

Efek Kombinasi Ekstrak *Anamirta cocculus* dan Artemisin terhadap Penurunan Jumlah Sel Apoptosis Jaringan Paru Mencit Malaria

Loeki Enggar Fitri,¹ Dara Dasawulansari Syamsuri,² Dorta Simamora,³ Soemarko,⁴
Karyono Mintaroem⁵

¹Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, ²Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, ³Laboratorium Genetika Medik, Pusat Penelitian Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Wijaya Kusuma Surabaya, ⁴Laboratorium Ilmu Bedah Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya-RSSA Malang ⁵Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya-RSSA Malang

Abstrak

Plasmodium dalam eritrosit akan menginduksi respons imun, berupa produksi radikal bebas yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan paru. Kombinasi ekstrak *Anamirta cocculus* dan artemisin diharapkan dapat mencegah komplikasi akibat radikal bebas yang dihasilkan oleh sel imun maupun artemisin. Studi eksperimental dengan metode *post test control group design only* dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya periode Juni–Oktober 2010 untuk membuktikan efek pemberian kombinasi ekstrak *A. cocculus* dan artemisin terhadap jumlah sel apoptosis jaringan paru mencit galur Balb/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Mencit dibagi dalam 6 kelompok, kelompok 1 terdiri atas 9 ekor mencit normal, kelompok 2 mencit yang diinfeksi *P. berghei* tanpa terapi, kelompok 3 mencit yang diinfeksi *P. berghei* dan diterapi artemisin dosis 0,04 mg/gBB, serta 3 kelompok perlakuan mencit diinfeksi *P. berghei* dan diterapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dengan ekstrak *A. cocculus* 0,01 mg/gBB; 0,1 mg/gBB; dan 1 mg/gBB. Sel apoptosis dihitung dari ekspresi *caspase-3* pada pewarnaan imunohistokimia. Pemberian ekstrak *A. cocculus* dosis 0,01 mg/gBB; 0,1 mg/gBB; dan 1 mg/gBB serta artemisin selama 3 hari menurunkan jumlah sel apoptosis secara signifikan dibandingkan dengan kelompok artemisin monoterapi ($p=0,00$; 0,026; 0,000). Hubungan lama terapi dengan ekspresi *caspase-3* menunjukkan pada kelompok terapi kombinasi ekstrak *A. cocculus* 0,01 mg/gBB dan artemisin 0,04 mg/gBB memiliki korelasi positif yang signifikan ($p=0,013$). Simpulan, terapi jangka pendek kombinasi ekstrak *A. cocculus* dan artemisin mempunyai efek yang lebih baik dibandingkan dengan pemberian artemisin monoterapi dalam hal penurunan jumlah sel apoptosis jaringan paru. [MKB. 2013;45(2):69–77]

Kata kunci: *Anamirta cocculus*, apoptosis sel paru, artemisin, *caspase-3*, malaria

The Effect of Anamirta cocculus Extract and Artemisin Combination in Decreasing Number of Apoptotic Lung Cells of Malaria Infected Mice

Abstract

The presence of Plasmodium in erythrocytes will induce immune responses, including the production of free radicals which can lead to lung tissue cells damage. Combination therapy of Anamirta cocculus extract and artemisin is expected to prevent complications caused by free radicals produced by immune cells and artemisin. This experimental study which using post test control group design only was done in Laboratory of Parasitology and Biomedic Faculty of Medicine, Brawijaya University on June–October 2010 to prove the effect of combination therapy of A. cocculus extract and artemisin towards the number of apoptotic lung tissue cells of Balb/C mice infected by Plasmodium berghei. Mice were divided into 6 groups, the first normal Balb/C mice, the second mice infected by P. berghei without treatment, the third mice infected by P. berghei and treated with artemisin 0.04 mg/g BW, and 3 combination contains mice infected by P. berghei and treated with a combination of artemisin 0.04 mg/gBW and A.cocculus extract 0.01 mg/gBW, 0.1 mg/gBW, 1 mg/ gBW respectively. The apoptotic cells of lung tissue were counted from the expression of caspase-3 in immunohistochemical staining. In day 3 combination A. cocculus extract dose 0.01 mg/gBW, 0.1 mg/gBW, 1 mg/ gBW and artemisin reduced the number of apoptotic cells significantly compared to the artemisin monotherapy ($p=0.00$, 0.026, 0.000). There was a positive correlation between the length of treatment and the expression of caspase-3 ($p=0.013$) on group that treated with combination of A. cocculus extract 0.01 mg/gBW and artemisin 0.04 mg/gBB. In conclusion, the short treatment of combination A. cocculus extract and artemisin has a better effect than artemisin monotherapy in decreasing number of apoptotic lung tissue cells. [MKB. 2013;45(2):69–77]

Key words: Anamirta cocculus, artemisinin, caspase 3, lung apoptotic cell, malaria

Korespondensi: Dr. Loeki Enggar Fitri, dr., Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, Jl. Veteran Malang, mobile 08125285531 e-mail loekif@yahoo.com

Pendahuluan

Dimulai dari tahun 1970-an, penelitian malaria beralih ke obat artemisinin, obat antimalaria baru. Obat yang diperoleh dari tanaman *Artemisia annua* ternyata telah berabad-abad lamanya dipakai sebagai pengobatan tradisional di Cina terhadap demam dan malaria.¹ Sejak tahun 2004, *World Health Organization* (WHO) merekomendasikan terapi kombinasi *artemisinin-based combination therapy* atau ACT untuk pengobatan malaria di daerah endemis.

Ada beberapa teori tentang mekanisme kerja antiplasmodial artemisin berdasarkan atas struktur trioksan.^{1,2-4} Salah satu teori menjelaskan bahwa bioaktivasi^{1,2-4} trioksan pada artemisin ini dipicu oleh Fe^{2+} sehingga dapat menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas ini kemudian mengikat dan menghambat kerja beberapa biomolekul parasit yang dapat mengakibatkan parasit mati.² Radikal bebas merupakan molekul yang reaktif dan dapat bereaksi dengan protein, asam nukleat, lipid, molekul lain, serta dapat mengubah struktur dan menimbulkan kerusakan jaringan, terutama sel endotel. Jika hal ini terjadi pada endotel paru dapat menyebabkan gejala edema paru yang merupakan salah satu komplikasi penyakit malaria.

Penelitian sebelumnya sudah membuktikan bahwa apoptosis pada sel endotel yang diinduksi eritrosit terinfeksi parasit dimediasi oleh stres oksidatif. Hambatan sintesis *nitric oxide* (NO) dan pemberian *superoxide dismutase mimetic* yaitu *manganese [III] tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin* (MnTBAP) melindungi sel endotel paru manusia terhadap apoptosis yang diinduksi oleh eritrosit terinfeksi parasit.³ Apoptosis pada sel endotel tidak hanya disebabkan oleh perlekatan eritrosit terinfeksi *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) tetapi juga disebabkan oleh produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan sekresi enzim proteolitik dari neutrofil.⁴ Berdasarkan fakta di atas, maka diperlukan suatu cara untuk mengatasi timbulnya radikal bebas akibat parasit malaria maupun akibat obat yang digunakan dalam terapi malaria. Hal yang dapat dilakukan antara lain dengan terapi antioksidan.

Tali kuning atau kayu kuning (*Anamirta cocculus*) adalah salah satu tumbuhan yang banyak ditemukan di Irian Jaya. Batang dan akar *Anamirta cocculus* ternyata mengandung alkaloid kuartener, seperti berberin, palmatin, magnoflorin, dan juga *columbamine*. Alkaloid kuartener ini mempunyai khasiat sebagai antimalaria dan juga antioksidan.^{5,6} Antioksidan mampu menangkap radikal bebas yang timbul dalam proses penyakit malaria. Atas dasar konsep tersebut, efek antioksidan berberin yang terdapat dalam tanaman *Anamirta cocculus*, diperkirakan dapat mencegah komplikasi pada

penyakit malaria, termasuk kerusakan jaringan paru. Penelitian ini dilakukan untuk mendapatkan alternatif pengobatan dalam penanganan penyakit malaria khususnya komplikasi pada organ paru.

Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan efek pemberian kombinasi ekstrak *A. cocculus* dengan artemisin terhadap penurunan jumlah sel apoptosis jaringan paru mencit galur Balb/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei* (*P. berghei*). *Plasmodium berghei* memiliki galur atau susunan kromosom yang berdekatan dengan *Plasmodium falciparum* sehingga dapat dipergunakan sebagai parasit hewan coba yang dianalogkan dengan infeksi *Plasmodium falciparum* pada manusia.⁷

Metode

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan menggunakan metode *post test control group design only* dan dilakukan di Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Juni–Oktober 2010. Sebanyak lima puluh empat ekor mencit jantan galur Balb/C, berumur 8–12 minggu, bobot 28–32 gram, sehat dan belum mengalami perlakuan apapun, dibagi menjadi enam kelompok, masing-masing terdiri atas 9 ekor mencit. Kelompok pertama terdiri atas mencit Balb/C yang tidak mendapat perlakuan apapun (normal) dan dijadikan kelompok kontrol negatif. Kelompok 2 terdiri atas mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa terapi (kontrol positif), dan kelompok 3 terdiri atas mencit yang diinfeksi *P. berghei* dan diterapi artemisin dosis 0,04 mg/gBB. Kelompok 4, 5 dan 6, masing-masing terdiri atas mencit yang diinfeksi *P. berghei* kemudian diterapi artemisin 0,04 mg/gBB yang dikombinasi dengan ekstrak *A. cocculus* 0,01 mg/gBB; 0,1 mg/gBB; dan 1 mg/gBB, secara per oral sampai hari ke-7. Data diambil pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 setelah pemberian terapi *Plasmodium berghei* didapatkan dari Laboratorium Sentral Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Inokulasi diberikan secara intraperitoneal (i.p.) sebanyak 107 parasit dalam 0,2 mL darah untuk tiap mencit. Setiap hari derajat parasitemia mencit diukur melalui pemeriksaan hapusan darah tipis. Setelah derajat parasitemia mencapai kurang lebih 10% dan telah timbul gejala klinis malaria, saat ini merupakan awal pemberian artemisin atau ekstrak *A. cocculus*. Artemisin yang diberikan diperoleh dari Departemen Kesehatan Jakarta sebagai bentuk tablet yang mengandung 50 mg artesunat/tablet. Artemisin diberikan secara per oral dengan menggunakan sonde selama 7 hari. Dosis yang digunakan 0,04 mg/gBB. Tablet artesunat yang telah ditimbang, digerus dengan mortar, kemudian

diencerkan menggunakan campuran akuades dan *carboxy-methyl-cellulose* (CMC) Na dan diaduk menggunakan vorteks.

Anamirta cocculus yang dipergunakan adalah bagian batang dan didapatkan dari daerah Papua. Pembuatan ekstrak ini mempergunakan etanol 80% yang kemudian diekstrak dengan metode maserasi di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sepuluh bagian simplisia serbuk batang Tali kuning (*A. cocculus*) dimasukkan ke dalam bejana, dituangi dengan 90 bagian cairan penyari (etanol 80%), ditutup dan dibiarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sesekali diaduk. Setelah 5 hari campuran tersebut disaring, sedangkan ampasnya dicuci dengan etanol 80% secukupnya sehingga diperoleh 100 bagian. Maserat dipindah dalam bejana tertutup dan dibiarkan di tempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Maserat disaring kemudian diuapkan pada tekanan yang rendah pada suhu tidak lebih dari 50 °C. Ekstrak dimasukkan dalam oven pada suhu 50 °C sampai didapat ekstrak kental. Ekstrak kental ini dianggap konsentrasi 100%. Ekstrak *A. cocculus* diencerkan dengan *carboxy-methyl-cellulose* (CMC) Na dan akuades. Ekstrak *A. cocculus* diberikan dalam dosis 0,01 mg/gBB; 0,1 mg/gBB; dan 1 mg/gBB serta dikombinasikan dengan larutan artemisin 0,04 mg/gBB. Campuran ini diberikan berturut-turut selama 7 (tujuh) hari per oral melalui sonde. Dosis ekstrak *A. cocculus* ditentukan atas dasar kandungan alkaloid (berberin) yang ada pada tumbuhan *A. cocculus*.

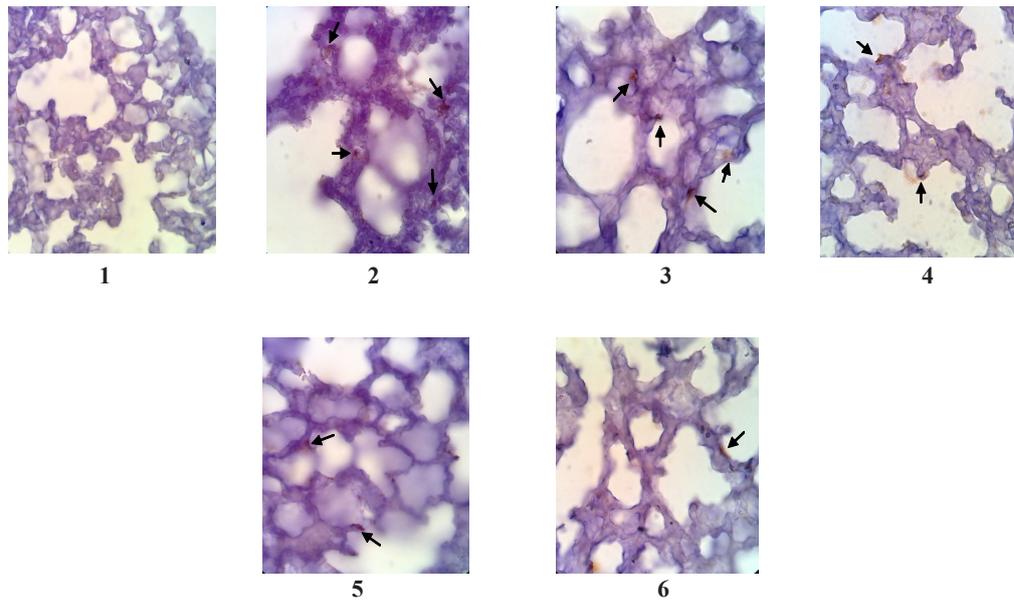
Setiap waktu pemeriksaan (hari ke-3, 5, dan 7) secara acak diambil 3 mencit dari tiap kelompok. Mencit-mencit tersebut dimatikan dengan narkose mempergunakan kloroform. Mencit diletakkan dengan posisi terlentang, kulit dibersihkan dengan alkohol 70%. Mencit dibedah dan diambil organ parunya. Organ paru dimasukkan ke dalam tabung plastik yang telah berisi formalin 10%. Organ paru yang telah difiksasi formalin 10% dibuat sediaan blok parafin di Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang, setelah itu *slide* siap dilakukan pengecatan imunohistokimia. Apoptosis jaringan paru dihitung dengan metode imunohistokimia mempergunakan antibodi monoklonal terhadap *caspase-3* (*anti rabbit caspase-3*) dari pabrik Bio Vision dengan katalog nomor 3015-100. Secara ringkas prosedur dari imunohistokimia sebagai berikut: *slide* preparat paru dicuci dengan *phosphate buffer solution* (PBS) pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan tisu. Kemudian *slide* diberi H₂O₂ 3% dalam metanol selama 20 menit lalu dibuang. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan tisu. Dilakukan

blocking slide menggunakan *fetal bovine serum* (FBS) 5% dan triton X-100 0,25% selama 60 menit pada temperatur ruangan. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan tisu. *Slide* diinkubasi dengan antibodi primer *caspase-3* (*caspase-3:FBS5%=1:100*, menggunakan vorteks) dalam *chamber* (permukaan rata dan suasana lembab dengan menggunakan tisu dan akuades) selama semalam yaitu pada 4 °C. *Slide* dikeluarkan dari *chamber* dan dikeringkan embunnya dengan tisu. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali, setelah itu ditetesi dengan antibodi sekunder berlabel biotin (Santa Cruz). *Slide* diinkubasi selama 1 jam dalam suhu ruangan kemudian dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan tisu. *Slide* ditetesi dengan *streptavidin horse radis peroxidase* (SA-HRP) selama 40 menit di *chamber*. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali dan dikeringkan dengan tisu. *Slide* ditetesi kromogen *diamono benzidine* (DAB) yang telah didilusi bufer DAB (1:50) selama 20 menit pada suhu ruangan. *Slide* dicuci dengan PBS pH 7,4 selama 5 menit sebanyak tiga kali kemudian dibilas dengan akuades sebanyak 3 kali. *Slide* diwarnai *counterstaining* dengan *Meyer hematoxylin* (*Meyer:tap water=1:25*) selama 10 menit pada suhu ruangan kemudian dicuci dengan *tap water* sebanyak 3 kali dan dikeringkan dengan tisu. Terakhir *slide* di-*mounting* menggunakan entelan serta ditutup dengan *cover glass*.

Preparat yang telah dicat lalu diamati secara mikroskopis mempergunakan mikroskop cahaya dengan perbesaran 1.000x dan dihitung jumlah sel rata-rata yang mengekspresikan apoptosis per lapangan pandang sebanyak 20 lapangan pandang secara semikuantitatif. Pemeriksaan mikroskopis ini bertujuan untuk menghitung jumlah ekspresi *caspase-3* pada jaringan paru mencit, yaitu pada epitel sel dinding alveolus. Sitoplasma sel yang telah terekspresi *caspase-3* akan berwarna coklat. Pengamatan ekspresi *caspase-3* dilakukan terhadap total sel pada setiap lapang pandang dan sel yang berwarna dihitung rasionya atau persentasenya terhadap total sel.

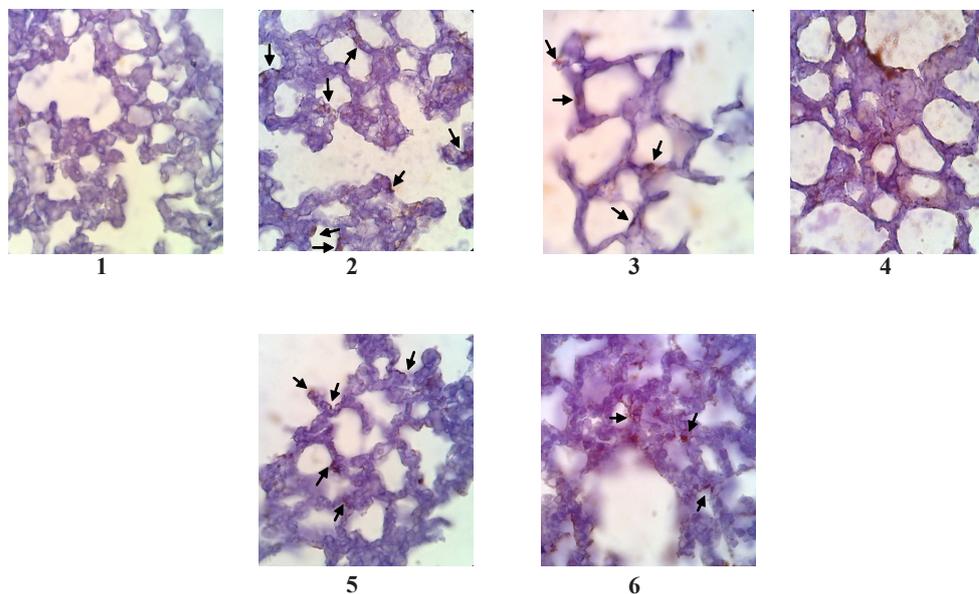
Hasil

Preparat yang tercatat diamati secara mikroskopis dalam 20 lapang pandang. Ekspresi *caspase-3* pada epitel dinding alveolus dihitung jumlahnya secara semikuantitatif. Sel yang mengekspresikan *caspase-3* akan memperlihatkan warna coklat. Untuk menghindari pengulangan pengamatan, dilakukan pengamatan dengan metode ular dan *hand counter*.



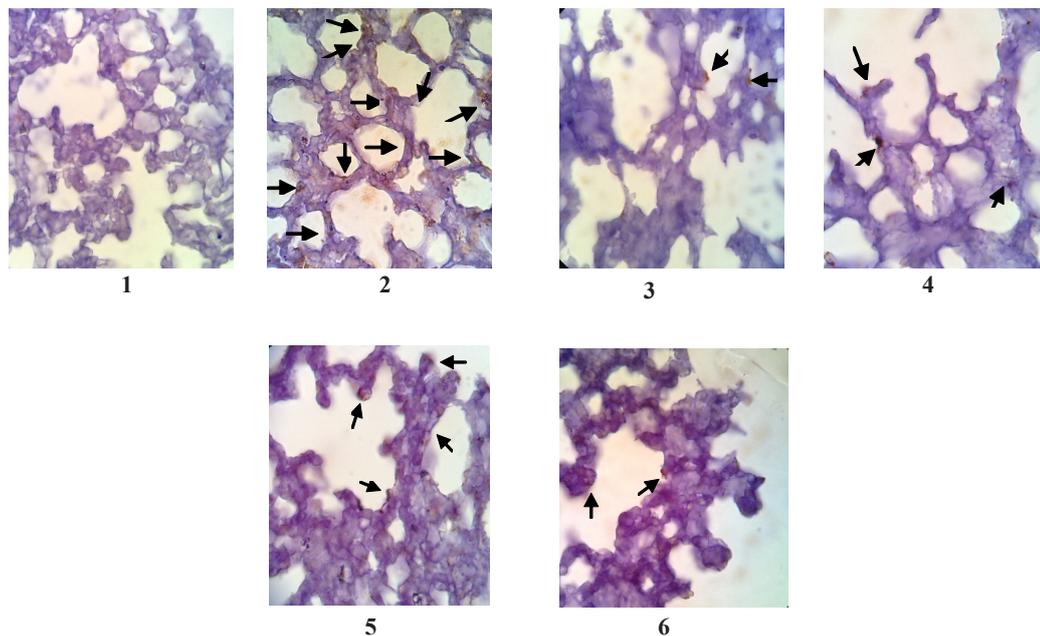
Gambar 1 Gambaran Sel Jaringan Paru yang Mengekspresi *Caspase-3* pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan pada Hari ke-3 (Tanda Panah/Warna Coklat) (Mikroskop Binokuler Olympus, 1.000x)

Keterangan: (1) Kelompok kontrol negatif (2) Kelompok kontrol positif (3) Kelompok terapi artemisin 0,04 mg/gBB (4) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 0,01 mg/gBB (5) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 0,1 mg/gBB (6) Kelompok dengan terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 1 mg/gBB



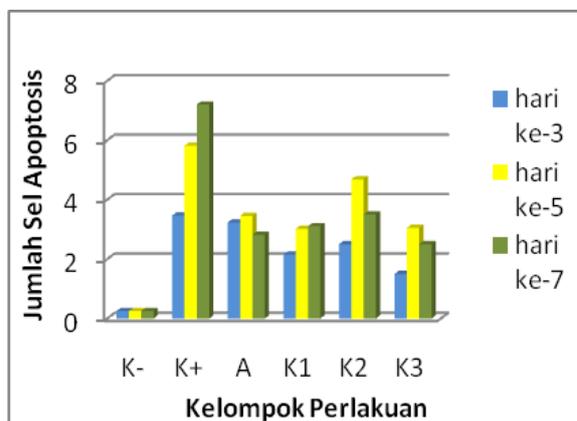
Gambar 2 Gambaran Sel Jaringan Paru yang Mengekspresi *Caspase-3* pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan pada Hari ke-5 (Tanda Panah/Warna Coklat) (Mikroskop Binokuler Olympus, 1.000x)

Keterangan: (1) Kelompok kontrol negatif (2) Kelompok kontrol positif (3) Kelompok terapi artemisin 0,04 mg/gBB (4) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 0,01 mg/gBB (5) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 0,1 mg/gBB (6) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 1 mg/gBB



Gambar 3 Gambaran Sel Jaringan Paru yang Mengekspresi *Caspase-3* pada Kelompok Kontrol dan Perlakuan pada Hari ke-7 (Tanda Panah/Warna Coklat) (Mikroskop Binokuler Olympus, 1.000x)

Keterangan: (1) Kelompok kontrol negatif (2) Kelompok kontrol positif. (3) Kelompok dengan artemisin 0,04 mg/gBB (4) Kelompok dengan terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 0,01 mg/gBB (5) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 0,1 mg/gBB (6) Kelompok terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *Anamirta cocculus* 1 mg/gBB



Gambar 4 Grafik Jumlah Sel Apoptosis Rata-rata berdasarkan Kelompok Perlakuan

Keterangan: K- =kontrol negatif (mencit normal), K+= kontrol positif (mencit malaria tanpa terapi), A=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB, K1=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB+ *Anamirta cocculus* 0,01 mg/gBB, K2=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB+*Anamirta cocculus* 0,1 mg/gBB, K3=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB+*Anamirta cocculus* 1 mg/gBB

Jumlah sel apoptosis terendah pada kelompok kontrol negatif dan tertinggi adalah pada kontrol positif pada hari ke-7 (Gambar 4). Pada kelompok kontrol positif, peningkatan jumlah sel apoptosis berbanding lurus dengan lamanya terapi. Pada kelompok artemisin serta kelompok kombinasi 2 dan 3, terjadi peningkatan jumlah sel apoptosis pada hari ke-5 dilanjutkan penurunan pada hari ke-7. Pada kombinasi 1 (terapi kombinasi artemisin 0,04 mg/gBB dan *A. cocculus* 0,01 mg/gBB) terjadi peningkatan jumlah sel apoptosis seiring lama perlakuan. Kelompok kombinasi 3 memiliki jumlah sel apoptosis yang lebih rendah dibandingkan dengan kelompok terapi artemisin tunggal.

Hasil uji *one way analysis of variance* (ANOVA) diperoleh $p=0,000$, artinya paling tidak terdapat perbedaan jumlah sel apoptosis secara bermakna antar kelompok. Untuk mengetahui pengaruh peningkatan dosis terhadap penurunan jumlah sel apoptosis, kelompok perlakuan saling diperbandingkan dalam dosis yang berbeda pada hari yang sama menggunakan uji *Tukey's honestly significant difference* (HSD).

Pada hari ke-3 didapatkan bahwa pemberian kombinasi ekstrak batang *A. cocculus* dosis 1,

Tabel 1 Hasil Signifikasi Uji Tukey HSD

Kelompok Perlakuan	Kelompok Pemanding	p		
		Hari ke-3	Hari ke-5	Hari ke-7
K -	K+	0,000*	0,000*	0,000*
	A	0,000*	0,000*	0,000*
	K1	0,000*	0,000*	0,000*
	K2	0,000*	0,000*	0,000*
	K3	0,000*	0,000*	0,000*
K+	A	0,832	0,001*	0,000*
	K1	0,000*	0,000*	0,000*
	K2	0,004*	0,099	0,000*
	K3	0,000*	0,000*	0,000*
A	K1	0,001*	0,862	0,207
	K2	0,026*	0,065	0,001*
	K3	0,000*	0,896	0,133
K1	K2	0,506	0,010*	0,040*
	K3	0,053	1,000	0,000*
K2	K3	0,003*	0,011*	0,000*

Keterangan: *Perbedaan signifikan pada level 0,05, K -=kontrol negatif (mencit normal), K += kontrol positif (mencit malaria tanpa terapi), A=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB, K 1=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB+*Anamirta cocculus* 0,01 mg/gBB, K 2=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB+*Anamirta cocculus* 0,1 mg/gBB, K 3=mencit malaria+artemisin 0,04 mg/gBB+*Anamirta cocculus* 1 mg/gBB

2 dan 3, serta artemisin menurunkan jumlah sel apoptosis secara signifikan dibandingkan dengan kelompok artemisin monoterapi ($p=0,00$; $0,026$; $0,000$). Perbedaan yang tidak bermakna terjadi pada hari ke-5. Pada hari ke-7, perbandingan kelompok artemisin dengan kelompok terapi kombinasi 1 dan 3 tidak didapatkan perbedaan yang bermakna. Pada hari ke-5 dan ke-7, jumlah sel apoptosis lebih tinggi pada kelompok terapi kombinasi 2 bila dibandingkan dengan kelompok terapi artemisin. Perbandingan kelompok terapi artemisin dengan kelompok terapi kombinasi 2 pada hari ke-7 mempunyai perbedaan yang bermakna.

Uji Korelasi Pearson untuk melihat kekuatan hubungan peningkatan dosis ekstrak *A. cocculus* dengan jumlah ekspresi *caspase-3* mendapatkan nilai $p>0,05$ dengan nilai $r=-0,573$ pada hari ke-3; $r=0,016$ pada hari ke-5; dan $r=-0,560$ pada hari ke-7. Hal ini membuktikan bahwa walaupun terdapat hubungan terbalik (negatif) antara dosis ekstrak dan jumlah sel yang apoptosis pada hari ke-3 dan ke-7, namun hubungan tersebut tidak bermakna. Uji Korelasi Pearson untuk melihat kekuatan hubungan lama terapi dengan jumlah ekspresi *caspase-3* mendapatkan nilai p sebesar $0,013$ pada K1, $0,250$ pada K2, dan $0,073$ pada K3. Hal ini menunjukkan hanya pada kelompok

terapi kombinasi 1 mempunyai korelasi positif antara lama terapi dan jumlah sel apoptosis. Nilai Korelasi Pearson kelompok terapi kombinasi 1 adalah $>0,5$ ($r=0,779$) menunjukkan korelasi yang cukup kuat antara lama terapi dan jumlah sel apoptosis. Pada kelompok kombinasi 1, semakin lama terapi, maka semakin banyak jumlah sel apoptosis.

Pembahasan

Penelitian bertujuan untuk mengetahui penurunan jumlah sel apoptosis jaringan paru pada mencit galur Balb/C yang diinfeksi *P. berghei* dan diterapi kombinasi ekstrak *A. cocculus* dengan artemisin. *Plasmodium berghei* dipergunakan karena merupakan bentuk infeksi pada mamalia selain manusia dan analog dengan *P. falciparum*. Mencit Balb/C dipakai untuk penelitian malaria karena tahan lama terhadap *P. berghei*, mudah diternakkan, dan mudah didapat.⁷

Tali kuning atau kayu kuning (*Anamirta cocculus*) merupakan tanaman kayu merambat dan tersebar di India, Sri Langka, Thailand, Indonesia (Irian Jaya, Jawa, Kalimantan, Sumatera), dan Filipina.⁸ Pada penelitian ini, digunakan batang *A. cocculus* karena mengandung alkaloid kuartener,

yaitu berberin, palmatin, magnoflorin, serta *columbamine*. Keempat alkaloid ini mempunyai khasiat sebagai antimalaria dan antioksidan.^{5,6}

Apoptosis adalah kematian sel yang fisiologis.⁹ Stres oksidatif dan apoptosis berperan dalam proses patologi pada infeksi malaria, termasuk patologi pada paru.¹⁰ Jumlah sel apoptosis dihitung dari sel yang mengekspresi *caspase-3*, yaitu salah satu mediator dalam jalur apoptosis. Semakin banyak jumlah *caspase-3* yang terekspresi, menunjukkan jumlah sel apoptosis yang lebih banyak pula.¹¹ Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa jumlah sel apoptosis rata-rata terendah tampak pada kelompok kontrol negatif. Hal ini karena kelompok ini tidak diinfeksi *P. berghei* sehingga apoptosis terjadi secara normal. Jumlah sel yang mengalami apoptosis dapat meningkat karena eritrosit terinfeksi malaria yang mengalami sekuestrasi dan juga menghasilkan radikal bebas. Radikal bebas mampu menyebabkan kerusakan sel, mengurangi kemampuan adaptasi sel, bahkan kematian sel (apoptosis).^{3,12} Apoptosis akibat radikal bebas disebut apoptosis intrinsik dengan mekanisme regulasi melalui jalur mitokondria.¹³

Kelompok kontrol positif memiliki jumlah sel apoptosis rata-rata yang paling tinggi bila dibandingkan dengan kelompok lain. Kelompok ini diinfeksi *P. berghei* dan tidak diberi terapi. Semakin lama mencit itu terinfeksi Plasmodium, jumlah Plasmodium semakin meningkat, dan semakin banyak pula jumlah radikal bebas yang dihasilkan. Selama infeksi malaria, penderita dan parasit dalam keadaan stres oksidatif akibat peningkatan produksi ROS oleh neutrofil *hospes* yang teraktivasi dan degranulasi hemoglobin dalam *food vacuola* parasit. Produksi ROS ini secara langsung ditujukan untuk dapat membunuh parasit intraeritrositik, namun pada produksi ROS yang berlebihan akan merusak jaringan/organ *hospes*.¹⁴

Pada kelompok terapi artemisin, penurunan jumlah sel-sel apoptosis rata-rata tidak seiring dengan lama pemberian terapi. Hal ini diduga karena artemisin mempunyai kelemahan, yaitu memerlukan waktu yang lama untuk pengobatan apabila dipergunakan secara monoterapi. Hal ini dibuktikan dengan tingginya jumlah sel apoptosis rata-rata pada hari ke-3 dilanjutkan peningkatan pada hari ke-5. Keadaan ini disebabkan karena pada saat itu Plasmodium masih hidup, berarti mekanisme artemisin membunuh Plasmodium melalui pembentukan radikal bebas yang sedang berlangsung dan radikal bebas meningkatkan jumlah sel apoptosis. Jumlah sel apoptosis rata-rata semakin menurun pada hari ke-7, oleh karena Plasmodium yang ada semakin sedikit, sehingga radikal bebas yang terbentuk semakin berkurang dan juga jumlah sel apoptosis semakin menurun.

Radikal bebas secara alami juga dihasilkan oleh sistem imun tubuh sebagai respons perlindungan tubuh untuk mengeliminasi parasit penyebab malaria.

Artemisin merupakan senyawa seskuipterpen laktone yang diekstrak dari tanaman *Artemisia annua*. Artemisin tersebut mempunyai jembatan endoperoksida, karena *heme* intraparasit dalam eritrosit akan mengkatalis pemutusan jembatan peroksida pada artemisin, sehingga menghasilkan radikal bebas berinti karbon yang ternyata sangat reaktif. Radikal artemisin ini menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam parasit yang dapat mengakibatkan parasit tersebut mati.² Seiring dengan lama pemberian terapi, maka jumlah parasit malaria yang mati semakin banyak dan jumlah radikal bebas yang terbentuk akan semakin sedikit.

Pada kelompok terapi kombinasi 1, didapatkan peningkatan jumlah sel apoptosis seiring dengan lama pemberian terapi. Hal ini diduga karena pada dosis tersebut, *A. cocculus* justru menghambat aktivitas artemisin. Selain itu, bentuk ekstrak kasar (*crude extract*) pada penelitian ini juga sangat berpengaruh pada efek antimalaria yang ditimbulkan, karena pada ekstrak kasar (*crude extract*) terdapat banyak kandungan senyawa aktif yang diduga memengaruhi kerja senyawa antimalaria, salah satunya kerja artemisin.¹⁵

Anamirta cocculus mempunyai kandungan senyawa alkaloid kuartener, yaitu berberin, palmatin, magnoflorin, dan juga *columbamine*. Keempat senyawa ini merupakan struktur senyawa yang mengandung nitrogen kuartener yang telah diketahui mampu memengaruhi pertumbuhan Plasmodium dengan cara menghambat transpor intraselular kolin. Senyawa kolin itu diperlukan untuk biosintesis fosfolipid dalam pembentukan membran parasit untuk menutup *parasitophorous vacuole*, sitosol, serta berbagai kompartemen subselular.⁵ *Anamirta cocculus* juga memiliki efek antioksidan. Kandungan senyawa antioksidan pada ekstrak *A. cocculus* akan menghambat kerja artemisin dengan cara meredam radikal bebas yang terbentuk, sehingga hal ini akan menguntungkan Plasmodium untuk tetap hidup.⁶

Pada kelompok terapi kombinasi 2 dan 3, mempunyai bentuk grafik yang sama dengan terapi artemisin monoterapi, yaitu jumlah sel apoptosis rata-rata yang semakin meningkat pada hari ke-5 dan menurun pada hari ke-7 (Gambar 4). Hal ini diduga karena kerja *A. cocculus* sebagai antimalaria dan antioksidan. Pada hari ke-3, ke-5 dan ke-7, artemisin dan *A. cocculus* berfungsi sebagai antimalaria. Artemisin tersebut menghasilkan radikal bebas untuk membunuh Plasmodium,² sedangkan *A. cocculus* memblokir transpor intraselular kolin sehingga membran

parasit tidak terbentuk dan Plasmodium mati.^{5,6} Dari penjelasan tersebut, radikal bebas tetap terbentuk dari mekanisme artemisin dan sistem imun tubuh melawan Plasmodium, sehingga sel apoptosis yang terbentuk juga tetap meningkat, sedangkan Plasmodium makin menurun. Pada hari ke-7, Plasmodium yang ada semakin sedikit, sehingga radikal bebas yang dihasilkan parasit semakin sedikit, jumlah sel apoptosis pun makin menurun.

Secara umum, hasil analisis *one-way* ANOVA pada kelompok terapi menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antar kelompok. Hasil analisis uji *post hoc* menunjukkan perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$), baik pada kelompok terapi artemisin, maupun kelompok terapi kombinasi 1, 2, dan 3, terhadap kontrol positif, kecuali pada perbandingan kelompok kontrol positif dengan kelompok terapi artemisin pada hari ke-3, dan kelompok kontrol positif dengan kelompok terapi kombinasi 2 pada hari ke-5. Perbedaan yang bermakna ini menunjukkan penurunan jumlah sel apoptosis yang signifikan pada mencit yang diberi terapi seiring dengan lama pemberian terapi.

Pada hari ke-3, jumlah sel apoptosis rata-rata pada kelompok kontrol positif tidak jauh berbeda dengan kelompok terapi artemisin. Diduga hal ini disebabkan oleh karena artemisin memerlukan waktu pengobatan lama apabila digunakan secara monoterapi, sehingga jumlah sel apoptosis tidak jauh berbeda. Pada hari ke-5, jumlah sel apoptosis rata-rata pada kelompok kontrol positif tidak jauh berbeda dengan kelompok terapi kombinasi 2, yaitu kelompok kombinasi terapi artemisin 0,04 mg/gBB dan ekstrak *A. cocculus* 0,1 mg/gBB. Hal ini diduga disebabkan kerja *A. cocculus* sebagai antioksidan belum efektif sehingga radikal bebas masih terbentuk dan jumlah sel apoptosis masih meningkat, tidak jauh berbeda dengan kontrol positif.

Dari hasil analisis statistik, terdapat perbedaan bermakna pada hari ke-3 antara kelompok terapi artemisin dan kelompok kombinasi 1, 2, dan 3. Kelompok kombinasi 1, 2, dan 3 memiliki jumlah sel apoptosis rata-rata yang lebih rendah daripada kelompok terapi artemisin. Hal ini diduga karena efek *A. cocculus* sebagai antioksidan, sehingga radikal bebas yang terbentuk semakin sedikit, begitu pula jumlah sel apoptosis. Jumlah sel apoptosis rata-rata hari ke-5 pada kelompok terapi artemisin tidak jauh berbeda dengan kelompok kombinasi 1, 2, dan 3. Hal ini dibuktikan dengan analisis statistik yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan bermakna. Diduga hal ini disebabkan karena Plasmodium itu masih hidup sehingga apoptosis sel masih terbentuk.

Perbedaan tidak bermakna juga ditemukan pada perbandingan kelompok terapi artemisin

dengan kelompok kombinasi 1 dan 3 pada hari ke-7, sedangkan pada kelompok kombinasi 2 didapatkan perbedaan bermakna yaitu jumlah sel apoptosis lebih tinggi pada kelompok terapi kombinasi 2 bila dibandingkan dengan kelompok terapi artemisin. Hal ini diduga, pertama karena ekstrak batang *A. cocculus* yang dipakai pada penelitian ini merupakan ekstrak kasar (*crude extract*) sehingga menyebabkan tidak spesifiknya aktivitas biologis senyawa antimalaria yang terdapat pada batang tanaman tersebut akibat pengaruh senyawa aktif lain yang terkandung dalam ekstrak kasar.¹⁴ Kedua, pada hari ke-5 dan ke-7 lama paparan terapi membuat antioksidan yang ada pada ekstrak menjadi prooksidan.

Perbandingan kelompok terapi kombinasi 1 dengan kelompok terapi kombinasi 2 dan 3 pada hari ke-3 tidak didapatkan perbedaan bermakna. Perbandingan antara kelompok terapi kombinasi 1 dan kelompok terapi kombinasi 2 pada hari ke-5 dan ke-7 mempunyai perbedaan bermakna. Perbandingan antara kelompok terapi kombinasi 1 dengan kelompok terapi kombinasi 3 pada hari ke-5 tidak memiliki perbedaan yang bermakna, sedangkan pada hari ke-7 berbeda bermakna. Perbandingan antara kelompok terapi kombinasi 2 dengan kelompok terapi kombinasi 3 berbeda bermakna pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7. Dari perbandingan antar kelompok terapi kombinasi, didapatkan berbeda bermakna pada hari ke-7. Mekanisme yang diduga dapat menyebabkan hal tersebut karena ekstrak *A. cocculus* mengandung banyak senyawa aktif. Senyawa aktif ini diduga memengaruhi kerja senyawa antimalaria, salah satunya kerja artemisin.¹⁴

Hasil Uji Korelasi Pearson yang dilakukan untuk menentukan kekuatan hubungan dosis dengan jumlah ekspresi *caspase-3*, didapatkan nilai signifikansi $p > 0,05$ atau tidak bermakna walaupun nilai r menunjukkan hubungan yang terbalik (negatif) antara dosis ekstrak dan jumlah sel yang apoptosis pada hari ke-3 ($r = -0,573$) dan hari ke-7 ($r = -0,560$). Jumlah sel apoptosis tidak menurun seiring lama pemberian terapi bahkan dari Uji Korelasi Pearson untuk melihat kekuatan hubungan lama terapi dengan jumlah ekspresi *caspase-3*, pada kelompok terapi kombinasi 1 memiliki korelasi positif kuat antara lama terapi dan jumlah sel apoptosis. Simpulan, pemberian kombinasi artemisin serta ekstrak batang *A. cocculus* mempunyai efek yang lebih baik bila dibandingkan dengan artemisin monoterapi itu dalam penurunan jumlah sel apoptosis jaringan paru mencit hanya pada hari ke-3. Terdapat hubungan negatif yang tidak signifikan dosis ekstrak *A. cocculus* yang dikombinasikan dengan artemisin terhadap jumlah sel apoptosis jaringan paru mencit. Terdapat hubungan positif lama

pemberian terapi ekstrak *A. cocculus* dosis 0,01 mg/gBB yang dikombinasikan dengan artemisin terhadap jumlah sel apoptosis jaringan paru menciit, yang berarti makin lama paparan ekstrak *A. cocculus* akan mengakibatkan semakin banyak sel yang mengalami apoptosis.

Ucapan Terima Kasih

Ucapan terima kasih ditujukan pada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya (FKUB) yang telah memberikan dana penelitian DPP/SPP tahun 2010 melalui Unit Pengembangan Penelitian (UPP) FKUB untuk keterlaksanaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Hommel M. 2007. Artemisin: natural, sintetik, atau rekombinan [diunduh 6 September 2009]. Tersedia dari: http://id.shvoong.com/medicine-and-health/comparative-medicine/185802_2-artemisinin-natural-sintetik-atau-rekombinan/.
2. Golenser J, Waknine JH, Krugliak M, Hunt NH, Grau HE. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. *Int J Parasitol.* 2006;36(14):1427–41.
3. Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010(1):582–6.
4. Hemmer CJ, Lehr HA, Westphal K, Unvericht M, Kratzius M, Reisinger EC. *Plasmodium falciparum* malaria: reduction of endothelial cells apoptosis in vitro. *Infect Immunol.* 2005;73(3):1764–70.
5. Rosenthal PJ. Antimalarial drug discovery: old and new approaches. *J Exp Biol.* 2003;206(21):3735–44.
6. Satya V, Paridhavi M. Ethno-botanical, phytochemical and pharmacological review of *Anamirta cocculus* (Linn.). *Int J Rev Life Sci.* 2012;2(1):1–6.
7. Langhorne J, Quin SJ, Sanni LA. Mouse models of blood-stage malaria infections: immune responses and cytokines involved in protection and pathology. *Chem Immunol.* 2002;80:204–28.
8. Ayushveda. 2009. *Anamirta cocculus* [diunduh 11 September 2009]. Tersedia dari: <http://www.ayushveda.com/herbs/anamirta-cocculus.htm>.
9. Bjelaković G, Nagorni A, Bjelaković M, Stamenković I, Arsić R, Katić V. Apoptosis: programmed cell death and its clinical implications. *Facta Universitatis Series: Medicine and Biology.* 2005;12(1):6–11.
10. Guha M, Kumar S, Choubey V, Maity P, Bandyopadhyay U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *FASEB.* 2006;20(8):1224–6.
11. Khotakota S. 2004. The role of caspase-3 in apoptosis [diunduh 29 Oktober 2009]. Tersedia dari: <http://www.bioscience.org/news/scientis/caspase.htm>.
12. Fitri LE. Expression of inducible nitric oxide synthase, caspase-3 and production of reactive oxygen intermediate on endothelial cell culture (HUVECs) treated with *P. falciparum* infected erythrocytes and TNF- α . *Med J Indonesia.* 2006;15(3):151–6.
13. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ.* 2012;19(1):107–20.
14. Mohanty S, Patel DK, Pati SS, Mishra SK. Adjuvant therapy in cerebral malaria. *Indian J Med Res.* 2006;124(3):245–60.
15. Muti'ah R, Fitri LE, Winarsih S, Soemarmo, Simamora D. Kombinasi ekstrak batang tali kuning dan artemisin sebagai obat antimalaria terhadap *Plasmodium berghei*. *Brawijaya Med J.* 2010;26(1):8–13.