

ABSTRAK DAN EXECUTIVE SUMMARY PENELITIAN HIBAH BERSAING



PENGEMBANGAN OBAT HERBAL TERSTANDAR EKSTRAK BANGLE (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) TERHADAP EKSPRESI ICAM-1 DAN KADAR IL-10 SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER UNTUK MENCEGAH KOMPLIKASI PADA MALARIA

(Tahun ke 1 dari rencana 2 tahun)

Oleh :

dr.Heni Fatmawati, M.Kes	NIDN. 0012027606
dr. Wiwien Sugih Utami, M.Sc	NIDN. 0022097606
dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed	NIDN. 0005048306

Dibiayai oleh DIPA Universitas Jember TA 2015

Surat Perjanjian Nomor : 194/UN25.3.1/LT/2015

Tanggal 5 Februari 2015

ABSTRAK

Penyakit malaria sampai saat ini masih menjadi masalah yang utama dalam skala Internasional maupun Nasional. Morbiditas dan mortalitas malaria di Indonesia masih tinggi akibat resistensi obat anti malaria dan radikal bebas yang berperan dalam patogenesis malaria. Pada malaria, eritrosit yang mengandung *Plasmodium sp.* akan merangsang keluarnya Th1 (T helper-1). Th1 ini akan menghasilkan interferon-gamma (IFN- γ) yang akan merangsang keluarnya monosit dan makrofag untuk melakukan fagositosis dan menghasilkan tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) yang akan merangsang keluarnya iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) yang menghasilkan radikal bebas yang dapat meningkatkan ekspresi adhesi molekul seperti ICAM-1, VCAM-1, CD36, dan P-selectin (Lou, 2001). Keseimbangan antara sitokin yang dikeluarkan oleh Th1 seperti TNF- α dan IFN- γ serta sitokin yang dikeluarkan oleh Th2 seperti IL-4 dan IL-10 dapat menentukan berat ringannya malaria. Tingginya rasio karakteristik TNF- α /IL-10 pada pasien malaria serebral mencerminkan produksi IL-10 tidak cukup untuk mencegah atau melawan penghambatan eritropoesis dan peningkatan erythrophagocytosis yang diinduksi oleh TNF dan atau mengurangi rangsangan pro-inflamatori (Philippe *et al.*, 2012). Penelitian menunjukkan bahwa IL-10 dapat menghambat produksi TNF- α dan IL-1. TNF- α dan ICAM-1 berperan penting dalam terjadinya malaria serebral yang merupakan salah satu komplikasi malaria.

Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai terapi komplementer baru yang diharapkan dapat mencegah terjadinya komplikasi malaria yang berakibat fatal. Tujuan penelitian ini menguji kemampuan ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebagai imunostimulan serta melihat efek sinergi dengan obat antimalaria standar yaitu Artemisinin secara *in vivo* dan membuat formulasi granul efervesen yang dapat digunakan sebagai terapi komplementer pada pengobatan malaria.

Sejumlah 25 ekor mencit Balb/C jantan dibagi dalam 5 kelompok masing-masing terdiri atas 10 ekor mencit. Kelompok perlakuan distimulasi dengan fraksi metanol ekstrak Bangle selama 14 hari berturut-turut, kemudian diinfeksi *Plasmodium berghei*. Pemberian fraksi metanol ekstrak Bangle ataupun Artemisinin diberikan apabila diketahui positif terinfeksi malaria. Semua kelompok diperiksa derajat parasitemianya tiap hari. Lama pemberian terapi selama 7 hari, merujuk pada regimen dosis Artemisinin yang diberikan secara peroral 0,04 mg/g BB/hari selama 7 hari (Fitri *et al.*, 2009). Hasil penelitian membuktikan bahwa pemberian Artemisinin dikombinasi fraksi metanol ekstrak Bangle dapat menghambat ekspresi gen ICAM-1 dan meningkatkan IL-10 pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA secara signifikan dan memberikan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan terapi Artemisinin atau fraksi metanol ekstrak Bangle secara tunggal. Hasil akhir dari penelitian adalah menghasilkan sediaan herbal terstandar berbahan baku fraksi aktif Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebagai terapi komplementer pada malaria yang efektif, aman, memiliki keajaiban khasiat, mudah digunakan dan memiliki stabilitas bahan aktif yang baik untuk mencegah terjadinya komplikasi pada malaria.

Kata kunci : *Zingiber cassumunar Roxb.*, malaria, imunomodulator, obat herbal terstandar, granul efervesen

EXECUTIVE SUMMARY

PENGEMBANGAN OBAT HERBAL TERSTANDAR EKSTRAK BANGLE (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) TERHADAP EKSPRESI ICAM-1 DAN KADAR IL-10 SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER UNTUK MENCEGAH KOMPLIKASI PADA MALARIA, Heni Fatmawati, Wiwien Sugih Utami, Bagus Hermansyah, Penelitian Hibah Bersaing Tahun Anggaran 2015, 43 halaman.

Penyakit malaria sampai saat ini masih menjadi masalah yang utama dalam skala Internasional maupun Nasional. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa berdasarkan *World malaria report* tahun 2011, pada tahun 2010 kasus malaria di dunia mencapai 216 juta dan diperkirakan 655 ribu orang meninggal (WHO, 2011). Di Indonesia penyakit malaria masih ditemukan pada semua provinsi dengan stratifikasi malaria tinggi (berdasarkan *Annual Parasite Incidence/API*) di wilayah Indonesia bagian Timur. Angka mortalitas (*Crude Fatality Rate/ CFR*) pada semua kelompok umur mengalami penurunan dari tahun 2004 (10,61%) ke tahun 2006 (1,34%), namun tahun 2006-2009 mengalami peningkatan sampai dua kali lipat dan terutama terjadi pada kelompok usia 5-9 tahun (Kemenkes RI, 2011). Mortalitas pada malaria disebabkan oleh terjadinya komplikasi karena infeksi *Plasmodium falciparum* dapat terjadi manifestasi malaria berat (*severe malaria*).

Pada malaria berat terjadi overproduksi sitokin pro-inflamasi seperti *Tumour Necrosis Factor- α* (TNF- α), *Interleukin-1* (IL-1), *Interferon- γ* (IFN- γ) dan radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI), *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), *Nitric Oxide* (NO) oleh sel-sel fagosit dan sel endotel yang teraktivasi. Pengeluaran mediator di atas sebenarnya bertujuan untuk membunuh parasit, namun karena sifat radikal bebas yang tidak spesifik dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitarnya (Lou *et al.*, 2001). Hasil penelitian menunjukkan tingginya konsentrasi TNF- α yang tinggi di serum berkaitan dengan progresivitas malaria otak (Grau *et al.*, 1987; Clark *et al.*, 1990; Neill & Hunt., 1995). Hasil pengukuran terhadap rerata kadar pemeriksaan TNF- α menunjukkan bahwa rata-rata TNF- α pada malaria komplikasi lebih tinggi dibandingkan dengan malaria tanpa komplikasi. TNF- α saja tidak dapat menjadi satu satunya parameter, namun harus juga melalui pemeriksaan respon sitokin regulator atau anti-inflamasi. Tingginya rasio karakteristik TNF/IL-10 pada pasien malaria serebral mencerminkan produksi IL-10 tidak cukup untuk mencegah atau melawan

penghambatan eritropoesis dan peningkatan erythrophagocytosis yang diinduksi oleh TNF dan atau mengurangi rangsangan pro-inflamatori (Philippe *et al.*, 2012)

Keseimbangan antara sitokin yang dikeluarkan oleh Th1 seperti TNF- α dan IFN- γ serta sitokin yang dikeluarkan oleh Th2 seperti IL-4 dan IL-10 dapat menentukan berat ringannya malaria falsiparum. Percobaan *in vitro* menggunakan sel pasien malaria menunjukkan bahwa IL-10 dapat menghambat produksi TNF- α dan IL-1. Dalam percobaan tersebut, pada penyakit malaria akibat *Plasmodium falciparum* akan terjadi peningkatan IL-12 dan IL-10 (Good and Doolan, 2010).

Interaksi antara p-RBC dan sel endotel dapat terjadi karena adanya berbagai reseptor yang tersedia untuk berikatan, antara lain ICAM-1, VCAM-1, CD-36, dan thrombospondin (Barnwell *et al.*, 1989; Berendt *et al.*, 1989; Ockenhouse *et al.*, 1992; Roberts *et al.*, 1985). Penempelan p-RBC pada sel endotel oleh ICAM-1, terutama pada organ-organ yang vital, mungkin akan mengarah pada penyakit yang berat dan kematian (Kun *et al.*, 1999). Apabila terjadi penempelan p-RBC pada venula otak dapat menyebabkan komplikasi malaria yang fatal, yaitu malaria serebral (Smith *et al.*, 2000).

Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) merupakan rempah-rempah dari famili yang sama dengan kunyit (*Curcuma sp.*) dan mengandung 42 komponen antara lain sabinen, terpinen-4-ol, seskuifeladren, sineol, asam dan gom, asam-asam organik dan albuminoid serta kurkuminoid (casumin A,B,C) (Hanani, 2000). Kandungan flavonoid dalam Bangle memiliki efek sebagai imunostimulan. Curcumin juga telah terbukti sebagai imunomodulator dapat meningkatkan ekspresi CD36 pada monosit atau makrofag yang memediasi terjadinya fagositosis secara non-opsonisasi (Mimche *et al.*, 2011). Oleh karena itu pemberian ajuvan bersama dengan obat antimalaria dapat menjadi terapi yang efektif untuk malaria berat.

Permasalahan penelitian yang diajukan dalam penelitian ini adalah apakah ekstrak Bangle (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) mempunyai potensi sebagai terapi komplementer malaria melalui aktifitas imunostimulan dan efek sinergi dengan antimalaria artemisin? Tujuan penelitian ini untuk menguji kemampuan ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebagai imunostimulan pada malaria melalui pemeriksaan ekspresi gen ICAM-1 serta peningkatan kadar IL-10 dari serum kemudian mengembangkan ekstrak Bangle

(menjadi obat herbal terstandar yang dapat digunakan sebagai terapi komplementer malaria.

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorik dengan rancangan *Pre test and post test controlled design*, dengan subyek penelitian mencit Balb/C dengan berat badan 20-30 g dan berumur 2-3 bulan sebanyak 25 ekor, yang dibagi ke dalam 5 kelompok yang diinduksi *Plasmodium berghei* strain ANKA dan diterapi standar dengan Artemisinin yang kemudian dilihat efek imunomodulasinya dengan melihat ekspresi gen ICAM-1 dan kadar IL-10.

Sebelum digunakan dalam pengujian, fraksi metanol ekstrak Bangle distandarisasi dengan mengukur kadar kurkumin dengan metode KLT-densitometri. Hewan coba diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan lalu diberi minum larutan fraksi metanol ekstrak Bangle selama 14 hari untuk stimulasi respon imun hewan coba. Setelah itu diinfeksi *Plasmodium berghei* dari stok, setelah positif terinfeksi diterapi dengan Artemisinin dosis 0,0364 mg/kg BB. Pada K-IV dan K-V tetap diberikan ekstrak Bangle atau fraksi aktif ekstrak Bangle sampai akhir pengobatan. Lama pemberian terapi selama 7 hari, merujuk pada regimen dosis Artemisinin yang diberikan secara peroral 0,04 mg/g BB/hari selama 7 hari (Fitri *et al.*, 2009). Selama 7 hari perlakuan, derajat parasitemia tetap diperiksa melalui pembuluh darah di ekor. Setelah selesai terapi, mencit dinarkose dan diambil darah intracardial untuk pemeriksaan kadar IL-10 dan limpa untuk pemeriksaan ekspresi gen ICAM-1.

Pemeriksaan ekspresi gen ICAM-1 dilakukan dengan isolasi RNA dari organ limpa dengan menggunakan RNA isolation kit selanjutnya dilakukan *reverse transcriptase-PCR* untuk mendapatkan cDNA dari ICAM-1 yang diharapkan. Selanjutnya dilakukan PCR dengan menggunakan primer spesifik ICAM-1 lalu dilakukan elektroforesis. Data dari pita-pita DNA diolah menggunakan *Image Analyzer*. Hasil terakhir berupa gambaran ekspresi gen ICAM-1 dalam bentuk semikuantitatif. Kadar IL-10 diukur menggunakan serum mencit menggunakan ELISA kit (R&D System) secara duplo. Analisis data meliputi analisis deskriptif dan analisis statistik inferensial. Analisis statistik menggunakan program SPSS for Windows.

Hasil amplifikasi PCR dirunning elektroforesis menggunakan gel agarose kemudian dilakukan analisis *gel band* (pita-pita) hasil elektroforesis menggunakan software analisis gel *ImageJ analyzer* dengan mengukur kuantitas ketebalan pita-pita

yang tampak pada gel. PCR konvensional dapat digunakan untuk mendapatkan data kuantitatif tersebut dengan menggunakan kompetitor (*internal exogenous standard*) atau dengan *housekeeping gene* (*internal endogenous standard*). Housekeeping gene sebagai *reference gene* yang dipakai disini adalah gen GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) dengan ukuran 165bp.

Tingginya rendemen yang terdapat pada pelarut metanol menunjukkan pelarut tersebut mampu mengekstrak lebih banyak komponen bioaktif yang memiliki sifat kepolaran yang lebih tinggi. Hal tersebut dapat terjadi karena metanol memiliki gugus polar yang lebih kuat daripada gugus nonpolar, hal ini dapat terlihat dari struktur kimia metanol yang mengandung gugus hidroksil (polar) dan gugus karbon (nonpolar) (Ukhty, 2011) sehingga pelarut methanol memiliki kandungan senyawa curcumin yang lebih besar dan efeknya terhadap mencit juga lebih besar dengan dosis yang sama.

Hasil penghitungan derajat parasitemia menunjukkan bahwa kelompok yang diberi terapi bangle dan artemisinin menunjukkan derajat parasitemia yang paling rendah (Kelompok IV). Semua kelompok mendapatkan imunomodulasi fraksi metanol ekstrak Bangle dosis 0,045mg/kgBB/hari kecuali kelompok I. Pada kelompok kontrol negatif (tidak diberi terapi) menunjukkan derajat parasitemia yang paling tinggi, sedangkan pada kelompok kontrol positif yang diberi terapi Artemisinin saja (kelp III) menunjukkan derajat parasitemia yang lebih tinggi daripada kelompok IV. Pada kelompok yang mendapatkan terapi bangle saja, menunjukkan hasil derajat parasitemia yang lebih rendah daripada kelompok kontrol negatif.

Pengukuran hasil ELISA terhadap kadar IL-10 masing-masing kelompok mencit, menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif yang mempunyai kadar IL-10 paling tinggi, kemudian kelompok III dan kelompok V juga terlihat mempunyai kadar IL-10 meski jumlahnya tidak sebanyak yang kelompok kontrol negatif. Pada kelompok kontrol negatif, mencit di stimulasi dan diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* tetapi tidak diterapi.

Hasil analisis data ICAM-1 dengan parametrik uji Oneway ANOVA menunjukkan hasil $p=0,149$. Nilai $p > \alpha$, di mana $\alpha = 0,05$, maka artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan pada keseluruhan kelompok. Dari hasil uji analisis LSD diketahui bahwa kelompok II berbeda secara bermakna dengan kelompok IV dan kelompok V begitu juga sebaliknya, tetapi menjadi tidak bermakna jika dibandingkan

dengan kelompok I dan III. Kelompok I dan kelompok III tidak berbeda secara bermakna jika dibandingkan dengan kelompok II, kelompok IV atau kelompok VII, kelompok IV atau kelompok V.

Keseimbangan antara sitokin yang dikeluarkan oleh Th1 seperti TNF- α dan IFN- γ serta sitokin yang dikeluarkan oleh Th2 seperti IL-4 dan IL-10 dapat menentukan berat ringannya malaria *falciparum*. Respon imun terhadap malaria, terutama yang melibatkan sitokin harus teregulasi dengan baik karena menentukan hidup matinya seorang penderita malaria berat. TNF- α merupakan sitokin pro-inflamasi utama dalam innate immunity (imunitas alamiah) yang berperan dalam kerusakan jaringan/ organ bila diproduksi dalam kadar yang tinggi. IFN- γ , suatu sitokin pro-inflamasi lain yang mengaktifasi makrofag dan memiliki fungsi sangat penting dalam imunitas alamiah dan adaptif terhadap mikroba intraseluler (termasuk Plasmodium), diduga memegang peran sentral dalam pengaturan respon imun terhadap malaria karena mengaktifasi makrofag memproduksi TNF- α dan juga IL-10. IL-10 adalah sitokin anti-inflamasi utama dalam respon imun alamiah dan adaptif yang berperan menghentikan respon imun/ inflamasi yang berlebihan melalui inaktivasi makrofag dan sel T. Ketiga sitokin ini merupakan mediator inflamasi lokal dan sistemik dan dapat diproduksi dalam jumlah besar sehingga mudah terdeteksi dalam serum (Abbas *et al.*, 2007). Saat peningkatan dan penurunan kadar sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi, kadar absolut sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi, keseimbangan kadar sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi akan mempengaruhi manifestasi klinis penderita malaria berat. Dari uraian di atas didapatkan bahwa sitokin pro-inflamasi dan sitokin anti-inflamasi berperan dalam eliminasi parasit namun sebaliknya juga menimbulkan proses patologis pada manusia dengan manifestasi malaria berat.

Hal ini sesuai dengan hasil penelitian yang menunjukkan bahwa pada kelompok yang tidak diterapi, menunjukkan kadar IL-10 paling tinggi sebagai upaya untuk menghambat aktivitas antigen malaria. Tubuh merespon terhadap infeksi malaria dengan cara mengeluarkan sitokin pro-inflamasi seperti IL-10, dan akibat adanya imunomodulasi yang telah dilakukan sebelumnya, mengakibatkan kadar IL-10 ini meningkat sebagai upaya mengeliminasi antigen malaria. Berbeda halnya dengan kelompok yang mendapatkan terapi bangle dan artemisinin yang hasil ELISA menunjukkan kadar IL-10 tidak ada atau nol, pada hari ke-7 terapi, meskipun telah di

stimulasi sebelumnya seperti kelompok lain, karena antigen malaria telah di eliminasi oleh pengobatan standart yaitu artemisinin yang dikombinasi dengan bangle. Hasil yang serupa pada kelompok yang hanya diterapi bangle saja atau artemisinin saja, meskipun kedua kelompok ini juga telah distimulasi sebelumnya, tetapi parasit malaria telah di eliminasi oleh obat standart ataupun bangle, sehingga kadar IL-10 tidak begitu tinggi terdeteksi dalam darah.

Berdasarkan hasil penelitian, terdapat perbedaan ekspresi gen ICAM-1 yang signifikan antara kelompok yang mendapat terapi standart artemisinin dikombinasi dengan fraksi ekstrak Bangle dibanding dengan kelompok tanpa terapi dan kelompok dengan pemberian Bangle saja. Terapi kombinasi ini juga memberikan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan terapi artemisinin secara tunggal (walaupun dengan perbedaan yang tidak signifikan).

Ekspresi ICAM-1 inilah yang berperan dalam proses *cytoadherence* dan *rosetting* pada infeksi malaria. *Cytoadherence* dan *rosetting* pada akhirnya akan menimbulkan sumbatan pembuluh darah kapiler/ venula yang menyebabkan kerusakan pada organ-organ yang divaskularisasi (Biggs dan Brown, 2001). Ekspresi ICAM-1 pada sel endotel akan meningkat dengan adanya sitokin proinflamasi *tumor necrosis factor- α* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), dan interferon- γ (IFN- γ) (Ho dan White, 1999).

Pada terapi yang menggunakan ekstrak Bangle ini, kerja sitokin-sitokin proinflamasi ini dihambat oleh antiinflamasi yang dimiliki oleh Curcumin yang terkandung dalam Bangle. Dengan dihambatnya kerja TNF- α , IL-1, serta IFN- γ ini, maka ekspresi gen ICAM-1 juga dapat ditekan. Senyawa curcumin inilah yang dapat menurunkan INF γ dan peningkatan yang signifikan terhadap IL-10, sehingga antibodi terhadap parasit malaria dibentuk secara besar-besaran yang dapat melindungi dari serangan parasit malaria. Fraksi bangle yang diberikan dapat merangsang pembentukan immunomodulator, yang diharapkan nantinya akan meningkatkan antibodi IL-10. Oleh karena itu, pemberian fraksi bangle sebagai terapi adjuvan bersama Artemisinin, dapat mencegah komplikasi malaria, salah satunya yaitu malaria serebral. Hal ini dapat dihubungkan bahwa terapi primer Artemisinin sebagai pembunuh parasit, sedangkan pemberian bangle sebagai perangsang pembentukan antibodi tubuh untuk meningkatkan perlindungan terhadap parasit. Hal tersebut diatas didukung oleh penelitian sebelumnya

yang menyatakan bahwa patogenesis dari malaria serebral adalah terjadinya peningkatan produksi proinflamasi sitokin dengan peningkatan regulasi molekul adhesi endotel. Curcumin memiliki aktivitas anti-inflamasi dan mengerahkan efek terapeutik dalam kasus malaria serebral dengan menghambat aktivasi NF-kB, diikuti oleh down regulasi produksi sitokin proinflamasi dan ekspresi molekul cytoadhesion di sel endotel (Padmanaban *et al.*,2012).

Pemberian fraksi metanol ekstrak Bangle pada kelompok IV dan kelompok V dapat menekan ekspresi gen ICAM-1. Pada kelompok II (kontrol negatif) ekspresi gen ICAM-1 terlihat sangat tinggi karena tidak ada terapi yang diberikan. Hal ini disebabkan karena reseptor ICAM-1 terdapat secara konstan pada membran sel leukosit dan endotel, meskipun dengan konsentrasi yang rendah (Ho dan White, 1999).

Dari penelitian diatas, dapat diambil kesimpulan bahwa pemberian Artemisinin dikombinasi fraksi metanol ekstrak Bangle dapat menghambat ekspresi gen ICAM-1 dan meningkatkan IL-10 pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA secara signifikan dan memberikan hasil yang lebih baik jika dibandingkan dengan diberikan Artemisinin atau fraksi metanol ekstrak Bangle secara tunggal. Hal ini membuktikan bahwa fraksi metanol ekstrak Bangle dapat menjadi pilihan yang tepat sebagai terapi komplementer pada malaria.