar	ii
Pernyataan Persetujuan Publikasi Tesis Untuk Kepentingan Akademis.....	v
Abstrak.....	vi
Abstrac	vii
Bab 1 Pendahuluan	1
1.1. Latar Belakang	1
1.2. Rumusan Masalah Penelitian	4
1.3. Tujuan Penelitian	4
1.4. Manfaat Penelitian	4
Bab 2 Tinjauan Pustaka	6
2.1. Definisi Tuberkulosis	6
2.2. Etiologi dan Faktor Resiko Tuberkulosis	7
2.2.1. Etiologi Tuberkulosis	7
2.2.2. Faktor Resiko Tuberkulosis	7
2.3. Epidemiologi Tuberkulosis	8
2.4. Patogenesis Tuberkulosis	10
2.4.1. Patogenesis Tuberkulosis Primer.....	10
2.5. Respon Imun Terhadap <i>M. tuberculosis</i>	13
2.6. Diagnosis.....	13
2.6.1. Diagnosis Tuberkulosis	13
2.6.2. Pemeriksaan Bakteriologi.....	14
2.6.3. Pemeriksaan Radiologi	18
2.6.4. Pemeriksaan Penunjang Lain.....	19
2.6.4.1. Analisis Cairan Pleura	19
2.6.4.2. Pemeriksaan Histopatologi Jaringan	19

2.6.4.3. Pemeriksaan Uji Microplate Resazurin	20
2.7. Pengobatan Tuberkulosis Paru	21
2.7.1. Tujuan Pengobatan	21
2.7.2. Prinsip Pengobatan	21
2.7.3. Tahapan Pengobatan	21
2.7.3.1. Obat Anti Tuberkulosis.....	23
2.7.4. Efek Samping OAT	24
2.8. Daun legundi (<i>Vitex trifolia L.</i>).....	27
2.8.1. Definisi	27
2.8.2. Penggunaan Tradisional	28
2.8.3. Fitokimia.....	29
2.8.4. Sifat Farmakologi	32
2.8.4.1. Sebagai Antibakteri	33
2.8.4.2. Sebagai Anti Inflamasi	36
A. Kerangka Teori.....	40
B. Kerangka Konsep Penelitian	41
C. Hipotesis Penelitian	42
Bab 3. Metode Penelitian.....	42
3.1. Definisi Operasional.....	42
3.2. Jenis Penelitian.....	43
3.3. Waktu dan Tempat Penelitian	43
3.4. Variabel Penelitian	43
3.5. Populasi dan Sampel Penelitian	43
3.6. Alat dan Bahan Penelitian.....	43
3.7. Langkah-langkah Penelitian.....	44
3.7.1. Pembuatan ekstrak daun Legundi	44
3.7.2. Langkah penelitian.....	44
3.8. Analisis Data	48
Alur Penelitian	49

Bab 4. Hasil dan Pembahasan.....	50
4.1. Hasil Penelitian	50
4.1.1. Data Konsentrasi Hambat Minimum	52
4.2. Pembahasan.....	55
Bab 5. Kesimpulan dan Saran	60
5.1. Kesimpulan Penelitian	60
5.2. Saran Penelitian.....	61
Referensi	62
Lampiran	73

Daftar Tabel

Tabel 2.1. Dosis OAT Lini Pertama.....	23
Tabel 2.2. Dosis OAT KDT	24
Tabel 3.1. Definisi Operasional	52
Tabel 4.1. Hasil pengujian pertumbuhan bakteri <i>M. tuberculosis</i> dengan perlakuan ekstrak	52
Tabel 4.2. Hasil pengujian pertumbuhan bakteri <i>M. tuberculosis</i> dengan Rifampicin.....	52
Tabel 4.3. Hasil nilai MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>) dari dua senyawa.....	54

Daftar Gambar

Gambar 2.1. Representasi grafis prinsip microplateresazurin assay	21
Gambar 2.2. Daun Legundi	29
Gambar 2.3. Struktur kimia <i>V. trifolia</i>	31
Gambar 4.1. Pelat Perlakuan REMA untuk Uji Aktivitas Antimikobakteri Ekstak Etanol Daun <i>Vitex trifolia L.</i> terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	50
Gambar 4.2. Hasil Perlakuan REMA untuk Uji Aktivitas Antimikobakteri Ekstrak Etanol Daun Legundi <i>Vitex trifolia L.</i> dan Rifampisin Terhadap <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51

Daftar Singkatan

TB	: Tuberkulosis
CD	: cell dendritic
LJ	: <i>Lowenstein Jensen</i>
IFN	: Interferon
MHC	: Major Histocompatibility Complex
TNF	: Tumor necrosis factor
KHM	: Kadar hambat minimum
IL	: Interleukin
RRTB	: Resisten terhadap rifampisin
MALT	: <i>mucosal associated lymphoid tissue</i>
NALT	: <i>nasal associated lymphoid tissue</i>
LALT	: <i>larynx associated lymphoid tissue</i>
BALT	: <i>bronchiole associated lymphoid tissue</i>
SIgA	: IgA sekretorik
APC	: sel penyaji antigen
TLR	: Reseptor mirip Toll
BJH	: Biopsi jarum halus
BAL	: Bronchoalveolar lavage
TCM	: Tes cepat molekuler
MGIT	: <i>Mycobacteria Growth Indicator Tube</i>
TBLB	: <i>Trans bronchial lung biopsy</i>
WHO	: World Health Organization
MDR-TB	: Multi Drug-Resistant Tuberculosis
XDR-TB	: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis
RIF	: Rifampisin
INH	: Isoniazid

DMSO	: Dimetil sulfoksida
H37Rv	: Strain virulen <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv
CFU	: Colony Forming Unit
MIC	: Minimum Inhibitory Concentration (Konsentrasi Hambat Minimum)
MBC	: Minimum Bactericidal Concentration
OD	: Optical Density
RPMI	: Roswell Park Memorial Institute (media kultur)
UV-Vis	: Ultraviolet–Visible Spectroscopy
GC-MS	: Gas Chromatography–Mass Spectrometry
EtOH	: Etanol
OAT	: Obat Anti Tuberkulosis
REMA	: Resazurin Microtiter Assay

BAB 1

Pendahuluan

1.1. Latar Belakang

Salah satu dari 10 penyebab kematian terbesar dan penyakit menular kedua di dunia yang membunuh banyak orang adalah tuberkulosis.^{1,2} Laporan WHO pada tahun 2021, diperkirakan 10 juta orang tertular tuberkulosis setiap tahunnya, dan 1,5 juta di antaranya berakhir dengan kematian.² Sekitar 43% kasus tuberkulosis di seluruh dunia ditemukan di Asia Tenggara, dengan Indonesia berada di urutan kedua. Di Indonesia, diperkirakan satu orang tertular tuberkulosis setiap 33 detik, dengan angka kejadian 354 kasus per 100.000 orang.³ Cara utama penularan tuberkulosis adalah melalui sistem pernafasan dan disebabkan oleh infeksi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Meskipun *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginfeksi berbagai organ, penyakit ini biasanya pertama kali muncul di paru-paru.⁴ Kini, WHO telah memperkenalkan pendekatan baru yang disebut pendekatan *End Tuberculosis Strategy*, yang berupaya mengurangi rasio kejadian dan kematian akibat tuberkulosis hingga 95% pada tahun 2035 guna mewujudkan masyarakat yang sehat dan bebas tuberkulosis.⁵

Ketika tubuh terinfeksi *Mycobacterium tuberculosis*, sistem kekebalan tubuh akan bekerja dengan memobilisasi berbagai jenis sel dan melepaskan sitokin spesifik atau non-spesifik untuk melawan infeksi. Mereka mengaktifkan limfosit T sitotoksik dan merekrut sel kekebalan bawaan seperti granulosit dan monosit untuk menangani infeksi *Mycobacterium tuberculosis*.^{6,7} Sitokin ini merangsang sel T yang melepaskan sitotoksin dan membantu infiltrasi sekaligus membangunkan sel kekebalan bawaan seperti monosit dan granulosit.^{8,9}

Meskipun terdapat terapi pengobatan, seringkali terapi tersebut memakan waktu lama, memerlukan banyak obat, dan mungkin menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan. Hanya 5–10% orang dengan infeksi *Mycobacterium tuberculosis* yang

dianggap sakit aktif, kebanyakan orang tergolong mengidap tuberkulosis laten, atau infeksi tanpa gejala penyakit apa pun.⁴ Pengembangan obat anti-TB baru masih kurang selama lebih dari 50 tahun. Obat-obatan seperti etambutol (ETH), pirazinamida (PZA), dan rifampisin (RIF) yang digunakan pada pengobatan awal memiliki pengaruh yang kecil terhadap kuman laten penyebab tuberkulosis. Golongan pengobatan lain, seperti turunan azole, nitroimidazole, rifamycin phenothiazine, fluoroquinolones, dan oxazolidinediones, yang diklasifikasikan sebagai berbagai jenis obat kemoterapi, juga baru-baru ini muncul sebagai pengobatan yang mungkin dan berhasil untuk tuberkulosis.¹⁰

Rencana pengobatan yang sangat efektif dapat memungkinkan pasien tuberkulosis menyelesaikan pengobatannya lebih cepat dari waktu enam bulan yang diwajibkan saat ini, sehingga meningkatkan kepatuhan dan kemungkinan menurunkan biaya dan efek samping pengobatan.⁶ Meskipun sejumlah obat baru untuk tuberkulosis telah dikembangkan, kendala seperti biaya tinggi, durasi terapi yang panjang, toksisitas obat lini kedua, serta resistensi tetap menjadi tantangan. Oleh karena itu, eksplorasi tanaman obat sebagai sumber senyawa antimikobakteri baru dengan potensi terapeutik tinggi perlu terus dilakukan.¹¹

Legundi (*Vitex trifolia L.*) telah mendapat perhatian karena penggunaannya yang luas dan nilai medisnya yang tinggi. Para peneliti telah mengidentifikasi lebih dari 300 senyawa dalam tanaman ini. Studi farmakologi modern mengungkapkan bahwa legundi memiliki berbagai efek menguntungkan, seperti bersifat sitotoksik, analgesik, antiinflamasi, antioksidan, antijamur, dan antibakteri. Temuan ini mendukung penggunaan Legundi (*Vitex trifolia L.*) untuk tujuan pengobatan.⁶ Fokus penelitian ini mengkaji bagaimana ekstrak daun Legundi melawan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Penelitian lalu menemukan apda ekstrak etanol dari daun legundi (*V. trifolia L.*) dapat menghentikan pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif. Pada penelitian tersebut menunjukkan ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) mempunyai aktivitas antibakteri dan dapat mencegah pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif, khususnya pertumbuhan in vitro *Salmonella tiphy*, *Candida*

albicans, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, dan *Staphylococcus aureus*.¹²⁻¹⁴ Hal serupa juga ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan pada penelitian sebelumnya, didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol kental daun legundi (*V. trifolia L.*) menghasilkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* secara *in vivo* pada model infeksi *Drosophila*.¹⁵ Daun legundi (*Vitex trifolia L.*) diketahui mengandung senyawa flavonoid dan minyak atsiri yang berperan sebagai antibakteri melalui mekanisme penggumpalan atau denaturasi protein protoplasma sel bakteri, serta melalui disrupsi struktur membran sel yang menyebabkan lisis dan kebocoran komponen intraseluler.^{16,17}

Pada penelitian sebelumnya, melaporkan bahwa senyawa 9-hidroksi-13(14)-labden-15,16-olide dan isoambreinolide yang diisolasi dari ekstrak metanol daun *Vitex trifolia L.* mampu menekan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara signifikan, dengan nilai konsentrasi inhibitor minimum sebesar 100 dan 25 µg/mL, yang menunjukkan potensi antimikobakteri yang signifikan.¹⁸ Dalam penelitian lain, ekstrak hidroalkohol daun *Vitex trifolia L.* pada konsentrasi 125 µg/mL mampu menghambat 50% pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁸ Selain itu, pada penelitian lain juga menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Vitex trifolia L.* memiliki aktivitas antiinflamasi pada pasien tuberkulosis paru.¹⁹

Penelitian sebelumnya yang dilakukan dengan menggunakan media *Lowenstein Jensen (LJ)* menunjukkan bahwa konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak kloroform yang diperoleh dari ekstrak daun legundi adalah 2%, sedangkan KHM ekstrak metanol tercatat lebih rendah, yaitu 0,5%, sehingga mengindikasikan bahwa ekstrak metanol memiliki potensi antimikobakteri yang lebih kuat.²⁰ Temuan lain menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Vitex trifolia L.* pada sel makrofag manusia U937 dapat menurunkan kadar sitokin proinflamasi IL-1β, IL-6, dan TNF-α secara signifikan, yang menandakan adanya potensi efek imunomodulator dalam mengurangi respon inflamasi akibat infeksi *Mycobacterium tuberculosis*.²¹ Hasil serupa juga dilaporkan pada penelitian tuberkulosis ekstraparu, dimana ekstrak daun

V. trifolia L. (Legundi) pada konsentrasi 70% dan 90% menunjukkan aktivitas antimikobakteri yang signifikan terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.¹⁶

Berdasarkan latar belakang tersebut, penelitian ini bertujuan untuk menilai potensi ekstrak etanol daun legundi sebagai agen antituberkulosis dengan mengamati nilai konsentrasi hambat minimum terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

1.2. Rumusan masalah penelitian

1. Apakah ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia* L.) memiliki potensi sebagai agen anti-tuberkulosis yang ditunjukkan melalui penentuan konsentrasi hambat minimum (MIC) menggunakan uji Resazurin Microplate Assay (REMA) secara *in vitro*?

1.1. Tujuan Penelitian

1.1.1 Tujuan umum penelitian ini adalah :

1. Mengetahui potensi aktivitas anti-tuberkulosis ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia* L.) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* secara *in vitro* melalui penentuan konsentrasi hambat minimum (MIC) dengan metode *Resazurin Microplate Assay* (REMA).

1.1.2 Tujuan Khusus penelitian ini adalah :

1. Mengetahui nilai konsentrasi hambat minimum (MIC) ekstrak etanol daun legundi terhadap *M. tuberculosis*.
2. Membandingkan aktivitas ekstrak etanol daun legundi dengan kontrol positif (rifampisin) dalam menghambat pertumbuhan *M. tuberculosis*.

1.3. Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah:

1. Manfaat Teoritis

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu biomedis, khususnya di bidang farmakologi dan fitokimia, melalui penyediaan data ilmiah mengenai aktivitas antimikobakteri ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia* L.) terhadap

Mycobacterium tuberculosis. Hasil penelitian ini dapat memperkaya literatur mengenai potensi senyawa metabolit sekunder dari tanaman obat sebagai agen antituberkulosis.

2. Manfaat Aplikatif

Secara aplikatif, penelitian ini berpotensi menjadi dasar dalam pengembangan kandidat fitofarmaka berbahan dasar ekstrak daun legundi sebagai alternatif atau pendukung terapi tuberkulosis. Temuan ini juga diharapkan dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan masyarakat, khususnya dalam pemanfaatan sumber daya hayati lokal sebagai upaya penemuan obat baru yang lebih aman, terjangkau, dan efektif.

Bab 2

Tinjaun Pustaka

2.1 Definisi *Mycobacterium tuberculosis*

Tuberkulosis merupakan penyakit yang disebabkan oleh infeksi bakteri menular aerobik *Mycobacterium tuberculosis*.²² Biasanya, tuberkulosis menyerang organ paru pada manusia. Penularannya terjadi melalui penderita yang BTA positif dan melalui droplet nuklei yang dikeluarkan saat penderita batuk atau bersin. Bakteri ini dapat terhirup oleh orang sehat, menyebabkan infeksi.²³

Karena penyakit ini menyebar melalui udara yang terkontaminasi ketika seseorang bersin, batuk, berbicara, atau meludah, sehingga tuberkulosis paru merupakan target organ utama yang terlibat dalam 85% kasus. Melalui jalur hematogen, limfatik, atau penyebaran langsung, tuberkulosis dapat berpindah dari paru ke bagian tubuh lain (penyakit luar paru).²² Selain paru-paru, *M. tuberculosis* dapat menginfeksi hampir semua tempat lain di tubuh, termasuk pleura, kelenjar getah bening, perut, sistem genitourinari, kulit, sendi, tulang, dan meningen.²⁴

Mycobacterium tuberculosis adalah bakteri Gram-positif yang memerlukan oksigen bebas untuk hidup (aerob obligat). Bakteri ini tidak memiliki endospora dan kapsul, serta tidak bersifat motil. Tahan terhadap asam, *M. tuberculosis* memiliki bentuk sel batang dengan ukuran 0,2-0,4 x 2-10 μm . Pertumbuhannya lambat, memerlukan waktu 2 – 60 hari pada suhu 37°C. Karakteristik unik dari genus bakteri ini terletak pada dinding sel yang kaya akan lipid dan lapisan peptidoglikan yang tebal. Dinding sel ini mengandung asam mikolat, arabinogalaktan, dan lipoarabinomanan. Diketahui bahwa asam mikolat hanya ditemukan pada dinding sel bakteri genus *Mycobacterium*.²⁵

2.2. Etiologi dan Faktor Resiko Tuberkulosis

2.2.1 Etiologi

Tuberkulosis merupakan penyakit infeksi menular yang disebabkan oleh bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Bakteri ini termasuk dalam famili Mycobacteriaceae dan berbahaya bagi manusia. Berikut ini merupakan beberapa karakteristik dari *Mycobacterium tuberculosis* :²⁶

- a. Dinding sel lipoid: dinding selnya kaya akan lipid dan tahan terhadap asam.
- b. Waktu mitosis: bakteri ini memerlukan waktu mitosis selama 12-24 jam.
- c. Rentan terhadap sinar matahari dan UV: Paparan sinar matahari dan ultraviolet dapat menyebabkan kematian bakteri ini secara cepat.
- d. Rentan terhadap air panas: dalam waktu 2 menit, bakteri ini mati ketika berada di lingkungan air dengan suhu 100°C.
- e. Sensitivitas terhadap alkohol dan lisol: bakteri ini akan mati jika terkena alkohol 70% atau lisol 50%.
- f. Dormansi: dalam jaringan tubuh, bakteri ini dapat mengalami dormansi selama beberapa tahun dan kemudian aktif kembali menyebabkan penyakit pada penderita.
- g. Sifat aerobik: bakteri ini membutuhkan oksigen untuk melakukan metabolisme.
- h. Preferensi terhadap oksigen: bakteri ini lebih menyukai jaringan yang kaya oksigen. Tekanan di bagian apikal paru-paru lebih tinggi daripada jaringan lainnya, sehingga bagian ini menjadi tempat yang baik untuk mendukung pertumbuhan bakteri *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2.2 Faktor Resiko

Resiko terkena penyakit tuberkulosis dipengaruhi oleh beberapa faktor, antara lain²⁶:

- a. Umur, kasus tertinggi TB terjadi pada usia muda hingga dewasa. Di Indonesia, sekitar 75% penderita berasal dari kelompok usia produktif (15-49 tahun).
- b. Jenis kelamin, TB lebih sering menyerang laki-laki karena banyak dari mereka memiliki kebiasaan merokok.
- c. Kebiasaan merokok, Merokok dapat menurunkan daya tahan tubuh, sehingga memudahkan terjadinya infeksi, terutama pada laki-laki yang juga mengonsumsi alkohol.
- d. Pekerjaan, Beberapa pekerjaan dapat menjadi faktor risiko kontak langsung dengan penderita TB. Risiko penularan TB tinggi pada tenaga kesehatan yang berinteraksi langsung dengan pasien. Namun, ada juga pekerjaan lain yang berisiko, seperti pekerjaan di pabrik.
- e. Status ekonomi, orang dengan pendapatan rendah memiliki risiko lebih tinggi terkena TB karena kesulitan memenuhi syarat-syarat kesehatan.
- f. Faktor lingkungan, kondisi rumah, termasuk pencahayaan, kelembapan, suhu, dan kepadatan hunian, memengaruhi penyebaran TB. Bangunan yang gelap dan minim sinar matahari dapat menjadi tempat masuknya bakteri *M. tuberculosis*.

2.3. Epidemiologi Tuberkulosis

Mycobacterium tuberculosis diperkirakan menginfeksi sekitar 25% populasi dunia secara laten dan telah berevolusi bersama manusia setidaknya selama 70.000 tahun.²⁷ Pada tahun 2017, diperkirakan terjadi sekitar 10 juta kasus Tuberkulosis baru dan 1,57 juta kematian akibat Tuberkulosis.²⁸ Menurut laporan global tuberkulosis WHO 2020 melaporkan jumlah kasus tuberkulosis pada tahun 2019 diperkirakan mencapai 10 juta kasus (kisaran 8,9–11,0 juta).²⁹ Lebih dari 1,7 miliar orang, atau 23% populasi global, diperkirakan mengidap infeksi tuberkulosis laten. Dengan 193 kasus per 100.000 orang pada tahun 2019, India mempunyai proyeksi kejadian tuberkulosis tertinggi di seluruh dunia dengan 2,64 juta kasus.¹ Jumlah kasus dan kejadian tuberkulosis tertinggi terjadi di wilayah

Asia Tenggara dan Afrika menurut WHO, dengan 9% kasus terjadi pada individu yang juga terinfeksi HIV.²⁸

Indonesia sendiri berada pada posisi kedua dengan jumlah penderita tuberkulosis terbanyak di dunia setelah India.³⁰ Setiap tahun didapatkan 250.000 kasus tuberkulosis baru di Indonesia dan kira-kira 100.000 kematian karena tuberkulosis.³¹ Kasus tuberkulosis di Indonesia diperkirakan sebanyak 969.000 kasus pada tahun 2021, meningkat 17% dibandingkan pada tahun 2020.³⁰ Penyakit tuberkulosis bertanggung jawab terhadap kematian hampir 2 juta penduduk setiap tahun, sebagian besar terjadi di negara berkembang.³¹ Pada tahun 2016, dari kematian terkait tuberkulosis, 22% adalah orang yang juga HIV positif, dan hampir 5% dari 10,4 juta kasus penyakit ini resisten terhadap setidaknya dua obat tuberkulosis lini pertama.²⁸ Kekhawatiran dan kesulitan yang terus berlanjut pada tuberkulosis adalah kasus terkait HIV dan tuberkulosis yang resistan terhadap obat. Dilaporkan bahwa terdapat 600.000 kasus baru tuberkulosis yang resistan terhadap beberapa obat (TUBERKULOSIS-MDR), dengan hampir setengah dari kasus ini terjadi di Tiongkok, Rusia, dan India. Dari kasus-kasus tersebut, 490.000 diantaranya resisten terhadap rifampisin, pengobatan lini pertama yang paling umum.²²

WHO telah menetapkan sasaran ambisius untuk periode 2020–2035. Sasaran ini mencakup pengurangan jumlah kematian akibat tuberkulosis sebesar 35% dan penurunan kejadian tuberkulosis sebesar 20% pada tahun 2020, dibandingkan dengan tahun 2015. Sejak tahun 2000, WHO secara rutin menyediakan perkiraan tuberkulosis tahunan untuk semua negara. Evaluasi perkiraan penyakit global dan regional pada tahun 2017 menunjukkan kemajuan dalam mencapai sasaran tersebut. Meskipun ada kemajuan dalam pemberantasan tuberkulosis global, pencapaian keseluruhan masih terbatas pada tahun 2017, sejalan dengan beberapa tahun sebelumnya. Upaya yang lebih intensif diperlukan untuk meningkatkan diagnosis, pengobatan, dan pencegahan tuberkulosis agar dapat mencapai sasaran global pada periode 2020–2035.²⁸

2.4. Patogenesis Tuberkulosis

Perkembangan tuberkulosis sangat erat kaitannya dengan respon imun pejamu. Dalam kebanyakan kasus, sistem kekebalan tubuh merespons secara efektif terhadap patogen tuberkulosis, membatasi pertumbuhan bakteri dan mencegah infeksi. Yang mengejutkan, sebagian besar kerusakan jaringan yang disebabkan oleh infeksi tuberkulosis sebenarnya disebabkan oleh respons imun tubuh. Misalnya, nekrosis dan rongga paru-paru sering terjadi pada pasien tuberkulosis. Namun, orang dengan sistem kekebalan tubuh lemah, seperti pengidap HIV, mungkin menunjukkan gejala yang tidak lazim. Pada pasien tuberkulosis – HIV, rontgen dada biasanya tidak menunjukkan adanya kavitas. Meskipun kerusakan jaringan minimal akibat respon imun, melemahnya sistem imun memungkinkan bakteri tuberkulosis berkembang biak dan menyebar. Fenomena ini sering diamati pada pasien tuberkulosis – HIV melalui rontgen dada yang menunjukkan tuberkulosis milier.³²

2.4.1 Patogenesis Tuberkulosis Primer

Tuberkulosis adalah penyakit yang ditularkan melalui udara melalui partikel kecil yang disebut droplet nuklei, yang berukuran 1 hingga 5 mikron. Droplet nuklei ini dapat bertahan di udara hingga beberapa jam, bergantung pada kondisi lingkungan. Ketika terhirup, droplet nuklei memiliki sifat aerodinamis yang memungkinkan bakteri masuk ke saluran pernapasan, mencapai bronkiolus dan alveoli. Jika jumlah dalam tubuh sedikit, makrofag sistem kekebalan tubuh segera melakukan fagositosis dan mencerna kuman tuberkulosis yang disimpan di saluran pernapasan. Namun jika jumlah kuman tuberkulosis melebihi kapasitas makrofag, maka bakteri tersebut dapat bertahan hidup dan berkembang biak di dalam makrofag sehingga menyebabkan pneumonia tuberkulosis lokal. Sistem kekebalan merespons dengan membentuk penghalang pelindung, seperti granuloma, di sekitar area yang terinfeksi.³² Pada tahap awal infeksi, interaksi antara *Mycobacterium tuberculosis* dengan sistem kekebalan tubuh menghasilkan

pembentukan granuloma. Granuloma terdiri dari kumpulan bakteri hidup dan mati yang dikelilingi oleh makrofag. Seiring waktu, granuloma berubah menjadi massa jaringan fibrosa. Bagian tengah dari massa ini disebut *Ghon tuberculosis* dan mengalami nekrosis, menyerupai massa keju. Proses ini mengarah pada klasifikasi dan akhirnya membentuk jaringan kolagen, dan bakteri memasuki keadaan dorman.²⁶

Setelah infeksi awal, seseorang dapat mengalami penyakit aktif karena gangguan atau respons yang tidak memadai dari sistem kekebalan tubuh. Jika respons imun tidak memadai, kuman tuberkulosis dapat menembus hambatan tersebut. Mereka kemudian dapat menggunakan sistem limfatik dan pembuluh darah untuk menyebar ke jaringan dan organ yang jauh, termasuk kelenjar getah bening, puncak paru-paru, ginjal, otak, dan tulang.³² Penyakit juga dapat aktif melalui infeksi berulang dan reaktivasi bakteri yang sebelumnya tidak aktif. Dalam kasus ini, tuberkel Ghon pecah, menghasilkan materi nekrotik di dalam bronkus. Bakteri kemudian menyebar melalui udara, menyebabkan penyebaran penyakit lebih lanjut. Tuberkel yang sembuh membentuk jaringan parut. Paru-paru yang terinfeksi membengkak, mengakibatkan bronkopneumonia lebih lanjut.²⁶

Bakteri tuberkulosis, bila terhirup melalui saluran napas, menetap di jaringan paru-paru, membentuk infeksi paru-paru lokal yang dikenal sebagai fokus primer. Fokus primer ini dapat terjadi dimana saja di dalam paru-paru. Selanjutnya, terjadi peradangan pada pembuluh limfatik yang menuju ke hilus paru (disebut limfangitis lokal). Pembengkakan kelenjar getah bening di hilus (disebut limfadenitis regional) menyertai peradangan ini. Kombinasi terjadinya fokus primer dan limfangitis regional disebut sebagai kompleks primer. Kompleks primer ini akan mengalami salah satu kejadian sebagai berikut :³²

1. Tuberkulosis dapat sembuh tanpa meninggalkan cacat sama sekali (*restitutio ad integrum*)
2. Sembuh dengan meninggalkan sedikit bekas (seperti lesi Ghon, garis fibrotik, atau fokus kalsifikasi di hilus).

3. Menyebar dengan cara:

- a. Perkontinuitatum, menyebar ke sekitarnya. Salah satu contoh adalah epituberkulosis, yaitu suatu kejadian di mana bronkus, biasanya bronkus lobus medius, ditekan oleh kelenjar hilus yang membesar sehingga menimbulkan obstruksi pada saluran napas yang terkena, dengan akibat atelektasis. Kuman *Mycobacterium tuberculosis* akan menjalar sepanjang bronkus yang tersumbat ini ke lobus yang atelektasis dan menimbulkan peradangan pada lobus yang atelektasis tersebut, yang dikenal sebagai epituberkulosis.
- b. Bronkogenik: Penyebaran melalui saluran pernapasan, baik ke paru yang sama maupun ke paru sebelahnya. Selain itu, penyebaran juga dapat terjadi melalui tertelan.
- c. Limfogenik: Penyebaran melalui sistem limfatik ke kelenjar limfa di sekitarnya, yang dapat menyebabkan limfadenitis tuberkulosis. Sistem limfatik paru memberikan jalur langsung bagi *Mycobacterium tuberculosis* untuk menyebar dari fokus infeksi awal di paru ke kelenjar limfa terdekat, di mana respon imun berikutnya terjadi. Pada pembuluh limfatik itu sendiri, terjadi inflamasi progresif sebagai bagian dari proses infeksi primer. Kuman *Mycobacterium tuberculosis* akan menyebar melalui saluran pembuluh limfatik pada tahap awal infeksi. Penyebaran infeksi di luar paru biasanya dimulai dari penyebaran ke kelenjar limfa. Dari sana, penyebaran melalui sistem limfatik dapat berlanjut ke penyebaran hematogen melalui duktus torasikus.
- d. Hematogenik: Penyebaran ini terkait dengan daya tahan tubuh, total, dan virulensi kuman. Meskipun beberapa lesi dapat sembuh secara spontan, jika tidak ada imunitas yang memadai, penyebaran ini dapat menyebabkan kondisi serius seperti tuberkulosis milier, meningitis tuberkulosis, dan *typhobacillosis Landouzy*. Penyebaran ini juga dapat mempengaruhi

organ tubuh lainnya, seperti tulang, ginjal, anak ginjal, dan genitalia.

Komplikasi dan Penyebaran:

Akibatnya, penyebaran ini dapat berakhir dengan dua kemungkinan: sembuh dengan meninggalkan bekas (misalnya pertumbuhan terhambat pada anak setelah mengalami tuberkuloma) atau kematian.³²

2.5 Respon Imun Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*

Komponen penting dalam upaya pemberantasan tuberkulosis melalui pengembangan terapi imunologi adalah memahami respons inang terhadap infeksi *Mycobacterium tuberculosis*. Sel imun bawaan paru-paru—terutama neutrofil, monosit, sel dendritik, dan makrofag—adalah yang pertama menangkis *Mycobacterium tuberculosis* dan mampu memfagosit patogen dengan mudah.³³ *Mycobacterium tuberculosis* dapat menginfeksi, hidup, dan menyebabkan penyakit progresif baik pada hewan percobaan maupun manusia dengan respons imun yang tampaknya normal. Hal ini menunjukkan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* telah mengembangkan pertahanan terhadap kehancuran oleh sistem kekebalan alami tubuh.³⁴

2.5.1 Diagnosis Tuberkulosis

Semua pasien yang dicurigai menderita tuberkulosis harus menjalani pemeriksaan bakteriologis untuk memastikan diagnosis tuberkulosis. Pemeriksaan bakteriologis mencakup pengambilan sampel dari sediaan biologis (seperti dahak atau spesimen lain), pemeriksaan kultur, dan identifikasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis*. Di wilayah dengan laboratorium yang dipantau mutunya melalui sistem pemantauan mutu eksternal, diagnosis kasus tuberkulosis paru dengan hasil pemeriksaan BTA positif dapat ditegakkan berdasarkan minimal satu spesimen dengan BTA positif. Namun, di daerah tanpa pemantauan mutu eksternal, definisi kasus tuberkulosis BTA positif memerlukan setidaknya dua spesimen dengan BTA positif.³⁶

2.5.2 Pemeriksaan Bakteriologi

a. Bahan Pemeriksaan

Bahan pemeriksaan Pemeriksaan bakteriologis untuk menemukan bakteri tuberkulosis mempunyai arti yang sangat penting dalam menegakkan diagnosis. Bahan untuk pemeriksaan bakteriologi ini dapat berasal dari dahak, cairan pleura, liquor cerebrospinal, bilasan bronkus, bilasan lambung, kurasan bronkoalveolar (bronchoalveolar lavage/BAL), urin, feses, dan jaringan biopsi (termasuk biopsi jarum halus/BJH).³²

b. Cara pengumpulan dan pengiriman bahan

Cara pengambilan dahak 2 kali dengan minimal satu kali dahak pagi hari. Untuk pemeriksaan TCM, pemeriksaan dahak cukup satu kali. Bahan pemeriksaan hasil BJH (Biopsi Jarum Halus) dapat dibuat menjadi sediaan apus kering di gelas objek. Untuk kepentingan kultur dan uji kepekaan dapat ditambahkan NaCl 0.9% 3-5 ml sebelum dikirim ke laboratorium mikrobiologi dan patologi anatomi.³²

c. Cara pemeriksaan dahak dan bahan lain

Pemeriksaan bakteriologi dari spesimen dahak dan bahan lain (cairan pleura, liquor cerebrospinal, bilasan bronkus, bilasan lambung, kurasan bronkoalveolar/BAL, urin, feses, dan jaringan biopsi, termasuk BJH) dapat dilakukan dengan cara:³²

- Mikroskopis
- Biakan

d. Pemeriksaan mikroskopis

- 1) Mikroskopis biasa : pewarnaan *Ziehl-Nielsen*
- 2) Mikroskopis fluoresens : pewarnaan auramin-rhodamin

Interpretasi pemeriksaan mikroskopis dibaca dengan skala IUATLD (rekomendasi WHO).

- Skala IUATLD (International Union Against Tuberculosis and Lung Disease) :
 - Tidak ditemukan BTA dalam 100 lapang pandang, disebut negatif.
 - Ditemukan 1-9 BTA dalam 100 lapang pandang, ditulis jumlah basil yang ditemukan.
 - Ditemukan 10-99 BTA dalam 100 lapang pandang disebut + (1+).
 - Ditemukan 1-10 BTA dalam 1 lapang pandang, disebut ++ (2+).
 - Ditemukan >10 BTA dalam 1 lapang pandang, disebut +++ (3+).

e. Pemeriksaan Bakteriologis – Kultur

Kultur spesimen melibatkan budidaya mikobakteri pada media padat atau cair. Kultur bakteriologis tetap menjadi standar emas untuk memastikan tuberkulosis di laboratorium. Pertumbuhan bakteri sangat penting untuk melakukan pengujian kerentanan obat dan genotipe. Terlepas dari apakah hasil hapusan basil tahan asam (AFB) positif atau negatif, semua spesimen harus menjalani kultur.

- Kultur Positif: Kultur positif menunjukkan adanya bakteri *Mycobacterium tuberculosis* dalam spesimen. Namun, meskipun tidak ada hasil kultur yang positif, penyakit tuberkulosis dapat didiagnosis berdasarkan tanda dan gejala klinis saja.
- Kultur Negatif: Kultur negatif berarti *Mycobacterium tuberculosis* tidak teridentifikasi dalam spesimen. Namun hal ini tidak menutup kemungkinan diagnosis penyakit tuberkulosis. Beberapa pasien dengan kultur negatif didiagnosis berdasarkan temuan klinis lain dan respons mereka terhadap pengobatan.

Ingatlah bahwa pendekatan komprehensif, yang menggabungkan penilaian klinis dan tes laboratorium, sangat penting untuk diagnosis dan penatalaksanaan tuberkulosis yang akurat.³⁷

I. Media *Lowenstein-Jensen*

Dalam mengidentifikasi *Mycobacterium tuberculosis*, pemeriksaan kultur menggunakan media tertentu lebih sensitif dibandingkan pemeriksaan mikroskopis. Media kultur dapat mendeteksi 10 – 1000 mikobakteri per mililiter. Media *Lowenstein-Jensen*, media padat yang mengandung komponen berbahan dasar telur, awalnya dikembangkan oleh Lowenstein dan kemudian disempurnakan oleh Jensen pada tahun 1930-an. Peneliti seperti Ogawa, Kudoh, Gruft, Wayne, dan Doubek terus mengerjakan media ini. Media Lowenstein-Jensen umumnya digunakan untuk mengisolasi dan membudidayakan spesies *Mycobacteria*. Ini berfungsi sebagai alat diagnostik yang berharga dengan sensitivitas dan spesifisitas tinggi dalam program pengendalian tuberkulosis.³²

II. *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT)

Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) mengukur pertumbuhan mikobakteri menggunakan sensor fluoresensi yang terintegrasi dalam bahan berbasis silikon. Untuk menghambat pertumbuhan basil kontaminasi, 0,5 ml suplemen nutrisi dan 0,1 ml kombinasi antibiotik ditambahkan ke dalam 4 ml kaldu Middlebrook 7H9 di dalam tabung. Saat *mycobacterium* tumbuh, ia akan mengonsumsi oksigen sehingga menyebabkan sensor menyala. Lampu UV sepanjang 365 nm akan digunakan untuk melihat sensor. Pendekatan MGIT memerlukan waktu rata-rata 21,2 hari (kisaran 4-53 hari) untuk mengidentifikasi pertumbuhan basil, sedangkan metode *Lowenstein Jensen* konvensional memerlukan waktu rata-rata 40,4 hari (kisaran 30-56 hari), menurut berbagai literatur. Sejumlah penelitian juga menunjukkan bahwa pendekatan MGIT merupakan cara yang sederhana, berguna, dan

ekonomis dalam budidaya *Mycobacterium tuberculosis*. Lanjutkan dengan identifikasi spesies *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan *Rapid Test Tuberculosis* Ag MPT64 jika terjadi perkembangan koloni pada budidaya. Pengujian oposisi terhadap OAT jalur 1 dan 2 juga dapat dilakukan setelah hasil kultur positif.³²

f. Uji Molekuler Cepat Tes molekuler cepat (TCM)

Dapat mendeteksi materi genetik yang menunjukkan resistensi, memungkinkan identifikasi MTB dan pengujian kerentanan obat secara bersamaan. GeneXpert MTB/RIF (uji kerentanan terhadap Rifampisin) adalah tes TCM yang sering digunakan. Meskipun tes ini belum begitu dikenal, tes TCM tambahan kini semakin populer. RIF/MTB GeneXpert Tes diagnostik otomatis yang disebut Xpert MTB/RIF menggunakan kartrid untuk mendeteksi resistensi MTB dan Rifampisin. Pendekatan uji amplifikasi asam nukleat (NAAT) mudah digunakan dan sangat sensitif dengan Xpert MTB/RIF, yang didasarkan pada platform Cepheid GeneXPert. Teknik ini menemukan rangkaian asam nukleat dalam genom tuberkulosis dan memurnikan, mengkonsentrasikan, memperkuat, dan menggunakan PCR waktu nyata. Dibutuhkan satu hingga dua jam untuk menyelesaikan proses manajemen tes. Metode ini akan bermanfaat untuk menyaring kasus suspek TB-RO secara cepat dengan bahan pemeriksaan dahak. Pemeriksaan ini memiliki sensitivitas dan spesifisitas sekitar 99%.³²

g. Uji molekuler lainnya:³²

1. MTBDRplus (uji kepekaan untuk R dan H)
2. MTBDRsl (uji kepekaan untuk etambutol, aminoglikosida, dan florokuinolon)
3. Molecular beacon testing (uji kepekaan untuk R)
4. PCR-Based Methods of IS6110 Genotyping
5. Spoligotyping

6. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)
7. MIRU / VNTR Analysis
8. PGRS RFLP
9. Genomic Deletion Analysis
10. Genoscholar:
 - PZA TB II (uji kepekaan untuk Z)
 - NTM+MDRTB II (uji kepekaan untuk identifikasi spesies Mycobacterium dan uji kepekaan H + R)
- h. FQ+KM-TB II (uji kepekaan florokuinolon dan kanamisin)

2.6.5. Pemeriksaan Radiologi

Pemeriksaan radiologi standar untuk tuberkulosis paru melibatkan foto toraks dengan proyeksi postero anterior (PA). Selain itu, pemeriksaan lain dapat dilakukan berdasarkan indikasi klinis, seperti foto toraks dengan proyeksi lateral, top-lordotik, oblik, atau *CT-Scan*. Pada hasil foto toraks, tuberkulosis dapat menampilkan berbagai bentuk gambaran radiologi (multiform).

Beberapa gambaran radiologi yang mencurigakan sebagai lesi tuberkulosis aktif meliputi³²:

1. Bayangan berawan atau nodular di segmen apikal dan posterior lobus atas paru serta segmen superior lobus bawah.
2. Kavitas, terutama jika lebih dari satu, yang dikelilingi oleh bayangan opak berawan atau nodular.
3. Bayangan bercak milier.
4. Efusi pleura, yang biasanya bersifat unilateral (umum) atau bilateral (jarang).

Gambaran radiologi yang mencurigakan lesi tuberkulosis inaktif meliputi:

1. Fibrotik: Ini mengacu pada gambaran radiologi yang menunjukkan adanya fibrosis (penggantian jaringan normal dengan jaringan ikat) pada paru-paru.
2. Kalsifikasi: Terdapat tanda-tanda kalsifikasi (pengerasan) pada gambaran radiologi.

3. Schwarte atau penebalan pleura: Ini mengacu pada perubahan pada lapisan pleura (membran yang melapisi paru-paru).

Selain itu, luluh paru (disebut juga *destroyed lung*) adalah kondisi di mana gambaran radiologi menunjukkan kerusakan berat pada jaringan paru. Gambaran radiologi luluh paru melibatkan:

- Ateletasis: Kolaps atau pengempisan bagian paru karena kegagalan ventilasi.
- Multikavitas: Terdapat lebih dari satu kavitas (ruang berongga) di dalam paru-paru.
- Fibrosis parenkim paru: Penggantian jaringan paru yang normal dengan jaringan ikat.

Namun, aktivitas lesi atau penyakit sulit dinilai hanya berdasarkan gambaran radiologi. Oleh karena itu, pemeriksaan bakteriologi diperlukan untuk memastikan aktivitas proses penyakit.³²

2.6.6. Pemeriksaan Penunjang Lain

2.6.6.1. Pemeriksaan Histopatologi Jaringan

Pemeriksaan histopatologi yang dilakukan untuk membantu mendiagnosis tuberkulosis. Pada pemeriksaan ini melibatkan pengambilan bahan jaringan melalui biopsi atau otopsi. Berikut ini adalah beberapa metode pengambilan jaringan: Biopsi aspirasi dengan jarum halus (BJH) pada kelenjar getah bening (KGB).

1. Biopsi pleura melalui torakoskopi atau menggunakan jarum abram seperti *Cope* dan *Veen Silverman*.
2. Biopsi jaringan paru (*trans bronchial lung biopsy/TBLB*) dengan menggunakan bronkoskopi, *trans thoracal needle aspiration/TTNA*, atau biopsi paru terbuka.
3. Biopsi atau aspirasi pada lesi organ di luar paru yang dicurigai tuberkulosis.

4. Otopsi.

Pada pemeriksaan biopsi, disarankan untuk mengambil dua sediaan: satu sediaan dimasukkan ke dalam larutan salin dan dikirim ke laboratorium mikrobiologi untuk dikultur, sementara sediaan yang kedua difiksasi untuk pemeriksaan histologi .

Aspiration fine needle (AFN) adalah prosedur yang jauh lebih tidak invasif yang memiliki nilai sensitivitas dan spesifitas yang tinggi yaitu 78,95% dan 90,32%. Beberapa penelitian telah menunjukkan kegunaannya AFN dalam diagnosis limfadenopati tuberkulosis.^{50,51} Pemeriksaan AFN dilakukan jika didapatkan adanya tanda kelainan pada pemeriksaan fisik yaitu dijumpai pembesaran pada nodul dari tubuh pasien.⁵²

Selain itu, pewarnaan *Ziehl-Neelsen* (ZN) untuk AFB, kultur mikobakteri, dan pengujian molekuler juga dilakukan pada bahan FNA. Pewarnaan ZN dan analisis mikroskopis cepat, terjangkau, dan sederhana, dengan spesifisitasnya mencapai 100%, dan sensitivitasnya antara 46% dan 78%.³⁸

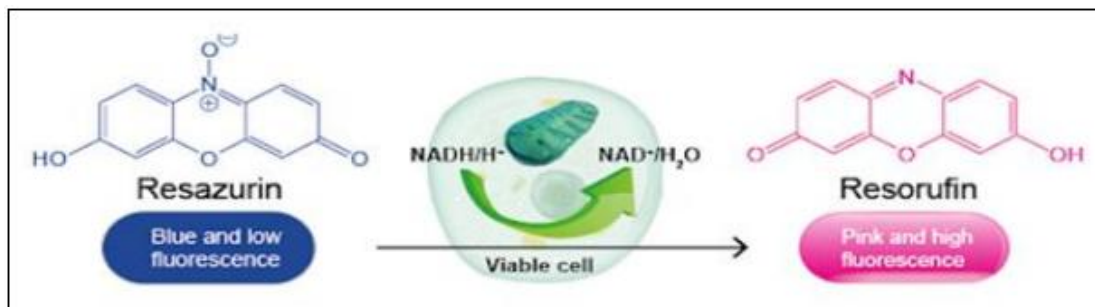
Salah satu teknik diagnostik yang paling penting adalah pemeriksaan histopatologi. Meskipun histologi adalah cara paling akurat untuk mendiagnosis limfadenitis servikal, penggunaannya dibatasi karena memerlukan pembedahan invasif dan oleh karena itu tidak diterima secara luas.³⁸ Penegakkan diagnosis limfadenitis tuberkulosis pada metode pewarnaan hematoxilin eosin (HE) apabila dijumpai pembentukan tuberkel atau granuloma dan nekrosis perkijuan.³⁹

2.6.6.2. Pemeriksaan Uji Microplate Resazurin:

Pendekatan baru yang memanfaatkan indikator kolorimetri sensitif redoks resazurin telah diperkenalkan untuk menilai resistensi obat dan menentukan konsentrasi penghambatan minimum (MIC) agen antimikroba terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Resazurin, yang tampak biru dalam bentuk

teroksidasi, berubah menjadi merah muda setelah direduksi oleh sel yang aktif secara metabolik. D

Uji mikrotiter resazurin (*Resazurin Microtiter Assay/REMA*) merupakan metode berbasis reaksi oksidasi-reduksi yang mendeteksi aktivitas metabolik sel melalui perubahan warna indikator resazurin dari biru menjadi merah muda di hadapan bakteri hidup, dan telah direkomendasikan oleh organisasi kesehatan dunia (WHO) sebagai metode alternatif untuk pengujian kepekaan obat terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. *Microplate Resazurin Assay* digunakan sebagai indikator viabilitas dengan mengubah resazurin menjadi resorufin. Resazurin, yang awalnya merupakan pewarna indikator non-fluoresen, mengalami konversi menjadi resorufin merah terang yang bersifat fluoresen melalui reaksi reduksi oleh aktivitas metabolik organisme hidup. Tingkat fluoresensi yang dihasilkan berbanding lurus dengan jumlah organisme yang masih hidup.⁴¹



(Gambar 2.1 Representasi grafis prinsip microplateresazurin assay).⁴¹

2.7. Pengobatan Tuberkulosis Paru

2.7.1. Tujuan Pengobatan

Pengobatan tuberkulosis paru bertujuan untuk.³⁶

1. Menyembuhkan pasien dan mempertahankan kualitas hidup serta produktivitas.
2. Mencegah kematian akibat tuberkulosis aktif atau efek lanjutan.
3. Mencegah kekambuhan tuberkulosis.

4. Mengurangi penularan tuberkulosis kepada orang lain.
5. Mencegah perkembangan dan penularan resistensi obat.

2.7.2. Prinsip Pengobatan

Prinsip pengobatan tuberkulosis melibatkan penggunaan obat anti-tuberkulosis (OAT), yang merupakan komponen terpenting dalam pengobatan tuberkulosis. Berikut adalah prinsip-prinsipnya:

1. Paduan OAT yang tepat: Pengobatan harus mengandung minimal 4 macam obat untuk mencegah terjadinya resistensi.
2. Dosis yang tepat: Obat harus diberikan dalam dosis yang sesuai.
3. Kepatuhan: Pasien harus menelan obat secara teratur dan diawasi oleh pengawas menelan obat (PMO) hingga selesai masa pengobatan.
4. Durasi pengobatan yang cukup: Pengobatan dibagi dalam tahap awal dan tahap lanjutan untuk mencegah kekambuhan.³⁶

2.7.3. Tahapan Pengobatan

Tahapan pengobatan tuberkulosis terdiri dari 2 tahap, yaitu :

1. Tahap Awal :

Pada tahap awal pengobatan tuberkulosis, pengobatan diberikan setiap hari. Tujuan dari paduan pengobatan pada tahap ini adalah untuk secara efektif menurunkan jumlah kuman tuberkulosis yang ada dalam tubuh pasien dan meminimalisir pengaruh dari sebagian kecil kuman yang mungkin sudah resisten terhadap obat sejak sebelum pasien mendapatkan pengobatan.

Pengobatan tahap awal pada semua pasien baru harus diberikan selama 2 bulan. Pada umumnya, dengan pengobatan secara teratur dan tanpa adanya penyulit, daya penularan tuberkulosis sudah sangat menurun setelah pengobatan selama 2 minggu pertama.

2. Tahap Lanjutan :

Pengobatan tahap lanjutan bertujuan untuk membunuh sisa-sisa kuman tuberkulosis yang masih ada dalam tubuh, terutama kuman yang bersifat persisten. Hal ini memungkinkan pasien sembuh sepenuhnya dan mencegah

terjadinya kekambuhan. Durasi pengobatan pada tahap lanjutan adalah selama 4 bulan. Pada fase lanjutan, obat seharusnya diberikan setiap hari.³⁶

Pengobatan untuk tuberkulosis paru (2RHZE/4RH), dengan durasi yang bervariasi antara 6 dan 12 bulan berdasarkan keadaan klinis.⁴²

2.7.3.1. Obat Anti Tuberkulosis (OAT)

Regimen pengobatan TB-SO Paduan OAT untuk pengobatan TB-SO di Indonesia adalah: 2RHZE / 4 RH Pada fase intensif pasien diberikan kombinasi 4 obat berupa Rifampisin (R), Isoniazid (H), Pirazinamid (Z), dan Etambutol (E) selama 2 bulan dilanjutkan dengan pemberian Isoniazid (H) dan Rifampisin (R) selama 4 bulan pada fase lanjutan. Pemberian obat fase lanjutan diberikan sebagai dosis harian (RH) sesuai dengan rekomendasi WHO. Pasien dengan TB-SO diobati menggunakan OAT lini pertama. Dosis OAT lini pertama yang digunakan dapat dilihat pada tabel 1.³²

Tabel 2.1 Dosis OAT lini pertama

Dosis OAT lepasan lini pertama untuk pengobatan TB-SO		
Nama Obat	Dosis harian	
	Dosis (mg/kgBB)	Dosis maksimum (mg)
Rifampisin (R)	10 (8-12)	600
Isoniazid (H)	5 (4-6)	300
Pirazinamid (Z)	15 (20-30)	
Etambutol (E)	15 (15-20)	
Streptomisin	12 (12-18)	

Untuk menunjang kepatuhan berobat, paduan OAT lini pertama telah dikombinasikan dalam obat Kombinasi Dosis Tetap (KDT). Satu tablet KDT

RHZE untuk fase intensif berisi Rifampisin 150 mg, Isoniazid 75 mg, Pirazinamid 400 mg, dan Etambutol 275 mg. Sedangkan untuk fase lanjutan yaitu KDT RH yang berisi Rifampisin 150 mg + Isoniazid 75 mg diberikan setiap hari. Jumlah tablet KDT yang diberikan dapat disesuaikan dengan berat badan pasien. Secara ringkas perhitungan dosis pengobatan TB menggunakan OAT KDT dapat dilihat pada Tabel 2.³²

Tabel 2.2 Dosis OAT KDT

Dosis OAT untuk pengobatan TB-SO menggunakan tablet kombinasi dosis tetap (KDT)		
Berat Badan (KG)	Fase intensif seetiap hari dengan KDT RHZE (15/75/400/275)	Fase lanjutan setiap hari dengan KDT RH (150/75)
	Selama 8 minggu	Selama 16 minggu
30 – 37 kg	2 tablet 4 KDT	2 tablet
38 – 54 kg	3 tablet 4 KDT	3 tablet
≥ 55 kg	4 tablet 4 KDT	4 tablet

Pengembangan pengobatan tuberkulosis paru yang efektif merupakan hal yang sangat penting untuk menyembuhkan pasien dan mencegah terjadinya tuberkulosis resisten obat (TB-RO). Strategi DOTS (*Directly Observed Treatment, Short-Course*) yang dikembangkan untuk mengontrol epidemi TB menjadi prioritas utama bagi WHO. *International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* (IUALTD) dan WHO telah menyarankan penggunaan kombinasi dosis tetap sebagai pengganti paduan obat tunggal atau obat lepasan dalam pengobatan tuberkulosis primer sejak tahun 1998.³²

2.7.4. Efek Samping OAT

Sebagian besar individu yang mengalami tuberkulosis dapat menyelesaikan pengobatan tanpa mengalami efek samping yang signifikan.

Namun, ada sekelompok kecil pasien yang mungkin mengalami efek samping selama masa pengobatan. Oleh karena itu, pemantauan terhadap kemungkinan efek samping sangatlah penting selama proses pengobatan. Efek samping yang mungkin timbul dapat beragam, mulai dari yang ringan hingga berat. Jika efek samping yang muncul bersifat ringan dan dapat diatasi dengan obat simtomatis, maka pemberian Obat Anti Tuberkulosis (OAT) dapat tetap dilanjutkan.³²

1) Isoniazid

Efek samping yang bersifat ringan dapat mencakup gejala gangguan pada syaraf tepi, seperti kesemutan, sensasi terbakar di kaki atau tangan, dan nyeri otot. Untuk mengurangi efek ini, pemberian piridoksin dengan dosis 100 mg per hari atau vitamin B kompleks dapat membantu. Dalam kondisi seperti ini, pengobatan dapat tetap dilanjutkan. Selain itu, perlu diwaspadai juga kemungkinan gejala defisiensi piridoksin yang dapat menyebabkan sindrom pellagra. Efek samping yang lebih serius melibatkan hepatitis akibat obat, meskipun insiden ini hanya terjadi pada sekitar 0,5% pasien.³²

2) Rifampisin

Efek samping yang bersifat ringan dapat mencakup:

- Sindrom flu: Gejala meliputi demam, menggigil, dan nyeri tulang.
- Sindrom dispepsia: Terdiri dari sakit perut, mual, penurunan nafsu makan, muntah, dan diare.

Sementara itu, efek samping yang berat dan jarang terjadi meliputi:

- Hepatitis akibat obat dan ikterik: Jika ini terjadi, pemberian Obat Anti Tuberkulosis (OAT) harus dihentikan sementara.
- Purpura, anemia hemolitik akut, syok, dan gagal ginjal: Jika salah satu dari gejala ini muncul, rifampisin harus segera dihentikan dan tidak boleh diberikan lagi, meskipun gejalanya telah menghilang.

- Sindrom respirasi: Ditandai dengan sesak napas.

Perubahan warna pada cairan tubuh: Rifampisin dapat menyebabkan warna merah pada air seni, keringat, air mata, dan air liur. Namun, perubahan warna ini tidak berbahaya dan terjadi karena proses metabolisme obat.³²

3) Pirazinamid

Hepatitis akibat obat adalah efek samping berat yang dapat terjadi (penatalaksanaan sesuai pedoman TB pada keadaan khusus). Selain itu, nyeri sendi juga dapat timbul namun, dapat diatasi dengan pemberian anti nyeri, seperti aspirin.

Sebagian kasus, dapat mengalami serangan artritis Gout, yang kemungkinan disebabkan oleh penurunan ekskresi dan penimbunan asam urat. Selain itu, reaksi lain yang mungkin terjadi meliputi demam, mual, kemerahan, dan reaksi kulit yang berbeda-beda.³²

4) Etambutol

Etambutol dapat menyebabkan gangguan penglihatan, terutama penurunan ketajaman penglihatan dan buta warna merah dan hijau. Efek ini tergantung pada dosis yang digunakan, dan sangat jarang terjadi pada penggunaan dosis 15-25 mg/kg BB per hari atau 30 mg/kg BB yang diberikan 3 kali seminggu. Setelah penghentian obat, gangguan penglihatan biasanya akan kembali normal dalam beberapa minggu. Namun, sebaiknya etambutol tidak diberikan pada anak-anak karena risiko kerusakan saraf okuler yang sulit dideteksi, terutama pada anak-anak yang kurang kooperatif.³²

5) Streptomisin

Efek samping utama dari streptomisin melibatkan kerusakan pada saraf kedelapan yang berhubungan dengan keseimbangan dan pendengaran. Risiko efek samping ini akan meningkat seiring dengan

peningkatan dosis yang digunakan dan usia pasien. Pasien dengan gangguan fungsi ekskresi ginjal memiliki risiko yang lebih tinggi. Gejala efek samping yang mungkin dirasakan termasuk telinga berdenging (tinitus), pusing, dan kehilangan keseimbangan. Keadaan ini biasanya dapat pulih jika obat segera dihentikan atau dosisnya dikurangi. Namun, jika pengobatan tetap berlanjut, kerusakan dapat menjadi permanen (kehilangan keseimbangan dan tuli). Reaksi hipersensitivitas kadangkala kadang terjadi, ditandai dengan demam mendadak, sakit kepala, muntah, dan eritema pada kulit. Efek samping ringan dan sementara (meskipun jarang) seperti kesemutan di sekitar mulut dan telinga berdenging dapat terjadi segera setelah suntikan. Jika reaksi ini mengganggu, dosis dapat dikurangi sebesar 0,25 gram. Perlu diperhatikan bahwa streptomisin dapat menembus sawar plasenta, sehingga tidak boleh diberikan kepada perempuan hamil karena dapat merusak fungsi pendengaran janin.³²

2.8. Daun Legundi (*Vitex trifolia L.*)

2.8.1. Definisi

Vitex, yang memiliki lebih dari 250 spesies pohon dan semak, dikenal tersebar di wilayah tropis, subropis, dan beberapa di iklim sedang. Genus ini adalah genus terbesar dalam keluarga Verbena.^{6,43} Berdasarkan Taksonomi *V. trifolia L* terdiri dari:

- Kingdom: Tumbuhan Plantae
- Divisi: Angiospermae
- Kelas: Eudicots
- Unranked: Asterids
- Ordo: lamiales
- Famili: lamiaceae, verbeniaceae
- Genus: *Vitex*

- Species trifolia
- Nama binomial *Vitex trifolia*

Vitex trifolia (dikenal juga sebagai legundi) adalah sejenis tumbuhan perdu atau pohon kecil yang dapat tumbuh hingga 6 meter. Tanaman ini ditemukan di beberapa wilayah di Asia, termasuk China, India, Indonesia, Sri Lanka, Singapura, dan Australia. Legundi memiliki sejarah panjang dalam pengobatan tradisional karena efektivitasnya dalam mengatasi asma dan gangguan pernapasan. Berbagai bagian tanaman, seperti buah, daun, akar, bunga, dan batang, telah terbukti memiliki nilai medis; namun, buahnya merupakan bagian yang paling banyak diteliti dan digunakan.⁴⁴

2.8.2. Penggunaan Tradisional

Tanaman obat tradisional, *Vitex trifolia L.*, memiliki sejarah panjang dalam penggunaan obat. Sebagian besar bagian tanaman ini, termasuk buah, daun, akar, bunga, dan batang, telah terbukti memiliki potensi terapeutik. Namun, penelitian terkini lebih fokus pada buah *Vitex trifolia L.*, yang dikenal sebagai Legundi atau folium viticis. Legundi telah digunakan selama bertahun-tahun dalam pengobatan tradisional Tiongkok (TCM) untuk mengatasi berbagai masalah kesehatan, termasuk flu, sakit kepala, bengkak mata, tinitus, dan gangguan pendengaran. Di India, para tabib suku dan lokal menggunakan Viticis Fructus untuk mengobati berbagai penyakit, seperti penyakit hati, tumor, nyeri rematik, peradangan, keseleo, demam, dan tuberkulosis. Di Korea, Viticis Fructus digunakan untuk mengatasi alergi dan infeksi saluran pernapasan atas, serta membantu pemulihan pascapersalinan, mengurangi sakit kepala, dan mengatasi nyeri mata, diare, dan memar.⁴⁵

Sifat farmakologis *Vitex trifolia L.*, termasuk sebagai efek analgesik, anti-inflamasi, antioksidan, antibakteri, dan sitotoksik pada sel kanker yang berbeda, ditunjukkan dalam literatur penelitian farmakologis kontemporer.⁴⁶ *Vitex trifolia*

L., tanaman obat yang semakin dikenal dan digunakan dalam terapi kontemporer. Beberapa penelitian menunjukkan legundi dapat menurunkan resiko katarak pada usia tua, membantu mengatasi rhinitis, mengurangi gejala neuralgia trigeminal, meskipun bukti ilmiah masih terbatas, beberapa praktisi menggunakan *Vitex trifolia L.* sebagai bagian dari pendekatan pengobatan untuk migrain., dan mengurangi gejala otitis media.⁴⁷



Gambar 2.2 Daun legundi.⁴⁸

2.8.3. Fitokimia

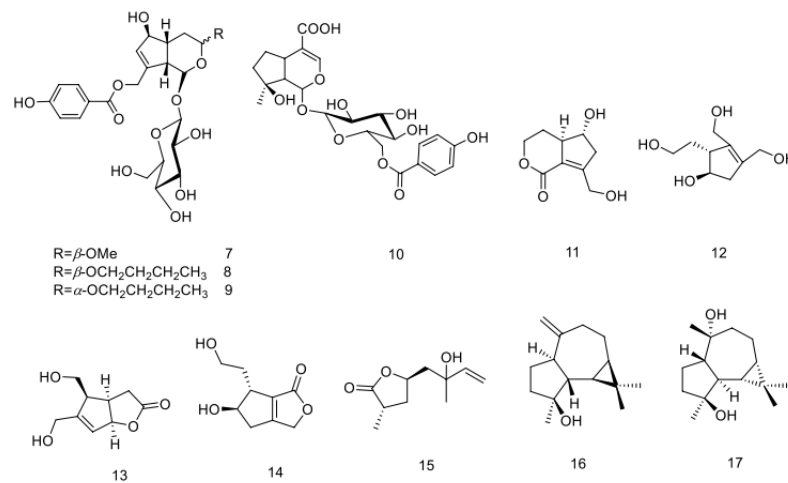
Genus Verbenaceae *Vitex* kaya akan terpenoid, yang meliputi monoterpenoid, seskui-terpenoid, diterpenoid, dan triterpenoid. Sampai saat ini, berbagai kelas metabolit sekunder telah diisolasi dan diidentifikasi dari *V. trifolia*, termasuk diterpen, triterpen, flavonoid, iridoid, lignan, fenolat, steroid, dan lain-lain.⁴⁸

Senyawa utama dalam *Vitex trifolia* teridentifikasi sebagai terpenoid, flavonoid, dan iridoid.^{65,66} Jalur biosintesis alami untuk senyawa ini melibatkan dua jalur utama: jalur mevalonat (MVA) dan jalur plastisida 2-C-metil-D-eritriol 4-fosfat (MEP). Jalur MEP berperan dalam sintesis hemi-, mono-, di-, dan triterpenoid, sementara jalur MVA bertanggung jawab atas sesqui- dan

triterpenoid. Iridoid, kelompok monoterpenoid yang beragam, dicirikan oleh struktur kerangka tertentu. Struktur ini terdiri dari cincin siklopentana yang menyatu dengan cincin beranggota enam yang mengandung atom oksigen, biasa disebut kerangka iridan. Senyawa ini sering ditemukan pada tumbuhan bersama molekul gula, membentuk glikosida dan membantu klasifikasinya. Berbeda dengan monoterpenoid lainnya, sistem iridoid berasal dari geraniol melalui proses pelipatan yang berbeda. Ada ribuan iridoid alami yang berbeda, masing-masing menunjukkan variasi struktural akibat hidroksilasi, esterifikasi, dan perubahan stereokimia.⁴⁹

Flavonoid, sekelompok metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuhan, berasal dari jalur metabolisme fenilpropanoid. Mereka memiliki struktur dasar yang terdiri dari cincin benzena C₁₅ (C₆-C₃-C₆). Penelitian terbaru telah menyelidiki mekanisme rumit di balik biosintesis flavonoid pada tanaman. Masuknya p-coumaroyl-CoA ke dalam jalur biosintesis flavonoid menandai dimulainya sintesis spesifik flavonoid, yang diawali dengan pembentukan kalkon. Kalkon memainkan peran penting sebagai produk awal dalam jalur metabolisme, menyediakan kerangka dasar untuk sintesis flavonoid selanjutnya. Flavanon, berdasarkan kerangka ini, dapat menimbulkan berbagai iterasi, termasuk flavon, flavonol, antosianidin, dan katekin.⁴⁹

Mayoritas monoterpenoid dalam *Vitex trifolia* adalah iridoid dan glikosida terkaitnya (metabolit 1–10). Selain itu, monoterpenoid asiklik yang disebut vitexoid (15) telah diidentifikasi dalam buah dan berfungsi sebagai metabolit khas *V. trifolia*. Hanya dua seskuiterpenoid tipe aromadendrane (16 dan 17) yang terdeteksi pada buah.⁴⁹



Gambar 2.3 Struktur kimia monoterpenoid dan seskuiterpenoid diisolasi dari *V. trifolia*.⁴⁹

Hasil ekstrak *Vitex trifolia L.* yang diperoleh berupa flavonoid, yaitu: casticin, 3,6,7-trimethyl quercetagenin, vitexin, artemetin, 5-methyl artemetin, 7-desmethyl artemetin, luteolin, luteolin- 7-O- β -d-glucuronide, luteolin-3-O- β -d-glucuronide telah dilaporkan. Struktur lainnya berupa isoorientin, alkaloid, friedelin triterpenoid, steroid, β -sitosterol, β -d-glukosida, tanin, saponin, karbohidrat, protein, asam amino, dan kandungan minyak atsiri telah dilaporkan dari analisis daun..^{22,45,46} Analisis mendalam telah dilakukan terhadap minyak atsiri (EO) yang diekstraksi dari berbagai bagian *Vitex trifolia*, termasuk biji, daun, komponen pucuk, dan bunga. Secara khusus, peneliti dari India berhasil memperoleh hasil minyak esensial tertinggi dari daun, dengan kandungan sekitar 5%, menggunakan metode uap distilasi. Pada tanaman legundi, senyawa minyak atsiri yang paling melimpah terdapat pada daunnya, dengan persentase sekitar 80,83%.³⁹

Saat ini telah ada empat diterpen tipe hallimane baru, vitetrifolins D – G, diisolasi dari buah *V. trifolia L.*⁵⁰ Studi kimia lainnya melaporkan komposisi dari daun dan ranting menghasilkan minyak atsiri *V. trifolia L.* adalah 1-d-pinene casticin, luteolin, isoorientin, α -pinene, linalool, terpinyl acetate, β -

caryophylline, caryophylline oxide, 5-methyl artemitin, β -sitosterol, vitetrifolins, dihydrosolidgenone abietatriene, vitetrifolin A, limonene, humulene oksida, α -humulemne, 20 hydroxycdysone, ecdysteroids, flavonoid, lignan, triterpenoid, iridoid, vitexin, β -sitosterols^{7-9,13,31-41} sedangkan ekstrak aseton buah-buahan dari *Vitex trifolia L.* mengisolasi vitetrifolin A, B dan C.⁵¹

2.8.4. Sifat Farmakologi

Berbagai penelitian telah mendalami manfaat daun lagundi. Selain itu, penelitian in vivo dan in vitro telah mengungkapkan beragam atribut farmakologis yang terkait dengan ekstrak *Vitex trifolia L.* Sifat-sifat ini mencakup aktivitas anti-oksidatif, anti-inflamasi, antikanker, larvasida, hepatoprotektif, analgesik, antibakteri, antijamur, dan lainnya.^{48,52}

Daun *V. trifolia L.* memiliki beragam kegunaan, antara lain meningkatkan daya ingat, meredakan nyeri, menghilangkan rasa tidak enak di mulut, dan mengobati demam. Ekstrak daunnya menunjukkan sifat anti kanker yaitu dengan menghambat pertumbuhan dan pembelahan sel tumor kulit tikus dengan dosis 0,5 g dan 1 g/kgBB ekstrak etanol buah *V. trifolia L.*⁷¹ Selain itu juga bermanfaat untuk amenore. Selain itu, bunganya, jika dicampur dengan madu, dapat digunakan untuk mengatasi demam yang disertai muntah dan rasa haus yang hebat. Selain itu, bagian pucuk dari tanaman ini efektif dalam pengobatan diabetes. Para peneliti yang menyelidiki tanaman obat India menemukan senyawa tipe halimane baru satu dan dua diterpenoid tipe labdane baru, bersama dengan 15 senyawa yang diketahui, dari daun *V. trifolia L.* sebagai bagian dari upaya berkelanjutan mereka untuk mengisolasi zat alami bioaktif.¹⁸

Senyawa yang berasal dari daun dan akar *V. trifolia L.* mempunyai nilai penting dalam bidang kedokteran. Selain itu, komponen tanaman lainnya, seperti daun dan biji, banyak digunakan secara eksternal untuk mengobati rematik dan radang sendi, dan juga diketahui memiliki sifat insektisida. Selanjutnya rebusan daunnya berfungsi sebagai diuretik, ekspektoran, obat

cacing, tonik, dan penurun demam.⁵² Akar semak *Vitex trifolia* mempunyai beberapa sifat, termasuk efek ekspektoran termogenik, astringen, karminatif, dan anti-inflamasi. Selain itu, terdapat penelitian yang terdokumentasi untuk mengobati peradangan, bronkitis, kusta, dan rambut rontok. Khususnya, ekstrak tumbuhan mengandung diterpen seperti Viteditifolins A, B, dan C.⁴⁶

2.8.4.1. Sebagai Antibakteri

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol dari daun legundi (*Vitex trifolia* Linn.) memiliki efektivitas yang lebih tinggi terhadap bakteri gram positif daripada bakteri gram negatif. Hal ini dikarenakan bakteri gram positif cenderung lebih rentan karena hanya memiliki lapisan peptidoglikan luar yang tidak efektif sebagai penghalang permeabilitas. Di sisi lain, bakteri gram negatif memiliki lipopolisakarida pada membran luar yang memberikan ketahanan terhadap zat antibakteri. Perbedaan sensitivitas antara bakteri gram positif dan gram negatif juga dapat disebabkan oleh perbedaan morfologi di antara keduanya.⁵³ Hal ini didukung oleh studi ini yang menunjukkan bahwa ekstrak daun dari *Vitex trifolia* L. menunjukkan penghambatan pertumbuhan terhadap enam spesies bakteri (termasuk dua spesies Gram-positif dan empat spesies Gram-negatif) serta satu spesies ragi. Khususnya, semua ekstrak sepenuhnya menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif, kecuali ekstrak metanol pada dosis terendah. Selain itu, pertumbuhan bakteri Gram-negatif dihambat sepenuhnya pada konsentrasi 10 mg/ml di semua ekstrak, kecuali *S. typhi*. Menariknya, terdapat penghambatan parsial terhadap *S. sonnei* dan *S. typhi* pada dosis 2,5 mg/ml, sedangkan dosis terendah menghambat pertumbuhan *C. albicans* pada 5 mg/ml.¹⁴

Penelitian lainnya juga mendukung adanya aktivitas antibakteri pada daun legundi dengan menilai menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, dan *Candida albicans* secara in vitro.^{20,21,22}

Selanjutnya, dalam penelitian yang dilakukan oleh Ida dan rekan-rekannya, dengan menggunakan 30 mcg amoksisilin digunakan sebagai kontrol positif, sementara etanol 96% digunakan sebagai kontrol negatif. Penelitian ini membandingkan tiga konsentrasi ekstrak, yaitu 20%, 30%, dan 40%, pada ekstrak tunggal dari daun legundi dan daun sirih, serta pada ekstrak gabungan dari kedua jenis daun tersebut. Hasil penelitian menunjukkan bahwa zona hambat pada ekstrak sirih dan ekstrak kombinasi tergolong kuat, sementara zona hambat pada ekstrak legundi tergolong dalam kategori sedang. Temuan ini mendukung klasifikasi ekstrak legundi sebagai antibakteri kelas menengah terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. Selain itu, ekstrak sirih juga menunjukkan aktivitas dalam kategori sedang hingga kuat, sementara ekstrak kombinasi memiliki aktivitas dalam kategori yang sama. Berdasarkan penelitian ini, zona hambat pada ekstrak sirih dan ekstrak kombinasi termasuk dalam kategori kuat, sedangkan pada ekstrak legundi termasuk dalam kategori sedang.¹²

Hal serupa juga ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan sebelumnya, didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol kental daun legundi (*V. trifolia L.*) menghasilkan aktivitas antibakteri terhadap *S. aureus* secara in vivo pada model infeksi *Drosophila* yang dibandingkan dengan pemberian pakan biasa sebagai kontrol negatif dan pemberian pakan tetrasiklin sebagai kontrol positif. Berdasarkan hasil analisis *survival assay*, terlihat sekitar 60% lalat pada kelompok kontrol negatif mati pada hari ketiga setelah ditusuk *S. aureus*. Selain itu, sekitar 80% lalat pada kelompok kontrol positif (yang diberi tetrasiklin 200 µg/g yang terkandung dalam makanan lalatnya) dapat bertahan hidup tiga hari setelah ditusuk dengan *S. aureus*. Tingkat kelangsungan hidup lalat yang diobati dengan ekstrak etanol kental daun legundi pada konsentrasi 5% dan 25% meningkat secara positif dibandingkan dengan *Drosophila* yang terinfeksi *S. aureus* pada kelompok kontrol negatif. Namun, lalat yang diobati dengan Ekstrak etanol kental daun legundi 1% tidak menunjukkan peningkatan dalam

tingkat kelangsungan hidup setelah infeksi *S. aureus*, menunjukkan bahwa pada konsentrasi 1%, jumlah senyawa antibakteri dalam ekstrak etanol kental daun legundi mungkin tidak cukup untuk mengatasi infeksi bakteri.¹⁵

Pada penelitian lainnya juga menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri pada daun *Vitex trifolia L.* yang diuji aktivitas antibakterinya menunjukkan hasil yang sensitif terhadap *Escherchia coli* dan *Streptococcus mutans*.⁸⁰ Konsentrasi ekstrak kasar *V. trifolia L.* yang dilakukan uji antimikroba secara in vitro menunjukkan area penekanan yang signifikan terhadap bakteri patogen yang diuji yaitu *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* dan *Klebsiella pneumoniae*.⁴⁸ Hal ini didukung dengan data penelitian yang menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi minyak atsiri dapat meningkatkan kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Karena zona penghambatan lebih dari 5 mm, minyak esensial *V. trifolia L.* (5-20 mg/mL) menunjukkan efektivitas penghambatan yang cukup besar terhadap *S. aureus*. Minyak atsiri yang diisolasi dari daun *V. trifolia L.* menunjukkan penghambatan terhadap *S. aureus* dengan caryophyllene (-7,5 kkal/mol melawan dihidrofolat reduktase) dan α -terpineol (-6,5 kkal/mol terhadap tyrosyl-tRNA synthetase) sebagai senyawa utama yang berperan sebagai antibakteri aktivitas. Senyawa lain seperti sabinene, eucalyptol, terpinen-4-ol, dan limonene memberikan pengaruh pengikatan yang lebih rendah terhadap aktivitas antibakteri. Aktivitas antibakteri sabinene terhadap *S. aureus* yaitu dengan mengganggu sintesis dan pemecahan ATP, mengganggu respirasi bakteri, dan merusak permeabilitas dan integritas membran sel dan dinding sel, limonene memiliki efek penghambatan yang kuat pada *S. aureus*. Selain itu, caryophyllene terhadap *S. aureus* menunjukkan aktivitas antibakteri yang kuat dengan MIC 3 μ M.⁵⁴

Ada kemungkinan bahwa flavonoid, triterpenoid, dan tanin yang ada dalam ekstrak tanaman inilah yang memberikan aktivitas antibakteri pada *V. trifolia L.*^{53,55,56} Temuan terbaru menunjukkan hasil isolasi yang diperoleh berupa dari

daun hexana *V. trifolia L.* berupa dua diterpenoid labdane baru, 6,7-diacetoxy-13-hydroxy-8(9),14-labdadien dan 9-hydroxy-13(14)-labden-15,16 -olide, serta diterpenoid halimane baru, 13-hydroxy-5(10),14-halimadien-6-one yang mempunyai sifat antituberkulosis.¹⁸ Penelitian lainnya yang dilakukan sebelumnya, menunjukkan adanya daya hambat pada biakan *Mycobacterium tuberculosis* yang berasal dari aspirasi limfadenitis tuberculosis yang diberikan ekstrak etanol daun legundi.¹⁶

Hasil penyelidikan ini mendukung penelitian sebelumnya yang menyatakan bahwa ekstrak tumbuhan *V. trifolia L.* lebih efektif melawan bakteri Gram positif karena menunjukkan bahwa bakteri Gram positif lebih rentan terhadap ekstrak tumbuhan dibandingkan bakteri Gram negatif. Membran luar bakteri gram negatif bertindak sebagai penghalang terhadap berbagai bahan kimia lingkungan, termasuk antibiotik, sehingga bakteri ini dianggap lebih resisten.⁵⁷ Lipid didistribusikan secara asimetris di membran luar ini, dengan lipopolisakarida dan fosfolipid masing-masing ditemukan di lapisan dalam dan luar. Sifat ini, yang tidak terdapat pada bakteri Gram positif, mungkin berfungsi sebagai penghalang ekstra untuk mencegah zat eksternal memasuki sel. Kandungan metabolit sekunder berupa steroid, saponin, alkaloid, flavonoid, triterpenoid dan tanin yang terdeteksi, mempunyai efek penghambatan yang lebih besar terhadap bakteri Gram positif dibanding Gram negatif.⁵⁸

2.8.4.2. Sebagai anti inflamasi

Banyak penelitian telah meneliti sifat anti-inflamasi dari ekstrak *V. trifolia L.* Diketahui bahwa Casticin (CA), yaitu zat aktif yang diisolasi dari *V. trifolia L.*, telah terbukti memiliki sifat anti inflamasi baik secara in vivo maupun in vitro. Begitu juga dampak ekstrak air daun *V. trifolia L.* pada gen inflamasi yang diinduksi lipopolisakarida telah dinilai. Ekstrak tersebut telah menunjukkan tindakan pengaturan pada faktor nuklir kappa β (NK- β), yang pada gilirannya mempengaruhi mediator peradangan. Ekstrak air daun *V.*

trifolia L. telah menunjukkan dampak penghambatan yang kuat tergantung dosis dan waktu pada sintesis IL-6 dan IL-10, namun hanya memiliki sedikit efek pada TNF- α , yang semuanya merupakan mediator inflamasi yang penting. uji garis sel in vitro.⁵⁹

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak daun legundi pada dosis 100 mg/kg dan 200 mg/kg secara signifikan menghambat edema kaki yang disebabkan oleh CA ($p < 0,05$) dan secara efektif mengurangi infiltrasi leukosit inflamasi. Lebih lanjut, ekstrak daun legundi secara nyata menghambat kadar Interleukin (IL)-1 β , IL-6, faktor nekrosis tumor (TNF)- α yang diinduksi CA dalam jaringan, dan kemoatraktan neutrofil (CINC)-2/C-X-C yang diinduksi sitokin. (CXCL)3 dan CINC-3/CXCL2 dalam jaringan serta serum. Di sisi lain, VTME secara signifikan meningkatkan konsentrasi sitokin antiinflamasi IL-10 di jaringan. Selain itu, ekstrak daun legundi secara signifikan melemahkan degradasi I κ B α yang diinduksi CA dan translokasi nuklir NF- κ B p65.⁶⁰

Dari penelitian sebelumnya menyatakan bahwa adanya pengaruh yang signifikan terhadap pergerakan paru-paru pada model tikus yang diberikan paparan asap rokok setelah diberikan casticin dibandingkan dengan kelompok yang tidak diberikan. Selain itu, sifat anti-inflamasi Casticin juga dipelajari secara in vitro pada sel epitel manusia tipe II A549 menggunakan uji berbasis eotaxin. Pada penelitian tersebut mengungkapkan bahwa casticin dapat menghambat migrasi eosinofil serta aktivitas kinase dan molekul adhesi kemotaktik yang berpartisipasi dalam proses asma dengan menghambat NF- κ B.⁶¹ Pada penelitian lainnya, efek *V. trifolia L.* pada sitokin proinflamasi seperti IL-1 β , IL-6, dan TNF- α telah dievaluasi dan menunjukkan hasil penurunan yang signifikan yang dilakukan pada makrofag U937 manusia.²¹

Ekstrak daun metanol *V. trifolia L.* menunjukkan aktivitas antioksidan yang tinggi dari kandungan fenolnya.⁵¹ Dilaporkan bahwa vitexicarpin, suatu flavonoid yang diisolasi dari *V. trifolia L.*, yang menginduksi apoptosis pada

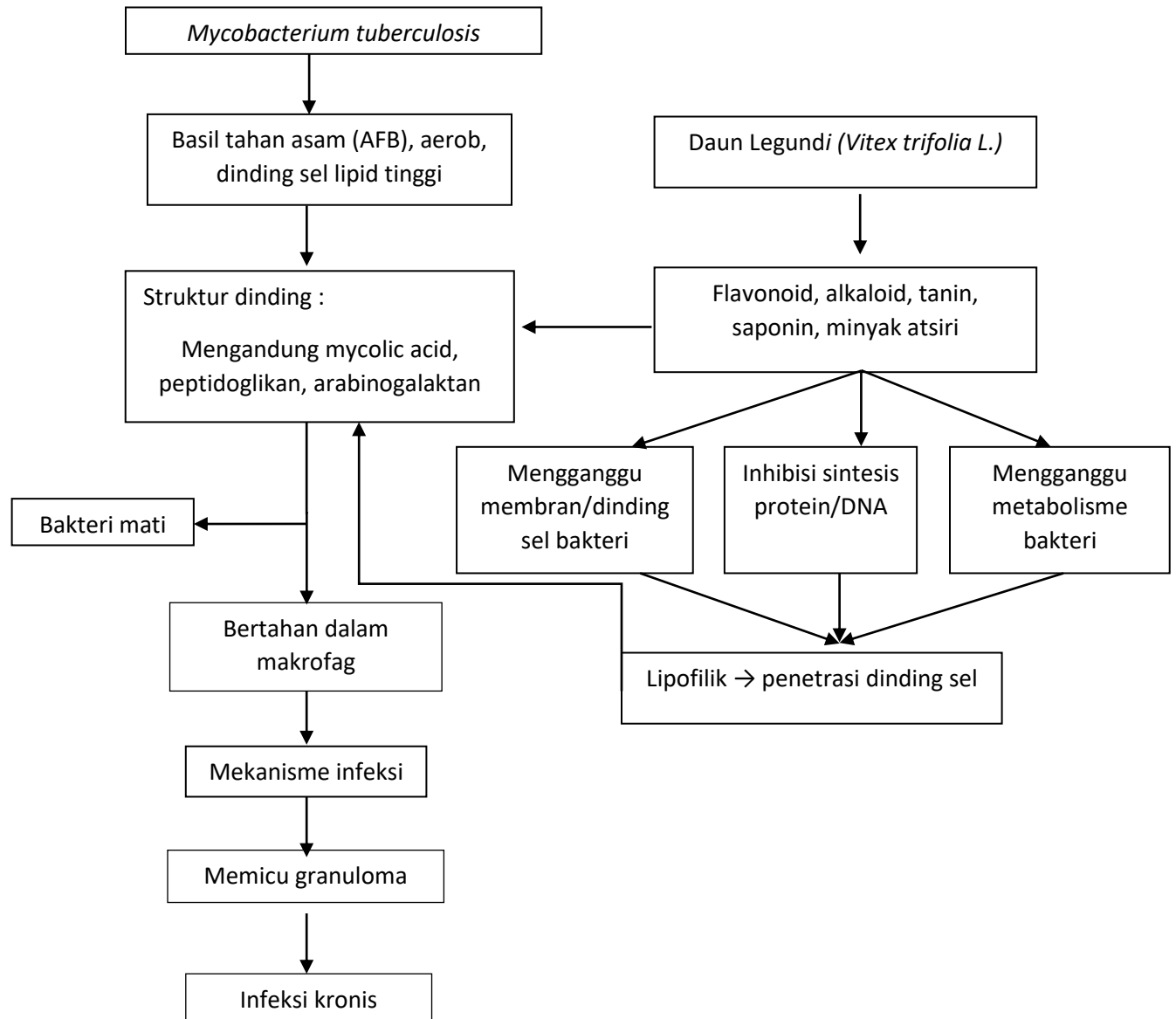
sel K562 melalui jalur apoptosis terkontrol mitokondria.⁶² Selain itu, diantara komponen yang diekstraksi dari buah *V. trifolia L.* dan dievaluasi dampak anti-inflamasinya terhadap produksi oksida nitrat yang diinduksi LPS dalam sel RAW264.7, casticin menunjukkan penghambatan yang kuat (dengan IC50 sebesar 21,4 $\mu\text{mol/L}$). Casticin, senyawa yang ditemukan dalam buah *V. trifolia L.*, telah menunjukkan kemampuan untuk mengurangi respon inflamasi paru akut yang disebabkan oleh asap rokok pada model murine. Ketika diobati dengan casticin, terjadi penurunan yang signifikan pada jumlah sel, neutrofil, makrofag, dan limfosit. Selain itu, tingkat sitokin dan kemokin proinflamasi diturunkan. Selain itu, casticin menyebabkan penurunan ketebalan epitel dan infiltrasi sel inflamasi.⁶³

Pada penelitian lainnya mengungkapkan bahwa ekstrak daun *Vitex trifolia L.* memiliki kemampuan untuk memodulasi kelebihan produksi mediator pro-inflamasi yang bergantung pada LPS—khususnya IL-1, IL-6, dan iNOS—baik dalam waktu maupun tergantung dosis. Selain itu, ekstrak ini tampaknya mengurangi kadar TNF-mRNA dan secara signifikan menghambat produksi berlebih protein TNF- α yang diinduksi LPS. Selain itu, sitokin anti-inflamasi IL-10 juga dipengaruhi, meskipun sedikit, oleh ekstraknya. Khususnya, setelah inkubasi 2 jam, ekspresi IL-10 mRNA yang diinduksi LPS meningkat di bawah pengobatan *Vitex trifolia L.* dan secara bertahap menurun hingga 24 jam. Temuan ini selanjutnya dikonfirmasi pada tingkat protein, menunjukkan peningkatan signifikan dalam produksi berlebih IL-10 yang bergantung pada LPS dalam kondisi yang sama pada 12 dan 24 jam pasca inkubasi. Secara kolektif, pengamatan ini menunjukkan bahwa ekstrak daun *Vitex trifolia L.* dapat meningkatkan ekspresi IL-10 anti-inflamasi yang bergantung pada LPS sekaligus menghambat produksi mediator pro-inflamasi seperti IL-1, IL-6, dan iNOS, yang menggarisbawahi sifat anti-inflamasinya.⁶⁴

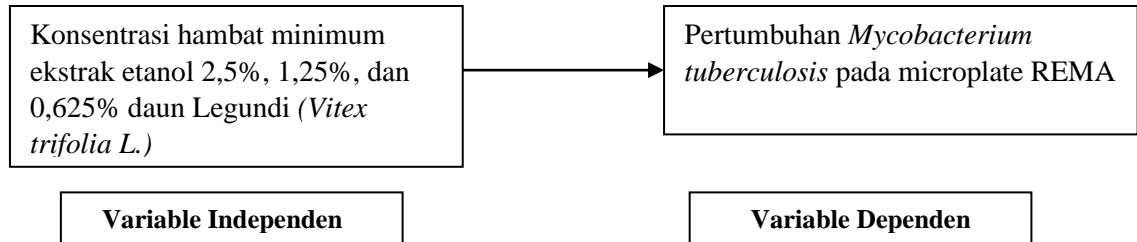
Pada penelitian terdahulu menyatakan bahwa casticin yang terkandung pada *V. trifolia L.* meningkatkan ekspresi gen IFN- γ pada BALF dibandingkan

dengan paru-paru menciit penderita asma.⁶⁵ Penelitian yang membahas efek Legundi terhadap IFN- γ saat ini masih terbatas. Namun, penelitian terdahulu telah memberikan bukti ilmiah untuk penggunaan tradisional daun *V. trifolia L.* sebagai sumber daya berkelanjutan dan menyoroti pentingnya konservasi tanaman obat sebagai sumber daya untuk penemuan obat. Hal ini menyarankan penyelidikan lebih lanjut terhadap *V. trifolia L.* dan konstituennya untuk mengembangkan strategi pengobatan baru dalam kondisi inflamasi yang dimediasi kekebalan diperlukan.

A. Kerangka Teori



B. Kerangka Konsep Penelitian



C. Hipotesis Penelitian

1. Hipotesis Nol (H_0):

Ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) tidak memiliki aktivitas anti-tuberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada konsentrasi 2,5%; 1,25%; dan 0,625% (b/v).

2. Hipotesis Alternatif (H_1):

Ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) memiliki aktivitas anti-tuberkulosis terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv pada konsentrasi 2,5%; 1,25%; dan 0,625% (b/v), yang ditunjukkan dengan nilai Konsentrasi Hambat Minimum (MIC) melalui metode *Resazurin Microplate Assay* (REMA).

Bab 3

Metode Penelitian

3.1. Tabel Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Skala Ukur	Hasil Ukur
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	strain laboratorium standar dari bakteri penyebab tuberkulosis	<i>Resazurin</i> <i>Microtiter</i> <i>Assay</i> (REMA)	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Warna biru: Tidak ada pertumbuhan bakteri. • Warna merah muda: Ada pertumbuhan bakteri
Konsentrasi Hambat Minimum (MIC)	Konsentrasi terendah suatu agen antimikroba (seperti antibiotik, antijamur, atau antiseptik) yang masih efektif untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme (bakteri, jamur, atau mikroba lainnya) secara in vitro setelah periode inkubasi tertentu.	Visual	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Warna biru: Tidak ada pertumbuhan bakteri. • Warna merah muda: Ada pertumbuhan bakteri

3.2. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *cross sectional* dengan melakukan observasi atau pengukuran variabel dengan rancangan *eksperimental posttest-only control design*.

3.3. Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini berlangsung mulai September 2024 hingga April 2025 di:

- Laboratorium Biokimia FKIK UMSU
- Laboratorium Tuberculosis Mikrobiologi FKMK UGM.

3.4. Variabel Penelitian

3.4.1. Variabel Independen

Variabel independen pada penelitian ini adalah konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol 96% daun Legundi dengan konsentrasi ekstrak 2,5%, 1,25%, dan 0,625% (b/v).

3.4.2. Variabel Dependen

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan bakteri pada media kultur *Mycobacterium tuberculosis* yang diuji dengan metode microplate REMA.

3.5. Populasi dan sampel penelitian

Bakteri yang digunakan adalah strain *Mycobacterium tuberculosis* H37RV, diperoleh dari persediaan bakteri di laboratorium tuberculosis mikrobiologi FKMK UGM.

3.6. Alat dan Bahan Penelitian

- **Alat**
 1. Yellow tip
 2. Blue tip
 3. Mikropipet 50 – 200 ul
 4. Mikropipet 200 – 1000 ul
 5. Vortex

6. Inkubator
7. Microtube 1,5 mL
8. Rak
9. Ose
10. Pipet ukur 10 mL
11. Pipet ukur 1 mL
12. Tabung screw cap + 10 glassbeads + 2 tetes Twen 0.05% steril
13. Mikroplate

- **Bahan**

1. Daun legundi (*V. trifolia L.*)
2. Bakteri *Mycobacterium tuberculosis* H37RV
3. 7H9 broth + Casitone
4. Aquadest steril
5. Resazurin 0,01%
6. DMSO 10%
7. Rifampicin dengan konsentrasi 0,25 µg/mL.⁶⁸
8. Desinfektan

3.7. Langkah-langkah penelitian

3.7.1. Pembuatan ekstrak daun legundi¹⁶

Daun legundi sebanyak 20 kg didapatkan dari pedagang pasar lokal. Bagian tanaman dipisahkan antara batang, daun, bunga dan akar. Proses pembuatan ekstrak daun legundi dilakukan dengan metode Ultrasonic-Assisted Extraction (UAE). Daun legundi dicuci dengan air mengalir lalu dikeringkan dengan penganginan alami. Herba yang sudah kering dihaluskan dengan mesin penggilingan kemudian diayak. Serbuk yang telah di tampuk kemudian dilakukan ekstraksi.

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi yaitu dengan merendam serbuk herba *Vitex trifolia L.* dalam pelarut etanol 96%. Perendaman serbuk dilakukan dalam benjana tertutup selama 3x24 jam pada suhu kamar sambil tetap sering diaduk untuk meningkatkan difusi senyawa. Kemudian rendaman disaring dengan memakai kain kasa untuk memisahkan ekstrak cair dengan residu padat. Selanjutnya ekstrak cair dimasukkan dipekatkan dengan cara menguapkan pelarut dengan rotary evaporator. Kemudian didapatkan ekstrak kental etanol herba *Vitex trifolia L.*

3.7.2. Langkah-langkah penelitian

Persiapan perlindungan dengan APD⁶⁷

Laboratorium yang digunakan sesuai dengan standar BSL-2

1. Persiapan sebelum masuk laboratorium
 - a. Memastikan semua APD tersedia dalam kondisi baik dan layak pakai
 - b. Melepaskan semua perhiasan, jam tangan, dan benda pribadi yang dapat menjadi media kontaminasi
 - c. Mencuci tangan dengan sabun atau hand run berbasis alkohol
 - d. Memastikan area kerja dalam laboratorium sudah dilakukan sterilisasi dan *biosafety cabinet* (BSC) sudah dinyalakan minimal 15 menit sebelum digunakan
2. Memakai APD
 - a. Memakai penutup kepala
 - b. Memakai masker respirator N95, serta melakukan *seal check* untuk memastikan masker yang digunakan telah rapat
 - c. Memakai *gown* lengan panjang berbahan tahan cairan, lalu dikancing dengan rapat
 - d. Memakai pelindung mata (*goggles*) dan *face shield*
 - e. Memakai sarung tangan sekali pakai menutupi manset baju
 - f. Memakai penutup sepatu khusus laboratorium
3. Selama bekerja di laboratorium

- a. Menghindari menyentuh wajah, rambut, atau APD bagian luar
- b. Tidak makan, minum, atau menggunakan ponsel di area kerja
- c. Segera mengganti sarung tangan jika terkontaminasi atau robek
- d. Membuang peralatan sekali pakai ke wadah limbah infeksius berlabel *biohazard*
- e. Menggunakan teknik aseptik untuk mencegah penyebaran aerosol ataupun tumpahan

4. Persiapan Inokulum⁶⁵

a. Strain Bakteri

Mycobacterium tuberculosis H37Rv diperoleh dari Laboratorium Tuberkulosis, Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada dan disubkultur pada medium *Lowenstein Jensen* (LJ). Suspensi fase log *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv disiapkan dalam larutan yang mengandung 0,04% (v/v) Tween 80 dan 0,2% albumin serum sapi (Sigma), hingga kekeruhannya sesuai dengan standar Mc.Farland no.1. Pengukuran kekeruhan dilakukan dengan metode penimbangan (Kemenkes RI, 2012). Suspensi tersebut kemudian diencerkan lebih lanjut dengan perbandingan 1:25 dalam kaldu 7H9GC (yang terdiri dari 4,7 g kaldu Middlebrook 7H9, 20 mL gliserol 10%, 880 mL air destilasi, dan 100 mL OADC yang mengandung asam oleat, albumin, dekstrosa, dan katalase).

b. Pengujian

- Uji Microplate Resazurin (Resazurin):

Aktivitas antimikobakteri kuantitatif in-vitro dari ekstrak tumbuhan daun legundi dengan konsentrasi yaitu 2,5%, 1,25%, dan 0,625%.⁶⁸ Perlakuan dievaluasi menggunakan pelat mikrotiter 96-sumur dengan resazurin sebagai indikator viabilitas bakteri. Medium middlebrook 7H9-S sebanyak 100 µL dimasukkan kedalam setiap sumur pada microtiter plate. Rifampisin, yang dilarutkan dalam dimetil sulfoksida, berperan sebagai kontrol positif pada konsentrasi awal konsentrasi 0,25, 0,125, dan 0,0625

$\mu\text{g/mL}$, sedangkan media bebas obat dengan suspensi bakteri digunakan sebagai kontrol negatif.

kemudian plate ditutup dan inkubasi 37°C . Setelah 7 hari inkubasi, 30 μL larutan resazurin 0,01% ditambahkan ke setiap sumur dan kembali diinkubasi semalaman. Setelah hari ke 7, diamati apakah terjadi perubahan warna dari biru (proses oksidasi) menjadi merah muda (proses reduksi) yang mengindikasikan pertumbuhan bakteri.

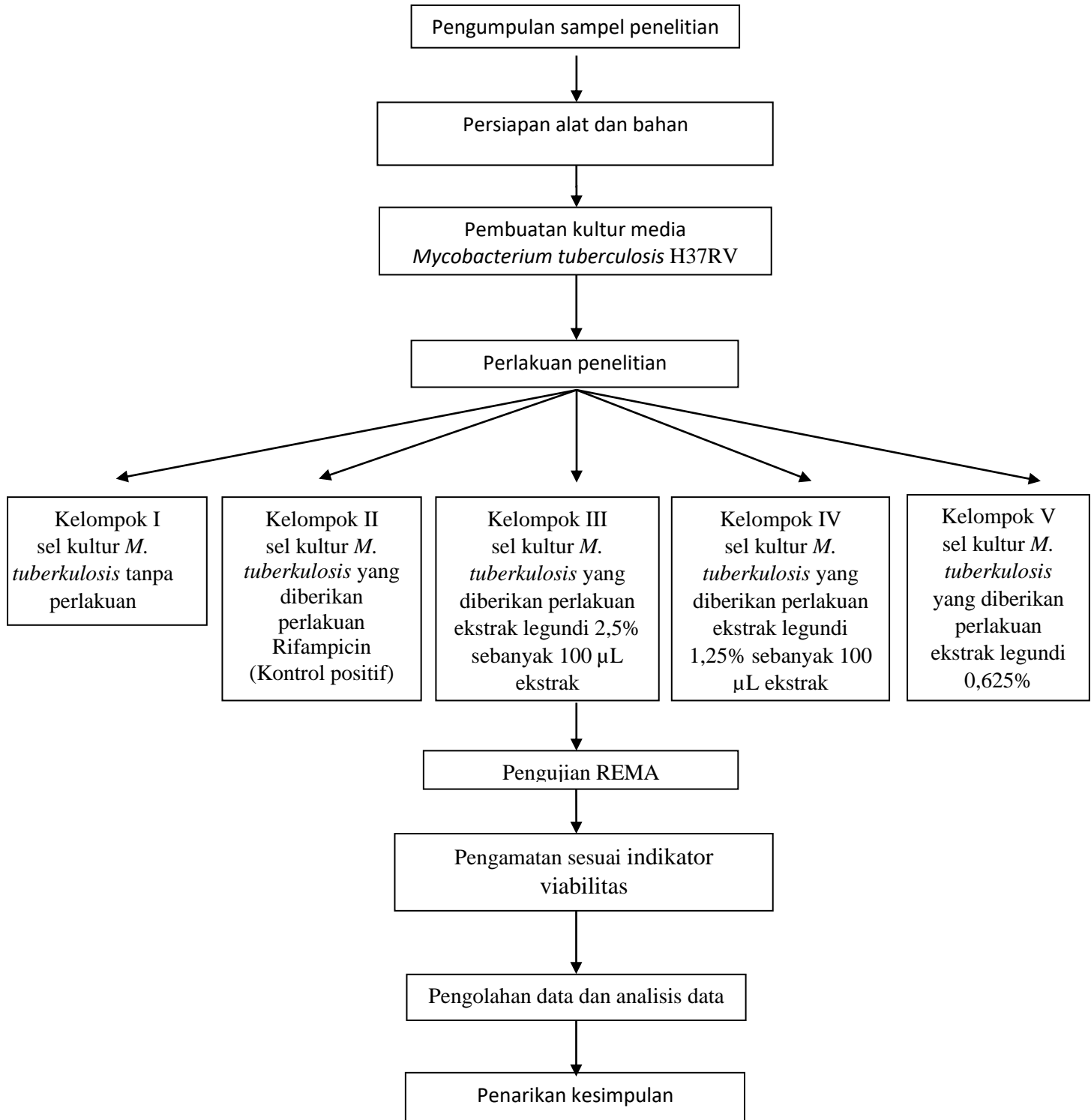
Nilai MIC yang diperoleh melalui metode ini diverifikasi menggunakan teknik pengenceran kaldu. Warna biru pada sumur menandakan "tidak ada pertumbuhan mikobakteri", sedangkan warna merah jambu menandakan "pertumbuhan bakteri".

4. Melepaskan APD sesuai dengan SOP
5. Melakukan dekontaminasi permukaan kerja dengan disinfektan efektif terhadap *Mycobacterium tuberculosis*
6. Memastikan BSC tetap menyala selama 10-15 menit setelah selesai pekerjaan dan sebelum dimatikan
7. Mencatat semua kegiatan di *log book* laboratorium

3.7.3. Analisis data

Analisis data dalam penelitian ini dilakukan secara deskriptif analitik. Pengamatan difokuskan pada pertumbuhan atau tidaknya *Mycobacterium tuberculosis* pada berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia* L.) serta pada kelompok kontrol. Viabilitas bakteri ditentukan berdasarkan perubahan warna indikator resazurin dalam metode mikrodilusi. Perubahan warna resazurin dari biru menjadi merah muda menandakan adanya aktivitas metabolik bakteri, sedangkan tidak terjadinya perubahan warna menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri terhambat. Hasil pengamatan pada setiap konsentrasi ekstrak kemudian dibandingkan dengan kontrol positif untuk memastikan validitas interpretasi.

Alur Penelitian

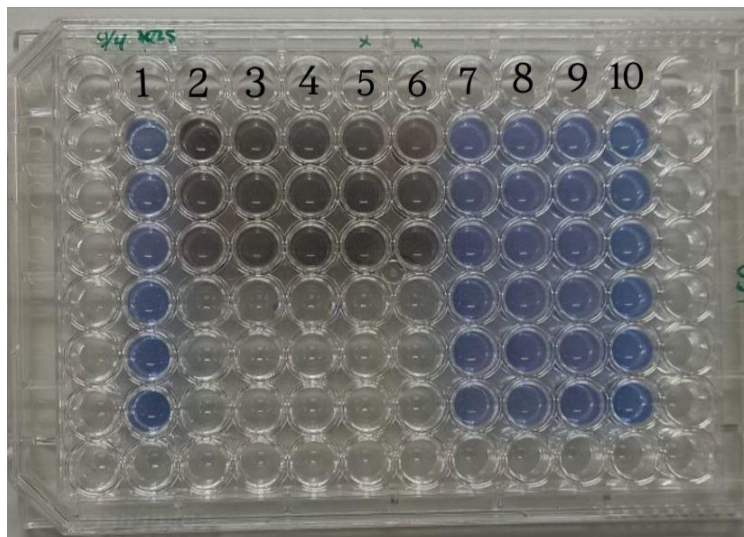


BAB 4

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Penelitian

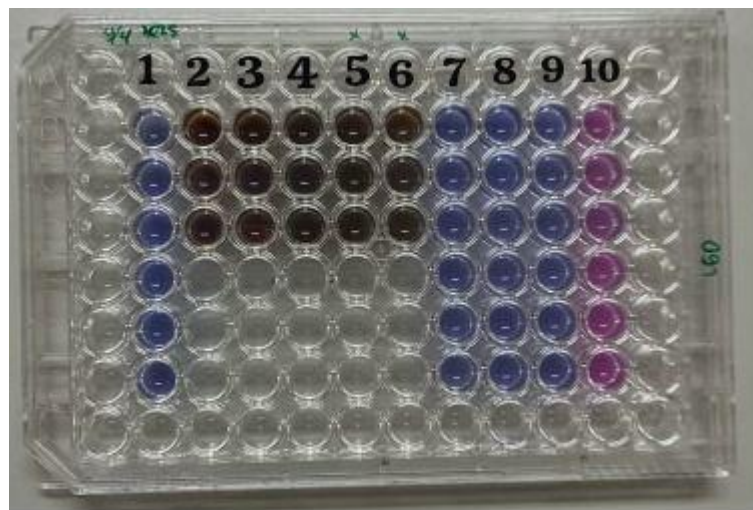
Konsentrasi hambat minimum (MIC) ekstrak ditentukan berdasarkan perubahan warna resazurin dari biru menjadi merah muda, yang menandakan terdapat pertumbuhan bakteri. Sebaliknya, sumur yang tetap berwarna biru menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri akibat efektivitas penghambatan oleh ekstrak. Pembacaan hasil dilakukan dengan melihat warna yang terbentuk, jika setelah hari ke 7 tidak ada perubahan warna pada medium yang telah diberikan indikator resazurin maka hasil dinyatakan negatif.⁶⁵



Gambar 4.1 Pelat Perlakuan REMA untuk Uji Aktivitas Antimikobakteri Ekstrak Etanol Daun *Vitex trifolia L.* terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

Gambar 4.1 menunjukkan pelat mikrotiter 96 sumur yang digunakan dalam metode *Resazurin Microplate Assay* (REMA) untuk menentukan konsentrasi hambat minimum (MIC) ekstrak etanol daun Legundi (*Vitex trifolia L.*). Deret sumur pertama merupakan kontrol media, kemudian deret

selanjutnya, pada deret 2, 3, dan 4 menunjukkan seri pengenceran ekstrak etanol daun legundi. Dalam pengenceran menggunakan serial dua kali lipat untuk menghasilkan hasil konsentrasi 2,5%, 1,25%, dan 0,625%. Perubahan gradasi warna cenderung pekat yang menunjukkan deret pengenceran konsentrasi. Pada deret ke 5 dan 6 merupakan kontrol senyawa dan kontrol pelarut. Pada deret sumur, 7, 8, dan 9 adalah pelat sumur dengan perlakuan Rifampisin dengan konsentrasi 0,25, 0,125, dan 0,0625 $\mu\text{g/mL}$. Lalu, pada deret ke-10 merupakan pelat media bakteri. Pembacaan hasil perlakuan dilakukan setelah hari ke-7 inkubasi. Nilai MIC ditentukan berdasarkan konsentrasi terendah yang mampu mempertahankan warna biru resazurin tanpa perubahan menjadi merah muda.



Gambar 4.2 Pelat Perlakuan REMA untuk Uji Aktivitas Antimikobakteri Ekstrak Etanol Daun Legundi *Vitex trifolia L.* dan Rifampisin Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

Gambar 4.2 Menunjukkan pelat mikrotiter 96 sumur yang digunakan dalam uji REMA (*Resazurin Microplate Assay*) setelah diberikan perlakuan lalu diamati setelah hari ke-7 untuk menentukan konsentrasi hambat minimum ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) dan rifampisin terhadap

Mycobacterium tuberculosis. Sumur berwarna biru menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri, yang menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut, ekstrak daun legundi berhasil menghambat aktivitas metabolik *Mycobacterium tuberculosis*. Pelat sumur yang berwarna ungu hingga merah muda menunjukkan terjadi pertumbuhan bakteri, karena resazurin telah tereduksi menjadi resorufin oleh bakteri yang masih hidup dan aktif secara metabolik. Pada pelat kontrol media didapatkan hasil pelat sumur berwarna biru. Pada pelat sumur perlakuan dengan ekstrak herbal daun legundi menunjukkan hasil berwarna biru kecoklatan. Pada pelat sumur senyawa didapatkan hasil berwarna biru, begitu juga pada pelat sumur dengan perlakuan rifampisin sebagai kontrol positif. Hanya pelat sumur kontrol bakteri yang berubah warna menjadi merah.

4.1.1 Data Konsentrasi Hambat Minimum (MIC)

Pada penelitian ini menggunakan sampel *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv yang diinkubasi selama 7 hari kemudian diberikan perlakuan ekstrak daun legundi (*Vitex trifolia L.*) yang dilakukan dalam tiga kali pengulangan (I, II, III) pada tiga konsentrasi yaitu 2,5%, 1,25%, dan 0,625%. Kemudian dibandingkan dengan rifampisin sebagai kontrol positif dengan konsentrasi 0,25 µg/mL yang dilakukan dalam tiga kali pengulangan. Penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun Legundi (*Vitex trifolia L.*) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode *Resazurin Microtiter Assay* (REMA).

Pengujian	Kontrol Bakteri	Kontrol Media	Kontrol Pelarut	Kontrol Senyawa	Ekstrak Daun Legundi		
					2,5%	1,25%	0,625%
I	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
II	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
III	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh

Tabel 4.1 Hasil Uji Aktivitas Antimikobakteri Ekstrak Etanol Daun Legundi terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode REMA.

Pada kontrol bakteri, semua pengulangan menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri, yang menandakan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* masih hidup dan aktif secara metabolik. Hal ini mengonfirmasi bahwa bakteri yang digunakan dalam uji ini bersifat *viable*. Selanjutnya pada kontrol media menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri, hal ini menunjukkan bahwa media kultur bersih dari kontaminasi dan tidak mendukung pertumbuhan jika diinokulasi dengan bakteri.

Pada kontrol pelarut, bakteri tetap tumbuh pada setiap pengulangan, ini menandakan bahwa pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak daun legundi tidak memiliki efek antimikobakteri pada konsentrasi yang digunakan. Selanjutnya, pada kontrol senyawa sebagai kontrol positif pada pelat ini, menunjukkan hasil tidak terjadi pertumbuhan bakteri pada seluruh pengulangan, yang mengonfirmasi bahwa kontrol positif yang digunakan mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara efektif. Sesuai dengan hipotesis awal penelitian ini, pada kelompok yang diberikan perlakuan ekstrak etanol daun legundi pada semua konsentrasi yang diuji yaitu 2,5%, 1,25%, dan 0,625%, menunjukkan hasil tidak terjadi pertumbuhan bakteri. Hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun legundi memiliki aktivitas antibakteri yang kuat bahkan pada konsentrasi paling rendah.

Pengujian	Kontrol Bakteri	Kontrol Media	Rifampisin
			0,25 $\mu\text{g/ml}$
I	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
II	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh
III	Tumbuh	Tidak tumbuh	Tidak tumbuh

Tabel 4.2 menunjukkan hasil uji efektivitas antibiotik rifampisin terhadap pertumbuhan bakteri uji pada berbagai konsentrasi

Pada kontrol bakteri, pada ketiga pengulangan menunjukkan hasil tumbuh yang menunjukkan bahwa *Mycobacterium tuberculosis* yang digunakan pada uji ini dalam kondisi hidup dan aktif. Sedangkan pada pelat sumur media, tidak menunjukkan pertumbuhan, hal ini memastikan bahwa media yang digunakan tidak mengalami kontaminasi. Pada pelat sumur yang dilakukan dengan perlakuan rifampisin dengan konsentrasi yaitu 0,25 $\mu\text{g/ml}$ menunjukkan tidak ada pertumbuhan bakteri. Hasil ini diamati secara konsisten pada ketiga ulangan yang dilakukan untuk masing-masing konsentrasi, mengindikasikan efektivitas rifampisin sebagai kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara in vitro.

No.	Nama senyawa	MIC
1.	Ekstrak daun legundi	0,625%
2.	Rifampisin	0,25 $\mu\text{g/ml}$

Tabel 4.3 Menunjukkan hasil nilai Konsentrasi Hambat Minimum (MIC) dari dua senyawa, yaitu ekstrak etanol daun legundi dan rifampisin, terhadap *Mycobacterium tuberculosis*.

Pengujian aktivitas antimikobakteri rifampisin menggunakan metode REMA terhadap *Mycobacterium tuberculosis* menunjukkan bahwa pada konsentrasi

yang diuji yaitu 0,25 µg/ml tidak terdeteksi adanya pertumbuhan bakteri. Hasil ini diamati secara konsisten pada ketiga pengulangan yang dilakukan, mengindikasikan efektivitas rifampisin sebagai kontrol positif dalam menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara in vitro.

Hasil serupa juga ditunjukkan oleh ekstrak etanol daun *Vitex trifolia L.*, yang mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara konsisten pada konsentrasi 2,5%, 1,25%, dan 0,625%. Kemampuan ekstrak etanol daun legundi tersebut menunjukkan adanya potensi senyawa bioaktif dalam ekstrak daun legundi sebagai kandidat antituberkulosis alternatif.

4.2. Pembahasan

Strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv telah digunakan secara luas sebagai strain referensi standar dalam berbagai penelitian oleh komunitas ilmiah global sejak awal abad ke-20. Strain ini menjadi model utama studi tuberkulosis karena konsistensinya dalam penelitian, sekaligus ketersediaan data biologis dan genomik yang komprehensif, menunjukkan tingkat konsistensi hasil yang tinggi dalam berbagai pendekatan eksperimental. Strain ini dikenal sensitif terhadap obat anti-tuberkulosis konvensional seperti rifampisin dan isoniazid, sehingga ideal digunakan sebagai kontrol standar dalam uji aktivitas antimikobakteri maupun penentuan konsentrasi hambat minimum (MIC). Banyak studi patogenik dan pengobatan tuberkulosis menggunakan H37Rv sebagai model studi karena profil virulensinya yang terdefinisi dan kemiripannya dengan strain klinis yang menyebabkan infeksi tuberkulosis aktif.⁶⁹

Berdasarkan hasil analisis fitokimia, ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) mengandung flavonoid, tanin, fenol, dan kuinon yang secara sinergis berkontribusi terhadap aktivitas antimikobakteri. Sifat lipofilik dari flavonoid dan kuinon, memungkinkan penetrasi lebih efektif melalui dinding sel mikobakteri yang kaya lipid, seperti pada *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga meningkatkan potensi hambatan terhadap pertumbuhan bakteri tersebut.⁷⁴

Dengan demikian, kombinasi senyawa aktif pada ekstrak daun legundi memberikan efek antimikobakteri melalui mekanisme multipel, baik dengan mengganggu struktur fisik maupun proses biokimia bakteri.

Pada penelitian ini menggunakan dengan konsentrasi ekstrak etanol daun legundi berturut-turut 2,5%, 1,25%, dan 0,625%. Pemilihan konsentrasi ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) pada penelitian ini, yaitu 2,5%, 1,25%, dan 0,625%, didasarkan pada prinsip serial pengenceran dua kali lipat (*two-fold serial dilution*). Metode ini umum digunakan dalam uji aktivitas antimikobakteri karena memungkinkan penentuan kisaran konsentrasi hambat minimum (*Minimum Inhibitory Concentration / MIC*) dengan tingkat ketelitian yang baik. Serial pengenceran dua kali lipat banyak diaplikasikan dalam uji resazurin microplate assay (REMA), di mana konsentrasi ekstrak atau senyawa uji secara bertahap diencerkan untuk menilai efektivitas penghambatan pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*. Pemilihan rentang konsentrasi tersebut sesuai dengan penelitian terdahulu.⁶⁸

Hubungan antara konsentrasi dan aktivitas antimikobakteri ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) dapat dianalisis melalui prinsip dosis dan respons, yang merupakan karakteristik umum pada interaksi senyawa bioaktif dengan target biologis. Secara umum, peningkatan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan peningkatan daya hambat terhadap *Mycobacterium tuberculosis* hingga mencapai titik tertentu. Seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak, jumlah senyawa aktif yang tersedia untuk berinteraksi dengan struktur vital bakteri, yaitu dinding sel yang kaya *mycolic acid*, membran plasma, serta enzim-enzim penting dalam metabolisme mikobakteri menjadi meningkat. Peningkatan ini berimplikasi pada tingginya kemungkinan terjadinya kerusakan struktural dan fungsional pada sel bakteri, yang pada akhirnya memicu efek penghambatan pertumbuhan yang lebih signifikan.⁷¹

Telah diketahui bahwa dinding sel *Mycobacterium tuberculosis* mempunyai struktur yang sangat unik dan kompleks, ditandai dengan adanya keberadaan

lapisan *mycolic acid* yang tebal, membentuk matriks lipid padat. Pada lapisan *mycolic acid* ini bersifat hidrofobik, sehingga membatasi masuknya senyawa hidrofilik dan molekul polar. Karakteristik tersebut menjadi salah satu mekanisme pertahanan utama *Mycobacterium tuberculosis* terhadap agen antibakteri, sehingga hanya senyawa dengan sifat lipofilik yang mampu menembus dan mencapai target intraseluler. Terdapat hubungan yang jelas antara lipofilitas dan aktivitas antimikobakteri, sebagaimana dibuktikan pada studi senyawa turunan Triazol Basa Schiff, di mana senyawa dengan nilai log P tinggi (+1,76 hingga +2,55) menunjukkan aktivitas antimikobakteri yang kuat, sedangkan senyawa yang lebih hidrofilik (log P rendah) tidak menunjukkan aktivitas signifikan.⁷² Hal ini konsisten dengan temuan bahwa meskipun obat antituberkulosis lini pertama seperti isoniazid dan pirazinamid memiliki nilai ClogP negatif, dimana jika dikaji secara komprehensif menunjukkan senyawa dengan aktivitas antituberkulosis umumnya lebih lipofilik dibandingkan senyawa yang tidak aktif. Bahkan, di dalam satu kelas obat, turunan yang lebih lipofilik cenderung memiliki aktivitas lebih tinggi terhadap *Mycobacterium* dibandingkan analognya yang lebih hidrofilik.⁷³

Mengingat peran krusial dari *mycolic acid* pada pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis*, enzim yang mengatur metabolisme tersebut dapat menjadi titik strategis untuk pengembangan agen antimikobakteri. Dalam hal ini, lipofilitas tinggi yang dimiliki ekstrak etanol daun legundi berpotensi memfasilitasi penetrasi ke dalam dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*, sehingga meningkatkan aktivitas antimikobakterium. Ekstrak etanol daun legundi diketahui mempunyai senyawa bioaktif bersifat lipofilik yaitu flavonoid, yang secara teoritis memiliki afinitas tinggi terhadap lingkungan hidrofobik pada dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*. Sifat lipofilik ini memfasilitasi penetrasi senyawa aktif melalui lapisan *mycolic acid*, sehingga memungkinkan senyawa tersebut mencapai target intraseluler. Temuan ini sejalan dengan studi yang telah dilakukan sebelumnya yang menunjukkan bahwa senyawa lipofilik

umumnya memiliki aktivitas antimikobakteri yang lebih tinggi daripada senyawa polar, karena kemampuannya melewati lapisan lipid tebal yang merupakan ciri khas genus *Mycobacterium*.⁷¹

Berbagai studi melaporkan bahwa senyawa lipofilik dari *Vitex trifolia L.* maupun genus *Vitex* lainnya mempunyai aktivitas antimikobakteri yang bermakna. Pada studi terdahulu, didapatkan bahwa dua senyawa diterpenoid yang terisolasi dari *V. trifolia L.* menunjukkan aktivitas terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, masing-masing dengan nilai MIC 100 µg/mL dan 25 µg/mL untuk isoambreinolide, menggunakan metode BACTEC-460.¹⁸ Senyawa terpenoid lipofilik lain, termasuk 6,7-dehydroroleanone dan minyak esensial, dilaporkan memiliki nilai MIC 62,5 µg/mL dan 31,2 µg/mL. Pada beberapa studi sebelumnya telah mengonfirmasi pola bahwa senyawa lipofilik umumnya lebih efektif menembus dinding sel *Mycobacterium tuberculosis*, yang kaya akan lapisan lipid *mycolic acid* sangat hidrofobik. Ini sesuai dengan argumen farmakodinamik bahwa lipofilitas tinggi memungkinkan penetrasi yang lebih dalam ke target intraseluler.

Hasil penelitian lainnya yang menguji enam strain *Mycobacterium tuberculosis*, termasuk strain sensitif H37Rv dan H37Ra dengan menggunakan metode *Resazurin Microtiter Assay* (REMA), vitexin menunjukkan nilai MIC 25 µg/mL, yang mana senyawa tersebut terbukti bersifat mikobakterisidal.⁷⁴

Dalam penelitian ini, ekstrak etanol daun *Vitex trifolia L.* mengandung senyawa yang memiliki sifat lipofilik. Dengan mempertimbangkan MIC ekstrak daun legundi yang didapatkan, sejumlah data literatur ini telah mendukung hipotesis bahwa lipofilitas merupakan faktor penting dalam efek antimikobakteri. Penelitian lain yang mendukung juga telah dilakukan juga menunjukkan bahwa ekstrak *Vitex trifolia L.* dengan metode menggunakan *Microplate Alamar Blue Assay* (MABA) pada *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap strain *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv dengan nilai MIC sebesar 8,02 µg/mL.⁷⁵ Pada uji *in vitro* lainnya menunjukkan, ekstrak buah

dan bunga tanaman legundi yang diperoleh menggunakan pelarut etanol 90% menunjukkan adanya aktivitas antimikobakteri dengan nilai MIC berkisar antara 77,6 hingga lebih dari 100 $\mu\text{g/mL}$ terhadap strain yang sama.⁶⁶ Selain itu, Pada studi sebelumnya, menunjukkan adanya zona hambat yang signifikan pada kultur *Mycobacterium tuberculosis* setelah perlakuan dengan ekstrak daun legundi pada konsentrasi 70% dan 90%.¹⁶ Hasil ini sejalan dengan temuan dalam penelitian ini yang mengonfirmasi aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol daun legundi terhadap *Mycobacterium tuberculosis*. Pada penelitian ini, nilai MIC ekstrak etanol daun legundi yang berada di bawah 0,625% menunjukkan bahwa senyawa aktif dalam ekstrak tersebut mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* secara efektif. Hasil ini sesuai dengan kriteria aktivitas antibakteri yang signifikan, di mana ekstrak dengan MIC $<10 \mu\text{g/mL}$ dianggap aktif secara farmakologis.⁷⁶

Penggunaan rifampisin sebagai kontrol positif sesuai dengan temuan pada penelitian meta-analisis yang telah dilakukan, dimana menunjukkan efektivitas rifampisin sebagai obat lini pertama tuberculosis yang menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* dengan metode REMA dengan tingkat akurasi yang tinggi.⁵⁷

Sebuah studi dari Amhara, Ethiopia, menggunakan REMA untuk menentukan MIC rifampisin serta beberapa obat lainnya, menunjukkan baik pada isolat klinis maupun *strain* referensi H37Rv. Didapatkan data rentang MIC untuk rifampisin yang diuji menggunakan REMA adalah 2–0,03 $\mu\text{g/mL}$, dan interpretasi resistensi mengacu pada ambang $\geq 0,5 \mu\text{g/mL}$.⁷⁷ Dalam penelitian ini, hasil pengujian menunjukkan MIC rifampisin sebesar 0,25 $\mu\text{g/mL}$ untuk strain H37Rv. Nilai tersebut berada jauh di bawah ambang resistensi, sehingga mengindikasikan bahwa strain tersebut bersifat sensitif terhadap rifampisin.

Meskipun penelitian ini menunjukkan adanya aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun legundi terhadap *Mycobacterium tuberculosis*, terdapat beberapa keterbatasan yang perlu diperhatikan pada penelitian selanjutnya. Penggunaan

ekstrak total tanpa dilakukan isolasi senyawa murni dapat mempersulit untuk menentukan senyawa bioaktif spesifik yang bertanggung jawab atas efek antibakteri yang diamati. Hal ini dapat disebabkan oleh kompleksitas komponen fitokimia dalam ekstrak yang belum dimurnikan, serta kemungkinan adanya interaksi antagonistik antar senyawa. Isolasi dan karakterisasi senyawa aktif menjadi langkah krusial guna memahami mekanisme aksi molekuler serta potensi pengembangan. Oleh karena itu, langkah berikutnya yang disarankan adalah proses isolasi, pemurnian, dan karakterisasi senyawa aktif utama, diikuti dengan evaluasi farmakodinamik dan farmakokinetik, serta uji toksisitas untuk memastikan keamanan penggunaan. Selain itu, jumlah sampel *Mycobacterium tuberculosis* yang digunakan dalam penelitian ini masih terbatas, sehingga nilai MIC yang diperoleh perlu dikonfirmasi melalui pengujian pada sampel yang lebih banyak dan beragam untuk mewakili variasi strain klinis ataupun variasi genetik saat ini.

BAB 5

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Pada penelitian ini, didapatkan nilai MIC pada ekstrak etanol daun legundi (*Vitex trifolia L.*) yang mampu menghambat pertumbuhan *Mycobacterium tuberculosis* yaitu 0,65%. Sedangkan nilai MIC pada rifampisin sebagai kontrol positif penelitian ini adalah 0,25 µg/mL. Meskipun nilai MIC ekstrak daun legundi lebih tinggi dibandingkan dengan rifampisin, namun ekstrak etanol daun legundi memiliki potensi sebagai agen antibakteri terhadap bakteri *Mycobacterium tuberculosis* yang dapat dikembangkan lebih lanjut.

5.2. Saran

5.2.1. Penelitian lanjutan

1. Diperlukan melakukan pengujian aktivitas antimikobakteri terhadap strain *Mycobacterium tuberculosis* lainnya guna memastikan efektivitas ekstrak pada berbagai variasi genetik bakteri.
2. Diperlukan penelitian lanjutan berupa uji toksisitas dan uji *in vivo* dianjurkan agar dapat menilai keamanan dan efektivitas ekstrak dalam sistem biologis yang lebih kompleks.
3. Melakukan studi stabilitas ekstrak dan senyawa aktif dari ekstrak yang diperoleh untuk memastikan bahwa aktivitas antimikobakteri tetap terjaga selama penyimpanan dan pemrosesan ekstrak

5.2.2. Evaluasi Efek Jangka Panjang

1. Diperlukan studi toksisitas jangka panjang dan efek samping potensial dari ekstrak daun legundi pada sel manusia untuk memastikan keamanan pemakaian ekstrak sebagai bahan obat

5.2.3. Studi Komparatif dengan Terapi Lain

1. Perlu adanya perbandingan ekstrak etanol daun legundi dengan agen terapi alami lainnya, seperti flavonoid dari tanaman lain, guna membantu menentukan apakah daun legundi memiliki keunggulan terapeutik yang lebih baik

5.2.4. Aplikasi dalam Pengembangan Obat

1. Jika hasil penelitian lebih lanjut menunjukkan efektivitas yang konsisten, ekstrak daun legundi dapat dikembangkan sebagai antituberkulosis alami atau fitofarmaka untuk membantu pengobatan tuberculosis dengan efek samping yang lebih minimal dibandingkan dengan obat sintesis.

Referensi

1. Sharma SK, Mohan A, Kohli M. Extrapulmonary tuberculosis. *Expert Rev Respir Med.* 2021;15(7):931-948. doi:10.1080/17476348.2021.1927718.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. World Health Organization; 2021. Accessed November 19, 2023. <https://www.who.int/teams/global-tuberculosis-programme/tb-reports/global-tuberculosis-report-2021>
3. Yayasan KNCV Indonesia. Laporan kasus tuberkulosis (TBC) global dan Indonesia. Yayasan KNCV Indonesia; November 30, 2022. Accessed June 6, 2023. <https://yki4tbc.org/laporan-kasus-tbc-global-dan-indonesia-2022/>
4. Algood HM, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(6):467-477. doi:10.1016/s1359-6101(03)00054-6.
5. Heye T, Stojkovic M, Kauczor H, Junghanss T, Hosch W. Extrapulmonary tuberculosis: radiological imaging of an almost forgotten transformation artist. *RoFo.* 2011;183(11):1019-1029. doi:10.1055/s-0031-1281742.
6. Dorman SE, Nahid P, Kurbatova EV, et al. Four-month rifapentine regimens with or without moxifloxacin for tuberculosis. *N Engl J Med.* 2021;384(18):1705-1718. doi:10.1056/NEJMoa2033400.
7. Jasenosky LD, Scriba TJ, Hanekom WA, Goldfeld AE. T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunol Rev.* 2015;264(1):74-87. doi:10.1111/imr.12272.
8. Queiroz MAF, Lima SS, Amoras EDSG, et al. Epidemiological and cytokine profile of patients with pulmonary and extrapulmonary tuberculosis in a population of the Brazilian Amazon. *Microorganisms.* 2022;10(10):2075. doi:10.3390/microorganisms10102075.
9. Mzinza DT, Sloan DJ, Jambo KC, et al. Kinetics of *Mycobacterium tuberculosis*-specific IFN- γ responses and sputum bacillary clearance in HIV-

- infected adults during treatment of pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis*. 2015;95(5):463-469. doi:10.1016/j.tube.2015.05.012.
10. Ankalikar AA, Viswanathswamy AH, Ronad P. Effect of hydroalcoholic extracts of leaves of *Vitex trifolia* Linn. on chronic inflammation and tuberculosis. *J Young Pharm*. 2023;15(4):671-678. doi:10.5530/jyp.2023.15.93.
 11. Radhakrishnan RK, Pradhan P, Sahoo S, et al. Mycobacterium tuberculosis evades host immunity by modulating lactate metabolism. *Nat Commun*. 2020;11(1):4520. doi:10.1038/s41467-020-18364-5.
 12. Singh A, Gopinath K, Sharma P. Vitamin D deficiency and tuberculosis: molecular linkages and treatment strategies. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2019;190:17-22. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.03.003.
 13. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(5):388-404. doi:10.1038/nrd4001.
 14. Wallis RS, Maeurer M, Mwaba P, et al. Tuberculosis—advances in development of new drugs, treatment regimens, host-directed therapies, and biomarkers. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(4):e34-e46. doi:10.1016/S1473-3099(16)00070-0.
 15. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent Mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:814943. doi:10.1155/2011/814943.
 16. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol*. 2009;7(12):845-855. doi:10.1038/nrmicro2236.
 17. Houben RM, Dodd PJ. The global burden of latent tuberculosis infection: a re-estimation using mathematical modelling. *PLoS Med*. 2016;13(10):e1002152. doi:10.1371/journal.pmed.1002152.

18. Esmail H, Barry CE, Wilkinson RJ. Understanding latent tuberculosis: the key to improved diagnostic and novel treatment strategies. *Drug Discov Today*. 2012;17(9-10):514-521. doi:10.1016/j.drudis.2011.12.013.
19. Horsburgh CR Jr, Rubin EJ. Latent tuberculosis infection in the United States. *N Engl J Med*. 2011;364(15):1441-1448. doi:10.1056/NEJMcp1005750.
20. Pai M, Behr MA, Dowdy D, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16076. doi:10.1038/nrdp.2016.76.
21. Wee HN, Neo SY, Singh D, et al. Effects of *Vitex trifolia* L. leaf extracts and phytoconstituents on cytokine production in human U937 macrophages. *BMC Complement Med Ther*. 2020;20(1):91. doi:10.1186/s12906-020-02884-w.
22. Pezzella AT. History of Pulmonary Tuberculosis. *Thorac Surg Clin*. 2019;29(1):1-17. doi:10.1016/j.thorsurg.2018.09.002.
23. Anggraeni DE, Rahayu SR. Gejala Klinis Tuberkulosis pada Keluarga Penderita Tuberkulosis BTA Positif. *HIGEIA J Public Health Res Dev*. 2018;2(1):91-101.
24. Tadele A, Beyene D, Hussein J, et al. Immunocytochemical detection of *Mycobacterium*. *Microbiol Spectrum*. 2014;4(6):10.1128/microbiolspec.TNMI7-0008-2016.
25. Astriany D, Husein SG, RJM. Karakterisasi bakteri *Mycobacterium tuberculosis* menggunakan spektrofotometri Fourier transform infrared. *Indones J Pharm Sci Technol*. 2017;6(2):13-21.
26. Mar'iyah K, Zulkarnain. Patofisiologi penyakit infeksi tuberkulosis. In: *Prosiding Biologi: Achieving the Sustainable Development Goals with Biodiversity in Confronting Climate Change*. 2021:83-92. ISBN: 987-602-72245-6-8.
27. Zhang L, Jiang X, Pfau D, Ling Y, Nathan CF. Type I interferon signaling mediates *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophage death. *J Exp Med*. 2021;218(2):e20200887.

28. MacNeil A, Glaziou P, Sismanidis C, Maloney S, Floyd K. Global Epidemiology of Tuberculosis and Progress Toward Achieving Global Targets—2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2019;68(11):263-266. doi:10.15585/mmwr.mm6811a2.
29. Koch A, Mizrahi V. *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 2018;26(6):555-556. doi:10.1016/j.tim.2018.02.012.
30. World Health Organization (WHO). Laporan Kasus Tuberkulosis (TBC) Global dan Indonesia 2022. <https://yki4tbc.org/laporan-kasus-tbc-global-dan-indonesia-2022/>.
31. Kartasmita CB. Epidemiologi tuberkulosis. *Sari Pediatri.* 2009;11(2):124-129.
32. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia. BUKU GUIDELINE TB 2021. Perhimpunan Dokter Paru Indonesia; 2022 Aug 25. p.21-22.
33. Sia JK, Rengarajan J. Immunology of *Mycobacterium tuberculosis* infections. *Microbiol Spectr.* 2019;7(4):GPP3-0022-2018.
34. Banaiee N, Kincaid EZ, Buchwald U, Jacobs WR Jr, Ernst JD. Potent inhibition of macrophage responses to IFN-gamma by live virulent *Mycobacterium tuberculosis* is independent of mature mycobacterial lipoproteins but dependent on TLR2. *J Immunol.* 2006;176(5):3019-3027.
35. Syafa'ah I, Yudhawati R. Peran Imunitas Mukosa terhadap Infeksi *Mycobacterium Tuberculosis*. *Jurnal Respirasi (JR).* 2016;2(2):61-68.
36. TB Indonesia. Strategis Nasional Penanggulangan Tuberkulosis di Indonesia 2020-2024. 2022 Dec 29.
37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). TB 101 - 5. Bacteriological Examination – Culture. CDC website.
38. Myllymäki H, Bäuerlein CA, Rämetsä M. The zebrafish breathes new life into the study of tuberculosis. *Front Immunol.* 2016;7:196.
39. Setianingsih NLPP, Made N, Singapurwa AS, Yohanes G, Arygunartha SAMA, Djelantik P, Winduyasa IW. Environmental Health Risk Analysis of

- Legundi Leaf Essential Oil Toxicity (*Vitex trifolia* L.). *J Environ Health*. 2023;15(1).
40. Khalifa RA, Nasser MS, Gomaa AA, Osman NM, Salem HM. Resazurin Microtiter Assay Plate method for detection of susceptibility of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* to second-line anti-tuberculous drugs. *Egypt J Chest Dis Tuberc*. 2013;62(2):241-247.
 41. Jethva K, Patel M, Singh R. Antimycobacterial screening of selected medicinal plants using MTT and the microplate resazurin assay. *Int J Pharm Sci Res*. 2021;12(3):1537-1545.
 42. Ministry of Health of the Republic of Indonesia. *Pedoman Nasional Pelayanan Kedokteran Tata Laksana Tuberkulosis*. Ministry of Health of the Republic of Indonesia; 2020. ISBN 978-602-416-919-0. p.1-156.
 43. Rajaram MV, Ni B, Dodd CE, Schlesinger LS. Macrophage immunoregulatory pathways in tuberculosis. *Semin Immunol*. 2014;26(6):471-485.
 44. Zaki FLM, Salleh W, Noor NNM, Shaharudin SM, Ab Ghani N. Characterisation of the essential oil components and their multivariate statistical analysis of the genus *Vitex* and *Plectranthus* (Lamiaceae). *Riv Ital Sostanze Grasse*. 2022;99:263-268.
 45. Lubis HML, Hariaji I. Ekstrak Buah Legundi (*Vitex trifolia*) Mampu Menghambat Pembelahan dan Pertumbuhan Sel Tumor Kulit Tikus. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran dan Kesehatan*. 2017;17(1):1-6.
 46. Ankalikar AA, Viswanathswamy AHM. Effect of *Vitex trifolia* Linn and *Solanum nigrum* Linn on oxidative stress and inflammation. *Indian J Health Sci Biomed Res*. 2017;10(3):269-275. doi:10.4103/kleuhsj.kleuhsj_11_17
 47. Yan CX, Wei YW, Li H, Xu K, Zhai RX, Meng DC, Fu XJ, Ren X. *Vitex rotundifolia* L. f. and *Vitex trifolia* L.: A review on their traditional medicine, phytochemistry, pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2023;308:116273.

48. Meng X, Wang H, Kuang Z, Wu Y, Su X, Wang J, Li L, Liu C, Jia M. Traditional use, phytochemistry and pharmacology of *Viticis Fructus*. *Heliyon*. 2023;9(9):e19144. doi:10.1016/j.heliyon.2023.e19144.
49. Mottaghipisheh J, Kamali M, Doustimotlagh AH, Nowroozzadeh MH, Rasekh F, Hashempur MH, Iraj A. A comprehensive review of ethnomedicinal approaches, phytochemical analysis, and pharmacological potential of *Vitex trifolia* L. *Front Pharmacol*. 2024;15:1322083.
50. Ono M, Ito Y, Nohara T. Four new halimane-type diterpenes, vitetrifolins D–G, from the fruits of *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull*. 2001;49:1220-1222.
51. Ono M, Ito Y, Kinjo J, Yahara S, Nohara T. Three new halimane-type diterpenes, vitetrifolins A–C, from the fruit of *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull*. 2000;48(5):769-771. doi:10.1248/cpb.48.769.
52. Ono M, Nishio S, Mishima K, Takamura C, Yoshimitsu H, Ikeda T, Nohara T. Four new halimane-type diterpenes, vitetrifolins H–K, from the fruit of *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull*. 2002;50(2):228-230. doi:10.1248/cpb.50.228.
53. Bhargavan B, Bedi YS, Singh B, Kaul VK. A new lignan from the roots of *Vitex trifolia* L. *Nat Prod Res*. 2009;23(16):1503-1508
54. Hossain MA, Al-Raqmi KAS, Al-Mijizy ZH, Weli AM, Al-Riyami Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013;3(9):705-710. doi:10.1016/S2221-1691(13)60142-2.
55. Gupta S, Sharma A, Bansal P. Antimicrobial activity of *Vitex trifolia* Linn. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(5):169-171.
56. Islam MT, Quispe C, El-Kersh DM, et al. A literature-based update on *Vitex* species: Chemical diversity, pharmacological properties, and therapeutic potentials. *Front Pharmacol*. 2021;12:700454. doi:10.3389/fphar.2021.700454.

57. Kaur A, Singh A, Duggal S. Phytochemistry and pharmacology of genus *Vitex*: A review. *Pharmacogn Rev.* 2016;10(19):118-125. doi:10.4103/0973-7847.176544.
58. Nair R, Kalariya T, Sumitra C. Antibacterial activity of some selected Indian medicinal flora. *Turk J Biol.* 2005;29(1):41-47.
59. Zhao YY, Feng YL, Du X, Xi ZH, Cheng XL, Wei F. Chemome diversity of essential oils from the fruits of *Vitex trifolia* L. *Biochem Syst Ecol.* 2009;37(4):581-588. doi:10.1016/j.bse.2009.09.011.
60. Valsaraj R, Pushpangadan P, Smitt UW, Adersen A, Nyman U. Antimicrobial screening of selected medicinal plants from India. *J Ethnopharmacol.* 1997;58(2):75-83. doi:10.1016/S0378-8741(97)00085-6.
61. Khare CP. *Indian Medicinal Plants: An Illustrated Dictionary.* Springer Science & Business Media; 2008. p. 695-696.
62. Ahmad I, Mehmood Z, Mohammad F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. *J Ethnopharmacol.* 1998;62(2):183-193. doi:10.1016/S0378-8741(98)00055-5.
63. Das B, Kashinatham A, Reddy MR, Srinivas Y. Chemical constituents of *Vitex trifolia* L. *Indian J Chem.* 2000;39B:1033-1036.
64. Ono M, Takamura C, Sugita F, et al. Diterpenes and norditerpenes from the fruits of *Vitex trifolia*. *J Nat Prod.* 2004;67(9):1432-1437.
65. Phuong TT, Mai HD, Matsunami K, Otsuka H. A new halimane-type diterpene and other diterpenes from the fruits of *Vitex trifolia* L. *Chem Pharm Bull.* 2008;56(7):941-944. doi:10.1248/cpb.56.941.
66. Tomimori T, Miyaichi Y, Imoto Y, Kizu H, Namba T. Studies on the Nepali crude drug "sambhalu": II. On the flavonoid constituents of *Vitex trifolia* L. *Chem Pharm Bull.* 1986;34(4):1669-1675. doi:10.1248/cpb.34.1669.
67. Matsumoto T, Yamazaki T, Hirano Y, et al. New labdane-type diterpenes from *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull.* 1995;43(12):2161-2166.

68. Ono M, Takamura C, Ito Y, et al. Four new diterpenes, vitetrifolins L–O, from the fruits of *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull.* 2003;51(7):790-793. doi:10.1248/cpb.51.790.
69. Gao H, Li G, Lou H. Structural studies on diterpenoids from *Vitex trifolia* L. *Planta Med.* 2006;72(9):860-864. doi:10.1055/s-2006-931562.
70. Ono M, Yanaka T, Yamamoto M, et al. New abietane-type diterpenes, vitetrifolins P and Q, from the fruits of *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull.* 2008;56(6):857-860. doi:10.1248/cpb.56.857.
71. Suksamrarn A, Panseeta P, Ratananukul P, Chimnoi N, Suksamrarn S. Diterpenes from the fruits of *Vitex trifolia* and their cytotoxic activity. *Planta Med.* 2003;69(9):877-879. doi:10.1055/s-2003-43218.
72. Ono M, Yamamoto M, Yanaka T, et al. New labdane-type diterpenes, vitetrifolins R–U, from the fruits of *Vitex trifolia*. *Chem Pharm Bull.* 2008;56(9):1282-1285. doi:10.1248/cpb.56.1282.

Lampiran



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA
FACULTY OF MEDICINE UNIVERSITY OF MUHAMMADIYAH SUMATERA UTARA

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
"ETHICAL APPROVAL"
No : 1423/KEPK/FKUMSU/2024

Protokol penelitian yang diusulkan oleh :
The Research protocol proposed by

Peneliti Utama : dr. Imas Putri Munthe

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara
Name of the Institution Faculty of Medicine University of Muhammadiyah of Sumatera Utara

Dengan Judul
Title

"MENGKALI POTENSI ANTIMIKOBAKTERI: PENILAIAN KONSENTRASI HAMBAT MINIMUM EKSTRAK ETANOL DAUN LEGUNDI (VITEX TRIFOLIA L.) MELALUI UJI MICROPLATE RESAZURIN (REMA) SECARA IN-VITRO"

"EXPLORING ANTIMYCOBACTERIAL POTENTIAL: ASSESSMENT OF THE MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION OF LEGUNDI LEAF (VITEX TRIFOLIA L.) ETHANOL EXTRACT VIA IN-VITRO RESAZURIN MICROPLATE TEST (REMA)"

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah
3) Pemerataan Beban dan Manfaat, 4) Resiko, 5) Bujukan / Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan
7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang merujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion / Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicator of each standard

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 20 Desember 2024 sampai dengan tanggal 20 Desember 2025
The declaration of ethics applies during the periode 20 Desember, 2024 until Desember 20, 2025

Medan, 20 Desember 2024
Ketua

Assoc. Prof. Dr. dr. Nurfady, MKT



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT, DAN KEPERAWATAN
DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI
Jln. Farmako, Sekip Utara, Yogyakarta, Telp. (0274) 580297, Hp.0811 2511 293
web: <http://microbiol.fk.ugm.ac.id>, e-mail: bm.fk@ugm.ac.id

Nomor : 124/UN1/FK-KMK.2/MIK/PT/2025
Lampiran : 1 bendel
Hal : Hasil Uji Mikrobiologi

21 April 2025

Yth. dr. Imas Putri Munthe
Universitas Muhammadiyah Sumatra Utara (UMSU)
Fakultas Kedokteran
Di Sumatra Utara

Bersama ini kami kirimkan hasil penelitian Analisis Anti tuberculosis dengan metode REMA sebanyak 1 sampel (terlampir).

Atas perhatiannya kami ucapkan terima kasih.



Ketua,
Prof. dr. Titik Nuryastuti, M.Si, PhD, Sp. MK(K)
NIP: 19720513 199702 2 001



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT DAN KEPERAWATAN
DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI
Jln. Farmako, Sekip Utara Yogyakarta, Telp./ Fax: (0274) 580297, 08112511293 E-mail : mimikrobiologi@ugm@yahoo.com Yogyakarta

HASIL UJI POTENSI ANTIBAKTERI Terhadap *Mycobacterium tuberculosis*
Metode : Resazurin Microtiter Assay (REMA)

dr. Imas Putri Munthe

Fakultas Kedokteran

Universitas Muhammadiyah Sumatera Utara (UMSU)

PENGUJIAN	K (B)	K (M)	K (P)	K (S)	NAMA SENYAWA	KONSENTRASI (%)		
						2,5	1,25	0,625
I	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	Ekstrak Etanol Daun Legundi (LGD)	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH
II	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	Ekstrak Etanol Daun Legundi (LGD)	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH
III	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	Ekstrak Etanol Daun Legundi (LGD)	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH



UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT DAN KEPERAWATAN
DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI
Jln. Farmako, Sekip Utara Yogyakarta, Telp./ Fax: (0274) 580297, 08112511293 E-mail : mimikrobiologi@ugm@yahoo.com Yogyakarta

HASIL UJI

PENGUJIAN	K (B)	K (M)	NAMA SENYAWA	KONSENTRASI (µg/ml)					
				2	1	0,5	0,25	0,125	0,0625
I	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	Rifampicin	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH
II	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	Rifampicin	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH
III	TUMBUH	TIDAK TUMBUH	Rifampicin	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH	TIDAK TUMBUH

Keterangan :

K (B) = KONTROL BAKTERI

K (M) = KONTROL MEDIA

K (P) = KONTROL PELARUT

K (S) = KONTROL SENYAWA



UNIVERSITAS GADJAH MADA
 FAKULTAS KEDOKTERAN, KESEHATAN MASYARAKAT DAN KEPERAWATAN
 DEPARTEMEN MIKROBIOLOGI

Jln. Farmako, Sekip Utara Yogyakarta, Telp./ Fax: (0274) 580297, 08112511253 E-mail : mimikrobiologi@ugm@yahoo.com Yogyakarta

HASIL MIC

NO	NAMA SENYAWA	MIC
1	Ekstrak Etanol Daun Legundi (LGD)	< 0.625 %
2	Rifampicin	< 0.0625 µg/ml

Laboran

Edo Ermanda Romadhoni



Ketua Departemen,

Prof. Dr. Titik Nuryastuti, M.Si Ph.D, SpMK(K)