

**PS1
10**

Jakarta

RAHASIA

LAPORAN HASIL PENELITIAN
PENGARUH EKSTRAK ETANOL KUNYIT DAN SENYAWA KURKUMIN STANDAR
TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE SEROTIPE 3, *IN VITRO*

RENI HERMAN

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan

LAPORAN HASIL PENELITIAN
PENGARUH EKSTRAK ETANOL KUNYIT DAN SENYAWA KURKUMIN STANDAR
TERHADAP INFEKSI VIRUS DENGUE SEROTIPE 3, IN VITRO

RENI HERMAN

Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
PERPUSTAKAAN
Tanggal : 20-8-2012
No. Judak : PS 1-10/12
No. Klass : PS1
10

Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan
Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
Kementerian Kesehatan

ABSTRAK

Telah dikaji efek antiviral senyawa ini secara *in vitro*. Hasilnya, terdapat penurunan titer (kuantitas) virus pada penambahan ekstrak etanol kunyit dan kurkumin pada sel Vero yang terinfeksi. Pada penelitian ini dikaji efek penghambatan kurkumin standar dan ekstrak kunyit terhadap replikasi virus pada sel manusia dan efek terhadap sitokin TNF α akibat infeksi virus dengue.

Uji didahului dengan persiapan ekstrak etanol kunyit dan senyawa Kurkumin standar yang diketahui konsentrasinya kemudian diikuti dengan uji toksisitas pada sel. Juga ditentukan kuantitas virus dengue serotipe 3 yang akan digunakan untuk uji. Berikutnya dilakukan uji kultur PBMC dan HUVEC dengan virus dan ekstrak etanol kunyit dan larutan Kurkumin dan menentukan efek ekstrak etanol kunyit dan senyawa Kurkumin standar terhadap TNF α .

Terdapat 28,29% kadar kurkumin pada ekstrak etanol kunyit, terjadi penurunan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit setelah disimpan selama 3 tahun. Hasil uji toksisitas adalah senyawa kurkumin standar aman digunakan hingga 6 $\mu\text{g/ml}$, sementara ekstrak kunyit 12,5 $\mu\text{g/ml}$. Efek antiviral melalui uji *cell titer proliferation* belum terlihat efek antiviral, dan masih harus dilakukan pemeriksaan titer virus dengan *plaque assay*. Untuk antiinflamasi, ada penurunan kadar TNF α setelah penambahan kurkumin 5 μg per ml dan penambahan ekstrak kunyit 12,5 μg per ml. Kadar TNF α pada penambahan sesuai dengan dosis tersebut sama dengan kadar TNF α pada sel yang tidak terinfeksi.

Hasil uji efek antiviral maupun antiinflamasi masih harus dilakukan beberapa kali untuk menunjukkan hasil ini bukan merupakan kebetulan.

Kata kunci: Kurkumin, ekstrak kunyit, antiviral, antiinflamasi

Ringkasan Hasil Penelitian
Pengaruh Ekstrak Etanol Kunyit dan Senyawa Kurkumin Standar
Terhadap Infeksi Virus Dengue serotipe 3 in vitro

Dengue adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus dengue yang bersifat endemik di daerah tropis dan sub tropis di seluruh dunia, terutama di daerah perkotaan. Namun begitu, belum tersedia terapi spesifik untuk infeksi virus dengue ini. Di Indonesia, bahan-bahan alami yang mengandung kurkumin sudah banyak digunakan sebagai obat tradisional. Dalam rangka melindungi tanaman (herbal) Indonesia yang mempunyai khasiat obat dan mendapatkan obat herbal yang bersifat menghambat replikasi virus dengue, kami telah mengkaji efek antiviral senyawa ini dengan cara menambahkan kurkumin pada medium kultur virus kemudian menghitung jumlah virus yang masih infeksi. Hasilnya, terdapat penurunan titer (kuantitas) virus pada penambahan ekstrak etanol kunyit dan kurkumin pada sel Vero yang terinfeksi. Oleh karena itu pada penelitian ini akan dikaji efek penghambatan replikasi virus pada sel manusia dan dikaji juga efek ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sitokin TNF α akibat infeksi virus dengue.

Secara umum tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui efek antiviral dan efek antiinflamasi dari senyawa kurkumin dan ekstrak etanol kunyit terhadap infeksi virus dengue sehingga bisa dimanfaatkan untuk pengobatan DBD. Secara khusus untuk menentukan efek ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sel PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell), menentukan efek ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sel HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), mengkaji penghambatan replikasi virus dengue oleh ekstrak etanol kunyit dan kurkumin pada membran sel, mengkaji penghambatan replikasi virus dengue oleh ekstrak etanol kunyit dan kurkumin pada protease virus di dalam sel serta mengkaji efek ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sitokin proinflammatory akibat infeksi virus dengue.

Uji didahului dengan persiapan ekstrak etanol kunyit dan senyawa Kurkumin standar yang diketahui konsentrasinya kemudian diikuti dengan uji toksisitas pada sel. Juga ditentukan kuantitas virus dengue serotipe 3 yang akan digunakan untuk uji. Berikutnya dilakukan uji kultur PBMC dan HUVEC dengan virus

dan ekstrak etanol kunyit dan larutan Kurkumin dan menentukan efek ekstrak etanol kunyit dan senyawa Kurkumin standar terhadap TNF α .

Pada tahap awal telah dilakukan pengujian terhadap kadar kurkumin pada ekstrak etanol kunyit yang sama dengan penelitian sebelumnya. Hasilnya terdapat 28,29% kadar kurkumin pada ekstrak etanol kunyit. Terjadi penurunan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit setelah disimpan selama 3 tahun. Oleh karena itu dilakukan pengujian dosis toksisitas kembali pada sel vero. Hasil akhir uji toksisitas adalah senyawa kurkumin standar aman digunakan hingga 6 $\mu\text{g/ml}$, sementara ekstrak kunyit 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

Setelah dilakukan uji pada PBMC belum terlihat efek antiviral melalui uji cell titer proliferation. Namun ini belum merupakan hasil yang final karena masih harus dilakukan pemeriksaan titer virus dengan plaque assay. Uji ini selayaknya dilakukan beberapa kali untuk mendapatkan hasil yang konsisten.

Hasil uji untuk menentukan efek antiinflamasi, menunjukkan ada penurunan kadar TNF α setelah penambahan kurkumin 5 $\mu\text{g per ml}$ dan penambahan ekstrak kunyit 12,5 $\mu\text{g per ml}$. Kadar TNF α pada penambahan sesuai dengan dosis tersebut sama dengan kadar TNF α pada sel yang tidak terinfeksi. Hasil ini juga masih harus dilakukan beberapa kali untuk menunjukkan hasil ini bukan merupakan kebetulan. Uji efek antiinflamasi masih harus dilanjutkan dengan uji pada HUVEC, mengingat tujuan dari penelitian adalah untuk melihat efek antiinflamasi akibat infeksi virus dengue.

DAFTAR ISI

ABSTRAK	ii
Ringkasan Penelitian.....	iii
Daftar isi.....	v
Daftar gambar.....	vi
Daftar lampiran.....	vii
Daftar ringkasan.....	viii
I. Latar Belakang	1
II. Manfaat	5
III. Tujuan	5
IV. Metode	6
V. Hasil Penelitian	14
VI. Pembahasan	23
VII. Daftar Pustaka	26

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1. Skema Immunopathogenesis Kebocoran plasma akibat infeksi dengue	2
Gambar 2. Skema kerangka konsep penelitian.....	6
Gambar 3. Alur kerja penelitian.....	3
Gambar 4. Uji sitotoksitas sel Vero dengan DMSO sebagai pelarut Kurkumin dan ekstrak kunyit.....	14
Gambar 5. Uji sistotoksitas sel Vero dengan larutan Kurkumin standar	15
Gambar 6. Uji sitotoksitas sel vero terhadap ekstrak kunyit.....	16
Gambar 7. Uji toksisitas PBMC terhadap DMSO sebagai pelarut.....	17
Gambar 8. Uji toksisitas PBMC terhadap kurkumin.....	17
Gambar 9. Uji toksisitas PBMC terhadap ekstrak kunyit.....	18
Gambar 10. Hasil optimasi virus dengue serotipe 3 strain H87.....	18
Gambar 11. Titer virus dengue serotipe 3 dengan plaque assay.....	19
Gambar 12. Titer harian virus dengue	20
Gambar 13. Persentasi sel yang hidup pada uji Kurkumin dengan virus dengue menggunakan PBMC.....	21
Gambar 14. Persentasi sel yang hidup pada uji ekstrak kunyit dengan virus dengue menggunakan PBMC.....	21
Gambar 15. Kadar harian TNF α	22
Gambar 16. Kadar TNF α pada uji virus dengue dengan Kurkumin dan ekstrak kunyit.....	23

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. <i>inform concent</i> pengambilan darah	28
Lampiran 2. <i>inform concent</i> pengambilan tali pusat.....	29
Lampiran 3. Hasil uji kadar kurkumin ekstrak kunyit I.....	30
Lampiran 4. Hasil uji kadar kurkumin ekstrak kunyit II.....	31

DAFTAR RINGKASAN

DBD	:	Demam Berdarah Dengue
DD	:	Demam Dengue
DENV	:	Dengue Virus
DMSO	:	Dimethyl Sulphoxide
ELISA	:	Enzyme Link Immunosorbent Assay
HUVEC	:	Human Umbilical Vein Endothelial cell
IFN γ	:	Interferon Gamma
IL-2	:	Interleukin-2
MHC I	:	Major Histocompatibility class I
MHC II	:	Major Histocompatibility class II
MOI	:	Multiplicity of infection
PBMC	:	Peripheral Blood Mononuclear Cell
SSD	:	Sindrom Syok Dengue
TNF β	:	Tumor Necrosis Factor β
TNF α	:	Tumor Necrosis Factor α

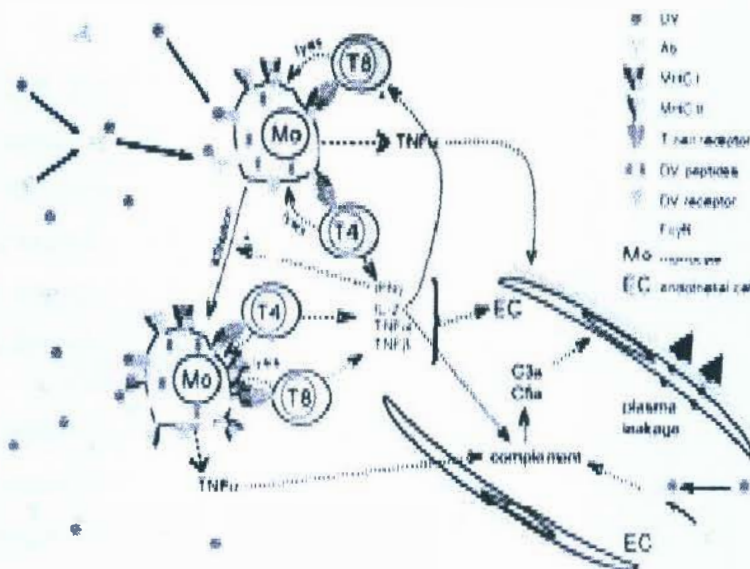
I. Latar Belakang

Dengue adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi virus dengue yang bersifat endemik di daerah tropis dan sub tropis di seluruh dunia, terutama di daerah perkotaan. Virus dengue ditransmisikan terutama oleh nyamuk *Aedes aegypti*, juga merupakan penyakit arbovirus (*arthropod borne virus*). Yang paling penting pada infeksi dengue adalah angka morbiditas dan mortalitas yang tinggi. Diperkirakan bahwa antara 50 juta sampai 100 juta kasus demam dengue (DD) terjadi setiap tahunnya dan 250 ribu sampai 500 ribu diantaranya berkembang menjadi demam berdarah dengue (DBD). Belakangan ini demam dengue dalam bentuk yang lebih serius seperti demam berdarah dengue dan sindrom syok dengue (SSD) telah muncul sebagai masalah yang besar bagi kesehatan masyarakat dengan peningkatan daerah epidemik dan penyebaran geografis yang meluas.¹

Berdasarkan jumlah kasus DBD, Indonesia menempati urutan kedua setelah Thailand. Sejak tahun 1968 angka kesakitan rata-rata DBD di Indonesia terus meningkat dari 0,05 (1968) menjadi 8,14 (1973); 8,65 (1983) dan mencapai angka tertinggi pada tahun 1988 yaitu 22,09 per 100.000 penduduk, dengan jumlah penderita sebanyak 47.573 orang dan 1.527 orang meninggal. Setelah epidemi tahun 1988, insiden DBD cenderung menurun, yaitu 12,7 (1990) dan 9,2 (1993) per 100.000 penduduk. Namun pada tahun 1994, insiden meningkat lagi menjadi 9,7 per 100.000 penduduk dan sampai tahun 1996 terjadi kecenderungan peningkatan insiden.² Berdasarkan data DBD dari tahun 2003 sampai dengan tahun 2007 *Insidence rate* (IR) cenderung meningkat, dan menurun dari tahun 2007 ke 2008 akan tetapi masih menunjukkan angka yang relatif tinggi dibandingkan dengan tahun sebelumnya. Demikian juga dengan CFR, menurun seiring dengan menurunnya IR.³

Patofisiologi demam berdarah dan dengue *shock syndrom* ditandai oleh adanya kebocoran plasma akibat adanya perubahan permeabilitas mikrovaskular.⁴ Manifestasi klinis yang berat akibat infeksi virus dengue adalah DHF dan DSS. Kejadian kebocoran plasma biasanya terjadi setelah akhir fase viremia, oleh karena itu kebocoran plasma lebih dihubungkan dengan faktor imunologi akibat infeksi dari pada faktor virus secara langsung.⁵ Berdasarkan suatu penelitian *in vitro*, kebocoran plasma diduga disebabkan oleh meningkatnya permeabilitas endotel akibat adanya perubahan morfologi sel dan penurunan VE-cadherin (sejenis protein transmembran yang berperan pada pembentukan ikatan antar sel endotel).^{6,7}

Nilai berbagai macam sitokin pada plasma menunjukkan peningkatan yang lebih tinggi pada DHF dibandingkan dengan DF. Laporan ini mendukung teori bahwa sitokin berperan pada proses imunopatogenesis infeksi dengue, oleh karena efek proinflamatorinya pada sel endotel vaskuler. Beberapa sitokin yang meningkat pada DHF adalah TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 dan IFN- γ .⁸ Banyak studi tentang TNF α melaporkan, sitokin ini merupakan sitokin primer yang memberikan implikasi terhadap patogenesis. Studi terhadap hewan coba yang diberi terapi anti TNF secara bermakna menurunkan angka kematian.⁹ TNF- α dihasilkan oleh monosit yang terinfeksi virus dengue, sitokin ini meningkatkan permeabilitas vaskuler. Selain itu sel limfosit T yang spesifik juga memproduksi TNF- α , IL-2 dan IFN- γ . Kedua sel ini yang meningkatkan level sitokin pada kasus DHF.⁸



Gambar 1. Skema Immunopathogenesis Kebocoran plasma akibat infeksi dengue (Rothman *et al*, 1999)

Berdasarkan mekanisme imunopatogenesis yang diusulkan oleh Rothman dan kawan-kawan, kebocoran plasma terjadi akibat monosit yang terinfeksi oleh virus dengue akan mengaktifkan respon imun dimana respon ini lah yang menyebabkan perubahan morfologi dari sel endotel. MHC II pada monosit yang terinfeksi akan berikatan dengan T cell receptor sel T4, ikatan ini akan menyebabkan lisis monosit. Sel T4 juga akan menghasilkan IFN γ , IL-2, TNF α dan TNF β . IFN γ akan mengaktifkan

monosit yang lain sehingga akan mengaktifkan MHC II monosit dan akan berikatan dengan *T cell receptor* sel T4 dan menghasilkan beberapa sitokin diatas. *T cell receptor* sel T8 juga akan berikatan dengan MHC I dari monosit yang terinfeksi dan monosit yang teraktifasi, sehingga menyebabkan menghasilkan sitokin seperti sel T4 dan monosit akan lisis. Sitokin inflammatory yang terbentuk ini diduga menyebabkan kebocoran plasma, selain disebabkan juga oleh komplemen yang terbentuk akibat ikatan antara antigen dan antibody, akan menghasilkan komplemen (C3a dan C5a) yang juga menyebabkan kebocoran plasma (Gambar 1).¹⁰

Sitokin mana yang dominan menyebabkan perubahan morfologi sel endotel secara *in vitro* telah diteliti oleh Beti dan kawan-kawan. Namun begitu, belum tersedia terapi spesifik untuk infeksi virus dengue ini.

Kurkumin adalah zat yang pernah diuji efek antivirusnya, yaitu terhadap HIV dan virus Herpes Simplex,^{11,12} merupakan senyawa aktif yang banyak ditemukan pada kunyit (*Curcuma domestica* Val) atau temulawak (*Curcuma Xanthorrhiza* Roxb). Kunyit dan temulawak mengandung senyawa kimia yang mempunyai keaktifan farmakologi yang terdiri atas dua kelompok yaitu zat warna termasuk kurkuminoid dan minyak atsiri. Kurkuminoid terdiri atas dua senyawa kuning kurkumin (75 %) dan turunannya yaitu *demethoxyKurkumin* (15-20 %) dan *bisdemethoxyKurkumin* (kurang lebih 3 %).¹³

Kurkumin adalah polifenol dengan rumus kimia $C_{21}H_{20}O_6$, dapat memiliki dua bentuk tautomer : keton dan enol. Struktur keton lebih dominan dalam bentuk padat, sedangkan struktur enol ditemukan dalam bentuk cairan. Kurkumin pertama kali diisolasi pada tahun 1815. Kemudian tahun 1910, didapatkan berbentuk kristal dan bisa dilarutkan tahun 1913. Kurkumin tidak dapat larut dalam air, tetapi larut dalam etanol dan acetone.^{12,13}

Kurkumin dilaporkan dapat menghambat replikasi HIV dengan cara menghambat aktivitas *Long Terminal Repeat*.¹¹ Sementara pada virus Herpes Simplex, Kurkumin menghambat gen *immediate-early* melalui mekanisme independent dari aktivitas *p300/CBP histon acetyltransferase*.¹⁴ Pada kedua virus ini penghambatan terdapat pada protein penting untuk virus. Pada suatu penelitian sebelum ini, telah dilaporkan penghambatan kurkumin terhadap protease, suatu protein pada virus dengue.¹⁵ Namun penelitian ini masih perlu mengujian oleh karena tidak menggunakan metode baku.

Di Indonesia, bahan-bahan alami yang mengandung kurkumin ini sudah banyak digunakan sebagai obat tradisional. Dalam rangka melindungi tanaman (herbal) Indonesia yang mempunyai khasiat obat

dan mendapatkan obat herbal yang bersifat menghambat replikasi virus dengue, kami telah mengkaji efek antiviral senyawa ini dengan cara menambahkan kurkumin pada medium kultur virus kemudian menghitung jumlah virus yang masih infeksi. Hasilnya, terdapat penurunan titer (kuantitas) virus pada penambahan ekstrak etanol kunyit dan kurkumin pada sel Vero yang terinfeksi. Pada sel yang telah terpapar ekstrak etanol kunyit dan kurkumin sebelumnya, kemudian sel diinfeksi virus dengue, titer virus juga menurun. Pada kedua perlakuan diatas, dengan penambahan ekstrak kunyit 10 ppm dan kurkumin 5 ppm, penurunan titer virus secara statistik bermakna ($p < 0,05$) terhadap kontrol positif.

Oleh karena itu pada penelitian ini akan dikaji efek penghambatan replikasi virus pada sel manusia, dalam hal ini menggunakan PBMC (*Perpheral Blood Mononuclear cell*) dan HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*). Sel tersebut diinfeksi virus dengue-3 (DENV-3), kemudian pada medium kultur ditambahkan kurkumin dan ekstrak kunyit. Kuantitas virus pada supernatan sel yang masih infeksi akan dihitung dengan *plaque assay*. Selain itu, akan dikaji juga tempat penghambatan replikasi virus oleh ekstrak etanol kunyit dan kurkumin. Hambatan pada tahap perlekatan virus dengan reseptor sel diuji dengan menginkubasi sel terlebih dahulu dengan kurkumin dan ekstrak kunyit, kemudian sel diinfeksi DENV3. Kuantitas virus yang masih infeksi juga dideteksi dengan *plaque assay*. Sementara hambatan pada *protease* virus, diuji dengan mendeteksi mRNA *protease* virus pada saat sel bereplikasi didalam sel.

Telah diketahui bahwa kurkumin mempunyai efek anti inflamasi, karena dapat menurunkan produksi sitokin *proinflammatory* diantaranya TNF α dan IFN γ .¹⁰ Sementara, pada beberapa hipotesis diterangkan terjadinya peningkatan permeabilitas pembuluh darah pada infeksi virus dengue berkaitan dengan peran beberapa sitokin termasuk TNF α dan IFN γ ¹⁴. Beberapa penelitian juga telah melaporkan keterlibatan sitokin dalam peningkatan permeabilitas mikrovaskuler^{16,17}. Maka pada penelitian ini akan dikaji juga efek ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sitokin TNF α dan IFN γ akibat infeksi virus dengue.

II. Manfaat

Ditemukannya senyawa yang dapat menghambat replikasi virus dengue dan membatasi produksi sitokin yang akan memperberat kebocoran mikrovaskuler akibat infeksi virus dengue.

III. Tujuan

1. Tujuan Umum

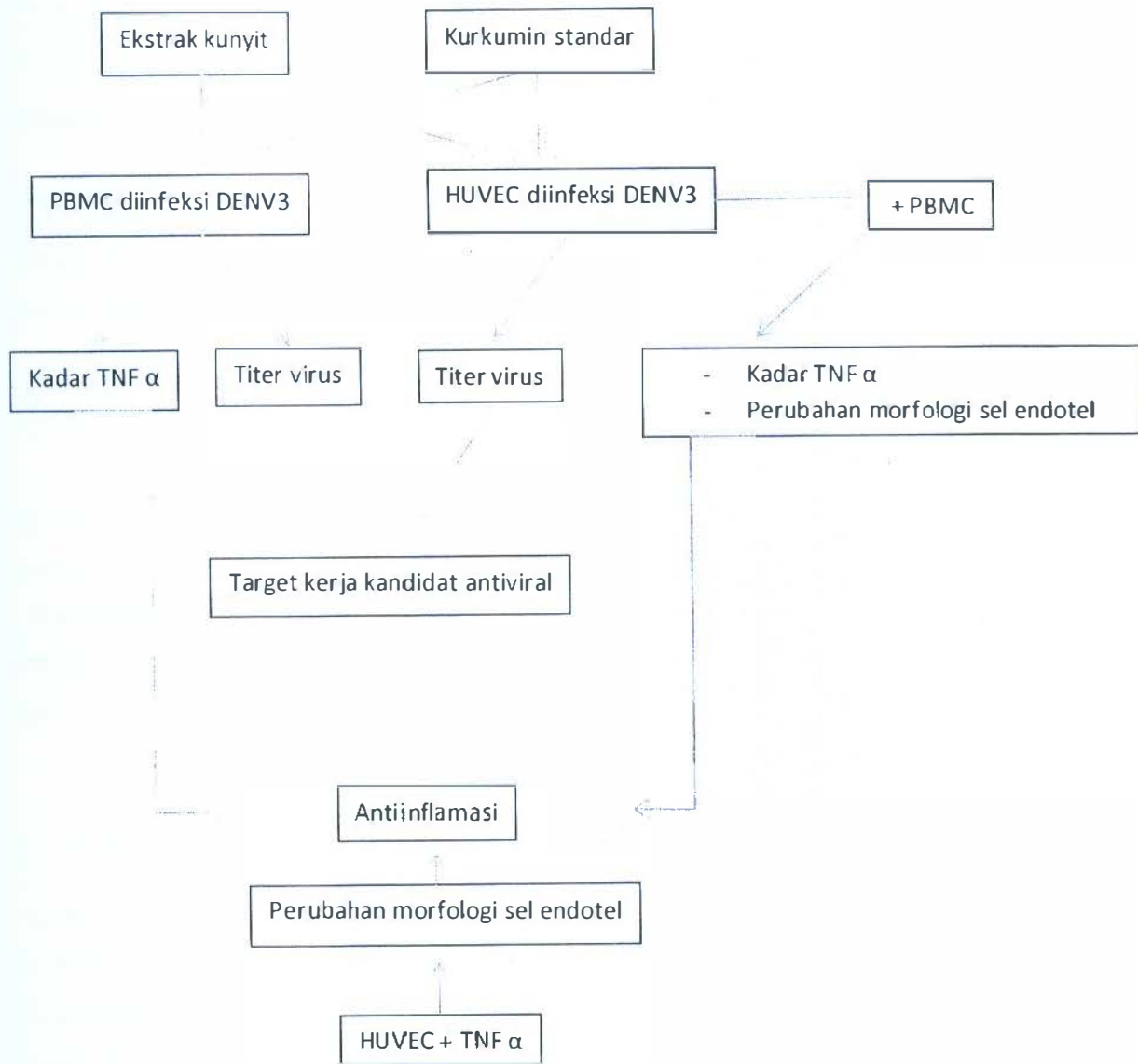
Mengetahui efek kurkumin dan kunyit sebagai antiviral dan anti inflamasi akibat infeksi virus dengue

2. Tujuan Khusus

- Menentukan efek toksisitas ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sel PBMC dan HUVEC
- Menentukan efek antiviral ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap HUVEC dan PBMC
- Mengkaji penghambatan replikasi virus dengue oleh ekstrak etanol kunyit dan kurkumin pada membran sel
- Mengkaji efek ekstrak etanol kunyit dan kurkumin terhadap sitokin proinflammatory dalam hal ini sitokin TNF α , akibat infeksi virus dengue pada PBMC dan HUVEC

IV. Metode

A. Kerangka konsep



Gambar 2. Skema kerangka konsep penelitian

B. Tempat dan waktu penelitian

Laboratorium Virologi Balitbangkes dan mikrobiologi FKUI

Lama penelitian sembilan bulan.

C. Jenis penelitian dan desain penelitian

1. Desain penelitian; eksperimen laboratorium

2. Membandingkan titer virus hasil kultur pada HUVEC dan PBMC yang mediumnya ditambahkan kurkumin, ekstrak kunyit atau medium tanpa penambahan apa-apa sebagai kontrol.

D. Populasi :

PBMC dan HUVEC yang diuji dengan pemberian kurkumin dari kunyit, kurkumin murni dan DMSO dengan dosis sesuai hasil uji toksisitas. Demikian juga HUVEC yang ditambahkan sitokin. PBMC diperoleh dari individu dengan IgG dengue positif. HUVEC diperoleh dengan cara membeli pada ATCC, namun bila sulit untuk mendapatkan HUVEC, diusahakan untuk membuat kultur sel yang berasal dari jaringan *umbilical* donor.

E. Bahan dan prosedur kerja

a. Strategi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan melalui beberapa tahapan kerja yang meliputi :

1. Persiapan sel C6/36, sel Vero, sel BHK 21, PBMC dan HUVEC
2. Persiapan virus dengue serotipe 3 (DENV-3)
3. Penentuan titer DENV-3
4. Persiapan ekstrak kunyit dan penentuan kadar kurkumin
5. Uji toksisitas kurkumin dan ekstrak kunyit terhadap sel.
6. Uji efek kurkumin dan ekstrak kunyit terhadap infeksi DENV-3 menggunakan PBMC
7. Uji efek kurkumin dan ekstrak kunyit terhadap infeksi DENV-3 menggunakan HUVEC
8. Uji efek kurkumin dan ekstrak kunyit terhadap infeksi DENV-3 menggunakan HUVEC dan

ditambahkan PBMC

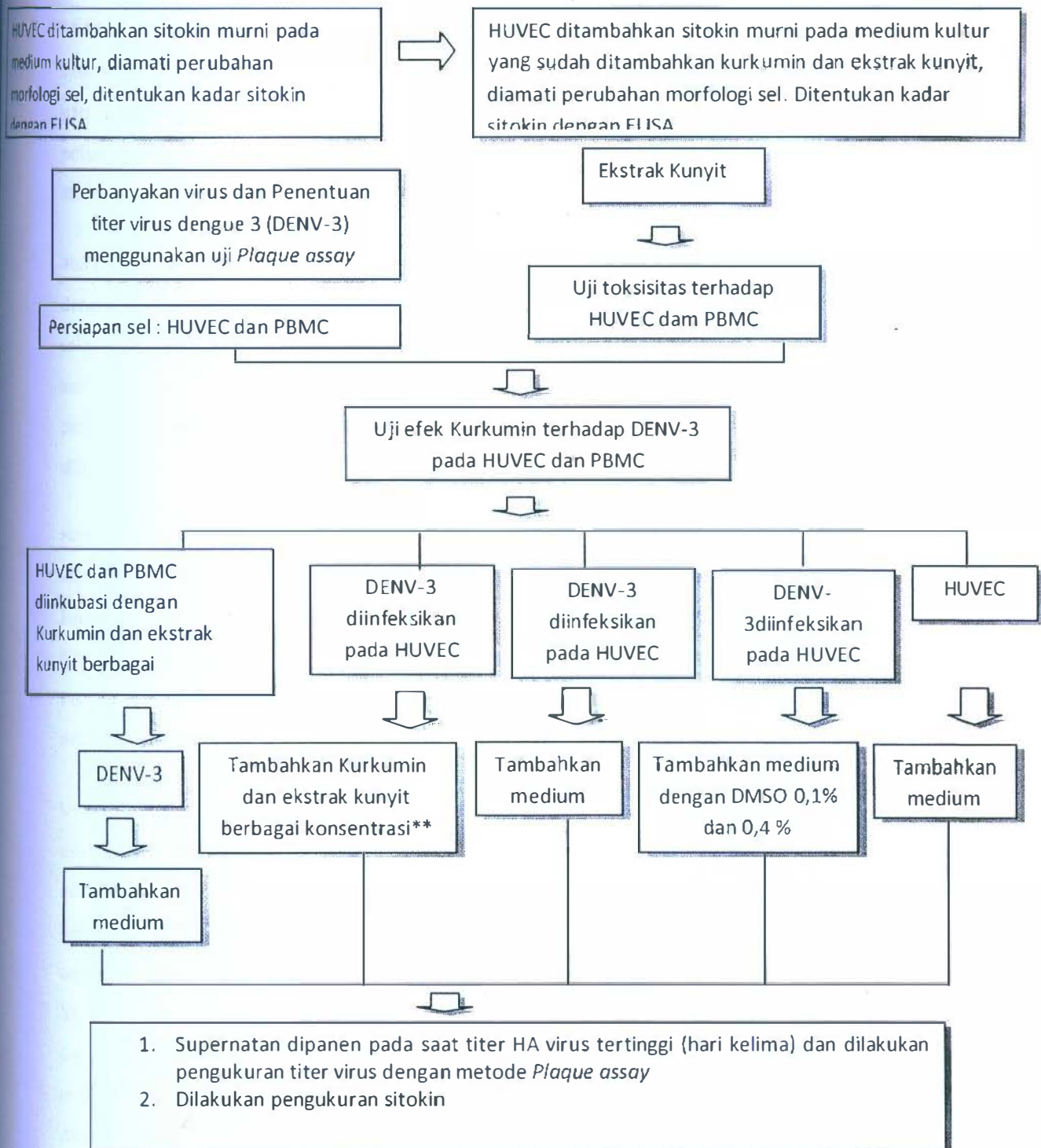
9. Mengukur titer DENV-3 dari supernatan sel yang telah diuji dengan kurkumin dan ekstrak kunyit.
10. Mengukur kadar TNF α dari supernatant PBMC yang telah diuji dengan kurkumin dan ekstrak kunyit.
11. Uji efek kurkumin terhadap sitokin TNF α yang ditambahkan pada HUVEC

b. Bahan

Sel yang digunakan pada penelitian ini adalah sel C6/36, sel Vero dan BHK-21 (Baby Hamster Kidney), PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear cell*) dan HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cell*). Sel C6/36 adalah sel yang berasal dari nyamuk *Ae. albopictus*, sel Vero adalah sel yang berasal dari ginjal kera (green mongkey kidney) dan sel BHK 21 yang berasal dari ginjal tupai, semuanya merupakan koleksi dari Litbangkes. PBMC diperoleh dari donor sementara HUVEC dibeli dari ATCC. Virus Dengue serotipe 3 (DENV-3) yang diuji adalah strain H87 yang merupakan koleksi Litbangkes. Kunyit yang digunakan adalah kunyit yang tumbuh di daerah Bogor, pada ketinggian lebih kurang 1000 m dpl dan curah hujan antara 3000-4000 mm/tahun. Tumbuhan kunyit yang dipanen adalah kunyit yang berumur 9 bulan. Kunyit segar langsung diolah dan disimpan dalam bentuk ekstrak pada suhu 2-8°C dan ditutupi aluminium foil sampai digunakan.

Kurkumin standar diperoleh dari bagian Farmasi Litbangkes, merupakan produk dari Merck-Schuchardt (Cat no. S3619 2498). Kurkumin tidak larut di dalam air, berdasarkan rekomendasi dari produsen maka kurkumin dan kunyit dilarutkan di dalam DMSO (Dimethyl Sulphoxide). Berat molekul kurkumin adalah 368.

c. Cara kerja



Gambar 3. Alur kerja penelitian

Pembuatan ekstrak kunyit

10 kg kunyit dipotong-potong dengan ketebalan 0,5 cm kemudian dicuci dan dikeringkan dibawah sinar matahari namun ditutupi dengan kain hitam supaya kadar kurkumin tidak rusak. Pada malam hari pengeringan dilakukan dengan menggunakan alat pengering (blower). Setelah lima hari potongan kunyit yang telah kering dihaluskan dengan menggunakan mesin grinder dengan mesh 40.

465 gram serbuk kunyit dimasukkan ke dalam wadah penampung, tambahkan pelarut ethanol 96% dengan perbandingan serbuk dan pelarut 1:3. Campuran ini kemudian diaduk menggunakan stirrer selama 3 jam dan diendapkan selama 24 jam. Kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring. Serbuk bekas di masukkan lagi ke dalam penampung dan ditambahkan pelarut dengan perbandingan serbuk pelarut 1:2. Dengan menggunakan stirrer, diaduk kembali selama 1 jam dan disaring.

Hasil saringan dimasukkan ke dalam Rotary Evaporator untuk menguapkan pelarut. Setelah pelarut menguap, hasilnya berupa ekstrak kental dengan berat 55 gram. Tahap berikutnya, konsentrasi kurkumin di dalam ekstrak diukur dengan menggunakan spektrofotometri panjang gelombang (λ) 530 nm. Hasilnya, konsentrasi kurkumin dalam ekstrak kunyit adalah 51,80 % (Lampiran.1). Pembuatan serbuk dan ekstrak kunyit hingga penentuan konsentrasi kurkumin pada ekstrak dilakukan di Balai Penelitian Tanaman Obat dan aromatik di Cimanggu, Bogor.

Untuk menguji toksisitas kurkumin terhadap sel, ekstrak kunyit dan kurkumin murni perlu dilarutkan terlebih dahulu. Berdasarkan informasi dari produsen, konsentrasi kurkumin murni adalah 97%. Dan direkomendasikan untuk menggunakan DMSO (Dimethyl Sulphoxide) sebagai pelarut oleh karena kurkumin tidak dapat larut di dalam medium kultur yang komposisi utamanya adalah air. Berdasarkan konsentrasi kedua bentuk kurkumin (ekstrak kunyit dan kurkumin murni) 51,80 : 97 %, diasumsikan konsentrasi kurkumin kunyit setengah dari konsentrasi kurkumin murni. Oleh karena itu kami membuat larutan kedua kurkumin ini dengan perbandingan 1 : 2. Kurkumin murni ditimbang sebanyak 9,4 mg dan ekstrak kunyit ditimbang sebanyak 18,9 mg. Masing-masing dilarutkan dengan 5 ml DMSO dalam tabung pengencer 5 ml.

Biakan sel C6/36, Vero dan BHK-21

Sel C6/36 pada satu flask kultur 25 cm² koleksi Litbangkes dikembangkan menjadi dua flask. Caranya, medium dibuang dan disisakan ± 2 ml. Dengan sisa medium dilakukan tirturasi pada sel agar sel terlepas dari dasar flask. 2 ml supernatan sel yang ini dipindahkan pada flask baru yang berisi 6 ml MEM FBS 10%, pada flask lama juga ditambahkan medium. Sel diinkubasi pada suhu ruang hingga monolayer dan siap untuk diinfeksi DENV-3.

Satu flask sel Vero koleksi Litbangkes dikembangkan pada flask 75 cm². Caranya, medium pada sel dibuang kemudian sel dicuci dengan PBS (-) 5 ml. Berikutnya ikatan antar sel dilepaskan dengan menambahkan 1 ml trypsin, inkubasi pada 37°C selama 5 menit. Untuk menghilangkan pengaruh trypsin, supernatan sel ditambahkan medium dan diputar dengan kecepatan 1500 putaran per menit agar sel mengendap. Buang supernatan, endapan sel dilarutkan kembali dengan menambahkan medium dan dimasukkan kedalam flask 75 cm² yang berisi medium 15 ml. Sel diinkubasi pada 37°C dengan CO₂ 5% hingga monolayer.

Sel BHK-21 dalam nitrogen cair dikeluarkan, setelah mencair ditambahkan medium dan diputar dengan kecepatan 1500 putaran per menit. Supernatan dibuang, endapan sel ditambahkan medium dan dilarutkan kembali. Supernatan sel ini dimasukkan ke dalam flask yang diisi medium 6 ml. Sel diinkubasi pada 37°C dengan CO₂ 5%.

Perbanyak Virus

Virus Dengue serotipe 3 (DENV-3) diinokulasikan pada sel C6/36, diinkubasi pada suhu kamar selama 7 hari.⁵⁵ Supernatan dipanen dan ditentukan titer virus dengan menggunakan metode plaque assay⁵⁵ dan Hemaglutinasi.⁵⁶ Virus disimpan pada suhu - 80°C.

Penghitungan Titer Virus

Plaque assay

Penentuan titer virus selain menggunakan HA juga dilakukan dengan plaque assay. Titer Den-3 ditentukan dengan metode pembentukan plak pada sel BHK-21 yang konfluen. Pertama membuat

serial pengenceran 10 kali supernatan sel C6/36 yang diinfeksi oleh virus Den-3. Sel BHK monolayer yang telah disiapkan sehari sebelumnya diinokulasikan dengan serial pengenceran virus. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C dengan CO₂ 5% selama 2 jam dengan agitasi setiap 30 menit. Selanjutnya tambahkan 3 ml Methylcellulose 1 % dan inkubasi pada suhu 37°C dengan CO₂ 5% selama 7 hari. Kemudian dilakukan fiksasi sel dengan larutan formalin 10% dan diwarnai dengan kristal violet.

Uji toksisitas kurkumin terhadap sel

Sel vero, BHK 21 disiapkan pada plate 24 well ditambahkan masing-masing jenis kurkumin (ekstrak kunyit dan kurkumin murni) dengan berbagai volume. Awalnya ditentukan konsentrasi DMSO tertinggi yang tidak merusak sel. Kemudian dilanjutkan dengan menyesuaikan konsentrasi kurkumin standar dan ekstrak kunyit yang dapat digunakan dalam pelarut. Uji dimulai dengan pemberian kurkumin standar dan ekstrak kunyit konsentrasi terkecil hingga pada konsentrasi yang tidak merusak sel. Inkubasi pada suhu 37°C dan CO₂ 5 % selama 3 hari. Dilakukan pengamatan kerusakan sel setiap hari.

Uji toksistas juga dilakukan dengan menggunakan *cell titer proliferation assay*. Uji ini menggunakan CellTiter 96® AQueous Assay Reagents, Promega (cat no. G5421) prosedur sesuai dengan instruksi produsen. Intensitas warna dibaca dengan ELISA reader dengan panjang gelombang 490 nm setiap 1 jam selama 4 jam. Hasil diterjemahkan sebagai persentase jumlah sel yang hidup dengan membandingkan nilai absorben sampel dengan nilai absorben sel kontrol, dan dikalikan 100.

Uji efek Kurkumin pada sel yang diinfeksi oleh virus Dengue serotipe 3

Uji efek pada sel yang diinkubasi terlebih dahulu

Pada medium PBMC dan HUVEC ditambahkan larutan kurkumin dan ekstrak kunyit masing-masing menggunakan dosis yang kecil dan dosis tertinggi yang tidak merusak sel, sesuai dengan hasil uji toksisitas. Kemudian diinkubasi selama 2 jam. Tahap berikutnya adalah penghitungan jumlah sel untuk menentukan MOI. Jumlah sel diitung menggunakan haemocytometer. Setelah 2 jam medium yang mengandung ekstrak kunyit dan kurkumin dibuang, dan diinfeksi Den-3 yang telah

diencerkan sesuai MOI. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dan CO2 5 % selama 2 jam, dan agitasi setiap 30 menit. Selanjutnya ditambahkan medium normal (MEM FBS 2%) dan diinkubasi pada suhu 37°C dan CO2 5 % selama 5 hari.

Uji efek pada sel yang terinfeksi kemudian ditambahkan medium dengan ekstrak kunyit, kurkumin dan DMSO

Sel dibuang mediumnya dan diinfeksi Den-3 yang telah diencerkan sesuai MOI. Sel diinkubasi pada suhu 37°C dan CO2 5 % selama 2 jam, dan agitasi setiap 30 menit. Berikutnya ditambahkan medium yang mengandung larutan ekstrak kunyit sesuai dengan dosis yang ditentukan. Sebagai kontrol, sel lain yang telah diinfeksi ditambahkan medium (kontrol positif), untuk kontrol pelarut (DMSO) medium ditambahkan masing-masing sesuai dengan dosis kurkumin dan ekstrak kunyit yang digunakan kontrol negatif hanya sel tanpa penambahan pada medium tanpa infeksi virus. Selanjutnya sel diinkubasi selama 5 hari pada suhu 37°C dan CO2 5 %.

Penilaian efek Kurkumin terhadap replikasi virus dengue

Efek kurkumin terhadap replikasi virus dengue dilakukan dengan mengukur titer virus dengue yang ada di supernatan sel yang diinfeksi dengan *plaque assay*. Penentuan titer virus menggunakan metode *plaque assay* sesuai dengan cara kerja diatas.

Efek terhadap replikasi juga dinilai dengan menggunakan *cell titer proliferation assay*, hasil diterjemahkan dengan menghitung persentase sel yang hidup dengan membandingkan nilai absorben sampel dengan kontrol dan mengalikannya dengan 100.

Penilaian efek antiinflamasi kurkumin

Dengan menggunakan Human TNF α ELISA kit (Invitrogen cat no KHC3013) dan prosedur sesuai dengan instruksi produsen, ditentukan kadar TNF α pada supernatant hasil uji.

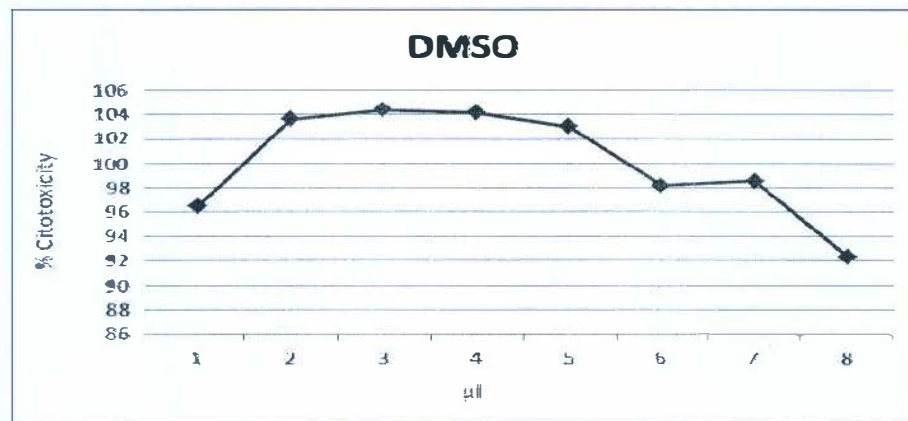
F. Analisa Data

Pengaruh kurkumin pada titer virus dianalisa menggunakan uji statistik yang sesuai, dengan cara membandingkan nilai rata-rata titer virus hasil *plaque assay* dengan kontrol positif. Perbedaan berbeda bermakna bila $P \text{ value} < 0,05$.

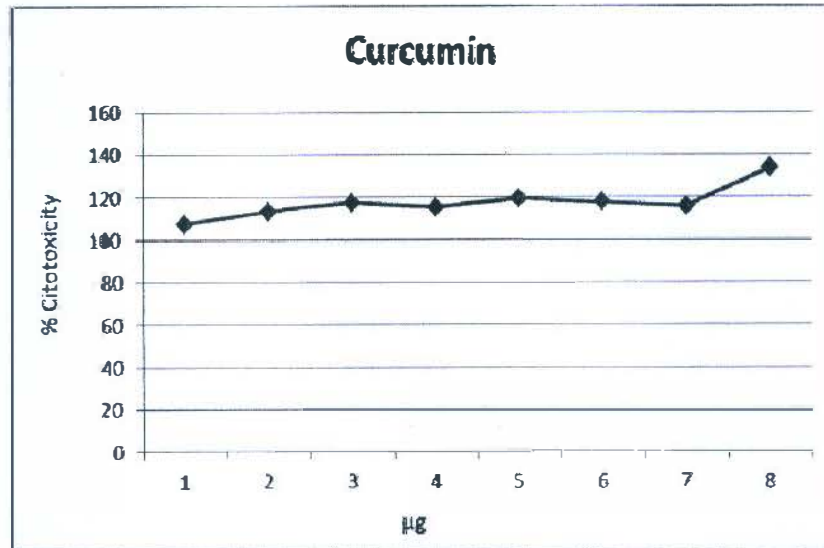
G. Hasil Penelitian

Dari kegiatan penelitian telah didapatkan hasil sebagai berikut.

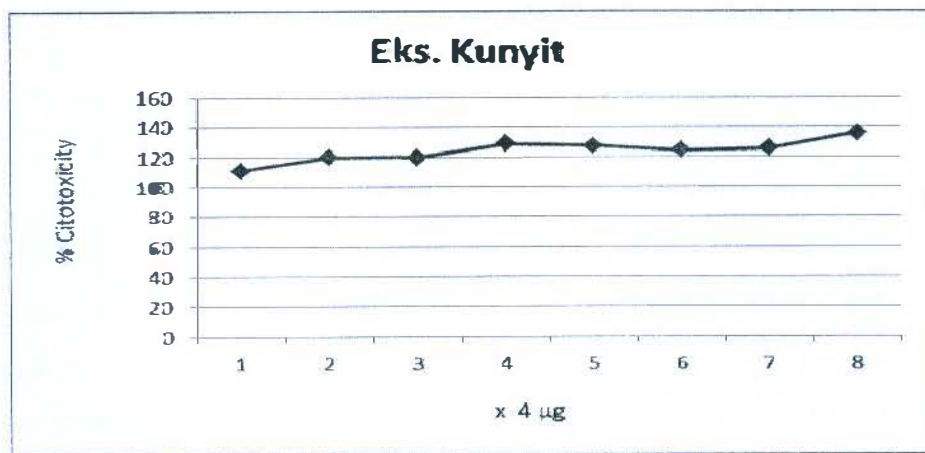
1. Prosentase Kurkumin yang terdapat pada ekstrak etanol kunyit sebesar 28,29 % (lampiran 3). Nilai ini lebih rendah dibandingkan dengan hasil pengukuran sebelumnya yaitu sebesar 51 % pada tiga tahun sebelumnya. Tampak ada penurunan kadar kurkumin selama kurun waktu tersebut.
2. Telah dilakukan uji toksisitas larutan kurkumin dan terhadap sel vero. Uji dengan CellTiter 96[®] AQueous Assay Reagents kemudian dibaca dengan ELISA reader, panjang gelombang 490 nm. Jumlah sel yang hidup sebanding dengan formazan yang terbentuk, ditandai dengan meningkatnya nilai absorben. Hasil ditampilkan dalam persentase sitotoksitas dengan cara membandingkan nilai absorben sel uji dengan control dan dikalikan dengan 100. Berdasarkan hasil uji, persentase sel Vero yang hidup setelah ditambahkan DMSO menurun pada penambahan 8 μ l. Sementara pada penambahan Kurkumin 1 sampai dengan 8 μ l dan ekstrak kunyit 4 sampai dengan 32 μ g persentase sitotoksitosis di atas 100%. (Gambar)



Gambar 4. Uji sitotoksitas sel Vero dengan DMSO sebagai pelarut Kurkumin dan ekstrak kunyit



Gambar 5. Uji sistotoksitas sel Vero dengan larutan Kurkumin standar



Gambar 6. Uji sistotoksitas sel Vero terhadap ekstrak kunyit.

Oleh karena belum didapatkan kadar yang menunjukkan efek toksik terhadap Kurkumin dan ekstrak kunyit, sementara efek toksik dari DMSO sudah tampak pada penambahan 8µl, maka dilakukan uji pada kultur sel yang tujuannya untuk menampilkan perbandingan optimal antara larutan kurkumin dan larutan ekstrak kunyit dengan seminimal mungkin DMSO. Uji dilakukan dengan perbandingan 1:3,5 (berdasarkan kadar Kurkumin standard dan hasil pemeriksaan kadar kurkumin pada ekstrak kunyit). Hasilnya, larutan Kurkumin tampak memberikan efek pada penambahan lebih dari 6 µg sementara

larutan ekstrak kunyit pada penambahan lebih dari 14 µg. Perbandingan kedua kadar kurkumin tersebut 1:2,3. Oleh karena itu dibuat larutan Kurkumin dan larutan ekstrak etanol kunyit dengan perbandingan 1:2,5 (Larutan Kurkumin 1000 ppm sementara larutan ekstrak kunyit 2500 ppm). Hasilnya, Kurkumin pada penambahan 6 µg tidak tampak kerusakan sel sementara ekstrak etanol kunyit pada penambahan 12,5 µg tampak kerusakan sel (tabel 1). Berdasarkan hasil uji pada kultur sel BHK 21 uji dilanjutkan dengan uji toksisitas dengan menggunakan *cell titer proliferation assay* menggunakan PBMC.

Tabel 1. Hasil uji larutan Kurkumin dan ekstrak kunyit terhadap kultur sel BHK 21

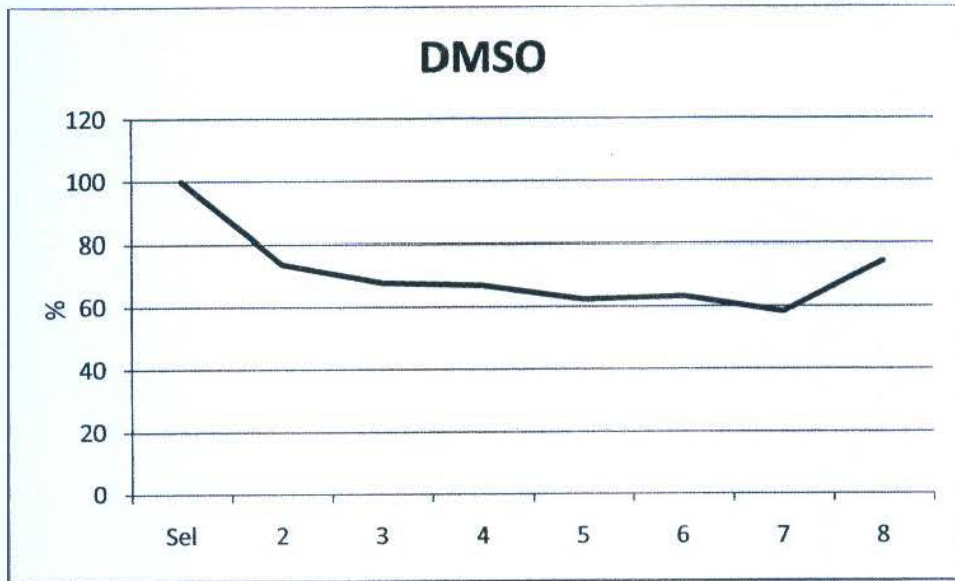
DMSO (µl)		Kirkumin (µg)		Eks. etanol kunyit (µg)	
3	Tidak rusak	3	Tidak rusak	7,5	Tidak rusak
4	Tidak rusak	4	Tidak rusak	10	Tidak rusak
5	Tidak rusak	5	Tidak rusak	12,5	Tidak rusak
6	Tidak rusak	6	Tidak rusak	15	Sel rusak

Hasil uji dengan *cell titer proliferation assay* ditampilkan sebagai presentase sel yang hidup berdasar berdasarkan nilai absorbenyang proporsional dengan jumlah sel yang hidup. Pada uji toksisitas DMSO 2 - 8µl per ml, pemberian hingga 7 µl per ml jumlah sel yang hidup terus menurun. Namun pada pemberian 8 µl per ml jumlah sel yang hidup kembali meningkat (Gambar. 7)

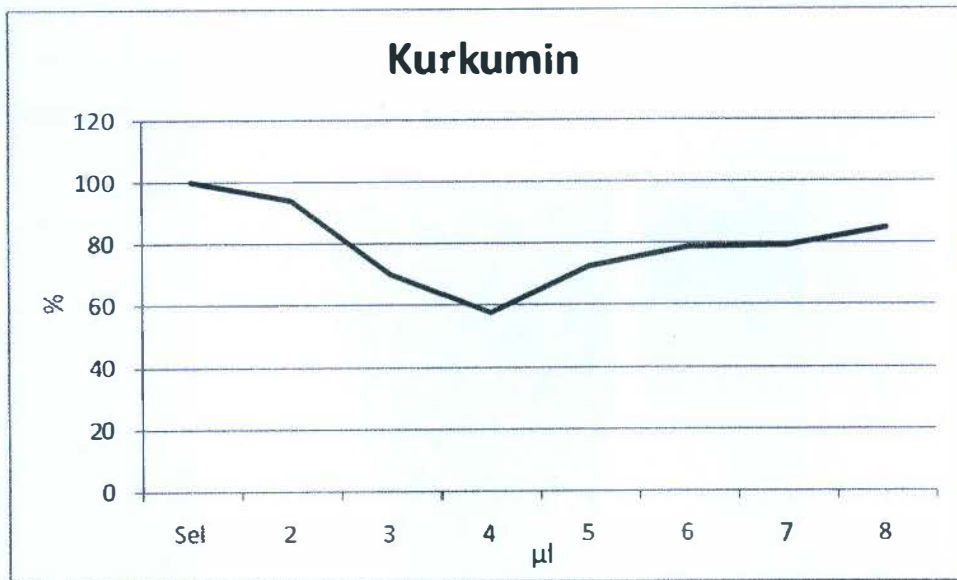
Pada uji PBMC dengan Kurkumin, sel ditambahkan 2 – 8 µg Kurkumin per ml. Persentase sel yang hidup menurun pada penambahan 4 µg per ml namun pada penambahan 5 µg hingga 8 µg cenderung meningkat.(Gambar. 8)

Uji PBMC dengan ekstrak kunyit, dimana ekstrak kunyit yang ditambahkan 5 - 20 µgper ml tampak menurun hingga 70% pada penambahan 12,5 µl kembali meningkat. (Gambar. 9).

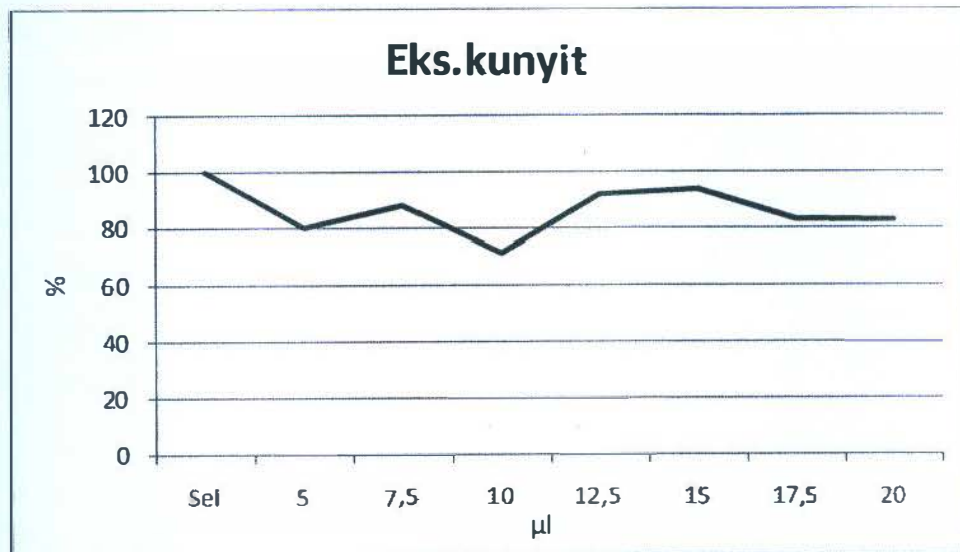
Berdasarkan hasil uji ini diambil dosis dimana jumlah sel yang hidup dengan penambahan Kurkumin dan ekstrak kunyit masih diatas 50%, dan dosis ini yang akan dipakai untuk uji dengan virus.



Gambar 7. Uji toksisitas PBMC terhadap DMSO sebagai pelarut



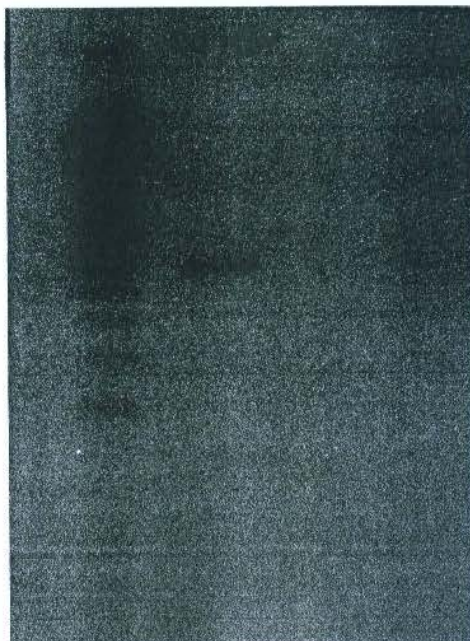
Gambar 8. Uji toksisitas PBMC terhadap kurkumin



Gambar 9. Uji toksisitas PBMC terhadap ekstrak kunyit

3. Titer virus dengue serotipe 3

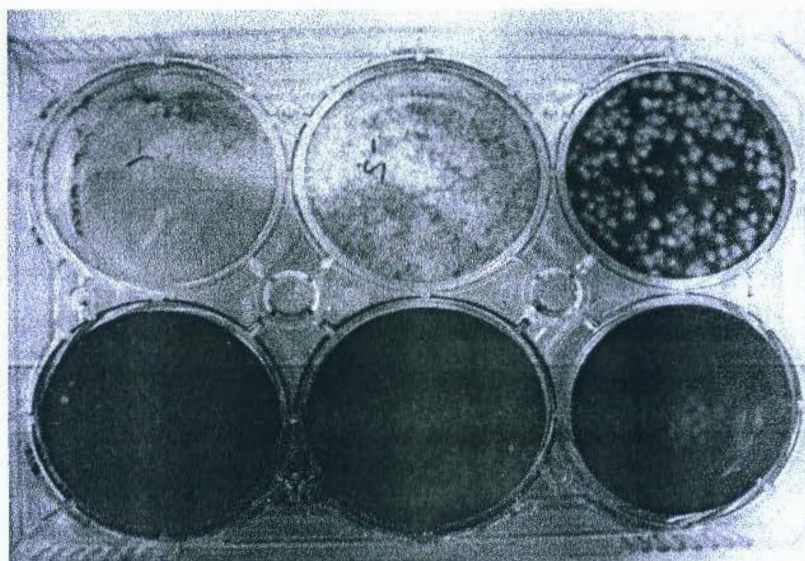
Virus yang digunakan pada penelitian ini adalah virus dengue serotipe 3 strain H87. Virus ini diperbanyak menggunakan *suckling mouse brain* dan untuk mendapat titer yang diharapkan telah dipasase sebanyak 6 kali pada sel C6/36.



Gambar 10. Hasil optimasi virus dengue serotipe 3 strain H87

Dengan menggunakan *plaque assay*, hasil perbanyakan virus dihitung titernya untuk mendapatkan jumlah per ml. Hasil pemeriksaan ini didapatkan jumlah virus 2×10^6 pfu/ml (Gambar 11).

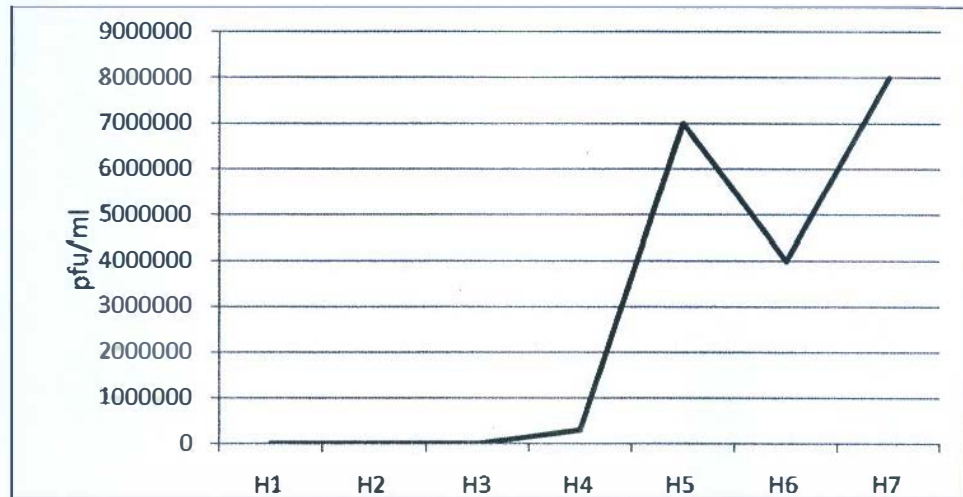
Jumlah ini diperlukan untuk dibandingkan jumlah sel yang akan diinfeksi. Pada penelitian ini akan menggunakan MOI (*multiplicity of infection*), yaitu perbandingan antara jumlah virus dan sel yang diinfeksi adalah 0,5.



Gambar 11. Titer virus dengue serotipe 3 dengan *plaque assay*

Kemudian untuk mengetahui lama uji, dilakukan penghitungan titer virus harian untuk melihat pada hari keberapa dalam 1 minggu titer virus meningkat. Sel diinfeksi virus, dan setiap hari diambil sebanyak $100 \mu\text{l}$ untuk dihitung titer virusnya.

Berdasarkan hasil pemeriksaan titer virus harian tampak pada hari ke 5 jumlah virus sudah cukup tinggi yaitu 7×10^6 pfu per ml. (Gambar 12) Sehingga dapat dihentikan pada hari ke 5 untuk melihat efek penghambatan dari Kurkumin dan ekstrak kunyit.



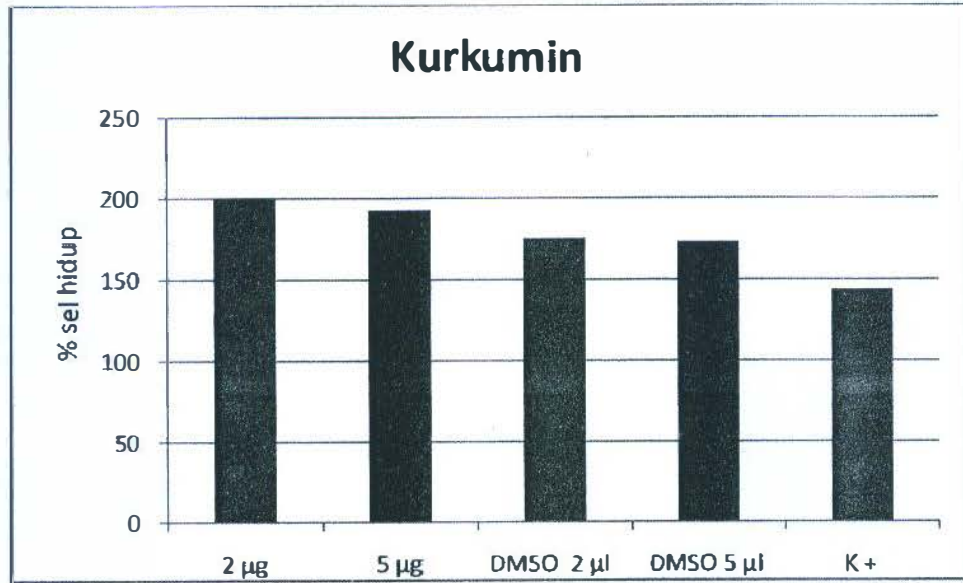
Gambar 12. Titer harian virus dengue

4. Uji Virus dengue serotipe 3 dengan Kurkumin dan ekstrak kunyit

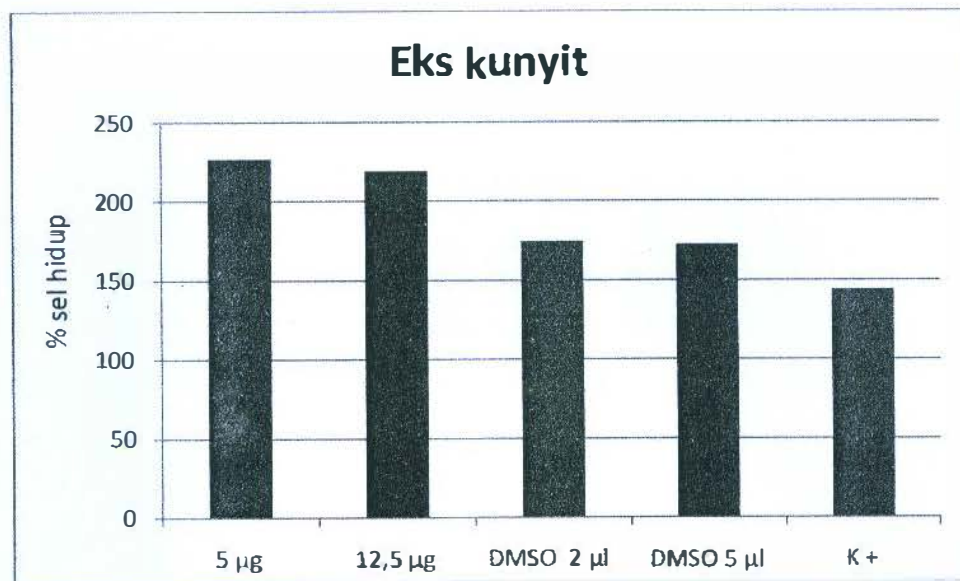
Berdasar hasil yang didapat dari uji sebelumnya pada uji virus dengue dengan kurkumin menggunakan dosis 2 μg dan 5 μg sementara dosis ekstrak kunyit menggunakan dosis 5 μg dan 12,5 μg . Perbedaan 2 dosis ini untuk melihat apakah peningkatan dosis berpengaruh terhadap hasil uji. Nilai absorben yang didapat pada uji sampel dibandingkan dengan nilai absorben sel yang tidak ditambahkan apa-apa dan dikalikan 100. Hasilnya berupa persentase sel yang hidup.

Setelah dilakukan uji PBMC terhadap virus dengue serotipe 3 dengan penambahan kurkumin dengan dosis 2 μg dan 5 μg dan diuji dengan *cell titer proliferation* tidak tampak hasil yang mengindikasikan adanya efek antiviral pada Kurkumin. Bahkan persentase sel yang hidup diatas 100 %. Bila dibandingkan dengan kontrol positif yang juga 100 %, pada uji ini tidak tampak ada infeksi. (Gambar 13)

Hasil yang sama juga terlihat pada uji dengan ekstrak kunyit. Pada kontrol DMSO jumlah sel yang hidup lebih dari 100%. Demikian juga pada penambahan kurkumin dan ekstrak kunyit. (Gambar 14)



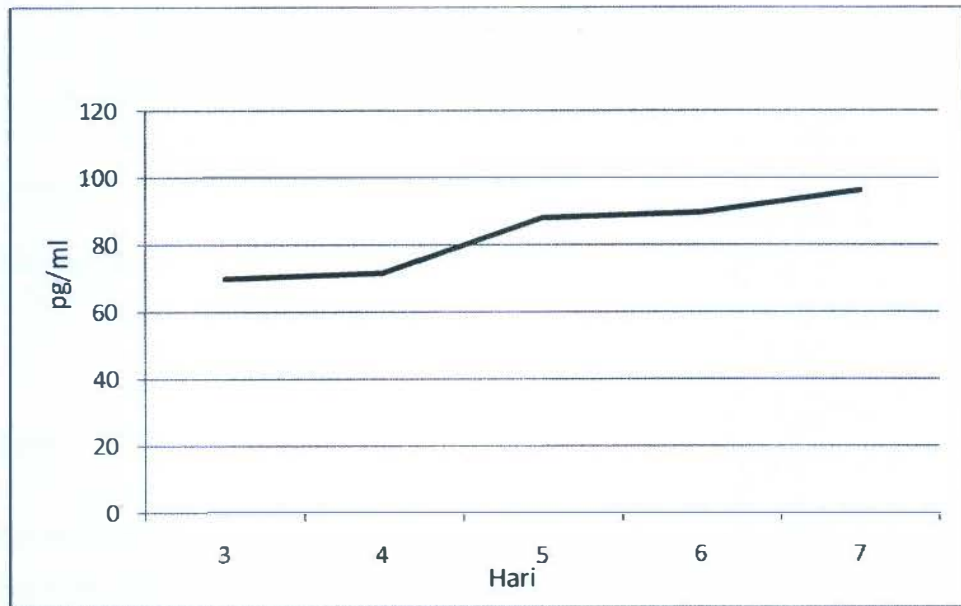
Gambar 13. Persentasi sel yang hidup pada uji Kurkumin dengan virus dengue menggunakan PBMC



Gambar 14. Persentasi sel yang hidup pada uji ekstrak kunyit dengan virus dengue menggunakan PBMC

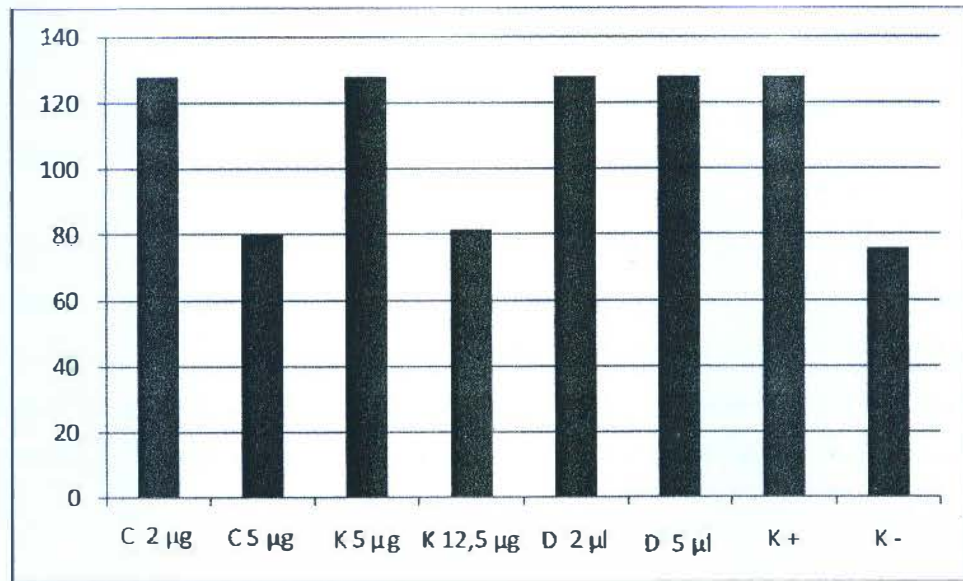
5. Uji efek Kurkumin dan ekstrak etanol kunyit terhadap sitokin TNF α

Pada uji ini supernatan hasil uji Kurkumin dan ekstrak kunyit yang diinfeksi virus dengue serotipe 3 dan ditentukan kadar TNF α yang ada pada supernatan tersebut. Untuk menentukan hari keberapa kadar TNF α meningkat, supernatant diambil setiap hari mulai hari ke 3 hingga hari 7. Berdasarkan hasil pembacaan dengan ELISA reader tampak kadar TNF α mulai meningkat pada hari 5 hingga hari 7. (Gambar 15)



Gambar 15. Kadar harian TNF α

Hasil penentuan kadar TNF α setelah diinfeksi virus dengue tampak pada gambar 16. Kadar TNF α menurun hingga 80 pg/ml ketika ditambahkan kurkumin 5 μg per ml dan ekstrak kunyit 12,5 μg per ml. Kadar 80 pg/ml mendekati kadar TNF α pada kontrol negatif dimana sel tidak diinfeksi.



Gambar 16. Kadar TNF α pada uji virus dengue dengan Kurkumin dan ekstrak kunyit

V. Pembahasan

Berdasarkan hasil pemeriksaan kadar kurkumin ekstrak kunyit pada tahun 2008, kadar kurkumin 51%, sementara hasil pemeriksaan tahun 2011 hanya tinggal 28,29%. Hal ini mestinya menjadi pertimbangan bila kurkumin akan digunakan sebagai bahan obat.

Oleh karena itu dilakukan kembali uji toksisitas untuk melihat perbandingan antara kadar kurkumin standar dengan kurkumin yang ada pada kunyit. Berdasarkan data ini dibuat perbandingan antara kedua jenis kurkumin ini untuk sama-sama diujikan pada sel dengan DMSO sebagai kontrol pelarut. Oleh karena DMSO toksik terhadap sel, maka uji dilakukan pada dosis dimana DMSO tidak toksik terhadap sel. Pada uji terhadap sel vero secara makroskopis didapatkan dosis 6 μ g kurkumin tidak merusak sel sementara pada ekstrak kunyit dosis 12,5 μ g tidak merusak sel vero. Pada hasil pemeriksaan tampak sel yang hidup lebih banyak dari pada yang mati bahkan jumlahnya lebih-banyak dibandingkan dengan kontrol hanya terdiri dari sel dan medium. Hal ini dapat disebabkan oleh karena jumlah sel yang tidak konsisten atau dapat juga disebabkan oleh kontaminasi. Kontaminasi oleh bakteri dapat menyebabkan dehidrogenase dari sel yang akan mengubah garam tertazolium menjadi formazan jumlahnya lebih

banyak karena bakteri yang berupa sel juga mengeluarkan enzim yang sama. Oleh karena itu perlu dilakukan uji ulangan untuk untuk mendapatkan hasil yang konsisten.

Perbanyak virus dengue dilakukan untuk persiapan uji yang biasanya dilakukan beberapa kali. Virus serotipe 3 yang digunakan pada penelitian ini perlu diperbanyak hingga 6 pasase, sehingga dapat menghasilkan titer hingga jutaan pfu per ml. Diperlukan titer yang tinggi untuk melihat tingkat pengurangan jumlah virus setelah ditambahkan dosis yang berbeda. Masing-masing strain virus berbeda virulensinya, oleh karena itu dilakukan pengukuran titer setiap hari untuk melihat titer tertinggi dalam 1 minggu.

Berikutnya dilanjutkan dengan uji pada PBMC. Uji dilakukan pada dosis 2 µg sebagai dosis terkecil untuk kurkumin standar dan 5 µg untuk dosis yang lebih tinggi. Sementara untuk ekstrak kunyit dosis terkecil 5 µg dan dosis yang lebih tinggi 12,5 µg. Dosis dibuat 2 tujuannya untuk melihat perubahan titer virus dan kadar sitokin TNFα bila diberikan dosis rendah dan dosis yang lebih tinggi.

Pada uji yang menggunakan *cell titer proliferation assay* melihat efek kurkumin terhadap titer virus caranya adalah dengan menentukan nilai absorben yang perubahannya menggambarkan jumlah sel yang masih hidup. Bila dilihat dari hasil uji, tidak tampak pengurangan jumlah sel pada uji virus dengue 3 dengan kurkumin dan ekstrak kunyit pada PBMC. Bahkan persentase sel yang hidup pada sel yang diuji lebih banyak dibandingkan dengan kontrol yang hanya terdiri dari sel dan medium. Bahkan kontrol positif, dimana sel hanya diinfeksi virus kemudian ditambahkan medium, tidak tampak pengurangan jumlah sel yang hidup. Hal ini dapat disebabkan oleh karena virus tidak menginfeksi sel karena jumlah sel monosit yang sedikit pada PBMC. Sementara jumlah persentase sel yang hidup pada sel uji lebih banyak. Hal ini dapat disebabkan oleh tidak konsistennya jumlah sel atau dapat juga disebabkan oleh kontaminasi bakteri, sehingga jumlah enzim dehidrogenasi lebih banyak dibandingkan dengan sel kontrol. Namun hasil ini perlu dikonfirmasi dengan *plaque assay* untuk melihat titer virus hasil uji. Bila pada uji titer virus terlihat ada virusnya, ini berarti sel PBMC dapat diinfeksi walaupun target selnya tidak begitu banyak. Namun bila pada uji *plaque* tidak ditemukan virus kemungkinan tidak terjadi infeksi karena jumlah target sel yang sedikit.

Dari supernatant hasil uji juga dilakukan pengukuran kadar TNFα, pertama untuk menentukan kapan uji TNF α idealnya dilakukan serta untuk melihat pengaruh kurkumin dan ekstrak kunyit terhadap TNF α.

Pada penelitian ini uji dihentikan pada hari ke 5, dimana kadar TNF α mulai meningkat dan titer virus juga mulai meningkat. Kadar TNF α ditentukan dengan membandingkan dengan kontrol.

Hasil uji menunjukkan pada penambahan kurkumin 5 μg kadarnya lebih rendah dibandingkan dengan penambahan kurkumin 2 μg . Demikian juga dengan penambahan ekstrak kunyit, pada pemberian ekstrak kunyit 5 μg kadar TNF α lebih tinggi dibandingkan dengan pemberian ekstrak kunyit 12,5 μg . Hasil ini mengindikasikan adanya penekanan jumlah TNF α pada dosis yang tinggi. Namun begitu perlu dilakukan beberapa kali uji untuk memastikan bahwa hasil ini bukan merupakan kebetulan semata bila hasil yang didapatkan konsisten.

Berdasarkan serangkaian hasil yang telah didapatkan sampai saat ini, belum dapat disimpulkan bagaimana efek antiviral dari kurkumin baik yang standar maupun yang berasal dari kunyit, karena uji ini masih harus dilakukan terhadap HUVEC. Demikian juga efek antiinflamasi, meskipun ada indikasi penurunan kadar TNF α dengan penambahan kurkumin dan ekstrak kunyit, pada penelitian ini akan ditentukan bagaimana penghambatan terhadap TNF α ini dapat dapat menghalang terjadinya perubahan morfologi dari sel endotel sehingga bisa mengurangi resiko terjadinya kebocoran plasma pada penderita DBD.

VI. Daftar Pustaka

1. Gubler, D. J. 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **11** (3): 480-496.
2. Soedarmo, S. P. 2004. Masalah demam berdarah dengue di Indonesia. *Dalam: Hadinegoro, S. R. H. & H. I. Satari (ed.). 2004. Demam berdarah dengue: Naskah lengkap pelatihan bagi pelatih dokter spesialis anak & dokter spesialis penyakit dalam dalam tata laksana kasus DBD.* Balai Penerbit FKUI, Jakarta: 1-13.
3. Departemen Kesehatan Indonesia. Penyakit potensial KLB/wabah : Demam Berdarah Dengue. Profil Kesehatan Indonesia Indonesia 2008. 2009:45-46.
4. Low, J.G., Oo, E.E., Tolsvensam, T., Leo, Y.S. Hibberd, M.L., et al. 2006. Early Dengue Infection and outcome Study (EDEN)-Study and Preliminary Findings. *Ann Acad Med Singapore* **35**:783-9.
5. Medin, CL. 2005. Chemokine induction by dengue virus infection : Mechanisms and role of viral protein. [Dissertation]. University of Massachusetts.
6. Dejana, E., Bazzoni, G. & Lampugnani, M.G. 1999. The role of endothelial cell to cell junctions in vascular morphogenesis. *Thromb Haemost.* **82**, 755-761.
7. Lampugnani, M.G., Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Hougen, G., Ruco, L.P. & Dejana, E. 1992. A Novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* **118**, 1511-1522.
8. Kurane, I. 2006. Dengue Haemorrhagic Fever with special Emphasis on Immunopathogenesis. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* **30**: 329-340.
9. Atrasheuskaya, A., Petzelbauer, P., Fredeking, T.M., Ignat'yev, G. 2002. Anti-TNF antibody treatment reduces mortality in experimental dengue virus infection. *FEMS Immunology and Medical Microbiology.* **35**: 33-42.
10. Li, C.J. Zhang, L.J. DeZube, B.J. Crumpacker, C.S. Pardee, A.B. 1993. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90** : 1839-1842.
10. Rothman, A.L dan Ennis, F.A. 1999. Minireview Immunopathogenesis of Dengue Haemorrhagic Fever. *Virology.* **257**:1-6
11. Kutluay, S.B. Doroghazi, J. Roemer, M.E. Triezenberg, S.J. 2008. Kurkumin inhibit herpes simplex virus immediate-early gene expression by a mechanism independent of p300/CBP histone acetyltransferase activity. *Virology.* **373** : 239-47. Available online at www.sciencedirect.com

12. Russo IH, Russo J. 1998. Role of hormones in mammary cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 3:49-61. PubMed DOI: [10.1023/A:1018770218022](https://doi.org/10.1023/A:1018770218022)
13. Anonym, 2008. Kurkumin. Wikipedia. Diunduh dari :<http://id.wikipedia.org/wiki/kurkumin>.
14. Joe, B., Vijaykumar, M., dan Lokesh, B.R. 2004. Biological properties of Kurkumin-cellular and molecular mechanisms of action. *Critical reviews in food science and nutrition*. 44: 97-1
15. Kiat, T.S., Pippen, R., Yusof, Rohana., Rahman, S.A., Ibrahim, H., Khalid, N. 2006. Screening of selected Zingiberaceae extracts for dengue-2 virus protease Inhibitory activities. *Sunway academic journal*. 3:1-7. 11
16. Dewi, B.E, Kinoshita H, Inoue H, Takasaki T, Haseba F, Kurane I, Morita K. The small interfering RNA to NS5 target gene suppresses dengue virus growth in human endothelial cells. Submitted to journal of Virological Method.
17. Dewi, B.E. Takasaki, T. Kurane, I. 2004. In vitro assessment of human endothelial cell permeability: effects of inflammatory cytokines and dengue virus infection.
18. Yamada, K. Takasaki, T. Nawa, M. Kurane, I. 2002. Virus isolation as one of the diagnostic methods for dengue infection. *J. Clin. Virol.* 24 : 203-209. *J Virol Methods*. 121(2):171-82.

DEPARTEMEN KESEHATAN RI
INSTITUT TEKNOLOGI DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
PUSAT PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

FORMULIR PENJELASAN DAN PERSETUJUAN PESERTA PENELITIAN (INFORMED & CONSENT FORMED)

Dengan hormat,

Bapak/ ibu/ saudara, saya minta ikut serta secara sukarela dalam penelitian yang berjudul :

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KUNYIT DAN SENYAWA KURKUMIN STANDAR TERHADAP INFEKSI VIRUS
DENGUE SEROTIPE 3 IN VITRO, LANJUTAN**

Pada penelitian ini Departemen Kesehatan akan melakukan penelitian untuk mempelajari efek kurkumin dan ekstrak etanol kunyit sebagai terapi untuk infeksi virus dengue.

Dalam penelitian ini akan diambil sampel darah dari individu sehat. Adapun darah yang diambil sebanyak 5 ml, tujuannya untuk dikultur kemudian menguji efek kurkumin dan ekstrak kunyit.

Pengambilan darah akan dilakukan oleh dokter dan analisis kesehatan. Resiko tidak nyaman untuk bapak/ ibu/ saudara/ adalah sedikit rasa sakit karena tusukan pada vena/pembuluh darah lengan.

Keuntungan yang akan bapak/ ibu/ saudara/ putra/ putri dapatkan dari keikutsertaan dalam penelitian ini adalah ikut serta berpartisipasi dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya untuk penanggulangan Demam Berdarah.

Sebagai ucapan terimakasih kami, apabila pengambilan darah selesai dilakukan bapak/ ibu/ saudara akan mendapatkan Rp 50.000,- guna pembelian vitamin atau bahan makanan yang berguna bagi kesehatan bapak/ ibu/ saudara.

Apabila dalam proses pemeriksaan atau pengambilan darah terjadi sesuatu yang tidak diinginkan bapak/ ibu/ saudara dapat menghubungi

Dr. Reni Herman

Alamat : Badan Litbangkes, Jl. Percetakan Negara no. 20, Jakarta 10560

Telpon : 021-4261088 ext. 326 / HP 081314659952

Bapak/ ibu/ saudara dapat menolak atau mengundurkan diri untuk tidak ikut dalam penelitian ini, hal ini sepenuhnya adalah hak bapak/ ibu/ saudara. Apabila bapak/ ibu/ saudara menyetujui untuk ikut dalam penelitian ini mohon bapak/ ibu/ saudara mau menandatangani formulir persetujuan ini.

Jakarta,/...../..... 2011

Nama:.....

Tanda tangan / cap jari peserta

..... dan tanda tangan saksi :

DEPARTEMEN KESEHATAN RI.
PUSAT BIOMEDIS dan TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN

FORMULIR PENJELASAN DAN PERSETUJUAN PESERTA PENELITIAN (*INFORMED & CONSENT FORMED*)

Dengan hormat,

Ibu/ saudara, saya minta ikut serta secara sukarela dalam penelitian yang berjudul :

**PENGARUH EKSTRAK ETANOL KUNYIT DAN SENYAWA KURKUMIN STANDAR TERHADAP INFEKSI VIRUS
DENGUE SEROTIPE 3 *IN VITRO*, LANJUTAN**

Pada penelitian ini Departemen Kesehatan akan melakukan penelitian untuk mempelajari efek kurkumin dan ekstrak etanol kunyit sebagai terapi untuk infeksi virus dengue.

Dalam penelitian ini akan diambil sampel tali pusat, tujuannya untuk dikultur kemudian menguji efek kurkumin dan ekstrak kunyit.

Pengambilan jaringan talipusat akan dilakukan oleh dokter sepanjang 3-5 cm. Tidak ada resiko untuk ibu maupun bayi, karena jaringan tali pusat diambil setelah terpisah dari bayi. Jaringan tali pusat ini nantinya akan di kultur di laboratorium virologi Badan Litbangkes untuk dilakukan pengujian efek kurkumin dan ekstrak kunyit.

Keuntungan yang akan bapak/ ibu/ saudara/ putra/ putri dapatkan dari keikutsertaan dalam penelitian ini adalah ikut serta berpartisipasi dalam pengembangan ilmu pengetahuan khususnya untuk penanggulangan Demam Berdarah.

Sebagai ucapan terimakasih kami, apabila pengambilan darah selesai dilakukan bapak/ ibu/ saudara akan mendapatkan Rp 50.000,- guna pembelian vitamin atau bahan makanan yang berguna bagi kesehatan bapak/ ibu/ saudara.

Apabila dalam proses pemeriksaan atau pengambilan darah terjadi sesuatu yang tidak diinginkan bapak/ ibu/ saudara dapat menghubungi

Dr. Reni Herman

Alamat : Badan Litbangkes, Jl. Percetakan Negara no. 20, Jakarta 10560

Telpon : 021-4261088 ext. 326 / HP 081314659952

Bapak/ ibu/ saudara dapat menolak atau mengundurkan diri untuk tidak ikut dalam penelitian ini, hal ini sepenuhnya adalah hak bapak/ ibu/ saudara. Apabila bapak/ ibu/ saudara menyetujui untuk ikut dalam penelitian ini mohon bapak/ ibu/ saudara mau menandatangani formulir persetujuan ini.

Jakarta,/..... 2011

Nama:

Tanda tangan/ cap jari peserta

Nama dan tanda tangan saksi :



Kementerian Pertanian
 Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian
Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
 Laboratorium Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik
 Jalan Tentara Pelajar No. 3 Kampus Penelitian Pertanian Citra agga, Bogor 16111
 Telepon : (0251) 8321879 Faksimile : (0251) 8327010 E-mail : balitro@depkemp.go.id



DF 5.10.1.2.

LAPORAN HASIL UJI
 No. Adm. : 170/T/LA13/IV/11

Kepada Yth.
Reni Herman
 Jakarta Timur

Kondisi/Identifikasi Contoh : Cairan
 Tanggal Penerimaan : 12 April 2011
 Tanggal Pengujian : 13 April 2011

No	Jenis Contoh	Jenis Pengujian/Pemeriksaan	Hasil Pengujian/Pemeriksaan (No. contoh/kode)	Metode Pengujian
I.	Ekstrak etanol kunyit	- Kadar kurkumin (%)	28,29	Spektrofotometer

Bogor, 18 April 2011
 Manajer Teknis


 Ma'mun, S.Si

Laporan hasil uji ini berlaku selama 90 hari sejak diterbitkan. Surat ini hanya agar memantapkan arsip administrasi. Hasil pengujian di atas hanya berdasarkan contoh uji yang bersangkutan. Laporan ini dianggap dipeliharakan kecuali atas persetujuan tertulis dari Laboratorium Pengujian Balitro.

Lampiran kedua : disimpan oleh Manajer Administrasi