



UNIVERSITAS
ISLAM
INDONESIA

P-ISSN-1693-8666
E-ISSN-2657-1420



Jurnal Ilmiah Farmasi

Scientific Journal of Pharmacy

Vol 18-**2nd** edition
AUGUST-DECEMBER 2022

Page 123-233

Now available at :

 journal.uii.ac.id/jif

Department of Pharmacy
Universitas Islam Indonesia
Jl. Kaliurang KM. 14,5
Yogyakarta 55584
Ph. (+62274) 896439 ext. 3047
email : jif@uui.ac.id

JURNAL ILMIAH FARMASI
(Scientific Journal of Pharmacy)

Head of the Journal

Head of Pharmacy Department
Universitas Islam Indonesia

Editor in Chief

Dr. apt. Arba Pramundita Ramadani, M.Sc.

Managing Editors

apt. Annisa Fitria, M.Sc.
apt. Chynthia Astiti Putri, M.Si
apt. Sista Werdyani, M.Biotech
apt. Yosi Febrianti, M.Sc.
apt. Siti Zahliyatul Munawiroh, Ph.D.
apt. Dian Medisa, MPH
Dr. apt. Rochmy Istikharah, M.Sc.
Dr. apt. Oktavia Indrati, M.Sc.

Editorial Boards

apt. Pinus Jumaryatno, M.Phil., Ph.D.
Prof. Dr. Is Fatimah
Prof. Patrick A. Ball
Dr. Hana Morrissey
Prof. Muhammad Taher
Assoc. Prof. Che Suraya Zin
Assoc. Prof. Deny Susanty
Dr. Mathew Bertin
Dr. Mohamed Haddad
Dr. Tommy Julianto
Prof. Dr. Abdul Rohman
Dr. Ronny Martien

Reviewers

Dr. apt. Vitarani Dwi Ananda N., M.Si.	Prof. apt. Trim Murti Andayani, Ph.D.
apt. Suci Hanifah, Ph.D.	Dr. apt. Susi Ari Kristina, M.Kes.
Dr. apt. Farida Hayati, M.Si.	Dr. apt. Bangunawati Rahajeng, M.Si.
Prof. Dr. apt. Yandi Syukri, M.Si.	Salmahaminati, M.Sc., Ph.D.
apt. Saepudin, M.Si., Ph.D.	Dr. F.V. Lanny Hartanti, M.Si.
Dr. apt. Lutfi Chabib, M.Sc.	Dr. dr. Isnatin Miladiyah, M.Kes.
apt. M. Hatta Prabowo, M.Si., Ph.D.	Dr. apt. Gunawan Pamudji Widodo
apt. Dimas Adhi Pradhana, M.Sc.	Dr. apt. Rifki Febriansah, M.Sc.
Dr. Tatang Shabur Julianto	Dr. apt. Purwanto, M.Sc., Ph.D.

Publisher

Department of Pharmacy
Faculty of Mathematics & Natural Sciences
Universitas Islam Indonesia

Address

Department of Pharmacy UII
Jl. Kaliurang km 14,5 Sleman Yogyakarta 55584
Phone. (+62274) 896439 ext. 3047
Email: jif@uii.ac.id
<https://journal.uui.ac.id/IIF>

TABLE OF CONTENTS

Editorial team	i
Table of contents	ii
Preface	iv
Cost analysis of patients with Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCARs) Qarriy 'Aina Urfiyya, Musa Fitri Fatkhiya, Dyah Aryani Perwitasari, Sri Awalia Febriana, Woro Supadmi	123-133
Review: Randomized Clinical Trial (RCT) study of influenza vaccine in children 6 to 35 months of age Cecep Suhandi, Cheryl Alodya, Abednego Kristande, Rano K. Sinuraya	134-144
Evaluation of single and combination chemotherapy agents in patients with metastatic breast cancer Martanty Aditya, Godeliva Adriani Hendra, Suhul Raos Kumawula Ing Gustyas	145-152
Screening of <i>Eurycoma longifolia</i> compounds against the cell cycle by docking through cyclin interaction Samsul Hadi, Khoerul Anwar, Noer Komari, Desiya Ramayanti Azhara, Diah Aulia Rosanti	153-163
Potential of the superoxide dismutase enzyme from corn kernels (<i>Zea mays</i> L.) for the repair of 3T3 fibroblast cells exposed to ultraviolet A light Mustika Endah Pratiwi, Jason Merari Peranginangin, Isna Jati Asiya, Ana Indrayati	164-177
<i>In vivo</i> nephroprotective effect of herbal plants towards gentamicin-induced nephrotoxicity: A literature review Erlyn Dwi Cahyani, Rahmad Aji Prasetya, Izzatul Ma'rifah, Deby Nanda Tri Widia, Tiara Sri Dewi, Sulfa Putri	178-191
Interferons and its use in children with COVID-19: a narrative review Chairunnisa, Suharjono	192-204
Mechanism and immunomodulator bioactive compounds of <i>Phyllanthus niruri</i> (meniran) Uzulul Hikmah, Asih Triastuti	205-218
Characterization and determination of total flavonoid content of extract and fraction of papaya jantan flower (<i>Carica papaya</i> L.) using UV-Vis spectrophotometry Dilla Nur Pratiwi, Nastiti Utami, Diah Pratimasari	219-233

PREFACE

Alhamdulillah, all praises are due to Allah Ta'ala, who has bestowed the opportunity and strength so that the **Scientific Journal of Pharmacy (JIF) Vol. 18 No. 1 of 2022** can be published. This issue contains nine articles, five on the Pharmaceutical Science topic and four from the Clinical Pharmacy scope. The article presented in the Clinical Pharmacy scope reviews the effectiveness of therapy in patients in hospitals and the evaluation of pharmacist services in health facilities. Meanwhile, papers in the Pharmaceutical Science area include testing drugs from natural ingredients and their approach through in silico methods.

We hope that all the articles presented in this issue provide benefits and add insight to readers regarding the development of research in pharmacy and health. We eagerly await suggestions and constructive criticism from readers. We also invite readers to participate in submitting articles to be published in this journal. For interested readers, they can pay attention to the submission guidelines and immediately send the manuscript to our online journal system (OJS)

Finally, we wish you happy reading and our apology for any errors and omissions in the publication of this issue.

Yogyakarta, December 2022
Editor in Chief

Cost analysis of patients with Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCARs)

Analisis biaya pasien *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs)

Qarriy 'Aina Urfiyya^{1*}, Musa Fitri Fatkhiya², Dyah Aryani Perwitasari², Sri Awalia Febriana³, Woro Supadmi²

¹Akademi Farmasi Indonesia Yogyakarta, Yogyakarta, Indonesia

²Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta, Indonesia

³Departemen Dermatologi dan Venerologi Fakultas Kedokteran, Universitas Gadjah Mada

* Corresponding author: qarriyaina@gmail.com

Abstract

Background: Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCARs), including Stevens Johnson Syndrome (SJS), Toxic Epidermal Necrolysis (TEN) and Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptom (DRESS), were the idiosyncratic reactions most commonly caused by drugs which has an impact on increasing the patient's financial burden.

Objectives: This study aims to determine the highest cost component and the illness cost in patients suffering from *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs).

Methods: This study was an analytic observational study with a cross sectional design. We collected direct medical cost, direct non-medical cost and indirect cost for inpatients with SJS, TEN and DRESS at Dr. Sardjito Yogyakarta Hospital from 2014-2018, retrospectively. We defined the highest cost component and the illness cost in patients with SCARs based on the societal perspective.

Results: The highest cost component for SJS, and TEN patients were obtained in the health professional services (24,1% and 25,2%, respectively), meanwhile the highest cost component for DRESS patients was the cost of drug (20,2%). The total illness cost of 47 SCARs patients (22 SJS patients, 6 TEN patients, and 19 DRESS patients) was IDR 666.615.321 with the highest average cost for TEN patients, followed by SJS and DRESS (IDR 16.510.595, IDR 14.205.545, and IDR 13.445.555, respectively).

Conclusions: The highest cost component was the health professional services in SJS and TEN patients, and the cost of medicine for DRESS patients. The management of SCARs required considerable cost, and it is still being financial burden on the patients.

Keywords: *Cost analysis, societal perspective, severe cutaneous adverse reactions*

Intisari

Latar belakang: *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs) termasuk *Stevens Johnson Syndrome* (SJS), *Toxic Epidermal Necrolysis* (TEN) dan *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptom* (DRESS), merupakan reaksi idiosinkratik yang paling sering disebabkan oleh obat yang berdampak pada peningkatan beban keuangan pasien.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui komponen biaya terbesar dan biaya perawatan pada pasien yang mengalami *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs).

Metode: Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain *cross sectional*. Pengumpulan data biaya medik langsung, biaya non medik langsung dan biaya tidak langsung pada pasien rawat inap dengan SJS, TEN dan DRESS di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta tahun 2014-2018, secara retrospektif. Kami menghitung komponen biaya tertinggi dan biaya perawatan pasien dengan SCARs berdasarkan perspektif masyarakat.

Hasil: Komponen biaya tertinggi pada pasien SJS dan TEN adalah biaya jasa profesional kesehatan (24,1% and 25,2%), sedangkan komponen biaya tertinggi pada pasien DRESS adalah biaya obat (20,2%). Total biaya

perawatan 47 pasien SCARs (22 pasien SJS, 6 pasien TEN, dan 19 pasien DRESS) adalah Rp 666.615.321, dengan biaya rata-rata tertinggi pada pasien TEN, diikuti SJS dan DRESS (Rp 16.510.595, Rp 14.205.545, and Rp 13.445.555)

Kesimpulan: Komponen biaya terbesar adalah biaya jasa professional kesehatan pada pasien SJS dan TEN, serta biaya obat bagi pasien DRESS. Penatalaksanaan SCARs membutuhkan biaya yang cukup besar, dan masih menjadi beban keuangan bagi pasien.

Kata kunci : *Cost analysis, societal perspective, severe cutaneous adverse reactions*

1. Pendahuluan

Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCARs) merupakan reaksi idiosinkratik yang paling sering disebabkan karena obat. Kejadiannya jarang namun dapat menyebabkan kecacatan atau kematian dengan angka mortalitas 10-40% akibat SJS/TEN dan 10% akibat DRESS (Lin *et al.*, 2014). SCARs yang akan dibahas pada artikel ini adalah *Stevens Johnson Syndrome* (SJS), *Toxic Epidermal Necrolysis* (TEN) dan *Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptom* (DRESS). Dilaporkan dari Januari 2006 sampai Desember 2015, terdapat 810 kasus SJS/TEN, serta 246 kasus DRESS, dengan 53 kasus SJS/TEN dan 12 kasus DRESS yang berakibat fatal (Teng, 2011). Dengan demikian sulit untuk mengumpulkan data biaya SCARs karena kejadiannya jarang.

SCARs bukan hanya masalah kesehatan tetapi juga dapat meningkatkan beban finansial bagi individu yang terkena dampak. Sebagian besar pasien akan mengunjungi departemen rawat jalan setelah dirawat inap, dengan dokter utama seperti internis dan dermatologis. Beberapa pasien juga mengunjungi departemen optalmologi, urologi, neuropsikiatri, serta departemen lainnya yang akan meningkatkan beban biaya pasien. Penelitian di Korea menunjukkan biaya perawatan satu kasus SCARs (SJS, TEN, dan DRESS) sebanding dengan biaya perawatan lima penyakit umum termahal secara nasional (Yang *et al.*, 2019). Penelitian yang dilakukan oleh Yang *et al.*, (2019) di Korea selama periode 2005-2010, rata-rata biaya SJS, TEN dan DRESS adalah Rp 10.624.885, dengan komponen biaya terbesar adalah biaya rawat inap, sebesar Rp 9.943.441 (Yang *et al.*, 2019). Sebelumnya penelitian Abdulah (2017) di Indonesia terkait biaya pasien SJS, *overlap* SJS/TEN dan TEN berdasarkan perspektif masyarakat menyimpulkan biaya rata-rata pasien per hari SJS Rp 1.681.181, *overlap* SJS/TEN Rp 1.966.700, dan TEN Rp 2.289.797 (Abdulah *et al.*, 2017). Penelitian Abdulah (2017) menilai biaya medik langsung dan biaya tidak langsung pada pasien SJS, TEN berdasarkan perspektif masyarakat, namun belum memperhitungkan biaya non medik langsung serta biaya pada pasien DRESS, sehingga tujuan penelitian ini untuk mengetahui komponen biaya terbesar dan biaya perawatan pasien SCARs (SJS, TEN dan DRESS) menggunakan biaya medik langsung, biaya non medik langsung dan biaya tidak langsung, berdasarkan perspektif masyarakat.

2. Metodologi penelitian

2.1 Deskripsi bahan dan teknik pengumpulan sampel

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan desain *cross sectional* dan pengambilan data secara retrospektif. Sampel pada penelitian ini adalah pasien dengan diagnosa SJS, TEN, DRESS yang menjalani rawat inap di RSUP Dr. Sardjito periode 2014-2018. Metode pengambilan sampel menggunakan *purposive sampling* dengan pembatasan tahun dan kriteria inklusi-eksklusi, dikarenakan jumlah pasien yang terbatas. Kejadian SCARs bukan karena obat, pasien yang dinyatakan pulang paksa, rujuk atau meninggal, pasien dengan kelas perawatan VIP, pasien yang mendapatkan terapi immunoglobulin intravena, dan pasien yang tidak bersedia menjadi subjek penelitian dieksklusi dari penelitian ini. Terdapat 111 pasien rawat inap dengan kode diagnosa *International Classification of Diseases 10 (ICD-10)* SJS (L51.1), TEN (L51.2), DRESS (L27.0) di RSUP Dr. Sardjito selama periode Januari 2014 sampai dengan Desember 2018. Sebanyak 47 pasien memenuhi kriteria inklusi (22 pasien SJS, 6 pasien TEN, dan 19 pasien DRESS).

2.2 Penjelasan mengenai deskripsi jalannya penelitian

Sampel penelitian merupakan pasien umum, Askes maupun BPJS, dengan data biaya medik langsung, biaya non medik langsung serta biaya tidak langsung, tanpa memperhitungkan *cost sharing patient* atau biaya yang dikeluarkan pasien untuk pengobatan, sehingga perspektif yang digunakan adalah perspektif masyarakat. Pengambilan data melalui penelusuran rekam medis, biaya medik langsung dibagian INSTI (Instalasi Teknologi Informasi) RSUP Dr. Sardjito. Biaya medik langsung meliputi biaya administrasi, obat, alat kesehatan, jasa profesional kesehatan, kamar, laboratorium, pemeriksaan penunjang, tindakan operatif, dan lain-lain. Biaya non medik langsung meliputi biaya transportasi dan makan keluarga pasien selama di Rumah Sakit. Biaya tidak langsung adalah biaya penurunan produktivitas pasien. Data biaya non medik langsung dan biaya tidak langsung dengan melakukan wawancara pasien. Lembar pengambilan data biaya pasien menggunakan *Case Report Form (CRF)* farmakoekonomi.

Persetujuan keikutsertaan pasien menggunakan *informed consent*. Wawancara pasien dilakukan untuk mendapatkan data transportasi yang digunakan pasien, serta jumlah keluarga yang menemani pasien selama di Rumah Sakit. Persetujuan etik penelitian ini dari Komite Etik Penelitian Medis dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada-RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, dengan nomor persetujuan etik KE/FK/1111/EC 19 Oktober 2018.

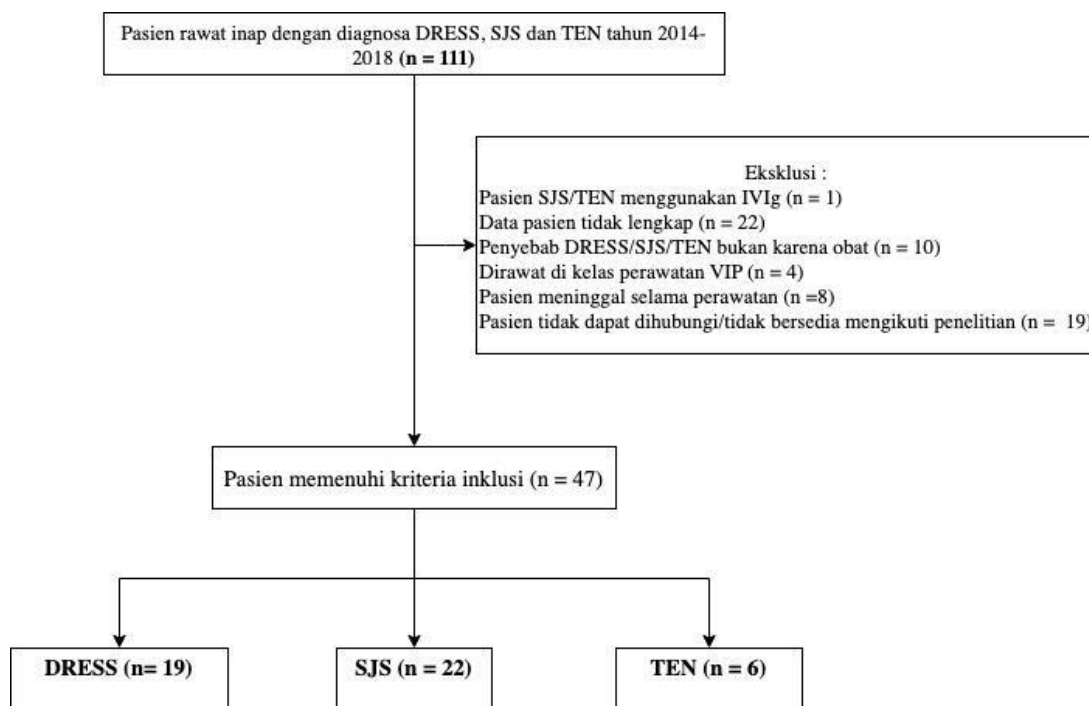
Biaya transportasi dihitung dengan memperkirakan jarak rumah dan harga bensin pada tahun sakit. Biaya makan dihitung dari jumlah keluarga yang menemani pasien dan biaya makan selama

pasien dirawat di Rumah Sakit. Biaya penurunan produktivitas dihitung dari lama rawat inap dan pendapatan harian pasien. Biaya makan dan pendapatan pasien berdasarkan Badan Pusat Statistik Indonesia pada masing-masing daerah. Asumsi biaya makan dan biaya penurunan produktivitas ini digunakan untuk mengurangi bias, karena pengambilan data secara retrospektif. Dilakukan *discounting* atau penyesuaian nilai dengan perhitungan *future value* pada data biaya tahun 2014-2017 untuk menggambarkan nilainya pada tahun 2018. Analisa dilakukan pada komponen biaya terbesar dan biaya perawatan pasien SCARs (SJS, TEN dan DRESS).

Dilakukan analisis statistik dengan *SPSS for Windows versi 22*. Analisis *kruskal-wallis* digunakan untuk membandingkan usia, lama rawat inap dan biaya pasien SJS, TEN dan DRESS. Analisis *chi-square* digunakan untuk membandingkan jenis kelamin. Secara statistik berbeda signifikan bila nilai ρ kurang dari 0,05.

3. Hasil dan pembahasan

Dari 111 pasien rawat inap dengan diagnosa DRESS, SJS dan TEN tahun 2014-2018 di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta, 47 pasien (19 DRESS, 22 SJS, 6 TEN) memenuhi kriteria inklusi. Bagan 1 menggambarkan proses seleksi sampel.



Gambar 1. Proses seleksi subjek penelitian

3.1 Karakteristik demografi pasien Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCARs)

Karakteristik demografi pasien yang diamati pada penelitian ini adalah jenis kelamin, usia, lama rawat inap, penggunaan terapi steroid dan agen penyebab SCARs. Karakteristik demografi dari 47 pasien ditampilkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Karakteristik demografi pasien *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs) RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta periode 2014-2018

Karakteristik	Jumlah pasien (%)			ρ value
	SJS (n=22)	TEN (n=6)	DRESS (n=19)	
Jenis Kelamin				0,656
Laki-laki	8 (33,4)	0 (0)	7 (37)	
Perempuan	14 (63,6)	6 (100)	12 (63)	
Usia (Rata-rata \pm SD)	32,09 \pm 16,923	37,67 \pm 11,570	41,5 \pm 11,2	0,054
Lama Rawat Inap (Rata-rata \pm SD)	11,96 \pm 5,904	12,5 \pm 3,674	10,5 \pm 6,9	0,361
Penggunaan Steroid	22 (100)	6 (100)	19 (100)	
Agen Penyebab*				
Allopurinol	3 (7,5)	0 (0)	0 (0)	
Antibiotik	10 (25)	3 (20)	13 (62)	
NSAID	4 (10)	2 (13)	1 (5)	
OAT	0 (0)	0 (0)	4 (19)	
ARV	3 (7,5)	1 (7)	1 (5)	
Anti konvulsan	8 (20)	0 (0)	2 (9)	
Obat Lainnya	12 (30)	9 (60)	0 (0)	

Keterangan: NSAID, *non-steroid anti-inflammatory drug*; OAT, obat anti tuberkulosis; ARV, antiretroviral; DRESS, *drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms*; SJS, *stevens johnson syndrome*; TEN, *toxic epidermal necrolysis*; obat lainnya, gemfibrozil, vitamin B12, parasetamol, domperidon, ambroxol, tramadol, diazepam, bromhexin; *satu pasien dapat lebih dari satu agen penyebab, $\rho < 0,05$ data berbeda signifikan.

Pada Tabel 1 dapat dilihat persentase kejadian SJS (63,6%), TEN (100%) dan DRESS (63%) pada perempuan lebih besar dibandingkan laki-laki, namun tidak berbeda signifikan secara statistik. Hasil ini sesuai dengan penelitian Velasco-Tirado *et al.* (2018) yang menyebutkan bahwa SJS/TEN lebih banyak muncul pada wanita dibandingkan laki-laki, dengan rasio laki-laki dibanding perempuan 0,6 (Velasco-Tirado *et al.*, 2018). Penelitian Rahmawati dan Diah (2016) di RSUD Dr. Soetomo Surabaya juga menunjukkan jenis kelamin terbanyak pada pasien SJS dan TEN adalah perempuan (75%) (Rahmawati & Indramaya, 2016). Penelitian di India dan Jerman juga melaporkan angka kejadian SJS dan TEN pada perempuan lebih banyak dibandingkan dengan laki-laki (Patel *et al.*, 2013; Rahmawati & Indramaya, 2016). Penelitian lain di UK tahun (2017) menunjukkan angka kejadian SJS/TEN pada perempuan (51,7%) lebih besar dibandingkan dengan laki-laki (48,3%) (Frey *et al.*, 2017). Namun penelitian oleh Wang dan Mei (2017) menunjukkan bahwa jenis kelamin ini tidak berkaitan dengan mortalitas pada pasien SJS/TEN (Wang & Mei, 2017).

Rata-rata usia pasien SJS, TEN dan DRESS pada penelitian ini adalah 32,09; 37,67; dan 41,5 tahun (Tabel 1). Penelitian Abdulah *et al.* (2017) di Rumah Sakit daerah Jawa Barat Indonesia, rata-

rata usia pada pasien SJS adalah $30,15 \pm 16,45$ tahun, sedangkan rata-rata usia pasien TEN adalah $25,45 \pm 15,82$ tahun (Abdulah *et al.*, 2017). Hasil penelitian ini, rata-rata usia pasien DRESS lebih tua dari pasien TEN dan SJS, tetapi tidak berbeda signifikan secara statistik. Penelitian Yang *et al.* (2019) di Korea, rata-rata usia pasien SJS dan TEN lebih tua apabila dibandingkan dengan penelitian di Indonesia, dengan rata-rata usia pasien SJS adalah $34,3 \pm 21,9$ tahun, dan pasien TEN adalah $42,8 \pm 27$ tahun (Yang *et al.*, 2019). Penelitian lain melaporkan angka kejadian dan pertambahan usia sebanding. Semakin tinggi usia semakin besar resiko mengalami kelainan kulit seperti SJS dan TEN, dikarenakan semakin tua usia seseorang, semakin banyak obat yang dikonsumsi dan semakin besar resiko interaksi obat (Rahmawati & Indramaya, 2016).

Rata-rata lama rawat inap pasien TEN (12,5 hari), lebih lama dibandingkan pasien SJS (11,96 hari) dan DRESS (10,5 hari), namun tidak berbeda signifikan secara statistik. Hasil ini sama dengan penelitian yang dilakukan oleh Velasco-Tirado *et al.* (2018) di Spanyol, yang menunjukkan rata-rata rawat inap pasien TEN lebih lama dibandingkan dengan pasien SJS, dan secara statistik terdapat perbedaan signifikan pada lama rawat inap pasien SJS ($12,9 \pm 13,57$ hari) dan pasien TEN ($22,01 \pm 28,46$ hari) (Velasco-Tirado *et al.*, 2018).

Obat penyebab utama pada pasien SJS adalah antibiotik (25%), diikuti anti konvulsan (20%) dan NSAID (10%), pada pasien TEN adalah antibiotik (20%), diikuti NSAID (13%) dan ARV (7%), sedangkan pada pasien DRESS adalah golongan antibiotik (62%) diikuti anti tuberkulosis (19%) dan anti konvulsan (9%). Golongan obat yang paling sering menyebabkan kejadian SCARs adalah antibiotik, baik pada pasien SJS, TEN maupun DRESS (Tabel 1). Antibiotik penyebab SCARs (SJS, TEN dan DRESS) pada penelitian ini adalah amoxicillin, cefadroxil, ceftazidime, cefuroxime, cefixime, ceftriaxone, cefotaxim, kotrimoksazol, dan ciprofloxacin. Antibiotik dengan jumlah kasus terbesar penyebab SCARs adalah cefixim, dengan 3 kasus SJS, 3 kasus TEN dan 2 kasus DRESS. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan bahwa antibiotik merupakan penyebab kasus SJS, TEN dan DRESS dengan kasus terbanyak dan paling umum terjadi (Wang & Mei, 2017; Wolfson *et al.*, 2019).

Seluruh pasien SCARs (SJS, TEN dan DRESS) mendapatkan terapi steroid (Tabel 2), baik injeksi maupun oral sebagai terapi spesifik. Selain pemberian terapi spesifik, pasien SCARs juga mendapatkan terapi suportif dan terapi topikal berdasarkan kondisi klinis masing-masing pasien. Terapi suportif yang diberikan diantaranya adalah cairan elektrolit dan protein, antihistamin serta antibiotik oral. Terapi topikal yang diberikan diantaranya tetes mata emolien, antibiotik salep kulit dan tetes mata antibiotik. Kortikosteroid sistemik yang digunakan di RSUP Sardjito adalah

deksametason injeksi 5 mg/mL, metil prednisolon injeksi 125 mg, metil prednisolon tablet 16 mg, metil prednisolon tablet 8 mg, dan prednison tablet 5 mg. Penelitian di India, seluruh pasien menerima kortikosteroid sistemik seperti deksametason (64,44%), prednisolon (31,11%) serta deksametason dan prednisolon *pulse therapy* (8,88%) (Lihite *et al.*, 2016). Penelitian Chantaphakul *et al.* (2015) menyimpulkan penggunaan steroid lebih banyak digunakan pada kelompok pasien dengan SJS dan TEN yang bertahan dibandingkan dengan kelompok pasien yang tidak bertahan, dan penggunaan kortikosteroid pada pasien SJS/TEN dapat mencegah komplikasi mata (Chantaphakul *et al.*, 2015).

3.2 Komponen biaya pasien Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCARs)

Pada Tabel 2, komponen biaya terbesar pada pasien SJS (24,1%) dan TEN (25,2%) adalah biaya jasa profesional kesehatan, yaitu sebesar Rp 75.171.912 dan Rp 24.309.830, sedangkan pada pasien DRESS komponen biaya terbesar adalah biaya obat (20,2%), yaitu Rp 62.210.100. Biaya jasa profesional kesehatan meliputi tindakan di IGD dan ruang perawatan, yang terdiri dari jasa dokter, perawat dan ahli gizi yang dapat dipengaruhi oleh kelas perawatan, lama rawat inap, penyakit komorbid, penyakit komplikasi serta jumlah dokter yang menangani.

Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian Abdulah *et al.* (2017) di Indonesia, dimana komponen biaya terbesar pasien SJS dan TEN adalah biaya kamar dan administrasi (43%; 32%), diikuti biaya penunjang medis (20%; 25%), dan biaya obat terapi (15%; 17%) (Abdulah *et al.*, 2017). Perbedaan hasil penelitian ini disebabkan karena pengelompokan kategori biaya yang berbeda. Pada penelitian Abdulah *et al.* (2017), biaya kamar dan administrasi merupakan jumlah biaya kamar serta biaya jasa pelayanan (jasa dokter, perawat, farmasi dan ahli gizi), sehingga biaya menjadi lebih besar dibandingkan dengan komponen biaya lainnya. Hasil ini juga berbeda dengan penelitian Yang *et al.* (2019) di Korea menunjukkan biaya kamar (32%) merupakan komponen biaya terbesar dari total biaya perawatan kesehatan, diikuti oleh biaya pengobatan (25%), dan biaya laboratorium (20%) (Yang *et al.*, 2019).

Tabel 2. Komponen biaya pasien *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs) di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta periode 2014-2018

Komponen biaya	Jumlah biaya (Rp) (%)		
	SJS (n=22)	TEN (n=6)	DRESS (n=19)
Biaya medik langsung			
Biaya obat	53.111.108 (17)	19.779.351 (20,5)	62.210.100 (20,2)
Biaya jasa profesional kesehatan	75.171.912 (24,1)	24.309.830 (25,2)	56.797.000 (19,9)
Biaya kamar+administrasi	54.851.937 (17,6)	10.482.897 (10,9)	39.701.000 (14,5)
Biaya alat kesehatan	24.826.573 (7,9)	12.283.051 (12,8)	22.136.086 (7,3)
Biaya tindakan operatif	1.404.590 (0,4)	0 (0)	0 (0)

Komponen biaya	Jumlah biaya (Rp) (%)		
	SJS (n=22)	TEN (n=6)	DRESS (n=19)
Biaya laboratorium	65.349.925 (20,9)	19.109.519 (19,8)	47.616.500,00 (18,3)
Biaya pemeriksaan penunjang	11.296.181 (3,6)	901.452 (0,9)	2.916.800,00 (1,1)
Biaya lain*	2.895.266 (0,5)	1.346.585 (1,4)	7.684.300,00 (3)
Biaya non medik langsung			
Biaya transportasi	2.302.219 (0,7)	825.997 (0,9)	2.332.518 (0,7)
Biaya makan	6.284.908 (2)	1.784.266 (1,9)	4.005.968,71 (1,6)
Biaya tidak langsung			
Biaya penurunan produktivitas	16.499.757 (5,3)	5.464.973 (5,7)	12.397.782,71 (4,8)

Keterangan : DRESS, *drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms*; SJS, *Stevens johnson syndrome*; TEN, *toxic epidermal necrolysis*; biaya merupakan jumlah masing-masing komponen biaya seluruh pasien; *biaya lain seperti tarif penunggu pasien dan rohaniawan.

Biaya obat pada penelitian ini juga cukup besar, baik pada pasien SJS (17%), TEN (20,5%) maupun DRESS (20,2%). Hasil ini menunjukkan bahwa obat merupakan kategori biaya yang signifikan dalam anggaran farmasi di rumah sakit pada terapi SCARs, khususnya pada pasien DRESS. Biaya obat meliputi biaya terapi untuk mengatasi SCARs, biaya obat komorbid, biaya obat komplikasi SCARs dan biaya efek samping obat. Biaya terapi SCARs meliputi terapi spesifik, suportif dan topikal. Terapi spesifik yang digunakan pasien adalah kortikosteroid, baik oral maupun intravena. Terapi suportif yang digunakan pada penelitian ini diantaranya elektrolit, antibiotik oral, antihistamin dan analgetik-antipiretik, serta perawatan topikal untuk mata, mulut dan kulit.

Besarnya biaya obat SCARs disebabkan karena penggunaan cairan elektrolit dan asam amino intravena, perawatan topikal pasien dan biaya komplikasi pasien. Cairan intravena digunakan secara terus-menerus untuk menjaga keseimbangan cairan dan elektrolit pasien, cairan elektrolit yang digunakan seperti infus ringer laktat, NaCl 0,9%, dextrose, futrolit, aminofluid, tutofusin dan clinimix. Komplikasi SCARs yang terjadi diantaranya adalah sepsis, gagal ginjal akut, infeksi saluran kemih, kandidiasis dan hiponatremia. Komorbid SCARs pada penelitian ini adalah HIV, epilepsi dan hipertensi, sedangkan efek samping adalah hiperglikemia akibat penggunaan kortikosteroid.

Biaya laboratorium sebesar 20,9% pada pasien SJS, 19,8% pada pasien TEN dan 18,3% pada pasien DRESS. Besarnya hasil biaya laboratorium ini karena pada pasien SCARs dapat terjadi kehilangan cairan, ketidakseimbangan elektrolit, dan abnormalitas hematologi (Purnamawati *et al.*, 2016), sehingga perlu dilakukan tes laboratorium secara berkala. Review sistematik pada pasien SJS/TEN ditemukan parameter laboratorium yang abnormal, seperti abnormalitas pada hematologi (41,54%), fungsi hati (39,43%), elektrolit (7,04%), hiperglikemia (6,33%) dan fungsi ginjal (5,63%) (Patel *et al.*, 2013).

3.3 Biaya perawatan pasien *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs)

Pada Tabel 3 dapat dilihat rata-rata biaya per pasien TEN (Rp 16.510.595) lebih besar dari pasien SJS (Rp 14.205.545) dan pasien DRESS (Rp 13.445.555), namun tidak berbeda signifikan secara statistik ($p > 0,05$). Hasil penelitian ini sama dengan penelitian-penelitian sebelumnya di Korea, India dan Spanyol yang menyatakan rata-rata biaya per pasien TEN lebih tinggi dibandingkan pasien SJS dan DRESS (Yang *et al*, 2017; Patel *et al*, 2013; Velasco-Tirado, 2018). Hasil penelitian ini juga sama dengan penelitian Abdulah (2017) di Indonesia bahwa rata-rata biaya per pasien TEN lebih besar dari SJS (Abdulah *et al.*, 2017).

Biaya perawatan pasien TEN lebih tinggi dibandingkan pasien SJS, dapat disebabkan karena luas detasemen epidermis pada TEN (lebih dari 30% luas permukaan tubuh) lebih besar dibandingkan detasemen epidermis pada SJS (kurang dari 10% permukaan tubuh). Tingkat keparahan yang lebih tinggi dan komplikasi penyakit yang lebih banyak terjadi pada pasien TEN, hal ini dapat menjelaskan lebih tingginya biaya perawatan pasien TEN dibandingkan dengan SJS. Biaya penanganan pasien DRESS juga cukup besar. Kriteria DRESS menurut RegiSCAR salah satunya adalah keterlibatan minimal satu organ dalam. Keterlibatan organ yang sering ditemukan adalah organ hati dan ginjal. Gangguan pada hati berupa hepatitis, nekrosis hati dan gagal hati, sedangkan gangguan ginjal yang paling sering ditemukan adalah nefritis interstisial (Manchanda *et al.*, 2018). Keparahan dan keterlibatan multi organ pada pasien DRESS yang menyebabkan besarnya biaya pasien, terutama pada biaya obat.

Tabel 3. Biaya perawatan pasien *Severe Cutaneous Adverse Reactions* (SCARs) di RSUP Dr. Sardjito Yogyakarta periode 2014-2018

Jenis biaya	Biaya (Rp)			<i>P value</i>
	SJS n = 22	TEN n = 6	DRESS n = 19	
Biaya Medik Langsung	287.502.905 (92)	88.212.685 (91,6)	236.729.269 (91,8)	
Biaya Non Medik Langsung	8.519.327 (2,7)	2.617.619 (2,7)	6.338.487 (2,5)	
Biaya Tidak Langsung	16.499.757 (5,3)	5.464.973 (5,7)	16.499.757 (5,7)	
Total Biaya	312.521.989 (46,8)	96.295.277 (14,5)	257.798.055 (38,7)	666.615.321 (100)
Rata-Rata Biaya Per Pasien (Mean ± SD)	14.205.545 ± 9.006.098	16.510.595 ± 5.034.381	13.445.555 ± 8.341.922	0.534

Keterangan : DRESS, *drug reaction with eosinophilia and systemic symptoms*; SJS, *Stevens johnson syndrome*; TEN, *toxic epidermal necrolysis*; biaya menggunakan mata uang rupiah (Rp); rata rata biaya ditampilkan dalam rata-rata ± standar deviasi, $p < 0,05$ data berbeda signifikan.

Pada Tabel 3, total biaya terbesar adalah SJS (46,8%), diikuti DRESS (38,7%) dan TEN (14,5%) dari total biaya SCARs. Hasil penelitian ini berbeda dengan penelitian di Korea dari tahun 2005 sampai 2010 yang menyimpulkan total biaya perawatan pasien TEN (49,6%) lebih besar dari SJS (27,5%) dan DRESS (22,9%) (Yang *et al*, 2017). Perbedaan pada kedua negara ini dapat disebabkan karena perbedaan jumlah pasien pada penelitian dan perbedaan penanganan SCARs pada masing-masing negara.

Biaya penanganan SCARs pada penelitian ini terhitung cukup besar apabila dibandingkan dengan rata-rata pengeluaran masyarakat Indonesia. Rata-rata pengeluaran per kapita masyarakat Indonesia tahun 2017 sebesar Rp 10.664.000 (Kemenkes_RI, 2018), artinya biaya perawatan satu kasus SCARs lebih besar dari rata-rata pengeluaran masyarakat Indonesia, sehingga biaya SCARs ini dinilai cukup berpengaruh signifikan pada keuangan individu yang terkena dampak.

Penelitian ini telah dilaksanakan sesuai prosedur dan rancangan metode penelitian, namun penelitian ini masih memiliki keterbatasan. Pertama, belum dapat mengelompokkan biaya berdasarkan diagnosa SJS, *overlap* SJS/TEN dan TEN, dikarenakan kode ICD *overlap* SJS/TEN belum tersedia di RSUP Dr. Sardjito. Kedua, penelitian ini dilakukan di satu rumah sakit, hasilnya tidak secara akurat mewakili situasi di rumah sakit lain dan tidak dapat merepresentasikan kondisi pada negara lainnya, sirenian perbedaan dalam sistem pelayanan kesehatan. Meskipun demikian, penelitian ini dapat meningkatkan kesadaran akan dampak biaya yang dikeluarkan pasien terkait dengan penanganan DRESS, SJS dan TEN.

4. Kesimpulan

Komponen biaya terbesar pasien SJS dan TEN adalah biaya jasa profesional kesehatan (24,1% dan 25,2%), sedangkan komponen biaya terbesar pada pasien DRESS adalah biaya obat (20,2%). Total biaya perawatan SCARs yaitu Rp 666.615.321. Penatalaksanaan SCARs membutuhkan biaya yang cukup besar dan masih menjadi beban keuangan bagi pasien.

Daftar pustaka

- Abdulah, R., Suwandiman, T. F., Handayani, N., Destiani, D. P., Suwantika, A. A., Barliana, M. I., & Lestari, K. (2017). Incidence, Causative Drugs, and Economic Consequences of Drug-Induced SJS, TEN, and SJS-TEN Overlap and Potential Drug-Drug Interactions during Treatment: A Retrospective Analysis at An Indonesian Referral Hospital. *Ther Clin Risk Manag*, 13, 919-925. <https://doi.org/10.2147/tcrm.S142226>
- Chantaphakul, H., Sanon, T., & Klaewsongkram, J. (2015). Clinical Characteristics and Treatment Outcome of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. *Exp Ther Med*, 10(2), 519-524. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2549>

- Frey, N., Jossi, J., Bodmer, M., Bircher, A., Jick, S. S., Meier, C. R., & Spöndlin, J. (2017). The Epidemiology of Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in the UK. *J Invest Dermatol*, 137(6), 1240-1247. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.01.031>
- Kemenkes_RI. (2018). *Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2017*. Jakarta
- Lihite, R. J., Lahkar, M., Borah, A., Hazarika, D., & Singh, S. (2016). A Study on Drug Induced Stevens-Johnson Syndrome (SJS), Toxic Epidermal Necrolysis (TEN) and SJS-TEN Overlap in A Tertiary Care Hospital of Northeast India. *Journal of Young Pharmacists*, 8(2), 149-153 <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.5530/jyp.2016.2.18>
- Lin, Y. F., Yang, C. H., Sindy, H., Lin, J. Y., Rosaline Hui, C. Y., Tsai, Y. C., Wu, T. S., Huang, C. T., Kao, K. C., Hu, H. C., Chiu, C. H., Hung, S. I., & Chung, W. H. (2014). Severe Cutaneous Adverse Reactions Related to Systemic Antibiotics. *Clin Infect Dis*, 58(10), 1377-1385. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu126>
- Manchanda, Y., Das, S., Sarda, A., & Biswas, P. (2018). Controversies in the Management of Cutaneous Adverse Drug Reactions. *Indian J Dermatol*, 63(2), 125-130. https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_585_17
- Patel, T. K., Barvaliya, M. J., Sharma, D., & Tripathi, C. (2013). A Systematic Review of the Drug-Induced Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis in Indian Population. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 79(3), 389-398. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.110749>
- Purnamawati, S., Febriana, S. A., Danarti, R., & Saefudin, T. (2016). Topical Treatment for Stevens - Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis: A Review. *Bali Medical Journal*, 5(1), 82-90. <https://doi.org/doi:10.15562/bmj.v5i1.274>
- Rahmawati, Y. W., & Indramaya, D. M. (2016). Studi Retrospektif: Sindrom Stevens-Johnson dan Nekrosis Epidermal Toksik (A Retrospective Study: Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis). *Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin – Periodical of Dermatology and Venereology*, 28(2), 68-76.
- Teng, C. (2011). A guide on guidelines. *Malays Fam Physician*, 6(1), 1.
- Velasco-Tirado, V., Alonso-Sardón, M., Cosano-Quero, A., Romero-Alegría, Á., Sánchez-Los Arcos, L., López-Bernus, A., Pardo-Lledías, J., & Belhassen-García, M. (2018). Life-threatening dermatoses: Stevens-Johnson Syndrome and Toxic Epidermal Necrolysis. Impact on the Spanish public health system (2010-2015). *PLoS One*, 13(6), e0198582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198582>
- Wang, L., & Mei, X. L. (2017). Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms: Retrospective Analysis of 104 Cases over One Decade. *Chin Med J (Engl)*, 130(8), 943-949. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.204104>
- Wolfson, A. R., Zhou, L., Li, Y., Phadke, N. A., Chow, O. A., & Blumenthal, K. G. (2019). Drug Reaction with Eosinophilia and Systemic Symptoms (DRESS) Syndrome Identified in the Electronic Health Record Allergy Module. *J Allergy Clin Immunol Pract*, 7(2), 633-640. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2018.08.013>
- Yang, M. S., Kim, J. Y., Kang, M. G., Lee, S. Y., Jung, J. W., Cho, S. H., Min, K. U., & Kang, H. R. (2019). Direct Costs of Severe Cutaneous Adverse Reactions in A Tertiary Hospital in Korea. *Korean J Intern Med*, 34(1), 195-201. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.365>

Review: Randomized Clinical Trial (RCT) study of influenza vaccine in children 6 to 35 months of age

Review: Studi *Randomized Control Trial (RCT)* vaksin influenza pada anak usia 6-35 bulan

Cecep Suhandi^{1*}, Cheryl Alodya¹, Abednego Kristande¹, Rano K. Sinuraya²

¹Bachelor of Pharmacy Program, Faculty of Pharmacy, Universitas Padjadjaran, Indonesia

²Department of Pharmacology and Clinical Pharmacy, Universitas Padjadjaran, Indonesia

*Corresponding author: cecep17001@mail.unpad.ac.id

Abstract

Background: Influenza is a contagious viral infectious disease that causes acute disorders of the respiratory tract. The prevalence of infection due to the influenza virus is higher in children than in adults. Thus, it is very important to vaccinate children using the most effective type of vaccine.

Objective: This review aimed to investigate the type of influenza vaccine with the highest effectiveness in children 6 to 35 months of age based on an RCT study.

Method: The review is carried out by collecting articles from Elsevier and Medline databases using "Influenza Vaccine", "Randomized Control Trial", and "Children" as the keywords.

Results: Based on the initial search, it was found that 6.261 articles and 9 articles fulfill the review criteria. The results showed that the best vaccine efficacy has gotten by trivalent vaccines against the strains of viruses A (H1N1), A (H3N2), and B (Yamagata) with vaccine efficacy values of 94.1%; 100%; and 97.1%, respectively. While the use of quadrivalent vaccines against strain B (Victoria) virus with a vaccine efficacy value of 87.2%.

Conclusion: Trivalent vaccine is more effective for strain A and B (Yamagata) virus, moreover quadrivalent vaccine is more effective for strain B (Victoria).

Keywords: Influenza, vaccine, children, trivalent, quadrivalent

Intisari

Latar Belakang: Influenza merupakan suatu penyakit infeksi virus menular yang mengakibatkan gangguan akut pada saluran pernapasan. Insidensi infeksi akibat virus influenza lebih tinggi terjadi pada anak-anak dibanding dewasa. Dengan demikian, sangat penting untuk memberikan vaksinasi pada anak-anak menggunakan jenis vaksin yang paling efektif.

Tujuan: Tujuan dari *review* ini adalah untuk menentukan jenis vaksin influenza dengan efektivitas tertinggi terhadap anak usia 6-35 bulan berdasarkan hasil studi (RCT).

Metode: *Review* dilakukan dengan penelusuran pustaka pada *database* ELSEVIER dan MEDLINE dengan kata kunci "*Influenza Vaccine*", "*Randomized Control Trial*", dan "*Children*".

Hasil: Berdasarkan hasil penelusuran, diperoleh 6.261 artikel dan 9 artikel yang memenuhi kriteria *review*. Hasil telaah dapat menunjukkan bahwa efektivitas vaksin terbaik pada vaksin *trivalent* terhadap virus *strain* A (H1N1), A (H3N2), dan B (Yamagata) dengan nilai efikasi vaksin secara berurutan sebesar 94,1%; 100%; dan 97,1% untuk usia anak 12-35 bulan. Sedangkan penggunaan vaksin *quadrivalent* terhadap virus *strain* B (Victoria) dapat mencapai nilai efikasi vaksin 87,2% pada anak usia 6-35 bulan.

Kesimpulan: Vaksin *trivalent* lebih efektif pada virus *strain* A dan B (Yamagata), sedangkan vaksin *quadrivalent* lebih efektif pada *strain* B (Victoria).

Kata kunci: Influenza, vaksin, anak-anak, *trivalent*, *quadrivalent*

1. Pendahuluan

Influenza (biasa disebut sebagai penyakit “flu”) merupakan infeksi virus menular yang disebabkan oleh virus influenza. Infeksi akibat virus influenza ini dapat mengakibatkan gangguan akut pada sistem pernapasan atas serta beberapa organ vital lainnya seperti jantung, otak, dan otot (Moghadami, 2017). Virus influenza diketahui memiliki empat jenis utama, yakni tipe A, B, C, dan D. Akan tetapi, dari keempat jenis virus tersebut hanya virus tipe A dan B saja yang dapat menyebabkan kelainan klinis, khususnya pada saluran pernapasan. Berbagai subtipe dari virus A dan B juga telah banyak ditemukan. Subtipe virus influenza A didasarkan pada komposisi hemagglutinin dan *neuraminidase* sedangkan pada tipe B didasarkan pada komposisi hemagglutinannya Ghebrehewet *et al.*, juga melaporkan bahwa virus tipe A memiliki tingkat infeksi paling tinggi dibandingkan dengan virus influenza tipe lainnya (Ghebrehewet *et al.*, 2016).

Secara global, infeksi akibat virus influenza berada pada kisaran 5-10% pada orang dewasa dan 20-30% pada anak-anak. Infeksi akibat influenza telah mengakibatkan 3-5 juta gangguan akut pada saluran pernapasan. Selain itu, influenza juga menjadi penyebab kematian pada sekitar 250.000-500.000 kematian di dunia setiap tahunnya (Rafeek *et al.*, 2017). Tingginya angka kejadian infeksi pada anak-anak diakibatkan oleh lemahnya imunitas terhadap serangan berbagai agen infeksi (Munoz, 2002). Paparan virus terhadap anak-anak mampu memberikan dampak yang lebih buruk dibanding orang dewasa. Hal ini didukung oleh hasil riset meta-analisis dari Nair, *et al.*, bahwa pada tahun 2008, kematian akibat influenza pada anak-anak mencapai lebih dari 100.000 kasus (Nair *et al.*, 2011). Oleh sebab itu, pemberian vaksin dapat menjadi salah satu jawaban atas permasalahan infeksi influenza pada anak-anak.

Pengembangan vaksin influenza telah banyak dilakukan. Akan tetapi, saat ini permasalahan utama dari berbagai jenis vaksin influenza adalah sifat dari virus influenza yang muncul secara musiman dengan strain virus yang bermacam-macam. Adapun vaksin yang diberikan belum tentu mampu memberikan imunitas yang spesifik terhadap strain virus influenza yang muncul pada musim tertentu (Jazayeri & Poh, 2019). Pengembangan vaksin bentuk *trivalent* dan *quadrivalent* menjadi salah satu solusi dalam mengatasi permasalahan pengembangan vaksin untuk virus influenza yang bersifat musiman.

Vaksin jenis *trivalent* menggunakan dua jenis *strain* virus influenza A (H1N1 dan H3N2) dan satu *strain* influenza B. Sementara itu, vaksin jenis *quadrivalent* menggunakan dua *strain* influenza A dan dua *strain* influenza B (Yamagata dan Victoria) (Baxter, 2016). Penggunaan berbagai *strain* virus influenza dalam satu sediaan vaksin ini dapat memberikan imunitas terhadap kedua jenis virus influenza (A dan B). Dengan demikian,

vaksin dapat memberikan perlindungan terhadap *strain* virus, baik influenza A maupun B, saat muncul pada musim tertentu (Tisa *et al.*, 2016). Pada *review* ini dilakukan kajian untuk melihat perbandingan efektivitas penggunaan vaksin, *trivalent* maupun *quadrivalent*, terhadap berbagai jenis *strain* virus influenza pada anak usia 6-35 bulan.

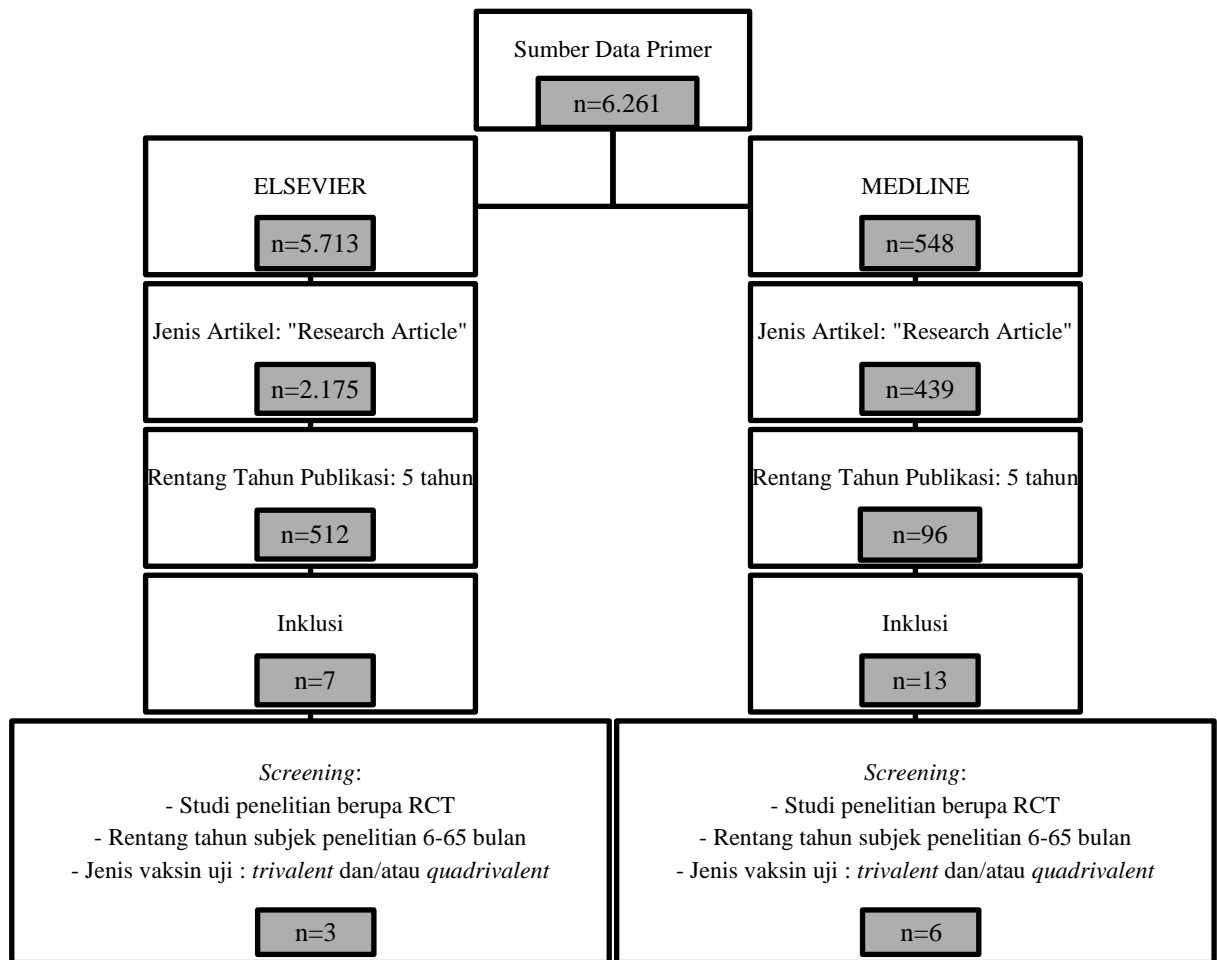
2. Metode

Review dilakukan dengan melakukan pencarian artikel penelitian pada dua *database*, yakni ELSEVIER dan MEDLINE. Pencarian dilakukan dengan memasukkan kata kunci "*Influenza Vaccine*", "*Randomized Clinical Trial*", dan "*Children*". Dalam proses seleksi dari artikel yang diperoleh, digunakan fitur penyaringan dengan kriteria rentang tahun publikasi 5 tahun terakhir (2016-2020) dan jenis artikel berupa artikel penelitian ("*Research Article*"). Penggunaan fitur penyaringan publikasi artikel pada 5 tahun terakhir bertujuan agar data yang diperoleh mampu memberikan representasi terkini mengingat tingginya laju mutasi dari virus influenza A dan B, yakni sekitar 2×10^{-6} dan $0,6 \times 10^{-6}$ mutasi per situs per siklus infeksi (Nobusawa & Sato, 2006). Mutasi yang terjadi dapat menurunkan efektivitas vaksin yang dikembangkan sebelumnya (Shao *et al.*, 2017).

Kriteria inklusi pada *review* ini adalah artikel berbahasa Inggris yang dipublikasikan pada 5 tahun terakhir (2016-2020), studi RCT, dan menggunakan vaksin influenza jenis *trivalent* dan/atau *quadrivalent*. Artikel yang diperoleh kemudian ditinjau dan dituangkan dalam bentuk tabel perbandingan efektivitas jenis vaksin influenza pada anak-anak rentang usia 6-35 bulan.

3. Hasil dan pembahasan

Hasil pencarian sumber literatur dari sumber data primer diperoleh jurnal internasional sebanyak 6.261 jurnal. Dari hasil penyaringan awal menggunakan fitur filterisasi diperoleh sebanyak 20 jurnal yang kemudian dilakukan *screening* secara manual hingga diperoleh 9 jurnal yang memenuhi kriteria inklusi (Gambar 1). Kemudian, dari 9 artikel yang memenuhi kriteria inklusi dilakukan telaah mengenai efektivitas penggunaan vaksin influenza sebagaimana tertera pada Tabel 1 .



Gambar 1. Diagram alur pencarian sumber literatur

Tabel 1. Perbandingan efektivitas vaksin influenza *Trivalent vs Quadrivalent* pada anak usia 6-35 bulan

Penulis	Tahun	Jenis vaksin	Rentang usia subjek (bulan)	Tipe virus	Jumlah subjek (orang)	Fase uji klinik	Efektivitas vaksin (%)	Efek samping
(Diallo <i>et al.</i> , 2018)	2012-2013	<i>Trivalent</i>	6-11	A/(H1N1)	296	NA	73,1	Rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi vaksin
				A/(H3N2)			96,2	
				B/(Yamagata)			80,8	
			12-35	A/(H1N1)			94,1	
				A/(H3N2)			100	
				B/(Yamagata)			97,0	
(Oh <i>et al.</i> , 2018)	2013-2014	<i>Trivalent</i>	6-35	A (H1N1)	386	Fase III	89,7	Rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi
				A (H3N2)			74,1	
				B			48,3	
* (Lee <i>et al.</i> , 2019)	2016-2017	<i>Trivalent</i>	6-35	A (H1N1)	124	NA	83,7	NA
				A (H3N2)			94,6	
				B/Yamagata			14,0	
				B/Victoria			27,9	
** (Rolfes <i>et al.</i> , 2017)	2010-2014	<i>Trivalent</i>	6-23	A (H1N1)	4.081	NA	33,3	NA
				A (H3N2)			30,9	
				B/Victoria			33,5	
				B/Yamagata			26,8	
(Claeys <i>et al.</i> , 2018)	2014-2015	<i>Quadrivalent</i>	6-35	A (H1N1)	1.861	Fase III	94,0	Rasa sakit pada area injeksi dan kenaikan suhu badan ($\geq 38^{\circ}\text{C}$)
				A (H3N2)			89,8	
				B/Yamagata			96,1	
				B/Victoria			83,1	
(Eun <i>et al.</i> , 2019)	2014-2015	<i>Quadrivalent</i>	6-35	A (H1N1)	455	Fase III	87,9	Rasa sakit pada area injeksi
				A (H3N2)			79,4	
				B/Yamagata			60,8	
				B/Victoria			43,9	
(Pepin <i>et al.</i> , 2019)	2014-2016	<i>Quadrivalent</i>	6-35	A (H1N1)	5.806	Fase III	74,98	Rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi vaksin
				A (H3N2)			48,50	
				B/Victoria			39,95	
				B/Yamagata			58,70	
(Lee <i>et al.</i> , 2018)	2015-2016	<i>Quadrivalent</i>	6-35	A (H1N1)	543	Fase III	73,0	

Penulis	Tahun	Jenis vaksin	Rentang usia subjek (bulan)	Tipe virus	Jumlah subjek (orang)	Fase uji klinik	Efektivitas vaksin (%)	Efek samping
				A (H3N2)			67,6	Rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi
				B/Yamagata			55,0	
				B/Victoria			45,0	
(Robertson <i>et al.</i> , 2019)	2016-2017	Quadrivalent	6-35	A (H1N1)	1.950	Fase IV	78,9	Rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi serta demam
				A (H3N2)			81,9	
				B/Yamagata			87,8	
				B/Victoria			87,2	
*(Lee <i>et al.</i> , 2019)	2016-2017	Quadrivalent	6-35	A (H1N1)	124	NA	91,4	NA
				A (H3N2)			98,7	
				B/Yamagata			23,8	
				B/Victoria			27,5	

Efektivitas vaksin uji direpresentasikan dengan nilai % Serokonversi, kecuali pada:

*) menggunakan % Seroproteksi

***) menggunakan persen kesembuhan dengan RT-PCR

3.1 Prevalensi influenza dan trend penggunaan vaksin trivalent dan quadrivalent

Influenza sebagai salah satu jenis infeksi virus pada saluran pernapasan memiliki tingkat insidensi yang tinggi. Virus influenza yang bersifat musiman menyebabkan variasi pada laju infeksi virus terhadap seseorang di segala usia. Hasil meta-analisis yang dilakukan oleh Tokars *et al.* menunjukkan bahwa tingkat insidensi influenza pada tahun 2010-2016 di *United States* berada pada nilai 3,0% -11,3% dengan median 8,3% pada segala usia. Sedangkan pada kategori usia anak, insidensi influenza berada pada kisaran nilai 8,7% (Tokars *et al.*, 2018).

Pengembangan vaksin untuk virus influenza belakangan ini mengarah pada produksi vaksin jenis *quadrivalent*. Hal ini dikarenakan adanya temuan baru pada *strain* influenza B, yakni B/Yamagata dan B/Victoria. Berbeda dengan jenis vaksin pendahulunya, yakni *trivalent*, yang menggunakan hanya salah satu dari *strain* virus influenza B (Ambrose & Levin, 2012). Tentunya terdapat beberapa keuntungan dan kerugian dari masing-masing jenis vaksin influenza ini. Penggunaan vaksin *trivalent* terbilang lebih murah dan memberikan efek imunitas spesifik sehingga efek samping yang ditimbulkan relatif lebih kecil bila dibandingkan dengan vaksin *quadrivalent* (Baxter, 2016). Akan tetapi, penggunaan salah satu *strain* virus influenza B pada vaksin *trivalent* tidak dapat memberikan imunitas universal terhadap kedua *strain* influenza B yang dapat muncul kapan saja.

Vaksin *quadrivalent* tentunya memerlukan biaya yang relatif lebih tinggi apabila dibandingkan dengan vaksin *trivalent* (Lee *et al.*, 2012). Namun, penggunaan vaksin *quadrivalent* dapat memberikan imunitas spesifik yang tinggi terhadap kedua *strain* virus influenza B (Rudenko *et al.*, 2018). Walaupun biaya yang perlu dikeluarkan untuk vaksin *quadrivalent* relatif lebih tinggi, namun bila digunakan dalam program imunisasi dapat memberikan efektivitas biaya yang lebih baik dari pada vaksin *trivalent* (Lee *et al.*, 2012). Tidak hanya permasalahan dalam biaya, efek samping dari penggunaan vaksin *quadrivalent* juga relatif lebih tinggi dibanding dengan vaksin *trivalent* (Rudenko *et al.*, 2018). Hal ini dapat terjadi karena jumlah *strain* virus influenza yang lebih variatif pada vaksin *quadrivalent*.

3.2 Studi penggunaan vaksin

3.2.1 Vaksin trivalent

Pengujian efektivitas vaksin *trivalent* pada anak usia 6-35 bulan dengan studi RCT ditunjukkan pada Tabel 1. Efektivitas tertinggi diperoleh dari hasil pengujian yang dilakukan oleh Diallo *et al.* terhadap dua kelompok subjek uji dengan usia 6-11 bulan dan

12-35 bulan. Hasil uji menunjukkan serokonversi yang tinggi pada anak usia 12-35 bulan dengan nilai serokonversi terhadap virus influenza A (H1N1), A (H3N2), dan B (Yamagata) secara berurutan sebesar 94,1%; 100%; dan 97,0%. Sedangkan pada kelompok usia 6-11 bulan menunjukkan nilai serokonversi secara berurutan sebesar 73,1%; 96,2% dan 80,8%.

Adapun pada pengujian yang dilakukan oleh Lee, *et al.* dan Rolfes, *et al.*, vaksin *trivalent* digunakan sebagai pembanding dari vaksin *quadrivalent* yang diuji. Dengan demikian, digunakan dua jenis vaksin *trivalent* dengan masing-masing menggunakan satu *strain* virus influenza B (Yamagata atau Victoria). Pada penelitian yang dilakukan oleh Oh *et al.*, *strain* virus influenza B yang digunakan tidak dinyatakan mengenai garis keturunannya (Yamagata atau Victoria) (Lee *et al.*, 2012; Rolfes *et al.*, 2017).

Profil keamanan dari vaksin *trivalent* ini menunjukkan kejadian efek samping yang hampir sama. Baik dari pengujian Diallo *et al.* maupun Oh *et al.* menunjukkan efek samping mayor yang sama, yakni rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi. Sedangkan pada penelitian yang dilakukan oleh Lee *et al.* dan Rolfes, *et al.* tidak dilakukan studi keamanan penggunaan vaksin *trivalent* (Lee *et al.*, 2012; Rolfes *et al.*, 2017).

3.2.2 Vaksin *quadrivalent*

Efektivitas vaksin *quadrivalent* bervariasi terhadap empat *strain* virus influenza sebagaimana tertera pada Tabel 1. Pada penelitian yang dilakukan oleh Claeys *et al.*, efektivitas vaksin *quadrivalent* relatif tinggi terhadap *strain* virus influenza A (H1N1) dan B/Yamagata dengan nilai seroproteksi masing-masing sebesar 94,0% dan 96,1%. Sedangkan efektivitas vaksin tertinggi untuk *strain* virus influenza A (H3N2) diperoleh dari pengujian yang dilakukan oleh Lee *et al.*, dengan nilai seroproteksi sebesar 98,7%. Kemudian, efektivitas vaksin tertinggi untuk *strain* virus influenza B/Victoria diperoleh dari hasil pengujian oleh Robertson *et al.*, dengan nilai serokonversi sebesar 87,2% (Lee *et al.*, 2012; Robertson *et al.*, 2019).

Profil keamanan vaksin *quadrivalent* tidak jauh berbeda dengan vaksin *trivalent*. Salah satu yang menjadi perbedaan dasar adalah timbulnya demam dengan suhu tubuh mencapai $\geq 38^{\circ}\text{C}$ sebagaimana yang terlihat pada pengujian yang dilakukan oleh Claeys *et al.* dan Robertson *et al.* Perbedaan ini dapat terjadi akibat dari perbedaan jumlah *strain* virus yang tercakup. Semakin banyak *strain* virus yang tercakup maka semakin tinggi pula patogenisitas dari vaksin *quadrivalent* sehingga menyebabkan respon imunitas yang lebih tinggi (Bailey *et al.*, 2020; Rudenko *et al.*, 2018).

Tabel 2. Efektivitas vaksin berdasarkan *strain* virus influenza

Strain virus	Jenis vaksin	Usia (bulan)	Efikasi vaksin (%)
A (H1N1)	<i>Trivalent</i>	12-35	94,1
A (H3N2)	<i>Trivalent</i>	12-35	100
B (Yamagata)	<i>Trivalent</i>	12-35	97,1
B (Victoria)	<i>Quadrivalent</i>	6-35	87,2

Sebagaimana tertera pada Tabel 2, apabila diurutkan berdasarkan jenis virusnya, maka diperoleh efektivitas tertinggi penggunaan vaksin *trivalent* pada usia 12-35 bulan (serokonversi 94,1%) untuk virus influenza A (H1N1), vaksin *trivalent* pada usia 12-35 bulan (serokonversi 100%) untuk virus influenza A (H3N2), vaksin *trivalent* pada usia 12-35 bulan (serokonversi 97,1%) untuk virus influenza B (Yamagata), dan vaksin *quadrivalent* pada usia 6-35 bulan (serokonversi 87,2%) untuk virus influenza B (Victoria).

4. Kesimpulan

Penggunaan vaksin influenza jenis *trivalent* maupun *quadrivalent* menunjukkan variasi efektivitas terhadap berbagai jenis virus influenza. Efektivitas penggunaan vaksin tertinggi untuk virus influenza A (H1N1), A (H3N2), dan B (Yamagata) diperoleh dengan pengujian menggunakan vaksin jenis *trivalent*. Sedangkan efektivitas vaksin yang tinggi pada virus influenza B (Yamagata) diperoleh dengan pengujian menggunakan vaksin jenis *quadrivalent*. Profil keamanan, baik dari vaksin *trivalent* maupun *quadrivalent*, sama-sama menunjukkan adanya rasa sakit dan pembengkakan pada area injeksi, serta adanya demam yang timbul pada penggunaan vaksin *quadrivalent*.

Daftar Pustaka

- Ambrose, C. S., & Levin, M. J. (2012). The Rationale for Quadrivalent Influenza Vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 8(1), 81-88. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17623>
- Bailey, R. I., Cheng, H. H., Chase-Topping, M., Mays, J. K., Anacleto, O., Dunn, J. R., & Doeschl-Wilson, A. (2020). Pathogen Transmission from Vaccinated Hosts can Cause Dose-Dependent Reduction in Virulence. *PLoS Biol*, 18(3), e3000619. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000619>
- Baxter, D. (2016). Evaluating the Case for Trivalent or Quadrivalent Influenza Vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 12(10), 2712-2717. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1091130>
- Claeys, C., Drame, M., García-Sicilia, J., Zaman, K., Carmona, A., Tran, P. M., Miranda, M., Martín-Torres, F., Thollot, F., Horn, M., Schwarz, T. F., Behre, U., Merino, J. M., Sadowska-Krawczenko, I., Szymański, H., Schu, P., Neumeier, E., Li, P., Jain, V. K., & Innis, B. L. (2018). Assessment of An Optimized Manufacturing Process for Inactivated Quadrivalent Influenza Vaccine: A Phase III, Randomized, Double-Blind, Safety and Immunogenicity Study in Children and Adults. *BMC Infect Dis*, 18(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3079-8>
- Diallo, A., Victor, J. C., Feser, J., Ortiz, J. R., Kanesa-Thasan, N., Ndiaye, M., Diarra, B., Cheikh, S., Diene, D., Ndiaye, T., Ndiaye, A., Lafond, K. E., Widdowson, M. A., & Neuzil, K. M.

- (2018). Immunogenicity and Safety of MF59-Adjuvanted and Full-Dose Unadjuvanted Trivalent Inactivated Influenza Vaccines among Vaccine-naïve Children in A Randomized Clinical Trial in Rural Senegal. *Vaccine*, 36(43), 6424-6432. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.08.032>
- Eun, B. W., Lee, T. J., Lee, J., Kim, K. H., Kim, D. H., Jo, D. S., Shin, S. H., Kim, H., Kim, K. H., & Kim, Y. K. (2019). A Randomized, Double-blind, Active-controlled Phase III Trial of a Cell Culture-derived Quadrivalent Inactivated Influenza Vaccine in Healthy South Korean Children and Adolescents 6 Months to 18 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J*, 38(9), e209-e215. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002406>
- Ghebrehewet, S., MacPherson, P., & Ho, A. (2016). Influenza. *Bmj*, 355, i6258. <https://doi.org/10.1136/bmj.i6258>
- Jazayeri, S. D., & Poh, C. L. (2019). Development of Universal Influenza Vaccines Targeting Conserved Viral Proteins. *Vaccines (Basel)*, 7(4). <https://doi.org/10.3390/vaccines7040169>
- Lee, B. Y., Bartsch, S. M., & Willig, A. M. (2012). The Economic Value of a Quadrivalent versus Trivalent Influenza Vaccine [Journal Article]. *Vaccine*. 2012; 30(52):7443-7446., 30(52). <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/33590>
- Lee, J., Lee, K. Y., Kim, J. H., Kim, C. S., Eun, B. W., Kim, H. M., Kim, D. H., Hong, Y. J., Choi, Y. Y., Jo, D. S., Ma, S. H., & Kang, J. H. (2018). Safety and Immunogenicity of an Egg-Cultivated Quadrivalent Inactivated Split-virion Influenza Vaccine (GC3110A) in Healthy Korean Children: a Randomized, Double-blinded, Active-controlled Phase III Study. *J Korean Med Sci*, 33(13), e100. <https://doi.org/10.3346/jkms.2018.33.e100>
- Lee, J. H., Cho, H. K., Kim, K. H., Lee, J., Kim, Y. J., Eun, B. W., Kim, N. H., Kim, D. H., Jo, D. S., Kim, H. M., & Kim, Y. K. (2019). Evaluation of Waning Immunity at 6 Months after Both Trivalent and Quadrivalent Influenza Vaccination in Korean Children Aged 6-35 Months. *J Korean Med Sci*, 34(46), e279. <https://doi.org/10.3346/jkms.2019.34.e279>
- Moghadami, M. (2017). A Narrative Review of Influenza: A Seasonal and Pandemic Disease. *Iran J Med Sci*, 42(1), 2-13.
- Munoz, F. M. (2002). The Impact of Influenza in Children. *Semin Pediatr Infect Dis*, 13(2), 72-78. <https://doi.org/10.1053/spid.2002.122992>
- Nair, H., Brooks, W. A., Katz, M., Roca, A., Berkley, J. A., Madhi, S. A., Simmerman, J. M., Gordon, A., Sato, M., Howie, S., Krishnan, A., Ope, M., Lindblade, K. A., Carosone-Link, P., Lucero, M., Ochieng, W., Kamimoto, L., Dueger, E., Bhat, N., Vong, S., Theodoratou, E., Chittaganpitch, M., Chimah, O., Balmaseda, A., Buchy, P., Harris, E., Evans, V., Katayose, M., Gaur, B., O'Callaghan-Gordo, C., Goswami, D., Arvelo, W., Venter, M., Briese, T., Tokarz, R., Widdowson, M. A., Mounts, A. W., Breiman, R. F., Feikin, D. R., Klugman, K. P., Olsen, S. J., Gessner, B. D., Wright, P. F., Rudan, I., Broor, S., Simões, E. A., & Campbell, H. (2011). Global Burden of Respiratory Infections Due to Seasonal Influenza in Young Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet*, 378(9807), 1917-1930. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(11\)61051-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(11)61051-9)
- Nobusawa, E., & Sato, K. (2006). Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses. *J Virol*, 80(7), 3675-3678. <https://doi.org/10.1128/jvi.80.7.3675-3678.2006>
- Oh, C. E., Choi, U. Y., Eun, B. W., Lee, T. J., Kim, K. H., Kim, D. H., Kim, N. H., Jo, D. S., Shin, S. H., Kim, K. H., Kim, H., & Kim, Y. K. (2018). A Randomized, Double-blind, Active-controlled Clinical Trial of a Cell Culture-derived Inactivated Trivalent Influenza Vaccine (NBP607) in Healthy Children 6 Months Through 18 Years of Age. *Pediatr Infect Dis J*, 37(6), 605-611. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000001973>
- Pepin, S., Dupuy, M., Borja-Tabora, C. F. C., Montellano, M., Bravo, L., Santos, J., de Castro, J. A., Rivera-Medina, D. M., Cutland, C., Ariza, M., Diez-Domingo, J., Gonzalez, C. D., Martínón-Torres, F., Papadopoulou-Alataki, E., Theodoriadou, M., Kazek-Duret, M. P., Gurunathan, S., & De Bruijn, I. (2019). Efficacy, Immunogenicity, and Safety of A

- Quadrivalent Inactivated Influenza Vaccine in Children Aged 6-35 Months: A Multi-Season Randomised Placebo-Controlled Trial in The Northern and Southern Hemispheres. *Vaccine*, 37(13), 1876-1884. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.11.074>
- Rafeek, R. A. M., Divarathna, M. V. M., & Noordeen, F. (2017). History and Current Trends in Influenza Virus Infections with Special Reference to Sri Lanka. *Virusdisease*, 28(3), 225-232. <https://doi.org/10.1007/s13337-017-0390-8>
- Robertson, C. A., Mercer, M., Selmani, A., Klein, N. P., Jeanfreau, R., & Greenberg, D. P. (2019). Safety and Immunogenicity of a Full-dose, Split-virion, Inactivated, Quadrivalent Influenza Vaccine in Healthy Children 6-35 Months of Age: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Pediatr Infect Dis J*, 38(3), 323-328. <https://doi.org/10.1097/inf.0000000000002227>
- Rolfes, M. A., Goswami, D., Sharmeen, A. T., Yeasmin, S., Parvin, N., Nahar, K., Rahman, M., Barends, M., Ahmed, D., Rahman, M. Z., Bresee, J., Luby, S., Moulton, L. H., Santosham, M., Fry, A. M., & Brooks, W. A. (2017). Efficacy of Trivalent Influenza Vaccine Against Laboratory-Confirmed Influenza among Young Children in A Randomized Trial in Bangladesh. *Vaccine*, 35(50), 6967-6976. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.10.074>
- Rudenko, L., Kiseleva, I., Krutikova, E., Stepanova, E., Rekstin, A., Donina, S., Pisareva, M., Grigorieva, E., Kryshen, K., Muzhikyan, A., Makarova, M., Sparrow, E. G., Torelli, G., & Kieny, M. P. (2018). Rationale for Vaccination with Trivalent or Quadrivalent Live Attenuated Influenza Vaccines: Protective Vaccine Efficacy in The Ferret Model. *PLoS One*, 13(12), e0208028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208028>
- Shao, W., Li, X., Goraya, M. U., Wang, S., & Chen, J. L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *Int J Mol Sci*, 18(8). <https://doi.org/10.3390/ijms18081650>
- Tisa, V., Barberis, I., Faccio, V., Paganino, C., Trucchi, C., Martini, M. and Ansaldi, F., 2016. Quadrivalent influenza vaccine: a new opportunity to reduce the influenza burden. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 57(1), p.E28.
- Tokars, J. I., Olsen, S. J., & Reed, C. (2018). Seasonal Incidence of Symptomatic Influenza in the United States. *Clin Infect Dis*, 66(10), 1511-1518. <https://doi.org/10.1093/cid/cix1060>

Evaluation of single and combination chemotherapy agents in patients with metastatic breast cancer

Martanty Aditya, Godeliva Adriani Hendra*, Suhul Raos Kumawula Ing Gustiyas

Department of Pharmacy, Faculty of Science and Technology, Universitas Ma Chung, Indonesia

*Corresponding author: godeliva.adriani@machung.ac.id

Abstract

Background: There are several ways to treat breast cancer, one of which is administering chemotherapy agents. Chemotherapy agents have activity in inhibiting the cell cycle. That will affect the effectiveness of therapy and the side effects of chemotherapy agents.

Objective: This study aimed to evaluate single and combination chemotherapy agent therapeutic efficacy and side effects

Method: The design of this study used an observational cohort study with retrospective data collection from January to December 2019. Patients obtained from medical records were diagnosed with metastatic stage of breast cancer at Panti Nirmala Hospital, Malang. The effectiveness of the chemotherapy agent was seen from the carcinoembryonic antigen (CEA) and cancer antigen 15-3 (CA15-3), which were carried out in the first and third cycles, then analyzed using the Wilcoxon and U-Mann Whitney tests. Side effects of chemotherapy agents were analyzed descriptively.

Results: Analysis of the Wilcoxon test showed differences between the two groups of chemotherapeutic agents in CEA and CA15-3 ($p < 0.05$). U-Mann Whitney test analysis showed no difference after administration of the two groups of chemotherapy agents at CEA ($p > 0.05$). However, there was a difference in CA15-3 ($p < 0.05$). Both chemotherapy agents showed most common side effects such as pain, nausea, vomiting, and alopecia.

Conclusion: Patients who received a combination of chemotherapy agents had lower CA15-3 levels than single chemotherapy agents.

Keywords: Metastatic breast cancer, CEA, CA15-3, side effects of chemotherapy agents

1. Introduction

Metastatic stage breast cancer is one of the highest malignancies among other types of cancer in Indonesia and globally, with an increasing incidence (Kemenkes, 2019; Yang *et al.*, 2017). As the implementation, metastatic breast cancer patients need to be monitored continuously to increase the survival rate. One way to assess the therapeutic effect is by measuring tumor biomarkers (McDonald *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2017). Reference tumor biomarkers are widely used to measure response to treatment, early recurrence, and predict prognosis. The biomarkers that are widely referenced to assess the effectiveness of therapy are carcinoembryonic antigen (CEA) which is a protein involved in cell adhesion, and cancer antigen 15-3 (CA15-3) or MUC-1, which represents the mucin sequence in cells undergoing malignancy (Hosseini *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017). CEA and CA15-3 are less sensitive for early detection but can predict positive treatment responses (Yang *et al.*, 2017). Serum levels of CEA and CA15-3 are also widely used to expect a response to therapy in metastatic breast cancer (Geng *et al.*, 2015).

In addition to the effectiveness of therapy, the side effects of chemotherapy agents also need to be monitored, which is important to improve the patient's quality of life. Many reports have stated the side effects induced by chemotherapeutic agents, including spinal cord suppression, neuropathy, gastrointestinal disorders, hair loss, weakness, and skin disorders (Chan & Ismail, 2014). In Indonesia, there have not been many studies that have looked at the differences in biomarkers and the frequency of possible side effects that occur with a single chemotherapy agent compared to combinations. This background underlies the need for a study to determine the differences in biomarkers of CEA and CA15-3 and the side effects of using a single agent compared to a combination that may occur.

2. Methodology

2.1. Study design and setting

The study design used an observational cohort study with retrospective data collection. Data was collected through medical records and laboratory results from January to December 2019. This research has passed ethical test No.E.5.a/209/KEPK-UMM/VIII/2020. The study location was at Panti Nirmala Hospital Malang and carried out in the Medical Record Unit and inpatient ward.

2.2. Sample size and sampling technique

The population of this study were inpatients diagnosed with breast cancer in the metastatic stage at Panti Nirmala Hospital and received chemotherapy agents. The study sample was breast cancer patients with metastases who entered the inclusion criteria. The sampling technique used in this study was the total sampling technique, where all population members were sampled. There were 45 samples from the medical record unit. 19 patients received single chemotherapy agents and 26 received combination chemotherapy agents.

2.3. Inclusion and exclusion criteria

The inclusion criteria were metastatic breast cancer patients who received single and combination chemotherapy agents; patient data was taken from the patient medical record according to biomarkers Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Cancer Antigen 15-3 (CA15-3). Exclusion criteria were patients who passed away and patients who did not have complete laboratory data when administering chemotherapy agents.

2.4. Data collection

The data collected in this study were patient characteristics which included: age, education, employment status, marital status, comorbidities, and history of hormonal contraceptive use. The data on the effectiveness of therapy was seen from the biomarkers of CEA and CA15-3. Data of the side effects were taken from using single and combination chemotherapy agents. The single chemotherapy agents used were Carboplatin, Navelbin, and Zometa/Zolenic. Combination chemotherapy agents consist of two or three chemotherapeutic agents. Two chemotherapeutic agents include Carboplatin+Docetaxel, Cisplatin+Docetaxel, and Cisplatin+Paclitaxel. The three chemotherapy agents were Carboplatin+Docetaxel+Fluorouracil and Cyclophosphamide+Epirubicin+Fluorouracil.

2.5. Data analysis

The data of this study were analyzed using the open-source R software. The relationship between chemotherapy agents and the characteristics of the respondents were analyzed using the Chi-Square test. The U-Mann Whitney test was used to compare therapeutic efficacy as measured by biomarkers CEA and CA15-3. Side effect data were analyzed descriptively as a percentage of events.

3. Result and discussion

Patient characteristics data are briefly presented in Table 1. Characteristics of metastatic breast cancer patients in the group receiving single or combination chemotherapy agents showed no relationship ($p > 0.05$).

Table 1. Patient characteristics data

Characteristic	Number of patient with single chemotherapy* (%)	Number of patient with combination chemotherapy** (%)	p-value
Age (year)			
26-45	3 (15.8)	5 (19.23)	0.917
46-65	14 (73.68)	19 (73.07)	
66-85	2 (10.53)	2 (7.69)	
Mean: 52			
Education			
Elementary	5 (26.31)	9 (34.61)	0.844
Junior High School	0	1 (3.85)	
Senior High School	6 (31.58)	7 (26.92)	
Associate Degree	3 (15.79)	3 (11.54)	
Bachelor Degree	2 (10.53)	6 (23.08)	
Master Degree	3 (15.79)	0	
Comorbidities			
Yes	6 (31.58)	6 (23.08)	0.767
No	13 (68.42)	20 (76.92)	

Characteristic	Number of patient with single chemotherapy* (%)	Number of patient with combination chemotherapy** (%)	p-value
Occupation			
Yes	6 (31.58)	12 (46.15)	0.498
No	13 (68.42)	14 (53.85)	
Married Status			
Married	15 (78.95)	18 (69.23)	0.308
Single	0	3 (11.54)	
Divorce	4 (21.05)	5 (19.23)	
Hormonal History			
Contraception Hormonal	16 (84.21)	17 (65.38)	0.171
Contraception Non-Hormonal	1 (5.26)	7 (26.92)	
No ontraception	2 (10.53)	2 (7.69)	
Biomarker CEA			
Normal	1 (5)	1 (3.85)	1.000
Abnormal	18 (95)	25 (96.15)	
Biomarker CA 15-3			
Normal	1 (5)	1 (3.85)	1.000
Abnormal	18 (95)	25 (96.15)	

Information:

*Carboplatin, Navelbin, Zometa/Zolenic

**Combination of two therapy agents: carboplatin+docetaxel, cisplatin+docetaxel, cisplatin+paclitaxel; combination of three therapy agent: carboplatin+docetaxel+fluorouracil, cyclophosphamide+epirubicin+fluorouracil

Patients were dominated by 46-65 years, without comorbidities, married status, and previously used hormonal family planning. Furthermore, the analysis of differences in CEA and CA15-3 biomarkers between those receiving single and combined chemotherapy agents can be seen in Table 2. There are differences in CA15-3 biomarkers after administration of single and combination chemotherapy agents. However, there was no difference in the CEA biomarker after administering single chemotherapy agents (mean CEA = 9.42 ng/mL) and combination chemotherapy agents (mean CEA = 9.70 ng/mL). CA15-3 levels of chemotherapeutic agents combinations had lower concentrations (mean CA15-3 = 105.60 U/mL) than single chemotherapy agents (mean CA15-3 = 129.48 U/mL).

Table 2. The U-Mann Whitney test of single and combination chemotherapy agents

Biomarker	<i>U</i>	p-value
CEA	256	0.422
CA15-3	325.5	0.036

Administration of single and combined chemotherapeutic agents decreased CA15-3 biomarkers, but not CEA. This result showed a significant response to the effectiveness of therapy after chemotherapy. Parameters of response to chemotherapy agents evaluated through CEA's tumor markers while in metastatic breast cancer had continuously increasing CEA levels. Therefore, the result (Table 2) showed that cancer cells did not

respond to treatment/relapse after getting treatment ($p>0.05$). However, CEA is an insensitive biomarker in breast cancer, so it cannot be used as the only screening. This condition caused the need for supporting data in the form of a CA15-3 biomarker. The CA15-3 biomarker aims to determine the prognosis of metastatic breast cancer. Monitoring response to therapy on CA15-3 was seen from increased levels of CA15-3, which was associated with the high severity of breast cancer (Kabel, 2017).

In a retrospective study, serum CA15-3 correlated with the location of the number of metastases in breast cancer patients but not with CEA. CEA has a higher sensitivity in patients with metastases that spread to other organs. Hence, it can be concluded that in patients with metastatic breast cancer, the sensitivity of the CA15-3 biomarker is intended for serum tumor markers in the breast. In contrast, the CEA biomarker is designed for sensitivity/marker of metastases in breast cancer patients (Yang *et al.*, 2017). The limitation of the problem in this study was that the sampling of CEA and CA15-3 biomarker data was only in the first and third cycles.

Table 3. Descriptive data side effects of single chemotherapy agents

Single chemotherapy agent (n=19 patients)	Side effects	Number of patients (%)
Carboplatin 400 mg inj (n=1)	Nausea/vomiting and alopecia	1 (100)
Navelbine 40 mg inj (n=15)	Pain	8 (53.33)
	Extravasation	1 (6.67)
	Nauseous/vomiting	12 (80)
	Short of breath	1 (6.67)
	Alopecia	12 (80)
Zometa/Zolenic 4mg (n=3)	Pain	2 (66.67)
	Nauseous/vomiting	3 (100)
	Alopecia	1 (33.33)

The side effects data for single chemotherapy agents are represented in Table 3. The most common side effects were nausea/vomiting, alopecia, and pain. Nausea/ vomiting was caused by chemotherapy-induced nausea and vomiting (CINV). The risk of developing CINV was higher with the short-term IV infusion route than with long-term or oral preparations. Neurotransmitters that play a role in activating CINV are 5-hydroxytryptamine (5-HT₂, 5-HT₃, and 5-HT₄), dopamine (D₂), histamine (H₁), and acetylcholine (Ach). Receptors of the neurotransmitter 5-HT and dopamine were abundant in the intestinal mucosa and activated when the neurotransmitter was released, causing nausea and vomiting. Chemotherapy agents given to patients will also quickly bind to the chemoreceptor trigger zone (CTZ) in the brain close to the vomiting center, resulting in nausea and vomiting (Antonarakis & Hain, 2004; Singh *et al.*, 2016).

Table 4. Descriptive data side effects of combination chemotherapy agents

Combination chemotherapy agent (n=26 patients)	Side effects	Number of patients (%)
Carboplatin 300 mg inj + docetaxel 110 mg inj (n=3)	Pain,	2 (66.67)
	Nausea/vomiting	3 (100)
	Alopecia	3 (100)
Carboplatin 300 mg inj + docetaxel 120 mg inj (n=1)	Pain, nausea/vomiting, and alopecia	1 (100)
Carboplatin 400 mg inj + docetaxel 120 mg inj (n=1)	Extravasation, pain, nausea/vomiting, and alopecia	1 (100)
Carboplatin 450 mg inj + docetaxel 110 mg inj (n=2)	Pain, nausea/vomiting, alopecia, and short of breath	2 (100)
Carboplatin 450 mg inj + docetaxel 120 mg inj (n=4)	Extravasation	1 (25)
	Pain	3 (75)
Cisplatin 50mg inj + docetaxel 100mg inj (n=4)	Extravasation	1 (36.36)
	Pain	2 (50)
	Nausea/vomiting	4 (100)
	Alopecia	1 (25)
Carboplatin 60 mg inj + docetaxel 120 mg inj (n=3)	Pain	3 (100)
	Nausea/vomiting	3 (100)
	Alopecia	1 (50)
Cisplatin 50 mg inj + paclitaxel 200 mg inj (n=1)	Extravasation and nausea/vomiting	1 (100)
Cisplatin 60 mg inj + paclitaxel 230 mg inj (n=1)	Extravasation, nausea/vomiting and alopecia	1 (100)
Carboplatin 450 mg inj, belotaxel 120 mg inj* + curacil 500 mg inj* (n=5)	Extravasation	1 (20)
	Pain	5 (100)
	Nausea/vomiting	5 (100)
	Short of breath	1 (20)
	Alopecia	4 (80)
Cyclovid 600 mg inj*, epirubicin 500 mg inj + curacil 500 mg inj* (n=1)	Extravasation, pain, nausea/vomiting, and alopecia	1 (100)

The side effects data for combination chemotherapy agents are represented in Table 4. The most common side effects are nausea/vomiting, alopecia, pain, extravasation, shortness of breath. The previous study also showed that the most common side effect was alopecia/chemotherapy-induced alopecia (CIA) (Rossi *et al.*, 2017). The incidence of alopecia was associated with the type of chemotherapeutic agent used in this study. The finding showed that 80% of the incidence occurred in the antimicrotubule group (vinorelbine, paclitaxel, docetaxel, epirubicin), 60% in alkylators (carboplatin and cisplatin), and 10-50% in antimetabolites (fluorouracil), 60-100% on topoisomerase. Alopecia results from the main target of chemotherapeutic agents, the keratinocyte matrix, which proliferates during the anagen/hair formation phase. The keratinocyte matrix is sensitive to chemotherapeutic agents and causes rapid apoptosis, which affects the anagen phase, namely hair follicle growth, and causes baldness (Haslam & Smart, 2019). However, this baldness is not permanent; within six months, the hair growth will occur again (Rossi *et al.*, 2017).

The subsequent most common side effect was a painful condition, often referred to as chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). Peripheral neuropathy induced by platinum-based drugs (carboplatin and cisplatin) causes glial cell activation, increasing the inflammatory pro-cytokines that increase nociceptor sensitivity and hyperexcitability of peripheral neurons. The effects, together with ROS (reactive oxygen species), damage the blood-brain barrier and leads to the development of neuroinflammation, damage to mitochondria, and increases ROS, which causes damage to enzymes, proteins, and lipids in neurons as well as dysregulation of calcium homeostasis which induces apoptotic changes in peripheral nerves. Peripheral neuropathy in using antimicrotubule (vinorelbine, paclitaxel, docetaxel, epirubicin) interferes with axonal transport. It causes degeneration of distal nerve segments, alters ion channel activity and hyperexcitability of peripheral neurons, and modifies the expression and function of Na⁺, K⁺ ion channels. Activation of microglia leads to the release and increase of pro-inflammatory cytokines. This process leads to nociceptor sensitivity and the development of neuroinflammation (Zajączkowska *et al.*, 2019).

4. Conclusion

The achievement in this study was that the CA15-3 biomarker in combination chemotherapy agents has lower levels than single chemotherapy agents. However, CEA levels did not give a significant change in single and combined agents. Both chemotherapy agents cause side effects, especially nausea/vomiting, alopecia, and pain.

Acknowledgment

We would like to thank Panti Nirmala Hospital Malang for assisting the research administration process, Mrs. Suhul Raos, who helped complete the research data, and Mrs. Martanty Aditya, who assisted in preparing this article.

References

- Antonarakis, E. S., & Hain, R. D. (2004). Nausea and vomiting associated with cancer chemotherapy: drug management in theory and in practice. *Arch Dis Child*, *89*(9), 877-880. <https://doi.org/10.1136/adc.2003.037341>
- Chan, H. K., & Ismail, S. (2014). Side effects of chemotherapy among cancer patients in a Malaysian General Hospital: experiences, perceptions and informational needs from clinical pharmacists. *Asian Pac J Cancer Prev*, *15*(13), 5305-5309. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.13.5305>
- Geng, B., Liang, M. M., Ye, X. B., & Zhao, W. Y. (2015). Association of CA 15-3 and CEA with clinicopathological parameters in patients with metastatic breast cancer. *Mol Clin Oncol*, *3*(1), 232-236. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.419>

- Haslam, I. S., & Smart, E. (2019). Chemotherapy-Induced Hair Loss: The Use of Biomarkers for Predicting Alopecic Severity and Treatment Efficacy. *Biomark Insights*, 14, 1177271919842180. <https://doi.org/10.1177/1177271919842180>
- Hosseini, S. M., Razmjoo, S., Arvandi, S. H., & Barat, T. (2015). CEA and CA 15-3 serum level in metastatic breast cancer and its correlation with distant metastasis *Biomedical and Pharmacology Journal*, 8, 721-727. <https://doi.org/https://doi.org/10.13005/bpj/775>
- Kabel, A. (2017). Tumor markers of breast cancer: New perspectives. *Journal of Oncological Sciences*, 3. <https://doi.org/10.1016/j.jons.2017.01.001>
- Kemenkes. (2019). Panduan Penatalaksanaan Kanker Payudara (*Breast Cancer Treatment Guideline*). *Jurnal Kesehatan Masyarakat* 4(4), 1-50. <http://kanker.kemkes.go.id/guidelines/PPKPayudara.pdf>
- McDonald, E. S., Clark, A. S., Tchou, J., Zhang, P., & Freedman, G. M. (2016). Clinical Diagnosis and Management of Breast Cancer. *J Nucl Med*, 57 Suppl 1, 9s-16s. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.157834>
- Rossi, A., Fortuna, M. C., Caro, G., Pranteda, G., Garelli, V., Pompili, U., & Carlesimo, M. (2017). Chemotherapy-induced alopecia management: Clinical experience and practical advice. *J Cosmet Dermatol*, 16(4), 537-541. <https://doi.org/10.1111/jocd.12308>
- Singh, P., Yoon, S. S., & Kuo, B. (2016). Nausea: a review of pathophysiology and therapeutics. *Therap Adv Gastroenterol*, 9(1), 98-112. <https://doi.org/10.1177/1756283x15618131>
- Yang, Y., Zhang, H., Zhang, M., Meng, Q., Cai, L., & Zhang, Q. (2017). Elevation of serum CEA and CA15-3 levels during antitumor therapy predicts poor therapeutic response in advanced breast cancer patients. *Oncol Lett*, 14(6), 7549-7556. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.7164>
- Zajączkowska, R., Kocot-Kępska, M., Leppert, W., Wrzosek, A., Mika, J., & Wordliczek, J. (2019). Mechanisms of Chemotherapy-Induced Peripheral Neuropathy. *Int J Mol Sci*, 20(6). <https://doi.org/10.3390/ijms20061451>

Screening of *Eurycoma longifolia* compounds against the cell cycle by docking through cyclin interaction

Skrining senyawa *Eurycoma longifolia* terhadap siklus sel dengan metode *docking* melalui interaksi *cyclin*

Samsul Hadi^{1*}, Khoerul Anwar¹, Noer Komari², Desiya Ramayanti Azhara¹, Diah Aulia Rosanti¹

¹ Prodi Farmasi, FMIPA, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia

² Prodi Kimia, FMIPA, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia

*Corresponding author: samsul.hadi@ulm.ac.id

Abstract

Background: The community has known pasak bumi for generations to increase sexual desire in men (aphrodisiac). Besides, it can improve the performance of sports athletes and as an antistress, reduce tension, anger, and confusion.

Objective: This relatively large number of uses encourages researchers to want to do *in silico* screening of active compounds against antitumors by going through 2 stages, namely through online PASS and docking.

Method: Docking method to see the stability interaction of compounds with cyclin. In this test, Pyrx was used as a docking tool with various cell cycle-related targets, namely cyclin D3 (PDB ID: 3G33), cyclin A (PDB ID: IJSU), cyclin A (PDB ID, cyclin C (1ZP2), cyclin D (ID PDB: 2W9F), cyclin H (PDB ID: 1KXU), and cyclin T (PDB ID: 3BLR).

Results: The docking result showed that each cyclin showed the best interaction with these compounds: Cyclin A and 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide (-8.6 Kcal/mol), cyclin H and Niloticin (-8.0 Kcal/mol), cyclin D3 is 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide (-7.2 Kcal/mol), cyclin D is Eurycolactone F (-8.4 Kcal/mol), cyclin C is and Niloticin (-7.5 Kcal/mol), and cyclin T and Niloticin (-8.2 Kcal/mol).

Conclusion: Based on the docking score obtained, the stability of the interaction is predicted to occur in cyclin A and 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide (ΔG : -8.6 Kcal/mol).

Keywords: Docking, *Eurycoma longifolia*, cyclin

Intisari

Latar belakang: Pasak bumi telah dikenal oleh masyarakat secara turun-temurun untuk meningkatkan gairah seksual pada pria (afrodisiaka). Disamping itu dapat meningkatkan performa atlet olahraga dan sebagai antistress, menurunkan tegangan, kemarahan, dan kebingungan.

Tujuan: Penggunaan yang relatif banyak ini mendorong peneliti berkeinginan melakukan skrining senyawa aktif terhadap antitumor secara *in silico* dengan melalui 2 tahap yaitu melalui PASS *online* dan *docking*.

Metode: Metode *docking* dipakai untuk melihat interaksi stabilitas senyawa dengan cylin. Dalam pengujian ini, Pyrx digunakan sebagai alat docking dengan berbagai target yang berhubungan dengan siklus sel, yaitu *cyclin* D3 (PDB ID: 3G33), *cyclin* A (PDB ID: IJSU), *cyclin* C (PDB ID: 1ZP2), *cyclin* D (ID PDB: 2W9F), *cyclin* H (ID PDB: 1KXU), dan *cyclin* T (ID PDB: 3BLR).

Hasil: Hasil *docking* pada masing-masing *cyclin* menunjukkan interaksi terbaik dengan senyawa berikut ini: *cyclin* A dan 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide (-8,6 Kkal/mol), *cyclin* H dan Niloticin (-8,0 Kkal/mol), *cyclin* D3 dan 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide (-7,2 Kkal/mol), *cyclin* D dan Eurycolactone F (-8,4 Kkal/mol), *cyclin* C dan Niloticin (-7,5 Kkal/mol), serta *cyclin* T dan Niloticin (-8,2 Kkal/mol).

Kesimpulan: Berdasarkan skor *docking* yang diperoleh, kestabilan interaksi diprediksi akan terjadi pada *cyclin* A dengan 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide (ΔG : -8.6 Kkal/mol).

Kata kunci: Docking, *Eurycoma longifolia*, cyclin

1. Pendahuluan

Pasak bumi atau dengan nama latin *Eurycoma longifolia* Jack. merupakan salah satu tumbuhan obat yang telah lama digunakan secara turun-temurun oleh masyarakat luas khususnya di pulau Sumatera dan Kalimantan untuk meningkatkan gairah seksual pada pria (afrodisiaka). Berdasarkan banyak penelitian *E. Longifolia* dapat meningkatkan stamina pria karena mengandung mineral dan metabolit sekunder. Senyawa dari *E. Longifolia* berperan dalam sintesis testosteron, meningkatkan kemampuan androgenik dan libido. Kandungan mineral dari *E. Longifolia* berperan dalam pendewasaan spermatozoa (Hamzah & Yusof, 2003). Metabolit dari golongan steroid berperan dalam meningkatkan testosteron pada sel leydig khususnya enzim mikrosomal (Tambi *et al.*, 2012). Selain sebagai afrodisiaka, penggunaan yang lain yaitu meningkatkan performa dari para atlet olahraga tanpa mengganggu fungsi hati dan ginjal dengan pengawasan *International Olympic Committee Medical Commission* (Chen *et al.*, 2014). Penggunaan *E. Longifolia* sebagai antistress telah dilakukan uji terhadap manusia baik laki-laki dan perempuan, hasil pengujian menunjukkan penurunan tegangan, kemarahan, kebingungan melalui penurunan kortisol dan peningkatan testosteron (Talbot *et al.*, 2013). Penggunaan *E. Longifolia* yang relatif banyak mendorong peneliti untuk melakukan skrining senyawa aktif terhadap tumor secara *in silico* dengan melalui 2 tahap, yaitu *PASS online* dan *docking*. Skrining dengan *PASS online* ditujukan untuk mencari senyawa yang mempunyai *probability to be active* (Pa) dengan nilai tinggi yang mempunyai aktivitas neoplastik. Stabilitas interaksi antar ligan dan protein terbaik dilakukan dengan menggunakan *docking*, dalam penelitian ini menggunakan Pyrx.

Target *docking* dalam penelitian ini adalah *cyclin*, karena berhubungan dengan siklus sel. Apabila terjadi gangguan dalam siklus sel, hal ini dapat menyebabkan penyakit seperti tumor. Penyakit tumor disebabkan oleh mutasi gen pada apoptosis dan pengatur pertumbuhan yang berhubungan dengan pembelahan sel. Siklus sel dibedakan menjadi dua fase, yaitu mitosis dan interfase (Haneef *et al.*, 2014). Fase interfase dibagi menjadi 3 fase, yaitu G1, S dan G2. Pada Fase G1 terjadi duplikasi DNA, sintesis mRNA, dan protein regulator. Pada fase G1 ini merupakan tahap penting dalam siklus sel karena pada fase ini merupakan tahap suatu ligan berikatan dengan reseptor yang mempengaruhi proliferasi sel pada jalur transduksi. Pada fase S1 terjadi sintesis DNA dan pada fase G2 merupakan tahap akhir penyempurnaan sentriol. Oleh karena itu skrining terakhir dalam penelitian ini adalah *cyclin*, karena *cyclin* akan berinteraksi dengan CDK yang memiliki fungsi penting dalam siklus sel.

2. Metode

2.1. Alat dan bahan

Peralatan yang dipergunakan adalah *laptop* Aspire ES14 dengan ram 2 GB. Perangkat lunak yang digunakan adalah Marvin bean (ChemAxon, 2016), Pyrx (Dallakyan & Olson, 2015), Discovery studio (Systèmes, 2020), dan Webserver dari PASS *online* dan Prankweb (Jendele *et al.*, 2019). Bahan yang dipakai adalah kandungan kimia *E. Longifolia* yang didapat dari *database* Knapsack.

2.2. Cara kerja

Sebanyak 28 Senyawa dari Knapsack dilakukan analisis prediksi antineoplastik dengan PASS *online*. Dari data PASS *online* kemudian diskriming melalui metode *docking* untuk melihat stabilitas interaksi dengan *cyclin*. Target *cyclin* yang dipergunakan adalah *cyclin* D3 (PDB ID: 3G33), *cyclin* A (PDB ID: 1JSU), *cyclin* C (PDB ID: 1ZP2), *cyclin* D (PDB ID: 2W9F), *cyclin* H (PDB ID: 1KXU), and *cyclin* T (PDB ID: 3BLR). Target *cyclin* tersebut tidak mempunyai ligan dalam RCSB, sehingga diperlukan Prankweb untuk memprediksi sisi aktif dari *cyclin*. Setelah mendapatkan sisi aktif dari masing-masing *cyclin*, langkah selanjutnya adalah *docking* dengan menggunakan *software* Pyrx. Hasil *docking* dari *software* Pyrx selanjutnya dilakukan skrining ligan yang mempunyai nilai *free binding energy* (ΔG) yang paling rendah pada masing-masing *cyclin*. Ligan yang berinteraksi dengan *cyclin* energi terendah dideteksi jenis ikatan dan residu yang terlibat dalam interaksi menggunakan Discovery studio.

2.3. Analisis data

Data yang diperoleh dari hasil *docking* diskriming untuk mencari senyawa yang paling stabil berikatan dengan *cyclin* tertentu dan dilihat residu yang berikatan.

3. Hasil dan pembahasan

Skrining senyawa aktif dengan spesifik target antineoplastik dilakukan terhadap 28 senyawa dari *E. longifolia*. Berdasarkan hasil penelusuran menggunakan PASS *online* terdapat 10 senyawa yang memiliki nilai *Probable to be active* (Pa) dengan nilai lebih dari 0,7, yaitu *Melianone*; *Eurycolactone F*; *Niloticin*; *6a-Hydroxyeurycolactone E*; *6a-Hydroxyeurycomalactone*; *Eurycomalide A*; *Eurycomalide B*; *Laurycolactone A*; *Longilactone*; *9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide*. Jika nilai Pa lebih tinggi dari 0,7 kemungkinan aktivitas secara eksperimental agak tinggi sebagai antineoplastik tetapi senyawa tersebut mungkin mendekati analog struktural obat antineoplastik yang ada. Jika nilai Pa lebih tinggi dari 0,5 maka peluang sebagai mempunyai aktivitas antineoplastik secara eksperimental

lebih rendah dan senyawa tersebut kurang mirip dengan obat antineoplastik yang sudah ada. Probabilitas terbaik adalah *Eurycolactone F*, sedangkan probabilitas terendah adalah *9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* dapat dilihat pada Tabel 1. Lebih lanjut, nilai $P_i < P_a < 0,5$ maka senyawa tersebut diprediksi secara eksperimental akan lebih rendah sebagai antineoplastik dan senyawa tersebut secara komputasi berpotensi sebagai antineoplastik (Rodríguez *et al.*, 1989). Disamping itu, nilai P_a yang lebih besar dari nilai P_i menunjukkan senyawa-senyawa tersebut berpotensi untuk dilakukan penelitian di laboratorium (Ivanov *et al.*, 2018). Berdasarkan nilai prediksi PASS *online* maka dapat dilanjutkan uji *docking* untuk melihat stabilitas interaksi antara ligan dan protein target (*cyclin A, H, D3, D, C, dan T*). Target *docking cyclin* mempunyai peranan dalam siklus sel dengan cara berinteraksi dengan *cyclin-dependent kinase (CDK)*.

Berdasarkan struktur pada RCSB, *cyclin-cyclin* tersebut tidak mempunyai ligan kompleks yang berinteraksi. Berdasarkan *database* di Uniprot, senyawa *cyclin* tersebut juga belum mempunyai *binding site* atau *catalytic site*. Oleh karena itu, diperlukan perangkat lain yang dapat dipergunakan untuk memprediksi sisi aktif dari ligan ini, yaitu *web server* Prankweb (Jendele *et al.*, 2019). Koordinat *cyclin A* adalah X: 37,6276;Y:-9,19354;Z:8,5080. Koordinat *cyclin H* adalah X:-19,9720;Y:30,0335;Z:71,7271. Koordinat *cyclin D3* adalah X:10,8800;Y:-35,6899;Z:-35,9799. Koordinat *cyclin D* adalah X:13,2428;Y: 5,6476; Y:51,1799. Koordinat *cyclin C* adalah X:53,7787;Y:32,3941; Z:25,2293. Koordinat *cyclin T* adalah X:16,7717;Y:22,2581;Z:-6,4086.

Tabel 1. Prediksi aktivitas PASS *online*

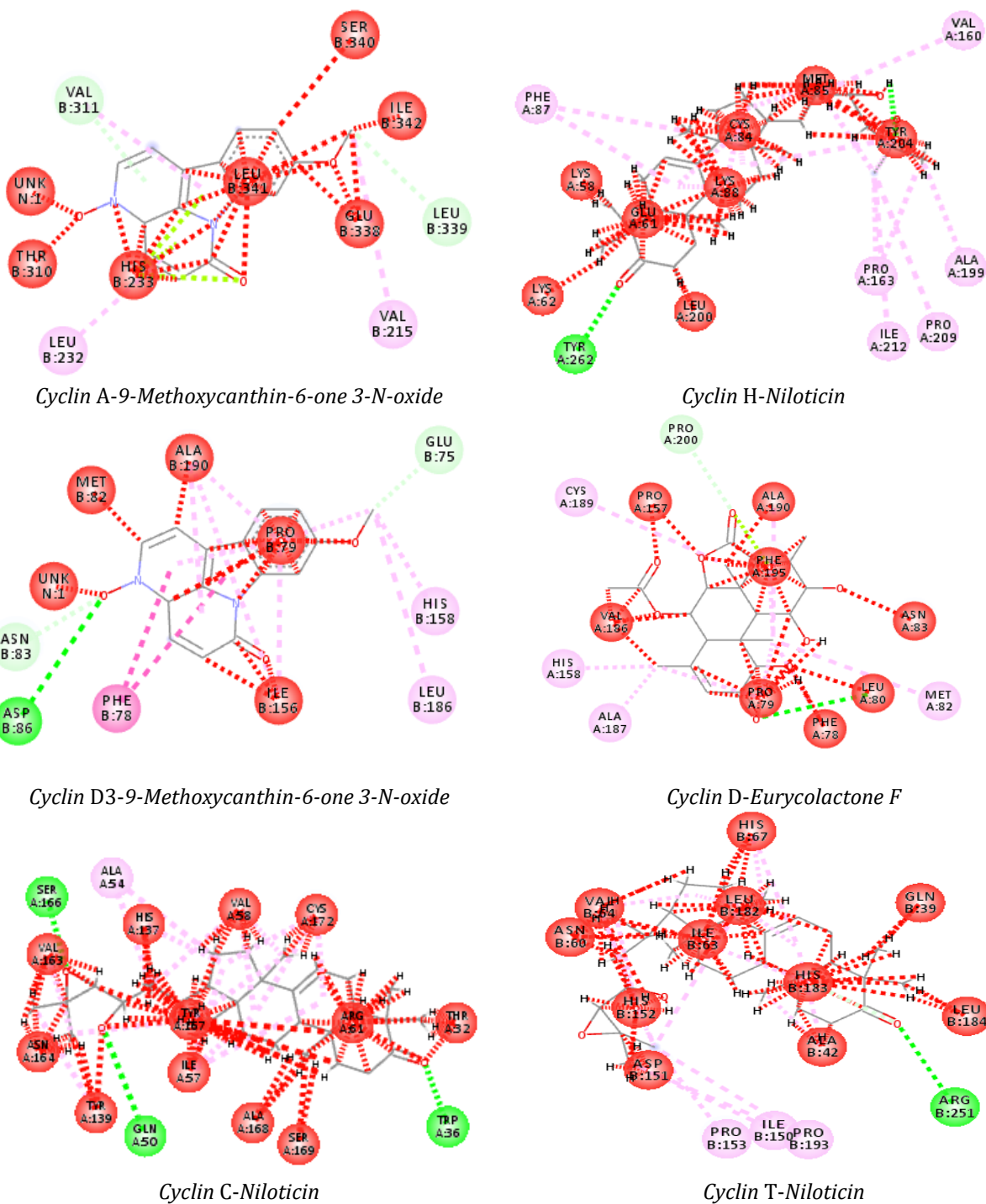
No	Ligan	Antineoplastik	
		P_a	P_i
1.	<i>Melianone</i>	0,944	0,004
2.	<i>Eurycolactone F</i>	0,984	0,004
3.	<i>Niloticin</i>	0,832	0,008
4.	<i>6alpha-hydroxyeurycolactone E</i>	0,968	0,004
5.	<i>6alpha-hydroxyeurycomalactone</i>	0,982	0,004
6.	<i>Eurycomalide A</i>	0,930	0,005
7.	<i>Eurycomalide B</i>	0,936	0,004
8.	<i>Lauricolactone A</i>	0,938	0,004
9.	<i>Longilactone</i>	0,979	0,004
10.	<i>9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide</i>	0,622	0,004

Berdasarkan *docking* yang dilakukan dengan menggunakan metode Pyrx didapatkan hasil seperti pada Tabel 2. Senyawa-senyawa dari *E. longifolia* mempunyai berbagai macam tingkatan *free binding of energy* (ΔG) yang menggambarkan tingkat kestabilan. Semakin negatif nilai ΔG maka interaksi semakin stabil dan reaksi yang terjadi spontan (Arwansyah *et al.*, 2014; Sutomo & Pratama, 2020). Sebaliknya, semakin positif nilai ΔG maka reaksi akan semakin susah terjadi, hal ini dikarenakan proses untuk terjadinya reaksi membutuhkan energi (Issa *et al.*, 2019). Dengan target *cyclin A*, senyawa nilai ΔG terendah adalah *9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* dengan nilai sebesar -

8,6 Kcal/mol. Hal ini disebabkan oleh berbagai macam ikatan dan jarak ikatan yang dapat dilihat pada Tabel 3 dengan visualisasi Gambar 1. Ikatan hidrogen yang berasal dari hidrogen karbon dari ligan berinteraksi dengan oksigen dari LEU339 (jarak ikatan 2,86164 Å). Ikatan hidrogen yang berasal dari hidrogen VAL311 berinteraksi dengan ikatan Pi dari ligan (jarak ikatan 3,1586 Å). Ikatan lone pair dengan Pi yang berasal dari HIS 233 dengan ikatan Pi C=O (2,99869 Å), C=C (2,33651 Å) dan gugus aromatik (2,82904 Å) dari ligan. Ikatan hidrofob yang berasal dari karbon alkil ligan dengan alkil VAL215 (5,25335), alkil LEU341 (3,77919 Å), alkil ILE342 (3,30709 Å). Ikatan hidrofob antara ikatan Pi dari ligan dengan alkil VAL311 (5,17451 Å), alkil LEU 232 (5,2526 Å). Nilai delta G dengan nilai kurang dari -8,5 menunjukkan stabilitas yang tinggi. Hal ini sejalan dengan penelitian ketika ligan berinteraksi dengan *ATP-binding Cassette Super-family G member 2* (Khan *et al.*, 2021).

Tabel 2. Skor docking

No.	Ligan	Free binding of energy (Kcal/mol)					
		Cyclin A	Cyclin H	Cyclin D3 (play molecule)	Cyclin D	Cyclin C	Cyclin T
1	Melianone	-5,7	-6,6	0,6	-4,5	-5,9	-7,2
2	Eurycolactone F	-5,2	-6,4	6,7	-8,4	-6,3	-7,2
3	Niloticin	nol	-8,0	Nol	-8,3	-7,5	-8,2
4	6a-Hydroxyeurycolactone E	-4,9	-6,4	-0,1	-7,3	-6,1	-7,1
5	6a-Hydroxyeurycomalactone	-5,1	-6,1	-0,6	-8,0	-6,6	-7,3
6	Eurycomalide A	-5,2	-6,2	-1,5	-7,9	-6,3	-6,9
7	Eurycomalide B	-8,2	-6,9	2,1	-7,7	-6,7	-7,5
8	Lauricolactone A	-5,7	-6,7	-5,0	-7,8	-6,5	-8,0
9	Longilactone	-5,4	-6,9	-4,2	-7,2	-6,7	-7,4
10	9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide	-8,6	-6,8	-7,2	-7,0	-6,0	-6,6



Gambar 1. Visualisasi interaksi

Tabel 3. Jenis ikatan dan residu yang terlibat

No.	Model	Jenis ikatan		
		Ikatan hidrogen	Ikatan hidrofob	Pi-Lone Pair
1	<i>Cyclin A 9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide</i>	LEU339; VAL311	VAL215; LEU341; ILE342; VAL311, LEU232	HIS233
2	<i>Cyclin H-Niloticin</i>	TYR262; TYR204	CYS84; LYS88; ALA199; MET85; VAL160; PRO163; PRO209; ILE212; PHE87; TYR204	-
3	<i>Cyclin D3 (play molecule)-9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide</i>	ASP86; ASN83, GLU75	PHE78; PRO79; LEU186; HIS158, ALA190; ILE156, ALA190, PRO79, ALA190	-
4	<i>Cyclin D-Eurycolactone F</i>	LEU80; PRO157; PRO200; PHE195	ALA187; ALA190; PRO79; MET82; CYS189; PHE78; HIS158, PHE195	-
5	<i>Cyclin C-Niloticin</i>	TRP36; GLN50; SER166	ALA54; ILE57; VAL58; ALA168; CYS172; ILE57; VAL163; HIS137; TYR139; TYR167	-
6	<i>Cyclin T-Niloticin</i>	ARG251; HIS183	ALA42; VAL64; ILE63; ILE150; PRO193; VAL64; PRO153; LEU182; HIS67; HIS152; HIS183	-

Cyclin H mempunyai kestabilan berinteraksi dengan *Niloticin* dengan nilai ΔG -8,0 Kcal/mol. Hal ini disebabkan oleh ikatan hidrogen yang berasal dari atom H TYR262 dengan atom O dari ligan (jarak ikatan 2,15554 Å). Ikatan hidrogen yang berasal dari atom H dari ligan dengan atom O dari TYR 204(2,05754 Å). Ikatan hidrofob berasal dari alkil CYS84 (3,62819 Å), alkil LYS88 (4,38262 Å), alkil ALA199 (4,01894 Å) dengan alkil ligan. Ikatan hidrofob berasal dari alkil ligan dengan MET85 (4,85545 Å), VAL160 (4,2167 Å), PRO163 (4,65865 Å), PRO163 (4,65865 Å), PRO209 (5,14868 Å), ILE212 (5,13564 Å), LYS88 (4,51633 Å) dengan alkil dari ligan. Ikatan hidrofob terjadi juga berasal dari ikatan Pi PHE87 (4,83235 Å), ikatan Pi dari TYR204 (2,91882 Å) dengan alkil dari ligan. Prediksi *binding cite* dari *cylin H* ini adalah 65;77; 80; 81; 84; 164 ;195;196; 199; 204, sehingga *Nilacotin* berada pada kedudukan di *binding cite* (Kim *et al.*, 1996).

Cyclin D3 mempunyai kestabilan interkasi dengan *9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* (-7,2 kcal/mol). Hal ini disebabkan oleh ikatan hidrogen yang berasal dari atom O dari ligan dengan ASP86 (jarak ikatan 3,21517 Å). Ikatan hidrogen berasal C-H ASN83 dengan atom oksigen (2,36846 Å). Ikatan hidrogen berasal dari C-H ligan dengan atom O dari GLU75 (2,37607 Å). Ikatan hidrofob berasal dari ikatan Pi PHE78 dengan ikatan Pi dari ligan (5,91708 Å). Ikatan hidrofob berasal dari ikatan aklil ligan dengan alkil PRO79 (3,53357 Å) alkil LEU 186(4,94888 Å). Interaksi ini sejalan dengan *binding cite* dari *cyclin D3* adalah ASN 83, ASP 86, ALA157, TYR38, TYR 198, LEU 186, ARG 57, residu ini berperan dalam inetraksi hidrogen dan hidrofob (Jayaraman & Jamil, 2014).

Cyclin D mempunyai kestabilan interaksi dengan *Eurycolactone F* (-8,4 Kcal/mol). Hal ini disebabkan oleh ikatan hidrogen dari donor H LEU80 (jarak ikatan 2,86227 Å); PRO157 (jarak ikatan

2,5238 Å); PRO 200 (jarak ikatan 2,95814 Å) terhadap atom O dari ligan. Ikatan jenis lain berasal dari lone pair atom O dari ligan terhadap ikatan Pi PHE195 (jarak ikatan 2,87685 Å). Ikatan hidrofob berasal dari alkil PRO79 (jarak ikatan 3,12389 Å); MET82 (jarak ikatan 5,05218 Å); CYS189 (jarak ikatan 5,23339 Å) dengan alkil ligan. Ikatan hidrofob dari ikatan Pi PHE78 (jarak ikatan 3,37667 Å); ikatan Pi HIS158 (jarak ikatan 3,80626 Å); Pi PHE195 (jarak ikatan 5,00687 Å) dengan alkil ligan. Interaksi dengan LYS 35 mempunyai pengaruh besar terhadap terjadinya interaksi, akan tetapi residu ini tidak berhasil diduduki oleh ligan (Jayaraman & Jamil, 2014).

Cyclin C mempunyai kestabilan interaksi dengan *Niloticin* sebesar -7,5 Kcal/mol. Hal ini disebabkan oleh ikatan hidrogen yang berasal dari donor H TRP36 (jarak ikatan 2,50201 Å); GLN50 (2,65325 Å); SER166 (2,20014 Å) terhadap atom O dari ligan. Ikatan hidrofob dari alkil ALA54 (5,03072 Å); ILE57 (3,67436 Å); VAL58 (5,33769 Å); ALA168 (3,65895 Å); CYS172 (4,30589 Å); VAL 163 (4,66141 Å) dengan alkil ligan. Ikatan hidrofob dari ikatan Pi HIS137 (5,29631 Å); TYR139 (4,38464 Å); TYR167 (4,6165 Å) dengan alkil ligan. *Binding site* dari prediksi 58; 62; 135; 136; 137; 138; 166; 171; 172; 175; 177; 180 berhasil diduduki oleh *Nilacotin* (Hoepner *et al.*, 2005).

Cyclin T mempunyai kestabilan terbaik dengan *Niloticin* -8,2 Kcal/mol. Hal ini disebabkan oleh ikatan hidrogen yang berasal donor hidrogen ARG251 (jarak ikatan 3,08001); HIS183 (2,12638 Å); Ikatan hidrofob berasal dari alkil ALA42 (3,44311 Å); VAL64 (3,74828 Å); ILE182 (3,28647 Å); ILE63(3,67316 Å); ILE150 (4,52122 Å); PRO193 (4,70172 Å); PRO153 (3,81589 Å); LEU182 (5,23209 Å) dengan alkil dari ligan. Ikatan hidrofob berasal dari ikatan Pi HIS67 (4,9482 Å); HIS152 (5,40427 Å); HIS183 (5,02642 Å) dengan alkil ligan. Residu SER 7, ARG 77 tidak diduduki oleh ligan, padahal residu ini berperan dalam terjadinya interaksi (Rekha *et al.*, 2020).

Binding site prediction dari *Cyclin A* adalah 193; 194; 195; 211; 233; 236; 237; 240; 309; 310; 311; 340; 341; 347; 348; 350; 352; 355. Ikatan yang ditempati *9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* adalah HIS233; VAL311; LEU341. Pada *cyclin H* adalah residu asam amino nomer 65;77; 80; 81; 84; 164 ;195;196; 199; 204. Dari *binding site* ini yang diduduki *Niloticin* adalah CYS84; ALA199; TYR204. *Cyclin D3* diprediksi menggunakan *playmolecule* dan di aplikasi ini tidak disebutkan daftar residu yang terlibat sebagai *binding site*. *Cyclin D* mempunyai prediksi *binding site* 65; 68; 69; 73; 75; 78; 79; 158; 183; 187. Residu yang diduduki oleh *Eurycolactone F* adalah PHE78; PRO79; ALA187; HIS158 (Jendele *et al.*, 2019). Prediksi *binding site cyclin C* adalah 58; 62; 135 ;136; 137; 138; 166; 171; 172; 175; 177; 180. Residu yang ditempati oleh *Niloticin* adalah VAL58; HIS137; SER166; CYS172. *Cyclin T* memiliki prediksi *binding site* 42; 64; 135; 136; 137; 138; 150; 171; 172; 175; 177; 183. Residu yang diduduki oleh *Niloticin* adalah ALA42; VAL64; ILE150; HIS 183 (Jendele *et al.*, 2019).

Stabilitas interaksi antara *cyclin A-9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* diharapkan dapat mempengaruhi siklus sel pada transisi G1/S dan G2/M. Dengan terbentuknya kompleks dapat mempengaruhi siklus sel mitosis *germline* dan mitosis pada sel somatik (Russo *et al.*, 1996). Terbentuknya *cyclin H-Niloticin* diharapkan dapat menurunkan energi pengikatan terhadap CDK7, sehingga terbentuk kompleks yang lebih stabil dan mengaktifkan kinase lain, yaitu CDK1, CDK2, CDK4, dan CDK6 melalui fosforilasi treonin. Kompleks yang stabil antara *cyclin* dan CDK dengan adanya faktor transkripsi TFIIH mengaktifkan RNA polimerase II dengan fosforilasi serin dari C-terminus domain (CTD) dan RNA polimerase II sub unit A (POLR2A) (Kim *et al.*, 1996). Kompleks *cyclin D3 A-9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* diharapkan dapat meningkatkan stabilitas interaksi CDK4 yang berperan dalam fosforilasi menghambat protein retinoblastoma (RB) dan mengatur siklus sel selama transisi G1/S. Fosforilasi RB1 memungkinkan disosiasi faktor transkripsi E2F dari kompleks RB/E2F dan transkripsi berikutnya dari gen target E2F yang bertanggung jawab untuk progresi melalui fase G1. Hipofosforilasi RB1 terjadi pada fase awal G1. Kompleks ini merupakan integrator utama dari berbagai sinyal mitogenik dan antimitogenik (Takaki *et al.*, 2009). Kompleks *cyclin D-Eurycolactone F* diharapkan dapat mempengaruhi kontrol sel dan diferensiasi dalam mempromosikan transisi G1/S, fosforilasi pRB/RB1, dan NPM1. Kompleks tersebut dapat berinteraksi dengan *cyclin G1 tipe-D* selama interfase di G1 untuk membentuk pRB/RB1 kinase dan mengontrol jalan masuk ke dalam siklus sel. Selain itu, kompleks tersebut juga terlibat dalam inisiasi dan pemeliharaan siklus sel selama diferensiasi sel, mencegah proliferasi sel, dan mengatur diferensiasi sel secara negatif (Day *et al.*, 2009). Kompleks *cyclin C-Niloticin* diharapkan dapat meningkatkan stabilitas ketika menjadi koaktifator dalam transkripsi gen yang diatur melalui gen *RNA polymerase II-dependent*. Koaktifator ini berperan sebagai jembatan untuk menyampaikan informasi dari gen regulator protein spesifik ke mesin transkripsi RNA polimerase II. Mediator direkrut ke promotor melalui interaksi langsung dengan regulator protein dan berfungsi sebagai dasar untuk perakitan kompleks prainisiasi fungsional dengan RNA polimerase II dan faktor transkripsi umum (Hoeppner *et al.*, 2005). Kompleks *cyclin T-Niloticin* diharapkan meningkatkan stabilitas ketika berinteraksi dengan CDK9 yang berperan dalam meningkatkan elongasi faktor B (P-TEFb) ketika fosforilasi CTD dari sub unit RNA polimerase II (Baumli *et al.*, 2008).

4. Kesimpulan

Berdasarkan skor *docking* yang diperoleh, kestabilan interaksi diprediksi akan terjadi pada *cyclin A* dengan *9-Methoxycanthin-6-one 3-N-oxide* (ΔG :-8.6 Kcal/mol).

Ucapan terimakasih

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lambung Mangkurat atas kesempatan yang diberikan sehingga peneliti dapat memperoleh data penelitian.

Daftar pustaka

- Arwansyah, A., Ambarsari, L., & Sumaryada, T. I. (2014). Simulasi docking senyawa kurkumin dan analognya sebagai inhibitor reseptor androgen pada kanker prostat. *Jurnal Dinamika*, 5(2), 60–75.
- Baumli, S., Lolli, G., Lowe, E. D., Troiani, S., Rusconi, L., Bullock, A. N., Debreczeni, J. E., Knapp, S., & Johnson, L. N. (2008). The structure of P-TEFb (CDK9/*cyclin* T1), its complex with flavopiridol and regulation by phosphorylation. *Embo j*, 27(13), 1907-1918. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.121>
- ChemAxon. (2016). *ChemAxon - Software Solutions and Services for Chemistry and Biology* MarvinSketch, Version 16.10.31. <https://chemaxon.com/>
- Chen, C. K., Mohamad, W. M., Ooi, F. K., Ismail, S. B., Abdullah, M. R., & George, A. (2014). Supplementation of *Eurycoma longifolia* Jack extract for 6 weeks does not affect urinary testosterone: epitestosterone ratio, liver and renal functions in male recreational athletes. *Int J Prev Med*, 5(6), 728-733.
- Dallakyan, S., & Olson, A. J. (2015). Small-molecule library screening by docking with PyRx. *Methods Mol Biol*, 1263, 243-250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2269-7_19
- Day, P. J., Cleasby, A., Tickle, I. J., O'Reilly, M., Coyle, J. E., Holding, F. P., McMenamin, R. L., Yon, J., Chopra, R., Lengauer, C., & Jhoti, H. (2009). Crystal structure of human CDK4 in complex with a D-type *cyclin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(11), 4166-4170. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809645106>
- Hamzah, S. H., & Yusof, A. (2003). *The Ergogenic Effect of Eurycoma longifolia Jack: A Pilot Study*
- Haneef, M., Lohani, M., Dhasmana, A., Jamal, Q. M., Shahid, S. M., & Firdaus, S. (2014). Molecular docking of known carcinogen 4- (Methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) with *cyclin* dependent kinases towards its potential role in cell cycle perturbation. *Bioinformation*, 10(8), 526-532. <https://doi.org/10.6026/97320630010526>
- Hoepfner, S., Baumli, S., & Cramer, P. (2005). Structure of the mediator subunit *cyclin* C and its implications for CDK8 function. *J Mol Biol*, 350(5), 833-842. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.05.041>
- Issa, N. T., Badiavas, E. V., & Schürer, S. (2019). Research techniques made simple: molecular docking in dermatology - a foray into in silico drug discovery. *Journal of Investigative Dermatology*, 139(12), 2400-2408.e2401. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.06.129>
- Ivanov, S. M., Lagunin, A. A., Rudik, A. V., Filimonov, D. A., & Poroikov, V. V. (2018). ADVERPred-Web Service for prediction of adverse effects of drugs. *J Chem Inf Model*, 58(1), 8-11. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.7b00568>
- Jayaraman, A., & Jamil, K. (2014). Drug targets for cell cycle dysregulators in leukemogenesis: in silico docking studies. *PLoS One*, 9(1), e86310. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086310>
- Jendele, L., Krivak, R., Skoda, P., Novotny, M., & Hoksza, D. (2019). PrankWeb: a web server for ligand binding site prediction and visualization. *Nucleic Acids Res*, 47(W1), W345-w349. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz424>

- Kim, K. K., Chamberlin, H. M., Morgan, D. O., & Kim, S. H. (1996). Three-dimensional structure of human *cyclin* H, a positive regulator of the CDK-activating kinase. *Nat Struct Biol*, 3(10), 849-855. <https://doi.org/10.1038/nsb1096-849>
- Rekha, U. V., Anita, M., Jayamathi, G., Sadhana, K., Deepa, S., Hussain, S., Bhuvaneshwari, J., Ramya, V., Selvaraj, J., & Naveenraj, N. S. (2020). Molecular docking analysis of piperine with CDK2,CDK4,*Cyclin* D and *Cyclin* T proteins. *Bioinformation*, 16(5), 359-362. <https://doi.org/10.6026/97320630016359>
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massagué, J., & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 *cyclin*-dependent-kinase inhibitor bound to the *cyclin* A-Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), 325-331. <https://doi.org/10.1038/382325a0>
- Sutomo, S., & Pratama, M. R. F. (2020). Measuring the potential antioxidant activity of methyl gallate: Molecular docking study. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44(1), 14-22.
- Systèmes, D. (2020). *Free Download: BIOVIA Discovery Studio Visualizer - Dassault Systèmes*. https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download#_ga=2.4935860.685747970.1587999055-a5d1c1c0-3176-11e9-a86f-e302515d21c8
- Takaki, T., Echalié, A., Brown, N. R., Hunt, T., Endicott, J. A., & Noble, M. E. (2009). The structure of CDK4/*cyclin* D3 has implications for models of CDK activation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(11), 4171-4176. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809674106>
- Talbott, S. M., Talbott, J. A., George, A., & Pugh, M. (2013). Effect of Tongkat Ali on stress hormones and psychological mood state in moderately stressed subjects. *J Int Soc Sports Nutr*, 10(1), 28. <https://doi.org/10.1186/1550-2783-10-28>
- Tambi, M. I., Imran, M. K., & Henkel, R. R. (2012). Standardised water-soluble extract of *Eurycoma longifolia*, Tongkat ali, as testosterone booster for managing men with late-onset hypogonadism? *Andrologia*, 44 Suppl 1, 226-230. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2011.01168.x>

Potential of the superoxide dismutase enzyme from corn kernels (*Zea mays* L.) for the repair of 3T3 fibroblast cells exposed to ultraviolet A light

Potensi enzim superoksida dismutase dari biji Jagung (*Zea mays* L.) untuk perbaikan sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar ultraviolet A

Mustika Endah Pratiwi¹, Jason Merari Peranginangin¹, Isna Jati Asiya², Ana Indrayati^{1*}

¹Program Studi S2 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Jebres, Surakarta-57127

²Program Studi S1 Farmasi, Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi Surakarta, Jl. Letjen Sutoyo, Mojosongo, Jebres, Surakarta-57127

*Corresponding author: anaindrayati2020@gmail.com

Abstract

Background: UV-A radiation induct disorder to the skin called photoaging. It requires treatment with antioxidant agent. Superoxide dismutase (SOD) is the first line antioxidant in the treatment of free radicals.

Objective: This study aimed to find out anti-photoaging activities of SOD extract of corn (*Zea mays* L.) kernels on radiated UV-A rays 3T3 fibroblast cells.

Method: SOD extraction of corn kernels was done by centrifugation, precipitation, and dialysis method. The activity of SOD extract in corn kernels was measured by WST-1 method. Anti-photoaging activity test of SOD extract in corn kernels was done on radiated UV-A rays 3T3 fibroblast cells with parameters of cell viability. Anti-photoaging activity test using cell control, negative, sample, and positive control.

Results: SOD activity showed that the highest percent inhibition value was SOD extract of corn kernels in precipitation of ammonium sulphate concentration was 60-90% with inhibition percentage was 65.50%. The result of anti-photoaging activity SOD extract of corn kernels showed significant difference in the value of percent cell viability in fibroblast cells between the extract group and the negative control group with the highest percent cell viability in SOD extract corn kernels with the concentration was 100 mg/mL, namely 142.31%.

Conclusion: SOD extract from corn kernels has proven had antioxidant activity that could be used as anti-photoaging through fibroblast cell reparation mechanism.

Keywords: Corn kernel, anti-photoaging, SOD, 3T3 fibroblast cell

Intisari

Latar belakang: Radiasi sinar UV-A memicu gangguan pada kulit yang disebut *photoaging*. Gangguan tersebut ditangani dengan zat antioksidan. *Superoksida dismutase* (SOD) merupakan antioksidan enzimatis lini pertama dalam penanganan radikal bebas.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas *anti-photoaging* ekstrak SOD biji jagung pada sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar UV-A.

Metode: Ekstraksi SOD biji jagung dilakukan menggunakan metode sentrifugasi, presipitasi dan dialisis. Aktivitas SOD hasil ekstraksi biji jagung dilakukan dengan menggunakan metode WST-1. Aktivitas *anti-photoaging* ekstrak SOD biji jagung dilakukan terhadap sel fibroblas 3T3 yang dipaparkan sinar UV-A. Parameter yang diamati adalah viabilitas sel. Pengujian menggunakan kontrol sel, kontrol negatif, sampel dan kontrol positif.

Hasil: Ekstrak SOD biji jagung presipitasi amonium sulfat (konsentrasi 60-90%) menunjukkan aktivitas SOD tertinggi dengan persen inhibisi 65,50%. Pengujian aktivitas *anti-photoaging* menunjukkan perbedaan bermakna antara kelompok ekstrak dengan kelompok kontrol negatif dengan hasil persen viabilitas sel tertinggi yaitu 142,31% pada ekstrak SOD biji jagung (consenters 100 mg/mL).

Kesimpulan: Ekstrak SOD dari biji jagung terbukti memiliki aktivitas sebagai antioksidan yang dapat digunakan sebagai *anti-photoaging* melalui mekanisme perbaikan sel fibroblas.

Kata kunci: Biji jagung, *anti-photoaging*, SOD, viabilitas, sel fibroblas 3T3

1. Pendahuluan

Kulit yang terkena paparan sinar UV (ultraviolet) dari matahari secara terus-menerus akan mengalami perubahan struktur dan komposisi serta menyebabkan timbulnya *stress* oksidatif pada kulit. Perubahan yang terlihat berupa perubahan jangka pendek dan perubahan jangka panjang. Perubahan jangka pendek bersifat akut seperti pigmentasi, eritema dan fotosensitivitas, sedangkan perubahan jangka panjang berupa penuaan dini bahkan kanker kulit (Pratiwi & Husni, 2017).

Sinar UV terbagi menjadi 3, yaitu sinar UV-A (315-400 nm), UV-B (290-320 nm) dan UV-C (100-280 nm) (Amaro-Ortiz *et al.*, 2014). Sinar UV-A dapat menembus hingga ke dalam ruangan dan menyerang lapisan dermis kulit. Hal ini dianggap sebagai penyebab utama penuaan kulit. Lapisan dermis meliputi 80-90% bagian dari kulit. Lapisan ini terdiri dari kolagen (70%), elastin dan matriks ekstraseluler yang berasal dari sel fibroblas. Lapisan dermis berkontribusi pada ketebalan kulit, terlibat dalam pembentukan kerutan, berperan dalam metabolisme, penyembuhan luka dan perbaikan sel. Fibroblas secara langsung berkaitan dengan penuaan karena memiliki reseptor untuk faktor pertumbuhan epidermal dan faktor pertumbuhan fibroblas (Yong & Ahn, 2018).

Perubahan yang terjadi pada kulit bila terpapar sinar matahari terus-menerus dalam waktu lama (kronik) dan intensitas sinar matahari kuat (radiasi UV tinggi) disebut *dermatoheliosis* atau *photoaging*. Kelainan kulit ini termasuk dalam penuaan ekstrinsik (penuaan karena faktor luar). Radiasi sinar UV menimbulkan radikal bebas pada kulit. Radikal bebas ini menghalangi difusi zat nutrisi, menon-aktifkan enzim, mengoksidasi lemak (dalam sel, membran sel dan antar sel) dan memecah DNA sehingga dapat membantu timbulnya keadaan pra-kanker (Kartawiguna, 2011).

Penanganan *aging* dilakukan dengan bahan kimia seperti *alpha hydroxy acid*, *retinoid*, *fluorouracil cream*. Selain itu, dapat juga dilakukan dengan *facial rejuvenation*, seperti *botox*, implantasi, *blepharoplasty* dan masih banyak lagi (Damayanti & Ratnayanti, 2013). Selain penggunaan bahan kimia dan *treatment* perawatan wajah, penanganan *aging* juga sedang dikembangkan melalui pemanfaatan bahan alam yang memiliki senyawa yang berpotensi sebagai *anti-aging*. Beberapa penelitian terkait penanganan *photoaging* menggunakan bahan alam telah dilakukan, diantaranya efek *anti-photoaging* dari ekstrak jeju putgyul (*Unripe citrus*) (Choi *et al.*, 2017), ekstrak *Bouea macrophylla* (Cheong *et al.*, 2018), ekstrak propolis (Ebadi & Fazeli, 2017) dan ekstrak *Angelica acutiloba* (Park *et al.*, 2017).

Radikal bebas dapat dinetralkan oleh antioksidan yang terdapat dalam tubuh yaitu enzim CAT (katalase), GSH-Px (glutation peroksidase), SOD (superoksida dismutase) dan zat non enzim yaitu vitamin E, vitamin C, beta karoten, vitamin A, metionin, selenium dan tirosin (Kartawiguna, 2011). SOD merupakan antioksidan enzimatik sangat kuat yang mengkatalisis perubahan radikal O_2^* (anion superoksida) menjadi H_2O_2 (hidrogen peroksida) dan O_2 (molekul oksigen) dalam sirkulasi peredaran darah. Antioksidan ini bekerja mengeluarkan substansi berbahaya seperti radikal bebas dan mengurangi stres oksidatif yang berkontribusi dalam penuaan. Untuk itu, diperlukan enzim SOD dari suplemen makanan untuk mengatasi *photoaging* yang disebabkan oleh radikal bebas (Sharma *et al.*, 2014).

Penelitian tentang isolasi SOD dari tumbuhan tingkat tinggi telah dilakukan oleh beberapa peneliti, di antaranya isolasi SOD dari biji bayam (*Amaranthus spinosus*) dengan aktivitas spesifik SOD sebesar 0,54 unit/mg (Sharma *et al.*, 2014) dan isolasi SOD dari akar *Stemona tuberosa* dengan aktivitas spesifik SOD sebesar 27,8 unit/mg (Niyomploy *et al.*, 2014). Namun, belum ada penelitian lanjutan mengenai aktivitas farmakologi *anti-photoaging* baik secara *in vitro* maupun *in vivo* dari tumbuhan-tumbuhan yang telah diisolasi enzim SOD-nya.

Jagung mengandung senyawa yang dapat beraktivitas sebagai antioksidan, yaitu senyawa beta karoten dan SOD. Isolasi SOD dari biji jagung telah dilakukan oleh Baum *et al.* (1983), namun belum dilakukan penelitian lanjutan terkait SOD dari biji jagung. SOD yang terdapat pada biji jagung berpotensi sebagai antioksidan yang dapat digunakan untuk menangani *photoaging*. Berdasarkan alasan tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan ekstraksi SOD dari biji jagung, menguji aktivitas antioksidan SOD menggunakan metode WST-1 (*Water soluble tetrazolium-1*) dan melakukan uji aktivitas *anti-photoaging* menggunakan sel fibroblas 3T3 dengan parameter viabilitas sel.

2. Metode

2.1. Bahan dan sampel

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji jagung, akuabides, NaOCl (natrium hipoklorit), dapar kalium fosfat 0,05 mM pH 7, amonium sulfat, tabung selofan, superoxide dismutase *activity assay kit*, sel fibroblas 3T3, media padat, $NaHCO_3$ (sodium bikarbonat), HCl 1 N, NaOH 1 N, penisilin-streptomisin, FBS (*Fetal Bovine Serum*), media DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), PBS (*Phosphate Buffer Saline*) 1X, reagen MTT, SDS (*sodium dodecyl sulphate*) 10%, HCl pekat, *sirius red*, asam pikrat, HCl 0,1 N, NaOH 0,5 N, tisu, alumunium *foil*. Sampel berupa buah jagung utuh dibeli di pasar tradisional Kaliurang kota Yogyakarta

2.2 Jalannya penelitian

2.2.1 Ekstraksi enzim SOD biji jagung

Biji jagung sebanyak 2000 g disterilkan selama 10 menit dalam 1% NaOCl, kemudian dibilas menggunakan akuabides dan direndam dalam akuabides selama 24 jam. Selanjutnya, biji jagung ditiriskan dan dihomogenisasi menggunakan *blender* dengan penambahan dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 sebanyak 500 mL. Homogenat tersebut disaring dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 30 menit pada suhu 4 °C kemudian diambil supernatannya.

Amonium sulfat ditambahkan ke dalam supernatan untuk membuat presipitasi amonium sulfat konsentrasi 20% kemudian diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit pada suhu 4 °C kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya. Supernatan yang diperoleh dibuat dalam konsentrasi presipitasi 40% dengan penambahan amonium sulfat dan diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya. Supernatan ini kemudian dibuat dalam konsentrasi presipitasi 60% dengan penambahan amonium sulfat dan diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Selanjutnya disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya. Supernatan yang diperoleh dibuat dalam konsentrasi presipitasi 90% dengan penambahan amonium sulfat dan diaduk selama 60 menit menggunakan *magnetic stirrer* dalam lemari pendingin. Larutan tersebut disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit kemudian dipisahkan supernatan dan peletnya.

Pelet dari masing-masing konsentrasi presipitasi amonium sulfat diresuspensikan ke dalam dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 sebanyak 20 mL dan didialisis selama 24 jam dalam dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0. Dialisat dari masing-masing konsentrasi presipitasi amonium sulfat disentrifugasi pada kecepatan 6000 rpm selama 10 menit, kemudian diambil peletnya. Pelet masing-masing ekstrak SOD presipitasi amonium sulfat dari biji jagung diresuspensi dengan dapar kalium fosfat 0,05 M pH 7,0 sebanyak 20 mL dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C

2.2.2 Pengujian aktivitas antioksidan ekstrak SOD biji jagung

- 1) Penyiapan *WST Working Solution*. Sebanyak 1 mL larutan WST diencerkan dengan 19 mL larutan dapar *assay*. Larutan ini stabil sampai 2 bulan penyimpanan pada suhu 4 °C.
- 2) Penyiapan *Enzyme Working Solution*. Larutan enzim disentrifugasi selama 5 detik. Larutan dicampur secara sempurna dengan menggunakan pipet (tahap ini perlu dilakukan karena enzim mempunyai dua lapis dan harus bercampur dengan sempurna sebelum dilakukan pengenceran).

Larutan enzim sebanyak 15 µL diencerkan dengan 2,5 mL larutan dapar. Hasil pengenceran larutan enzim stabil sampai 3 minggu pada suhu 4 °C.

- 3) Penyiapan Sampel Uji. Ekstrak SOD biji jagung pada masing-masing konsentrasi presipitasi amonium sulfat dilarutkan dalam dapar kalium fosfat sebanyak 20 µL. Larutan sampel, blanko 1, blanko 2 dan blanko 3 dibuat dengan komposisi seperti tercantum pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi larutan sampel dan blanko

	Sampel (µl)	Blanko 1 (µl)	Blanko 2 (µl)	Blanko 3 (µl)
Larutan sampel	20	-	20	-
ddH ₂ O	-	20	-	20
WST Working Solution	200	200	200	200
Enzyme Working Solution	20	20	-	-
Larutan dapar	-	-	20	20

Larutan sampel, blanko 1, blanko 2 dan blanko 3 dimasukkan dalam *plate 96 well* kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 20 menit. Larutan uji diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Hasil absorbansi digunakan untuk menentukan persen inhibisi menggunakan rumus:

$$\% \text{ Inhibisi} = [(A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}}) - (A_{\text{sampel}} - A_{\text{blanko 2}})] / (A_{\text{blanko 1}} - A_{\text{blanko 3}}) \times 100$$

Keterangan:

A_{blanko1} : Absorbansi blanko 1; A_{blanko 2} : Absorbansi blanko 2

A_{blanko3} : Absorbansi blanko 3; A_{sampel}: Absorbansi sampel

2.2.3 Pengujian aktivitas anti-photoaging secara in vitro

- 1) Pembuatan media cair

Media padat DMEM disiapkan sebanyak 1 sachet. Akuabides steril sebanyak 800 mL disiapkan dalam gelas beker 1000 mL dalam LAF (*Laminar Air Flow*). Media bubuk DMEM dituang ke dalam akuabides steril dalam gelas beker, kemudian diaduk hingga homogen. Sisa bubuk dalam kemasan media dibersihkan dengan akuabides lalu dituang ke dalam gelas beker. Sebanyak 3,7 g NaHCO₃ ditambahkan ke dalam larutan media. Akuabides steril ditambahkan ke dalam gelas beker berisi larutan media hingga volume 1000 mL. Semua komponen dalam larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga terlarut sempurna. pH larutan media disesuaikan dengan penambahan HCl 1N atau NaOH 1N. Media yang telah disesuaikan pH-nya difiltrasi menggunakan filter 0,2 µm kemudian media ditampung ke dalam botol Duran 1000 mL. Larutan media diberi penanda dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C.

- 2) Pembuatan media kultur

FBS dan penisilin-streptomisin dicairkan terlebih dahulu pada suhu ruang sebelum digunakan. Botol Duran volume 100 mL disiapkan. Sebanyak 10 mL FBS diambil dan dituang ke dalam botol Duran. Sebanyak 1 mL penisilin-streptomisin diambil dan dituang ke dalam botol

Duran. Media cair ditambahkan ke dalam botol Duran hingga volume 100 mL. Botol diberi penanda berupa nama media dan tanggal pembuatan media kultur.

3) Penyiapan Sel Fibroblas 3T3

Cryo tube yang berisi sel diambil dari tangki nitrogen cair. Suspensi sel dalam *cryo tube* dicairkan pada suhu ruang hingga mencair sempurna. Suspensi sel diambil menggunakan *micropipet* 1000 µl kemudian dimasukkan setetes demi setetes ke dalam *conical tube* berisi media kultur yang telah disiapkan. *Conical tube* ditutup rapat kemudian suspensi sel tersebut disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm selama 5 menit. *Conical tube* disemprot dengan alkohol untuk kondisi kerja aseptis. *Conical tube* dibuka dan supernatan media kultur dibuang ke dalam pembuangan. Sebanyak 4 mL media kultur ditambahkan ke dalam *conical tube* lalu sel diresuspensi hingga homogen. Sebanyak 2 mL suspensi sel dipindahkan ke dalam *petridish* kemudian ditambahkan media kultur sebanyak 5 mL. Kondisi sel dalam *petridish* diamati dengan mikroskop. Sel disimpan dalam inkubator CO₂ 5%.

Sel diambil dari inkubator CO₂ dan diamati kondisinya, serta dipanen setelah mencapai konfluensitas 80%. Media dibuang menggunakan *micropipet* atau pipet *pasteur* steril. Sel dicuci dengan PBS sebelum dipanen. Sel dipanen dengan cara menambahkan tripsin 0,1 % dan EDTA. Sel yang telah dipanen kemudian diinkubasi selama 5 menit, selanjutnya ditambahkan media kultur. Sel disentrifugasi, kemudian diambil bagian peletnya. Sel ditambahkan lagi dengan media kultur, kemudian dilakukan perhitungan sel menggunakan alat hemositometer.

4) Pemaparan Sel Fibroblas 3T3 dengan Sinar UV-A

Media dari kultur sel yang telah konfluen dibuang kemudian sel dicuci sebanyak 2 kali dengan PBS 1X. Sel disinari dengan lampu UV-A pada dosis 1000 mJ/cm² selama 55 menit pada jarak sinar 1 meter. Kelompok kontrol sel normal dan blanko ditutup menggunakan isolasi hitam agar tidak terkena sinar UV-A. Setelah penyinaran, PBS dibuang kemudian diganti dengan media kultur sebanyak 100 µL. *Microplate* diinkubasi dalam inkubator CO₂ 5% pada suhu 37 °C selama 24 jam.

5) Pembuatan Larutan Stok Ekstrak SOD Biji Jagung

Larutan ekstrak SOD biji jagung dibuat pada konsentrasi 12,5; 25; 50; dan 100 mg/mL dengan metode pengenceran bertingkat.

6) Penentuan Viabilitas Sel

Viabilitas sel ditentukan menggunakan uji MTT. Sel yang telah dipaparkan sinar UV-A, diberi larutan uji dan diinkubasi selama 24 jam. Larutan dalam *plate* dibuang setelah diinkubasi. Setiap kelompok sampel ditambahkan larutan MTT sebanyak 100 µL. Larutan MTT dibuat sebanyak 10

mL dengan perbandingan MTT : media (1:9). *Plate* berisi MTT kemudian diinkubasi selama 4 jam dalam inkubator CO₂. *Plate* berisi MTT ditambahkan *stopper* SDS 10% sebanyak 100 µL tiap *well* dan disimpan selama 24 jam dengan membungkus *plate* terlebih dahulu dengan *aluminium foil* atau kertas. Jumlah formazan dihasilkan dari reduksi MTT oleh mitokondria sel hidup ditentukan dengan mengukur absorbansi pada panjang gelombang 595 nm. Absorbansi yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus untuk menentukan persen viabilitas sel. Rumus persen viabilitas sel:

$$\frac{(\text{Abs.sel perlakuan} - \text{Abs.blanko})}{(\text{Abs.sel kontrol} - \text{Abs.blanko})} \times 100\%$$

3. Hasil dan pembahasan

3.1 Ekstraksi enzim SOD biji jagung

Ekstraksi SOD biji jagung dilakukan menggunakan metode sentrifugasi, dilanjutkan dengan presipitasi enzim menggunakan amonium sulfat dan tahap akhir dilakukan dialisis. Ekstrak SOD biji jagung yang diperoleh berupa padatan berwarna putih kekuningan. Rendemen yang diperoleh dari hasil ekstraksi SOD biji jagung pada tahap presipitasi amonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Rendemen ekstrak SOD biji jagung

No.	Konsentrasi presipitasi amonium sulfat (%)	Berat basah (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
1.	0-20	2.000	4,56	0,228
2.	20-40	2.000	4,78	0,239
3.	40-60	2.000	5,20	0,260
4.	60-90	2.000	5,69	0,285

Metode pengambilan enzim dimulai dari pemecahan sel yang dilakukan dengan cara homogenisasi sampel biji jagung menggunakan alat *blender*. Dapar kalium fosfat ditambahkan pada sampel biji jagung untuk membantu membasahi sel agar proses pemecahan sel menjadi lebih mudah. Penambahan dapar kalium fosfat juga dimaksudkan untuk mempertahankan pH enzim yang akan diambil. Sentrifugasi dilakukan untuk memisahkan fraksi yang larut (*supernatan*) dan tidak larut (*debris*), dimana protein terdapat dalam fraksi terlarut. Hal ini dikarenakan sel memiliki densitas yang lebih besar daripada molekul protein. *Supernatan* yang diperoleh disebut dengan ekstrak kasar SOD biji jagung. Langkah selanjutnya yaitu pemurnian SOD menggunakan metode pengendapan dan filtrasi. *Supernatan* yang diperoleh ditambahkan padatan amonium sulfat. Penambahan amonium sulfat disesuaikan dengan konsentrasi kejenuhan presipitasi yang diinginkan.

Konsentrasi garam yang ditambahkan ke dalam ekstrak kasar SOD biji jagung dibuat variatif dan dilakukan pada suhu rendah. Kondisi suhu rendah mampu meningkatkan presipitasi protein saat penambahan garam dengan kadar tinggi. Semakin tinggi konsentrasi garam, kelarutan protein akan

semakin rendah sehingga protein akan mengendap. Garam memiliki derajat ionisasi yang lebih tinggi daripada protein, sehingga garam memiliki afinitas yang lebih tinggi terhadap air yang mengelilingi protein. Akibatnya, terjadi kompetisi antara garam dan protein untuk mempertahankan molekul air. Keuntungan menggunakan metode pengendapan dengan amonium sulfat yaitu dapat mengendapkan hampir seluruh protein karena amonium sulfat memiliki molaritas yang besar, memiliki densitas rendah yakni $1,235 \text{ g/cm}^3$ sehingga amonium sulfat tidak akan ikut terendapkan saat sentrifugasi protein.

Pemurnian tahap lanjut dilakukan dengan filtrasi menggunakan kantong dialisis. Metode dialisis merupakan metode yang umumnya digunakan untuk meningkatkan kemurnian suatu molekul dalam tahap purifikasi. Pemisahan ini perlu dilakukan untuk mengeluarkan sisa garam amonium sulfat yang kemungkinan ikut terendapkan bersama protein, agar garam amonium sulfat tersebut tidak mengganggu tahap pengujian selanjutnya.

3.2 Aktivitas antioksidan ekstrak SOD biji jagung

Aktivitas antioksidan ekstrak SOD biji jagung dilakukan menggunakan metode WST-1. Nilai absorbansi ekstrak SOD biji jagung yang diperoleh kemudian dimasukkan ke dalam rumus bersama dengan nilai absorbansi blanko 1, 2 dan 3 untuk memperoleh nilai persen inhibisi. Persen inhibisi aktivitas SOD ekstrak biji jagung dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Persen inhibisi pengukuran aktivitas ekstrak SOD biji jagung

No.	Sampel (%)	% Inhibisi (1)	% Inhibisi (2)	% Inhibisi (3)	Rerata \pm SD
1.	Presipitasi amonium sulfat 0-20	45,61	42,11	52,63	46,78 \pm 5,36
2.	Presipitasi amonium sulfat 20-40	52,63	49,12	56,14	52,63 \pm 3,51
3.	Presipitasi amonium sulfat 40-60	61,40	56,14	63,16	60,23 \pm 3,65
4.	Presipitasi amonium sulfat 60-90	63,16	61,40	71,93	65,50 \pm 5,64

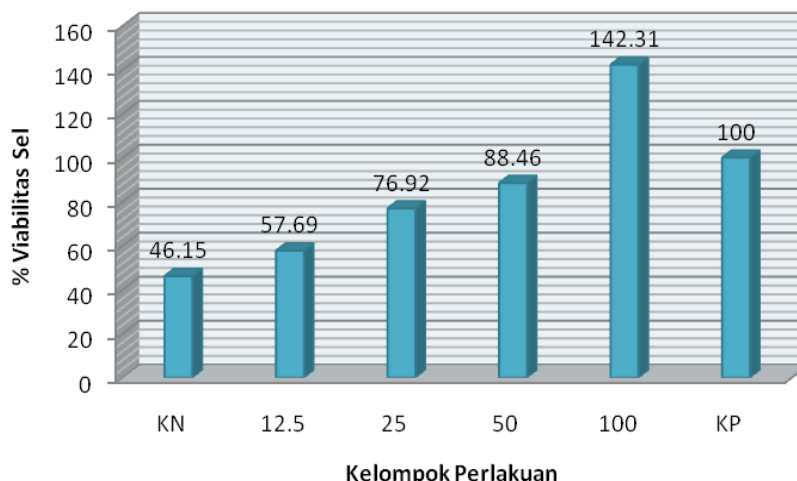
WST memiliki rumus kimia 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium monosodium salt yang menghasilkan pewarna formazan yang larut dalam air pada reduksi dengan O_2^* . Nilai reduksi WST-1 dari O_2^* berhubungan linier dengan aktivitas xantin oksidase dan aktivitas tersebut dihambat oleh SOD. Aktivitas hambat dari SOD dapat ditentukan dengan metode kolorimetri. Prinsip dari pengukuran SOD adalah radikal bebas atau superoksida yang dihasilkan akan bereaksi dengan WST-1 sehingga menghasilkan WST-1 formazan yang berwarna kuning. SOD mengubah superoksida yang akan menghambat reduksi WST-1 menjadi WST-1 formazan. SOD berkompetisi dengan WST-1 untuk bereaksi dengan superoksida sehingga menghambat pembentukan zat warna. Aktivitas SOD diukur melalui derajat penghambatan (inhibisi)

pembentukan zat warna pada panjang gelombang 450 nm (Wahyu *et al.*, 2005). Panjang gelombang 450 nm merupakan panjang gelombang yang dapat menganalisis serapan warna yang dihasilkan dari reaksi WST-1 menjadi WST-1 formazan (Baharvand, 2015).

Persen inhibisi paling tinggi dari ekstrak SOD biji jagung ditunjukkan pada presipitasi enzim amonium sulfat konsentrasi 60-90% yaitu sebesar 65,50 %. Hal ini dikarenakan semakin tinggi konsentrasi presipitasi amonium sulfat, maka semakin murni enzim yang diperoleh sehingga aktivitas antioksidannya juga semakin meningkat. Ekstrak SOD biji jagung presipitasi amonium sulfat konsentrasi 60-90% digunakan untuk pengujian aktivitas *anti-photoaging*.

3.3 Aktivitas *anti-photoaging* ekstrak SOD biji jagung

Aktivitas *anti-photoaging* ekstrak enzim biji jagung ditentukan berdasarkan parameter persen viabilitas sel. Persen viabilitas sel fibroblas 3T3 setelah dipaparkan sinar UV-A setelah pemberian ekstrak SOD biji jagung dan asam askorbat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Persen viabilitas sel fibroblas 3T3

Keterangan:

KN : Kontrol negatif (sel yang diberikan dapar kalium fosfat)

KP : Kontrol positif (sel yang diberikan asam askorbat 1,25 mg/mL)

Sinar UV-A yang dipaparkan pada sel menurunkan viabilitas sel fibroblas 3T3 dilihat dari persen viabilitas sel pada kelompok kontrol negatif jika dibandingkan dengan persen viabilitas sel yang tidak dipaparkan sinar UV-A. Pemberian ekstrak SOD biji jagung menunjukkan peningkatan persen viabilitas sel jika dibandingkan dengan persen viabilitas sel pada kelompok kontrol negatif. Peningkatan persen viabilitas sel yang paling tinggi ditunjukkan oleh penambahan ekstrak SOD biji jagung konsentrasi 100 mg/mL dengan nilai 142,31 %. Hasil ini dihitung menggunakan kontrol berupa pemberian asam askorbat konsentrasi 1,25 mg/mL. Hasil yang diperoleh dalam penelitian

ini menunjukkan persen viabilitas sel yang lebih tinggi dibandingkan persen viabilitas sel yang dihasilkan dari pemberian kombinasi madu dan ekstrak lidah buaya yang menghasilkan viabilitas sel sebesar 99,80% (Rizqi & Amestiasih, 2020). Asam askorbat dan SOD merupakan zat antioksidan, akan tetapi memiliki mekanisme yang berbeda dalam mengatasi radikal bebas. Persen viabilitas sel yang diberikan asam askorbat lebih tinggi dibandingkan ekstrak SOD biji jagung karena asam askorbat yang digunakan merupakan asam askorbat murni, sedangkan ekstrak SOD biji jagung memiliki kemurnian yang masih rendah, sehingga efek yang dihasilkan lebih rendah di bawah asam askorbat sebagai kontrol positif.

Penuaan akibat paparan sinar UV (*photoaging*) melibatkan berbagai mekanisme, seperti kolagenase dan aktivitas sitokin inflamasi. Sitokin inflamasi ini merangsang akumulasi senyawa oksigen reaktif (SOR) yang merusak jaringan dan sel kulit. Radikal bebas yang terbentuk akibat paparan sinar UV khususnya sinar UV-A yang kronis dapat diatasi dengan senyawa antioksidan. SOD sebagai antioksidan enzimatis lini awal dapat mereduksi radikal bebas dengan cara mengubah radikal bebas reaktif menjadi radikal bebas yang tidak reaktif. SOD akan mengubah O_2^- menjadi H_2O_2 sehingga radikal bebas yang terbentuk dapat berkurang.



Gambar 2. Sel fibroblas sebelum dipaparkan sinar UV-A

Sel fibroblas normal digambarkan dalam bentuk *spindle* memanjang dengan ujung yang hampir tidak jelas. Sel fibroblas yang viabilitasnya tidak menurun akibat paparan sinar UV menunjukkan bentuk sel fibroblas normal. Hal ini terjadi karena kerusakan pada organel sel belum terjadi sehingga bentuk sel tidak mengalami perubahan. Gambar sel fibroblas normal yang tidak dipaparkan sinar UV-A dapat dilihat pada Gambar 2. Sel fibroblas manusia bereplikasi dengan jumlah terbatas sebelum memasuki tahap terhentinya pembelahan secara permanen, yang disebut sebagai penuaan replikatif (*replicative senescence*) atau penuaan sel (*cellular senescence*). Selain penuaan replikatif, sel juga dapat diinduksi untuk mengalami penuaan dini dengan pajanan dosis sub

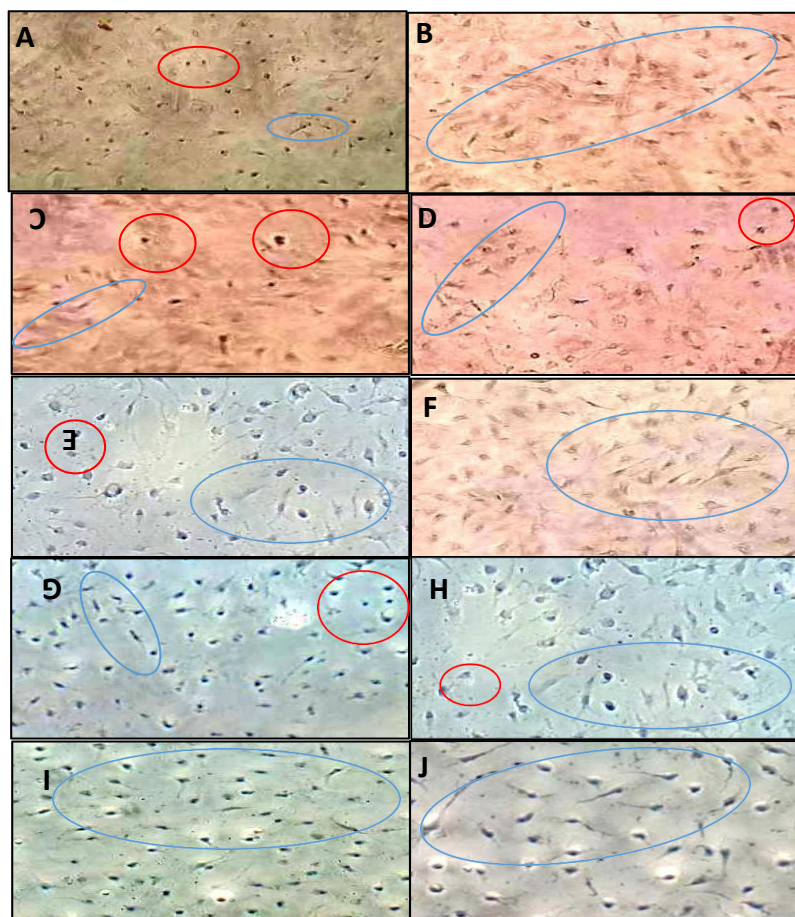
sitotoksik agen penyebab stres oksidatif, agen perusak DNA, *histone deacetylase inhibitor*, atau over ekspresi onkogen tertentu (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2012).

Viabilitas sel merupakan kemampuan sel untuk hidup dan menjalankan fungsi metabolismenya (Indrayati *et al.*, 2016). Metabolisme sel berhubungan dengan keadaan organel-organel sel yang berperan dalam prosesnya. Apabila organel sel dalam keadaan baik, maka sel dapat bermetabolisme dengan baik sehingga viabilitas sel tidak mengalami penurunan. Paparan sinar UV secara berlebihan dapat menyebabkan terbentuknya radikal bebas SOR, yaitu radikal O_2^* . Radikal O_2^* akan merusak mitokondria sel, sehingga siklus sel akan berhenti dan menyebabkan viabilitas sel menurun. Viabilitas sel yang menurun ini akan berpengaruh pada jumlah sintesis kolagen dan elastin yang berperan penting dalam kesehatan kulit.

Radikal superoksida yang terbentuk akan menginduksi kerusakan DNA melalui *cross linking* yang terjadi antara basa pirimidin yang berdekatan. *Cross linking* ini akan menyebabkan kerusakan langsung pada DNA karena terjadinya pembentukan *cyclobutane-pirimidin dimer (CDPs)* dan *pirimidin-pyrimidone (6-4) photoproducts ((6-4)PP)* dan ikatan dengan asam amino aromatik. Hal ini mengakibatkan provokasi radikal bebas dan penurunan antioksidan kulit, merusak kemampuan kulit untuk melindungi diri dari radikal bebas yang dihasilkan oleh paparan sinar matahari (Svobodova *et al.*, 2006). Kerusakan DNA ini dapat menghambat proliferasi sel melalui perpanjangan fase *G1-arrest* sehingga viabilitas sel akan menurun.

Sinar UV juga menimbulkan kerusakan pada kulit secara tidak langsung, melalui fotosensitisasi. Efek biologis timbul apabila molekul pada kulit yang disebut kromosfor harus menyerap UV dan energi yang terserap harus diubah menjadi reaksi kimia. Kromosfor utama kulit yaitu DNA, asam urokonik, asam amino aromatik, retinoid, karotenoid, bilirubin, flavin, hemoglobin, melanin dan NAD(P)H (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Penyerapan energi UV pada fotoreaksi tipe-1 akan menyebabkan kromosfor mentransfer elektron atau ion hidrogen ke molekul substrat membentuk radikal bebas. Pada fotoreaksi tipe-2 minor terjadi fotosensitisasi yang menghasilkan anion superoksida (O_2^*). Pada fotoreaksi tipe-2 mayor, fotosensitisasi menghasilkan *single oxygen* (1O_2). Radikal bebas yang terbentuk akan berinteraksi dengan biomolekul seluler lainnya memprovokasi respon biologis akhir (Baran & K, 2010).



SOD pada ekstrak SOD biji jagung berperan melalui pengubahan radikal O_2^* menjadi H_2O_2 yang tidak mampu menyebabkan kerusakan dengan sendirinya. H_2O_2 selanjutnya akan diubah menjadi molekul air dan oksigen oleh katalase dan glutathion peroksidase, sehingga jumlah radikal bebas dalam tubuh akan berkurang.



Gambar 3. Sel fibroblas berbagai kelompok perlakuan setelah dipaparkan sinar UV-A.

Kontrol negatif (A); Kontrol sehat (B); SOD 12,5 mg/mL (C); SOD 25 mg/mL (D); SOD 50 mg/mL (E); SOD 100 mg/mL (F); Asam askorbat 1,25 mg/mL (G); Asam askorbat 2,5 mg/mL (H); Asam askorbat 5 mg/mL (I); Asam askorbat 10 mg/mL (J).

Keterangan:

-  = Sel hidup
-  = Sel mati

Gambar 3 menunjukkan sel fibroblas di bawah mikroskop dimana pada kelompok kontrol negatif jumlah sel fibroblas berkurang akibat terjadi kerusakan sel oleh paparan sinar UV-A. Sel dengan viabilitas menurun akan menunjukkan morfologi yang berbeda dari sel normal. Sel yang rusak menunjukkan bentuk sel yang bulat dan mengecil.

Metode yang digunakan untuk pengukuran viabilitas sel fibroblas adalah metode MTT. Prinsip dari metode MTT adalah terjadinya reduksi garam kuning tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid) oleh sistem reduktase. Suksinat tetrazolium yang termasuk dalam rantai respirasi dalam mitokondria sel-sel yang hidup membentuk kristal formazan berwarna ungu

dan tidak larut air. Penambahan reagen *stopper* (bersifat detergenik) akan melarutkan kristal berwarna ini yang kemudian diukur absorbansinya menggunakan ELISA *reader*. Intensitas warna ungu yang terbentuk proporsional dengan jumlah sel hidup. Jumlah sel hidup semakin banyak jika intensitas warna ungu semakin besar (CCRC, 2009). Absorbansi sampel dihitung dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 550-600 nm. Keuntungan penggunaan metode ini adalah dapat dilakukan pada semua jenis sel dengan biaya yang dikeluarkan relatif sedikit.

4. Kesimpulan

Ekstrak SOD yang diperoleh dari biji jagung dibuktikan memiliki aktivitas antioksidan dengan persen inhibisi tertinggi yaitu 65,50% pada ekstrak SOD konsentrasi presipitasi 60-90%. Berdasarkan hasil tersebut, dilakukan pengujian aktivitas *anti-photoaging* pada sel fibroblas 3T3 yang telah dipaparkan sinar UV-A dan memperoleh hasil perbaikan sel fibroblas dilihat dari kenaikan viabilitas sel tertinggi yaitu pada ekstrak SOD biji jagung konsentrasi 100 mg/mL dengan nilai 142,31%.

Ucapan terima kasih

Peneliti mengucapkan terima kasih kepada LPPM Universitas Setia Budi Surakarta yang telah memberikan bantuan dana penelitian dari program hibah penelitian internal.

Daftar pustaka

- Amaro-Ortiz, A., Yan, B., & D'Orazio, J. A. (2014). Ultraviolet Radiation, Aging and the Skin: Prevention of Damage by Topical cAMP Manipulation. *Molecules*, 19(5), 6202-6219. <https://doi.org/10.3390/molecules19056202>
- Baharvand, H. (2015). *Stem-Cell Nanoengineering* New Jersey: Wiley Blackwell
- Baran, S. J., & K, D. D. (2010). *Teori Komunikasi Massa: Dasar, Pergolakan dan Masa Depan* Jakarta: Salemba Humanika
- Baum, J. A., Chandlee, J. M., & Scandalios, J. G. (1983). Purification and Partial Characterization of a Genetically-Defined Superoxide Dismutase (SOD-1) Associated with Maize Chloroplasts. *Plant Physiol*, 73(1), 31-35. <https://doi.org/10.1104/pp.73.1.31>
- CCRC. (2009). *Prosedur tetap Uji Sitotoksik Metode MTT* Yogyakarta: Cancer Chemoprevention Research Center Farmasi UGM Yogyakarta.6-9
- Cheong, Y., Kim, C., Kim, M. B., & Hwang, J. K. (2018). The anti-photoaging and moisturizing effects of *Bouea macrophylla* extract in UVB-irradiated hairless mice. *Food Sci Biotechnol*, 27(1), 147-157. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0276-y>
- Choi, S. H., Choi, S. I., Jung, T. D., Cho, B. Y., Lee, J. H., Kim, S. H., Yoon, S. A., Ham, Y. M., Yoon, W. J., Cho, J. H., & Lee, O. H. (2017). Anti-Photoaging Effect of Jeju Putgyul (Unripe Citrus) Extracts on Human Dermal Fibroblasts and Ultraviolet B-induced Hairless Mouse Skin. *Int J Mol Sci*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijms18102052>

- Damayanti, N. M., & Ratnayanti, I. D. (2013). Therapeutic of Skin Aging with Carbon Dioxide Laser Skin Resurfacing And Combination With Air Cooling. *E-Jurnal Medika Udayana*, 2054-2061. <https://ojs.unud.ac.id/index.php/eum/article/view/7340>
- Debacq-Chainiaux, F., Leduc, C., Verbeke, A., & Toussaint, O. (2012). UV, stress and aging. *Dermatoendocrinol*, 4(3), 236-240. <https://doi.org/10.4161/derm.23652>
- Ebadi, P., & Fazeli, M. (2017). Anti-Photoaging Potential of Propolis Extract in UVB-Irradiated Human Dermal Fibroblast Through Increasing The Expression of FOXO3A and NGF Genes, *Biomed Pharmacother. Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 47-54. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.019>
- Indrayati, A., Asyarie, S., Suciati, T., & Retnoningrum, D. S. (2016). Pengaruh Superoksida Dismutase Rekombinan Staphylococcus equorum terhadap Viabilitas Sel dan Deposisi Kolagen Pada Sel Fibroblas 3T3 Yang Dipaparkan UVA. *Jurnal Farmasi Indonesia*, 13 (1), 34-40.
- Kartawiguna, E. (2011). *Dermatoheliosis*. Retrieved September 2019 from <https://univmed.org/wp-content/uploads/2011/02/vol.18%20no.1>
- Niyomploy, P., Boonsombat, R., Karnchanatat, A., & Sangvanich, P. (2014). A Superoxide Dismutase Purified From The Roots From Stemona tuberosa. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 44(7), 663-679. <https://doi.org/10.1080/10826068.2013.868356>
- Park, M. A., Sim, M. J., & Kim, Y. C. (2017). Anti-Photoaging Effects of Angelica acutiloba Root Ethanol Extract in Human Dermal Fibroblasts. *Toxicol Res*, 33(2), 125-134. <https://doi.org/10.5487/tr.2017.33.2.125>
- Pratiwi, S., & Husni, P. (2017). Potensi Penggunaan Fitokonstituen Tanaman Indonesia sebagai Bahan Aktif Tabir Surya: Review.
- Rizqi, J., & Amestiasih, T. (2020). Pengaruh Kombinasi Madu dan Lidah Buaya (Aloe Vera) Terhadap Proliferrasi pada Sel Line Fibroblast NIH3T3: Studi In Vitro. *Prosiding Seminar Nasional Multi Disiplin Ilmu UNRIYO*, 2(1), 535-541.
- Sharma, S., Bahuguna, S., Nameet, K., & Chaudhary, N. (2014). Biochemical aspects of superoxide dismutase isolated from *Amaranthus spinosus*: A Therapeutically Important Plant. *International Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 0974-3073]. 5, 35-42.
- Svobodova, A., Walterova, D., & Vostalova, J. (2006). Ultraviolet Light Induced Alteration to The Skin. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 150(1), 25-38. <https://doi.org/10.5507/bp.2006.003>
- Wahyu, W., Ratu, S., Rymond, R., & Marlinda, S. (2005). Penapisan Aktivitas Superoksida Dismutase Pada Berbagai Tanaman. *Maranatha Journal of Medicine and Health*, 5(1).
- Yong, H. J., & Ahn, J. J. (2018). Antioxidant and Skin Protection Effect of Morin Upon UV-A Exposure. *Biomedical Dermatology. Biomedical Dermatology*, 2(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41702-018-0026-7>

***In vivo* nephroprotective effect of herbal plants towards gentamicin-induced nephrotoxicity: A literature review**

Kajian literatur efek nefroprotektif tanaman herbal terhadap nefrotoksisitas yang diinduksi gentamisin secara *in vivo*

Erlyn Dwi Cahyani¹, Rahmad Aji Prasetya^{2*}, Izzatul Ma'rifah¹, Deby Nanda Tri Widia¹, Tiara Sri Dewi¹, Sulfa Putri¹

¹Akademi Farmasi Surabaya, Surabaya, Indonesia

²Department of Clinical Pharmacy, Akademi Farmasi Surabaya, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: prasetya.ra@akfarsurabaya.ac.id

Abstract

Background: Gentamicin can cause nephrotoxicity due to accumulation in proximal tubules then triggering free radical generation that damages the nephrons. In response, our body produces endogenous antioxidants. However, extensive formation of free radicals requires exogenous antioxidants which can be obtained from herbal plants to compensate. Thus, rigorous preclinical and clinical studies are needed to prove the efficacy of medicinal plants that protect the kidneys from gentamicin nephrotoxicity.

Objective: This review article provides a scientific overview of the herbal plants' nephroprotective activity towards gentamicin induction *in vivo*.

Method: A literature search through ScienceDirect database in July 2022 using the keywords "kidney damage", "herbal plants", and "gentamicin" resulted in 12 articles to be reviewed.

Results: We found 12 herbal plants proven to reverse the declining kidney function. We observed significant attenuation in elevated Blood Urea Nitrogen (BUN) and/or creatinine levels in subject animals receiving herbal plants compared to the gentamicin-induced group. This nephroprotective effect is due to the content of several compounds such as flavonoids, polyphenols, and tannins. Although each plant contains different compounds, all of them have antioxidant activity that inhibits oxidation in nephrons due to gentamicin induction.

Conclusion: The antioxidant compounds contained in herbal plants have the potential to prevent or treat nephrotoxicity due to gentamicin usage.

Keywords: Gentamicin, herbal plant, nephroprotector, antioxidant

Intisari

Latar belakang: Gentamisin berpotensi menyebabkan nefrotoksisitas karena akumulasi dalam nefron dan memicu produksi radikal bebas. Karena itu, tubuh merespon dengan memproduksi antioksidan endogen. Namun, banyaknya radikal bebas yang terbentuk membutuhkan antioksidan eksogen yang bisa didapatkan dari tanaman herbal untuk mengimbangnya. Hanya saja diperlukan uji preklinis dan klinis untuk membuktikan khasiat dari tanaman obat yang dapat melindungi ginjal dari nefrotoksisitas gentamisin.

Tujuan: Artikel ini memberikan gambaran secara ilmiah tentang efek nefroprotektif tanaman herbal pada diinduksi gentamisin secara *in vivo*.

Metode: Pencarian literatur melalui basis data Science Direct pada bulan Juli 2022 menggunakan kata kunci "*kidney damage*", "*herbal plants*", dan "*gentamicin*" diperoleh total 12 artikel untuk dikaji.

Hasil: Didapatkan 12 tanaman herbal yang terbukti dapat mengembalikan penurunan fungsi ginjal karena kerusakan yang diinduksi gentamisin. Hal ini terlihat dari penurunan signifikan kadar *blood urea nitrogen* (BUN) dan/atau kreatinin yang semula meningkat pada hewan coba yang mendapat terapi

tanaman herbal dibandingkan kelompok perlakuan gentamisin. Efek nefroprotektif pada tanaman disebabkan adanya kandungan beberapa senyawa seperti flavonoid, polifenol, dan tanin. Walaupun masing-masing tanaman memiliki kandungan senyawa yang berbeda-beda, namun semuanya memiliki aktivitas antioksidan untuk melindungi ginjal dengan mekanisme menghambat atau mencegah terjadinya oksidasi dalam sel pada ginjal karena induksi gentamisin.

Kesimpulan: Kandungan antioksidan senyawa pada tanaman herbal berpotensi untuk mencegah atau mengatasi nefrotoksisitas akibat penggunaan gentamisin.

Kata kunci: Gentamisin, tanaman herbal, nefroprotektor, antioksidan

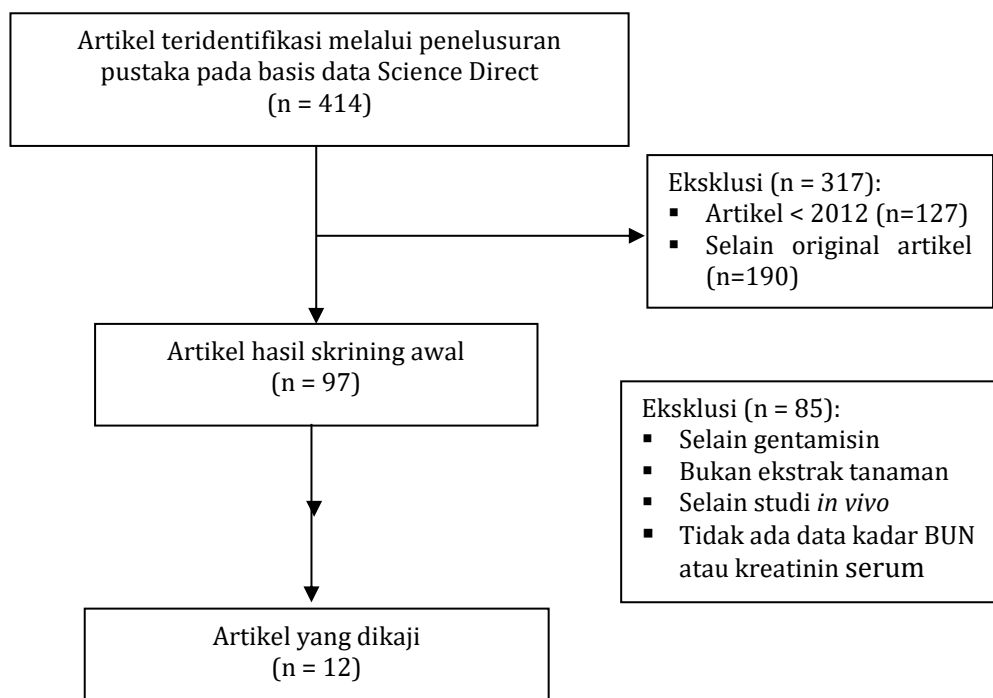
1. Pendahuluan

Gentamisin termasuk antibiotik golongan aminoglikosida yang banyak digunakan pada pengobatan infeksi bakteri Gram negatif dan bakteri endokarditis seperti misalnya infeksi mata, paru-paru dan usus (Lopez-Novoa *et al.*, 2011). Antibiotik aminoglikosida memiliki pola aktivitas yang tergantung pada kadar dan efek persisten yang lama. Semakin tinggi kadar, semakin ekstensif dan cepat tingkat bakterisidalnya. Namun, gentamisin memiliki indeks terapi yang sempit (Kemenkes_RI, 2011), dan berpotensi menyebabkan nefrotoksisitas. Diperkirakan hampir 25% pasien yang menerima dosis terapi aminoglikosida dapat mengalami efek samping nefrotoksik (Lopez-Novoa *et al.*, 2011).

Kerusakan ginjal ini disebabkan karena gentamisin dalam dosis tinggi akan terakumulasi di tubulus proksimal setelah difiltrasi di glomerulus (Lintong *et al.*, 2013). Akumulasi gentamisin dalam sel dapat menyebabkan terjadinya peningkatan *reactive oxygen species* (ROS) yang selanjutnya dapat memicu peningkatan radikal bebas sehingga menyebabkan kerusakan sel dan ginjal mengalami nekrosis (Sujono & Rizki, 2020). Respon tubuh untuk menangkal radikal bebas adalah dengan memproduksi antioksidan endogen. Namun jika radikal bebas yang dibentuk melebihi antioksidan endogen, maka dibutuhkan antioksidan eksogen untuk mengimbangnya seperti suplementasi vitamin E. Akan tetapi, bioavailabilitas dan efektivitas vitamin E dapat terganggu jika dikonsumsi oleh orang dengan gangguan liver dan empedu. Selain itu, vitamin E membutuhkan makanan yang mengandung lemak untuk membantu proses absorpsinya (Ungurianu *et al.*, 2021). Oleh karena itu, diperlukan sumber antioksidan eksogen alami yang diperoleh dari berbagai jenis tanaman (Siahaan *et al.*, 2016). Selanjutnya, perlu penelitian atau pengujian secara ilmiah untuk membuktikan khasiat dari tanaman obat yang dapat melindungi ginjal dari nefrotoksisitas gentamisin. Artikel ini diharapkan akan memberikan gambaran penelitian terbaru dalam rentang sepuluh tahun terakhir terkait efek nefroprotektif beberapa tanaman herbal pada kerusakan ginjal yang diinduksi oleh gentamisin secara *in vivo*.

2. Metode

Pencarian sumber literatur dilakukan pada bulan Juli 2022 melalui *database* Science Direct dengan detail pencarian sebagai berikut: (("acute kidney injury" OR "kidney failure chronic" OR *nephrotoxicity* OR *nephrotoxic*) AND ("medicinal plants" OR "medicinal herbs" OR "plant preparations" OR "herbs") AND *Gentamicin*). Artikel yang didapat dari hasil pencarian otomatis sebanyak 414 artikel. Artikel kemudian diskruining dengan kriteria artikel dengan rentang tahun 2012-2022 dan hanya dipilih tipe artikel penelitian (*original research article*) didapatkan 97 artikel. Terakhir, artikel diseleksi sesuai kriteria berikut ini: studi *in vivo*, menggunakan gentamisin untuk menginduksi kerusakan ginjal, menggunakan bagian tanaman atau hasil ekstraksi dari tanaman, terdapat data pengujian serum kreatinin atau BUN sehingga didapat 12 artikel untuk ditelaah lebih lanjut. Bagian alir pencarian literatur terdapat pada Gambar 1.



Gambar 1. Bagan alir *literature review*

3. Hasil dan pembahasan

Tabel 1 menunjukkan 12 artikel mengenai studi tanaman herbal yang digunakan untuk mengatasi nefrotoksisitas akibat induksi gentamisin. Studi dilakukan di sembilan negara dalam rentang tahun 2012 sampai 2021. Bagian morfologi tanaman yang digunakan beragam, mulai

akar, rimpang, buah, dan bunga. Sedang daun merupakan bagian yang paling sering digunakan dalam penelitian yang dikaji.

Tabel 1. Daftar artikel

No. artikel	Negara	Nama tanaman	Nama latin	Bagian tanaman	Referensi
1.	India	Lidah buaya	<i>Aloe barbadensis</i>	Daun	(Chatterjee <i>et al.</i> , 2012)
2.	Turki	Akar manis	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Akar	(Aksoy <i>et al.</i> , 2012)
3.	India	Terung hijau bulat	<i>Solanum xanthocarpum</i>	Buah	(Hussain <i>et al.</i> , 2012)
4.	Irak	Jelatang	<i>Urtica dioica</i>	Daun	(Salih, 2015)
5.	Serbia	Teh hijau	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Daun	(Veljković <i>et al.</i> , 2016)
6.	Pakistan	Bunga fagonia	<i>Fagonia olivieri</i>	Bunga	(Rashid & Khan, 2017)
7.	Brazil	<i>Erva de bugre</i>	<i>Rudgea viburnoides</i>	Daun	(Galdino <i>et al.</i> , 2017)
8.	India	<i>Rotula aquantica</i>	<i>Rotula aquantica</i>	Akar	(Vysakh <i>et al.</i> , 2018)
9.	Mesir	Mata gandum (<i>Wheat germ</i>)	<i>Triticum aestivum</i> L.	Biji	(Kandeil <i>et al.</i> , 2018)
10.	Iran	Bunga mallow	<i>Malva sylvestris</i>	Bunga	(Mohamadi Yarijani <i>et al.</i> , 2019)
11.	Brazil	Ginseng India	<i>Withania somnifera</i>	Rimpang	(Govindappa <i>et al.</i> , 2019)
12.	Malaysia	Tanaman jarak	<i>Jatropha mollissima</i>	Daun	(Iqbal & Yahya, 2021)

Masing-masing penelitian menggunakan metode ekstraksi yang berbeda dengan pelarut yang berbeda pula. Namun terdapat satu penelitian yang tidak melakukan ekstraksi karena menggunakan bagian bibit gandum (*wheat germ*) secara utuh yang dibeli dari “Bon Pharma Company” dan satu penelitian yang membeli ekstrak air kering *Aloe barbadensis* dari pedagang rekanan di Kolkata, India pada September 2010. Tabel 2 menunjukkan metode ekstraksi dari masing-masing artikel, kandungan senyawa utama yang berperan dalam perlindungan kerusakan ginjal, dan dosis ekstrak tanaman herbal yang bervariasi pada setiap artikel dengan rute pemberian secara (i.p) *intraperitoneal* atau (p.o) *per oral*.

Kerusakan pada ginjal dapat diketahui dengan beberapa parameter pengujian diantaranya adalah pengujian kadar kreatinin dan pengujian kadar urea darah atau *blood urea nitrogen* (BUN) (Irtawaty, 2017). Kreatinin merupakan hasil metabolisme dari kreatin dan fosfokreatin. Kreatinin difiltrasi di glomerulus dan direabsorpsi di tubulus. Jika terjadi disfungsi renal maka kemampuan filtrasi kreatinin akan berkurang dan kreatinin serum akan meningkat (Alfonso *et al.*, 2016). BUN adalah produk hasil buangan dari protein. Pada ginjal yang sehat BUN akan disaring dari darah dan dikeluarkan melalui urin, sedangkan pada ginjal yang sudah tidak berfungsi dengan baik, BUN akan tetap tertahan di dalam darah. Oleh karena itu,

peningkatan kadar BUN di dalam darah menjadi salah satu indikator terjadinya gangguan pada ginjal (Sujono & Rizki, 2020). Secara mikroskopik, nefrotoksisitas ditandai dengan adanya nekrosis pada tubulus, edema pada epitel tubulus proksimal, deskuamasi sel, fibrosis tubulus, kongesti glomerulus, dan kerusakan lainnya yang berakibat pada disfungsi ginjal (Balakumar *et al.*, 2010).

Pengujian efek nefroprotektif dilakukan secara *in vivo* pada beberapa jenis hewan yakni tikus Wistar (sembilan artikel), tikus Sprague Dawley (dua artikel), dan kelinci (satu artikel) sehingga ketentuan kadar normal BUN dan kreatinin setiap hewan berbeda-beda. Pada tikus Sprague Dawley, kadar BUN normal adalah 11,7-26,4 mg/dL dan kadar kreatinin normal adalah pada rentang 0,5-0,83 mg/dL (Han *et al.*, 2010). Pada tikus Wistar, kadar BUN normal adalah 15,0-44,5 mg/dL (Dewi *et al.*, 2016) dan kadar kreatinin normal adalah 0,578-1,128 mg/dL (Alimuddin *et al.*, 2019). Sedangkan pada kelinci, kadar BUN normal adalah sekitar $41,28 \pm 1,74$ mg/dL dan kadar kreatinin normal sekitar $1,00 \pm 0,05$ mg/dL (Özkan, 2019). Sejauh ini belum ditemukan sumber yang menyatakan adanya satu model hewan yang terbaik untuk pengujian efek aktivitas nefroprotektif sehingga efektivitas bahan herbal dibandingkan dengan nilai normal masing-masing hewan coba. Induksi gentamisin terhadap hewan uji diinjeksikan secara *intraperitoneal* (i.p) pada bagian rongga perut, bukan pada usus ataupun organ lainnya. Penyuntikan dilakukan di kuadran bawah atau kiri perut dengan jarum yang relatif pendek (misalnya 0,5 inci atau kurang) dengan jumlah maksimal yang dapat diinjeksikan yaitu 3-4 mL (Silverman, 2012). Namun tercatat ada satu artikel yang melakukan induksi gentamisin dengan injeksi *subcutan* (s.c) tanpa menyebutkan bagian tubuh lokasi penyuntikan (Galdino *et al.*, 2017). Dosis gentamisin yang digunakan pada setiap artikel juga beragam yakni 80, 100, atau 120 mg/kg berat badan.

Pada Tabel 3, hasil pengujian *in vivo* disajikan dengan menampilkan data dari tiga kelompok berbeda yaitu (1) kelompok kontrol atau hewan uji tidak diberi perlakuan apapun baik gentamisin maupun ekstrak tanaman herbal, (2) kelompok gentamisin (GM) yakni hewan uji yang diberi perlakuan gentamisin sesuai dosis yang tertulis, dan (3) kelompok perlakuan ekstrak tanaman herbal (TH+GM) yakni hewan uji yang diinduksi gentamisin dan ekstrak tanaman herbal. Berdasarkan hasil studi *in vivo*, semua studi menunjukkan bahwa kelompok hewan dengan perlakuan gentamisin (GM) mengalami peningkatan signifikan kadar kreatinin dan BUN dibandingkan dengan kelompok kontrol. Selanjutnya, kelompok hewan dengan pemberian ekstrak tanaman herbal dan gentamisin (TH+GM) terlihat kadar kreatinin dan BUN

lebih rendah dan berbeda secara signifikan dari pada kelompok hewan yang hanya diberi perlakuan gentamisin (GM) saja, walaupun nilainya masih lebih tinggi dari kadar kreatinin dan BUN kelompok kontrol.

Dari Tabel 3 terlihat bahwa pemberian ekstrak tanaman efektif mencegah kerusakan ginjal yang ditunjukkan dengan rendahnya kadar kreatinin dan BUN pada hewan uji yang mendapatkan tanaman herbal dan gentamisin (TH+GM) bila dibandingkan dengan hewan coba yang menerima gentamisin saja (GM). Pencegahan peningkatan kadar ini berkaitan dengan kandungan senyawa antioksidan dari ekstrak tanaman yang digunakan. Antioksidan ini bekerja dengan mencegah penurunan tingkat antioksidan endogen non-enzimatik dalam ginjal seperti mencegah penurunan kadar SOD (*superoxide dismutase*) dan GSH (*reduced glutathione*) (antioksidan endogen dalam tubuh). Antioksidan juga bekerja melemahkan aktivitas peroksidasi lipid dengan indikator kadar MDA (*Malondialdehyde*). Semakin tinggi kadar MDA menunjukkan adanya proses oksidasi dalam sel. Pengujian tanaman herbal difokuskan pada ekstrak senyawa yang memiliki khasiat antioksidan ataupun inflamasi yang bisa berperan sebagai nefroprotektor (Hussain *et al.*, 2012). Dari tanaman yang telah dikaji didapati kandungan senyawa serta mekanisme perlindungan pada ginjal yang berbeda-beda.

3.1 Steroidal lakton

Withanolides tergolong senyawa steroidal lakton yang memiliki sifat antioksidan. Pada akar tanaman *Withania somnifera* terkandung senyawa steroidal lakton (*withanolide A*, *withanolide B*, *withanoside IV-V* dan *12-deoxy withastramonoide* dan *withaferin A*). Senyawa ini bekerja dengan mencegah penurunan kadar SOD, menormalkan kadar BUN, kadar kreatinin, dan nitrogen non protein dengan meningkatkan kadar antioksidan (Dar *et al.*, 2015).

3.2 Asam fenolat

Asam galat (*3,4,5-trihydroxybenzoic acid*) merupakan senyawa turunan polifenol yang terdapat pada tanaman dengan aktivitas antioksidan dan antiinflamasi. Senyawa ini juga diketahui berkhasiat sebagai antimikroba, antikanker, antidiabetes, dan anti-angiogenik. Asam galat memberi efek antioksidan dengan menangkap radikal bebas, seperti anion superoksida dan radikal hidroksil (Ghaznavi *et al.*, 2018). Pada penelitian ini tanaman yang mengandung asam galat yaitu *Urtica dioica*, *Triticum aestivum L.*, *Fagonia olivieri*, dan *Rotula aquatica*.

Tabel 2. Identifikasi senyawa tanaman

No. artikel	Nama tanaman	Metode ekstraksi	Dosis ekstrak tanaman	Kandungan senyawa
1.	<i>Aloe barbadensis</i>	NA	100 atau 200 mg/kg berat badan (p.o)	NA
2.	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	1 kg akar manis dimaserasi dalam air suling selama 24 jam pada suhu kamar lalu disaring. Hasil ekstrak disimpan pada suhu 4°C.	Hasil ekstraksi diencerkan 60x sebelum diberikan ke tikus	<i>Glycyrrhizin</i>
3.	<i>Solanum xanthocarpum</i>	Serbuk buah kering dimaserasi dengan pelarut petroleum eter, dan etanol 50 % selama 3 hari. Ekstrak mentah dievaporasi dan dikeringkan dengan <i>lyophilizer</i> hingga menjadi serbuk.	200 atau 400 mg/kg berat badan (p.o)	Flavonoid quercetin dan apigenin glikosida
4.	<i>Urtica dioica</i>	Daun dikeringkan dan diserbuk. 10g serbuk diekstrak dengan <i>soxhlet</i> menggunakan 50 mL pelarut etanol 95% hingga didapat ekstrak kering dan dilarutkan dengan dimetil-sulfoksida	100 mg/kg berat badan	Fenol (Asam galat)
5.	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Serbuk daun kering diekstraksi menggunakan etanol 70% dengan perkolasi kemudian dilanjutkan evaporasi hingga kering	300 mg/kg berat badan (p.o)	Polifenol tanin (<i>epigallocatechin-3-gallate</i>)
6.	<i>Fagonia olivieri</i>	Bunga dikeringkan dan diserbuk. Serbuk bunga (2 kg) diekstraksi dua kali dalam 4 L pelarut metanol 95% pada suhu 40°C selama 7 hari. Ekstrak mentah dikeringkan dengan <i>evaporator</i> dan disimpan pada suhu 4°C.	200 atau 400 mg/kg berat badan (p.o)	Asam heksadekanoat, <i>2-methoxy-4-vinylphenol</i> , dan polifenol seperti rutin, katekin, dan asam galat.
7.	<i>Rudgea viburnoides</i>	Daun dikeringkan dengan oven suhu 40°C dan digiling hingga didapatkan serbuk yang dimaserasi dengan etanol 95% (1:5) selama 4 jam. Proses diulang dua kali dan dilanjutkan dengan penyaringan dan pengentalan ekstrak pada <i>evaporator</i> .	50 atau 200 mg/kg berat badan (p.o)	NA
8.	<i>Rotula aquatica</i>	Serbuk kering akar (40 g) diekstraksi dengan 400 mL metanol menggunakan <i>soxhlet</i> . Kemudian dievaporasi hingga didapat ekstrak kering. Ekstrak metanol kering lalu disuspensikan dalam 100 mL <i>aquadest</i> dan difraksinasi dengan etil asetat.	50 atau 100 mg/kg berat badan (p.o)	Alkaloid, flavonoid, asam galat, dan quercetin

No. artikel	Nama tanaman	Metode ekstraksi	Dosis ekstrak tanaman	Kandungan senyawa
9.	<i>Triticum aestivum</i> L.	NA	20% dari berat badan (p.o)	Fenol (asam galat) dan flavonoid (katekin)
10.	<i>Malva sylvestris</i>	60 g serbuk bunga diekstraksi dalam 4 L pelarut etanol 70% selama 24 jam. Ekstrak dikeringkan dengan <i>evaporator</i> pada suhu 40°C. Hasil ekstrak disimpan pada suhu -20°C sebelum digunakan.	200 atau 400 mg/kg berat badan (i.p)	Anthocyanins (<i>malvidine 3-glucoside</i>)
11.	<i>Withania somnifera</i>	Rimpang dikeringkan dan diserbuk. Serbuk diekstraksi dengan pelarut alkohol menggunakan <i>soxhlet</i> . Ekstrak dikeringkan dengan <i>evaporator</i> pada suhu 60°C sampai pekat dan menjadi pasta. Selanjutnya dikeringkan dengan vakum pada suhu 35°C.	500 mg/kg berat badan (p.o)	Withanolides (<i>withanolide A, withanolide B, withanolide IV-V, 12-deoxy-withastromono-lide dan withaferin A</i>)
12.	<i>Jatropha mollissima</i>	Daun dikeringkan dan diserbuk 800 g serbuk direndam pelarut hidro alkohol (70:30 v/v). Ekstrak dikeringkan dengan <i>evaporator</i> pada suhu 30-40°C	400 mg/kg berat badan (p.o)	Fitol, γ -sitosterol, <i>lupeol</i> , asam linolenat, dan β -amirin

(NA)=*Not Applicable* atau peneliti tidak melakukan proses ekstraksi.

Tabel 3. Analisis perbandingan parameter

No. artikel	Nama tanaman / Hewan coba	Dosis gentamisin (rute pemberian)	Kreatinin			BUN		
			Kontrol n=5-8	GM n=5-8	TH + GM n=5-8	Kontrol n=5-8	GM n=5-8	TH + GM n=5-8
1.	<i>Aloe barbadensis</i> (tikus Wistar)	80 mg/kg berat badan (i.p)	0,95 ± 0,09 mg/dL	5,33 ± 0,27 mg/dL ##	2,2 ± 0,10 mg/dL **	15,24 ± 1,26 mg/dL	39,03 ± 3,05 mg/dL ##	19,94 ± 1,33 mg/dL *
2.	<i>Glycyrrhiza glabra</i> (tikus Wistar)	100 mg/kg berat badan (i.p)	0,64 ± 0,05 mg/dL	5,2 ± 2,36 mg/dL ###	0,92 ± 0,18 mg/dL ***	31,8 ± 17,20 mg/dL	293,8 ± 73,3 mg/dL ###	45,2 ± 6,9 mg/dL ***
3.	<i>Solanum xanthocarpum</i> (tikus Wistar)	100 mg/kg berat badan (i.p)	0,89 ± 0,14 mg/dL	2,41 ± 0,11 mg/dL ###	1,32 ± 0,12 mg/dL ***	23,49 ± 1,2 mg/dL	65,43 ± 3,0 mg/dL ###	32,37 ± 2,8 mg/dL ***
4.	<i>Urtica dioica</i> (kelinci)	100 mg/kg berat badan (i.p)	1,44 ± 0,38 mg/dL	3,80 ± 0,22 mg/dL #	1,62 ± 0,25 mg/dL *	12,70 ± 0,43 mg/dL	17,44 ± 0,48 mg/dL #	12,70 ± 0,27 mg/dL *

No. artikel	Nama tanaman / Hewan coba	Dosis gentamisin (rute pemberian)	Kreatinin			BUN		
			Kontrol n=5-8	GM n=5-8	TH + GM n=5-8	Kontrol n=5-8	GM n=5-8	TH + GM n=5-8
5.	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze (tikus Wistar)	100 mg/kg berat badan (i.p)	48 μmol/L	150 μmol/L ###	50 μmol/L ***	6 mmol/L	30 mmol/L	8 mmol/L ***
6.	<i>Fagonia olivieri</i> (tikus Sprague Dawley)	80 mg/kg berat badan (i.p)	0,41 ± 0,01 mg/dL	3,35 ± 0,28 mg/dL #	0,63 ± 0,05 mg/dL *	36,22 ± 2,21 mg/dL	94,03 ± 2,28 mg/dL #	52,11 ± 1,44 mg/dL *
7.	<i>Rudgea viburnoides</i> (tikus Wistar)	80mg/kg berat badan (s.c)	0,02 ± 0,004 mg/24h	0,09 ± 0,026 mg/24h #	0,01 ± 0,001 mg/24h *	NA	NA	NA
8.	<i>Rotula aquatica</i> (tikus Wistar)	80 mg/kg berat badan (i.p)	0,35 ± 0,02 mg/dL	3,08 ± 0,04 mg/dL #	1,53 ± 0,01 mg/dL *	18,23 ± 0,06 mg/dL	110,5 ± 0,27 mg/dL #	54,42 ± 1,01 mg/dL *
9.	<i>Triticum aestivum</i> L (tikus Sprague Dawley)	120 mg/kg berat badan (i.p)	0,75 ± 0,5 mg/dL	1,1 ± 0,5 mg/dL #	0,65 ± 0,5 mg/dL *	35 ± 0,5 mg/dL	75 ± 0,5 mg/dL #	44 ± 0,5 mg/dL *
10.	<i>Malva sylvestris</i> (tikus Wistar)	100 mg/kg berat badan (i.p)	0,7 mg/dL	1,8 mg/dL ###	1,2 mg/dL **	19 mg/dL	75 mg/dL ###	59 mg/dL ***
11.	<i>Withania somnifera</i> (tikus Wistar)	80 mg/kg berat badan (i.p)	0,32 ± 0,01 mg/dL	0,90 ± 0,04 mg/dL #	0,37 ± 0,01 mg/dL *	34,09 ± 1,9 mg/dL	78,17 ± 2,45 mg/dL #	37,42 ± 0,35 mg/dL *
12.	<i>Jatropha mollissima</i> (tikus Wistar)	100 mg/kg berat badan (i.p)	5,0 mg/dL	1,6 mg/dL #	2,8 mg/dL *	20 mg/dL	59 mg/dL #	34 mg/dL *

GM=kelompok perlakuan gentamisin; TH+GM=kelompok perlakuan dengan pemberian gentamisin dan ekstrak tanaman herbal; (NA)=Not Analyzed atau tidak dilakukan pengujian. *P< 0,05, **P< 0,01, dan ***P< 0,001 dibandingkan dengan kelompok gentamisin. #P< 0,05, ##P< 0,01, ###P< 0,001 dibandingkan dengan kelompok kontrol. Data tanpa nilai standar deviasi berarti data asli hanya berupa grafik.

3.3 Flavonoid

Mekanisme aksi antioksidan dari flavonoid adalah menekan pembentukan ROS baik dengan penghambatan enzim maupun dengan elemen khelat yang terlibat dalam pembentukan radikal bebas, menekan aktivitas ROS, dan meningkatkan perlindungan antioksidan (Kumar & Pandey, 2013). Nama tanaman yang memiliki kandungan flavonoid tersaji pada Tabel 4.

Tabel 4. Daftar senyawa yang tergolong flavonoid

Kelas	Flavonoid	Tanaman
Fenol	<i>2-methoxy-4-vinylphenol</i>	<i>Fagonia olivieri</i>
Flavanol	Katekin	<i>Triticum aestivum</i> L.
	<i>Epigallocatechin-3-gallate</i>	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze
Flavonol	Rutin	- <i>Triticum aestivum</i> L - <i>Fagonia olivieri</i>
	<i>Quercetin</i>	- <i>Solanum xanthocarpum</i> - <i>Rotula aquatica</i>
Flavon	<i>Apigenin</i>	<i>Solanum xanthocarpum</i>
Antosianin	<i>Malvidine</i>	<i>Malva sylvestris</i>

Katekin tergolong dalam senyawa flavonoid kelas flavanol. Senyawa ini memiliki sifat antioksidan yang bisa menangkap radikal bebas dalam tubuh. Pada ekstrak biji gandum (*Triticum aestivum* L.) terkandung senyawa katekin (Kandeil *et al.*, 2018), dan pada ekstrak teh hijau (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) terkandung senyawa *epigallocatechin-3-gallate* yang merupakan turunan dari senyawa katekin. Senyawa katekin ini akan bereaksi dengan hidrogen peroksida dalam membran sel melalui transfer elektron tunggal diikuti dengan deprotonasi. Katekin juga merangsang enzim detoksifikasi fase II yang bertindak sebagai antioksidan (Veljković *et al.*, 2016).

Antosianin adalah senyawa turunan polifenol yang dapat larut dalam pelarut polar, serta memberikan warna oranye, merah, ungu, biru, hingga hitam pada tumbuhan (Priska *et al.*, 2018). Pada ekstrak tanaman *Malva sylvestris* terkandung senyawa antosianin. Mekanisme senyawa antosianin malvidine 3-glukosida adalah menghambat *interleukin-6* (IL-6), bekerja dengan memperbaiki cedera ginjal melalui pengurangan *stress* oksidatif dan peradangan (Yarijani *et al.*, 2019). Salah satu penanda adanya inflamasi adalah peningkatan IL-6 dalam darah (Kardani *et al.*, 2021). Antosianin memiliki aktivitas antioksidan yang kuat dengan sistem menangkap radikal bebas dan mengatasi peroksidasi lipid (Ghédira & Goetz, 2016). Proses ini terjadi melalui mekanisme pemutusan rantai propagasi dari radikal bebas, yakni ketika semua gugus hidroksil (OH·) pada cincin β berperan sebagai donor elektron atau hidrogen sehingga mencegah terbentuknya radikal bebas (Priska *et al.*, 2018).

3.4 Terpenoid

Pada tanaman *Jatropha mollissima*, terdapat 51 senyawa yang terdeteksi dan terdapat 23 kandungan yang berkhasiat obat, lima diantaranya menunjukkan kadar yang cukup besar yaitu fitol (18,39%), γ -sitosterol (12,12%), *lupeol* (9,30%), dan β -amirin (6,05 %) (Bastos-Cavalcante *et al.*, 2020). Pada tanaman *Aloe barbadensis* juga diidentifikasi mengandung senyawa timokuinon. Senyawa-senyawa tersebut tergolong dalam senyawa turunan terpenoid (Julianto, 2019) sebagaimana tercantum dalam Tabel 5.

Tabel 5. Daftar senyawa yang tergolong terpenoid

Kelas	Terpenoid	Tanaman
Monoterpenoid	Timokuinon	<i>Aloe barbadensis</i>
Diterpenoid	Fitol	<i>Jatropha mollissima</i>
Triterpenoid	- β -amirin - γ -Sitosterol - <i>Lupeol</i>	<i>Jatropha mollissima</i>

Berdasarkan literatur, senyawa-senyawa terpenoid tersebut dikaitkan memiliki khasiat sebagai anti inflamasi, antibakteri, antijamur, antivirus, antitumor, antidiabetes, anti-*ulcerogenic*, hepatoprotektif, neuroprotektif, antiparasit, analgesik, dan antioksidan (González-Coloma *et al.*, 2011).

3.5 Asam lemak organik

Asam lemak tanaman biasanya terdapat dalam bentuk terikat ester, gliserol, dan lemak. Pada tumbuhan, lemak ini digunakan untuk cadangan energi. Tanaman *Jatropha mollissima* mengandung asam linoleat dan *Fagoni olivieri* mengandung asam heksadekanoat (asam palmitat). Aktivitas antioksidan terhadap komponen minyak atsiri kemungkinan dipengaruhi oleh struktur senyawanya karena mempunyai gugus OH⁻ (hidroksi) yang berperan penting dalam proses antioksidan (Gunawan & Karda, 2015).

3.6 Glycyrrhizin

Dari hasil pengujian tanaman akar manis (*Glycyrrhiza glabra*), didapati kandungan senyawa *Glycyrrhizin* (Aksoy *et al.*, 2012), yang menunjukkan adanya aktivitas enzim antioksidan. Mekanisme kerjanya adalah dengan menekan peroksidasi lipid dan kadar GSH, mengurangi peradangan, dan melindungi mukosa dari cedera oksidatif (Li *et al.*, 2011).

Kesimpulan

Artikel ini memberikan gambaran secara ilmiah tentang 12 jenis tanaman herbal yang telah terbukti dapat melindungi fungsi ginjal dari kerusakan yang diakibatkan oleh induksi gentamisin. Kandungan senyawa dari semua tanaman tersebut berasal dari golongan yang berbeda-beda, namun semuanya memiliki aktivitas serupa sebagai antioksidan. Mekanisme perlindungan ginjal dengan antioksidan yakni menghambat atau mencegah terjadinya aktivitas oksidasi dalam sel pada ginjal yang disebabkan oleh penggunaan gentamisin. Selain itu, pada beberapa tanaman juga terkandung senyawa dengan khasiat antiinflamasi yang berguna untuk meredakan peradangan pada ginjal akibat gentamisin. Berdasarkan berbagai penelitian yang telah dilakukan dan hasil yang telah didapat, penulis menyarankan bahwa dalam penelitian selanjutnya, perlu dilakukan uji toksisitas dan uji klinis ekstrak tanaman herbal agar efektivitasnya dapat dirasakan oleh banyak orang.

Daftar pustaka

- Aksoy, N., Dogan, Y., Iriadam, M., Bitiren, M., Uzer, E., Ozgonul, A., & Aksoy, S. (2012). Protective and therapeutic effects of licorice in rats with acute tubular necrosis. *J Ren Nutr*, 22(3), 336-343. <https://doi.org/10.1053/j.jrn.2011.07.002>
- Alfonso, A. A., Mongan, A. E., & Memah, M. F. (2016). Gambaran kadar kreatinin serum pada pasien penyakit ginjal kronik stadium 5 non dialisis. *Jurnal E-Biomedik*, 4(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.35790/ebm.4.2.2016.12658>
- Alimuddin, A., Murtini, S., Faridah, N., & Nuryati, S. (2019). Behavior, histopathology and physiological responses of rat fed diets containing growth hormone transgenic fish meal. *HAYATI Journal of Biosciences*, 26(1), 1-6. <https://doi.org/https://doi.org/10.4308/hjb.26.1.1>
- Balakumar, P., Rohilla, A., & Thangathirupathi, A. (2010). Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it? *Pharmacol Res*, 62(3), 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.04.004>
- Bastos-Cavalcante, N., Rodrigues dos Santos-Barbosa, C., Silva-Pereira, R. L., Feitosa-Muniz, D., de Melo-Coutinho, H. D., Araújo-Rolim, L., & da Silva- Almeida, J. R. G. (2020). Phytochemical Analysis, Antibacterial Activity and Antibiotic Modifying Action of *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill. (Euphorbiaceae). *Anales de Biología*(42), 85-94. <https://doi.org/https://doi.org/10.6018/analesbio.42.10>
- Chatterjee, P., Mukherjee, A., & Nandy, S. (2012). Protective effects of the aqueous leaf extract of *Aloe barbadensis* on gentamicin and cisplatin-induced nephrotoxic rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2(3, Supplement), S1754-S1763. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60490-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60490-0)
- Dar, N. J., Hamid, A., & Ahmad, M. (2015). Pharmacologic overview of *Withania somnifera*, the Indian Ginseng. *Cell Mol Life Sci*, 72(23), 4445-4460. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2012-1>

- Dewi, P. R. P., Hairrudin, H., & Normasari, R. (2016). Pengaruh Stres Fisik terhadap Kadar Kreatinin Serum Tikus Wistar Jantan (*Rattus norvegicus*). *Pustaka Kesehatan*, 4(2), 218–221. <https://jurnal.unej.ac.id/index.php/JPK/article/view/3005>
- Galdino, P. M., Alexandre, L. N. P., Lílian Fernanda Junior, Ruyde Souza Lino, Paula, J. R. P., Gustavo Rodrigues, & Xavier, C. H. F., Patrícia Maria (2017). Nephroprotective effect of *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth leaves on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 201, 100-107. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.035>
- Ghaznavi, H., Fatemi, I., Kalantari, H., Hosseini Tabatabaei, S. M. T., Mehrabani, M., Gholamine, B., Kalantar, M., Mehrzadi, S., & Goudarzi, M. (2018). Ameliorative effects of gallic acid on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Asian Nat Prod Res*, 20(12), 1182-1193. <https://doi.org/10.1080/10286020.2017.1384819>
- Ghédira, K., & Goetz, P. (2016). *Malva sylvestris* L. (Malvaceae) : Mauve. *Phytothérapie*, 14(1), 68-72. <https://doi.org/10.1007/s10298-016-1023-x>
- González-Coloma, A., López-Balboa, C., Santana, O., Reina, M., & Fraga, B. M. (2011). Triterpene-based plant defenses. *Phytochemistry Reviews*, 10(2), 245–260. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11101-010-9187-8>
- Govindappa, P. K., Gautam, V., Tripathi, S. M., Sahni, Y. P., & Raghavendra, H. L. S. (2019). Effect of *Withania somnifera* on gentamicin induced renal lesions in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(2), 234-240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjfp.2018.12.005>
- Gunawan, I. W. G., & Karda, I. M. (2015). Identifikasi Senyawa Minyak Atsiri dan Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Kulit Batang Kepuh (*Sterculia foetida* L.). *Chemistry Progress*, 8(1), 12–16. <https://doi.org/https://doi.org/10.35799/cp.8.1.2015.9398>
- Han, Z.-Z., Xu, H.-D., Kim, K.-H., Ahn, T.-H., Bae, J.-S., Lee, J.-Y., Gil, K.-H., Lee, J.-Y., Woo, S.-J., Yoo, H.-J., Lee, H.-K., Kim, K.-H., Park, C.-K., Zhang, H.-S., & Song, S.-W. (2010). Reference Data of the Main Physiological Parameters in Control Sprague-Dawley Rats from Pre-clinical Toxicity Studies. *Laboratory Animal Research*, 26, 153. <https://doi.org/10.5625/lar.2010.26.2.153>
- Hussain, T., Gupta, R. K., Sweety, K., Eswaran, B., Vijayakumar, M., & Rao, C. V. (2012). Nephroprotective activity of *Solanum xanthocarpum* fruit extract against gentamicin-induced nephrotoxicity and renal dysfunction in experimental rodents. *Asian Pac J Trop Med*, 5(9), 686-691. [https://doi.org/10.1016/s1995-7645\(12\)60107-2](https://doi.org/10.1016/s1995-7645(12)60107-2)
- Iqbal, M. O., & Yahya, E. B. (2021). In vivo assessment of reversing aminoglycoside antibiotics nephrotoxicity using *Jatropha mollissima* crude extract. *Tissue Cell*, 72, 101525. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2021.101525>
- Irtawaty, A. (2017). Klasifikasi Penyakit Ginjal dengan Metode K-Means. *JTT (Jurnal Teknologi Terpadu)*, 5, 49. <https://doi.org/10.32487/jtt.v5i1.241>
- Julianto, T. S. (2019). *Fitokimia Tinjauan Metabolit Sekunder dan Skrining Fitokimia* 1 ed., Yogyakarta, Indonesia: Universitas Islam Indonesia
- Kandeil, M. A. M., Hassanin, K. M. A., Mohammed, E. T., Safwat, G. M., & Mohamed, D. S. (2018). Wheat germ and vitamin E decrease BAX/BCL-2 ratio in rat kidney treated with gentamicin. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 7(3), 257-262. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjbas.2018.02.001>
- Kardani, A. K., Soemyarso, N. A., Aras, J. A., Prasetyo, R. V., & Noer, M. S. (2021). Increased Interleukin-6 as Inflammatory Response and Magnesium Deficiency in Pre-dialysis Chronic Kidney Disease of Indonesian Children. *Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease*, 9(2), 93. <https://doi.org/https://doi.org/10.20473/ijtid.v9i2.21479>

- Kemenkes_RI. (2011). *Pedoman Pelayanan Kefarmasian untuk Terapi Antibiotik* Jakarta: Kementrian Kesehatan Republik Indonesia
- Kumar, S., & Pandey, A. K. (2013). Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 162750. <https://doi.org/10.1155/2013/162750>
- Li, X.-L., Zhou, A.-G., Zhang, L., & Chen, W.-J. (2011). Antioxidant Status and Immune Activity of Glycyrrhizin in Allergic Rhinitis Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 905-916. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms12020905>
- Lintong, P. M., Kairupan, C. F., & Sondakh, P. L. N. (2013). Gambaran Mikroskopik Ginjal Tikus Wistar (*Rattus norvegicus*) Setelah Diinduksi Dengan Gentamisin. *Jurnal Biomedik* 4(3), 185-192. <https://doi.org/https://doi.org/10.35790/jbm.4.3.2012.800>
- Lopez-Novoa, J. M., Quiros, Y., Vicente, L., Morales, A. I., & Lopez-Hernandez, F. J. (2011). New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. *Kidney Int*, 79(1), 33-45. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.337>
- Mohamadi Yarijani, Z., Najafi, H., Shackebaei, D., Madani, S. H., Modarresi, M., & Jassemi, S. V. (2019). Amelioration of renal and hepatic function, oxidative stress, inflammation and histopathologic damages by *Malva sylvestris* extract in gentamicin induced renal toxicity. *Biomed Pharmacother*, 112, 108635. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.108635>
- Özkan, Ö., & Pekkaya, S. . (2019). Normal Values of Biochemical Parameters in Serum of New Zealand White Rabbits. *Turk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 76(2), 157-162. <https://doi.org/https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2018.53254>
- Priska, M., Peni, N., Carvallo, L., & Ngapa, Y. D. (2018). Review : Antosianin dan Pemanfaatannya. *Cakra Kimia (Indonesian E-Journal of Applied Chemistry)*, 6(2), 79-97.
- Rashid, U., & Khan, M. R. (2017). Fagonia olivieri prevented hepatorenal injuries induced with gentamicin in rat. *Biomed Pharmacother*, 88, 469-479. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.088>
- Salih, N. A. (2015). Effect of nettle (*Urtica dioica*) extract on gentamicin induced nephrotoxicity in male rabbits. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 5(9), 756-760. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.07.005>
- Siahaan, G., Lintong, P., & Loho, L. (2016). Gambaran histopatologik ginjal tikus wistar (*Rattus norvegicus*) yang diinduksi gentamisin dan diberikan ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas* L. Poir). *Jurnal e-Biomedik*, 4(1). <https://doi.org/10.35790/ebm.4.1.2016.12229>
- Silverman, J. (2012). Biomedical Research Techniques. In *In The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (1 ed.). Elsevier Inc. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380920-9.00029-8>
- Sujono, T. A., & Rizki, F. A. (2020). Efek Nefroprotektif Ekstrak Etanol Bawang Putih (*Allium sativum* L.) pada Tikus yang Diinduksi Gentamisin. *Pharmacon Jurnal Farmasi Indonesia*, 1-9.
- Ungurianu, A., Zănfirescu, A., Nițulescu, G., & Margină, D. (2021). Vitamin E beyond Its Antioxidant Label. *Antioxidants (Basel)*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/antiox10050634>
- Veljković, M., Pavlović, D. R., Stojiljković, N., Ilić, S., Petrović, A., Jovanović, I., & Radenković, M. (2016). Morphological and morphometric study of protective effect of green tea in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Life Sci*, 147, 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.035>
- Vysakh, A., Abhilash, S., Kuriakose, J., Midhun, S. J., Jyothis, M., & Latha, M. S. (2018). Protective effect of *Rotula aquatica* Lour against gentamicin induced oxidative stress and nephrotoxicity in Wistar rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1188-1194. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.066>

Interferons and its use in children with COVID-19: a narrative review

Chairunnisa, Suharjono*

Department of Clinical Pharmacy, Faculty of Pharmacy, Universitas Airlangga, Surabaya, Indonesia

*Corresponding author: suharjono@ff.unair.ac.id

Abstract

Background: All ages, including children, are susceptible to the disease COVID-19. The severity of COVID-19 in children is milder than in adults. One of the recommended antiviral drugs for COVID-19 in children is interferon.

Objective: To describe the efficacy and safety of using interferon in children with COVID-19

Method: The article is a narrative study. The main databases in the article search process in this literature review are PubMed and Google Scholar.

Results: The articles that could potentially be involved in this study were 28 articles. A total of 13 articles included the criteria, 9 articles discussed the use of interferon against respiratory syndrome, 4 articles on interferon in children, and one reference from a literature search.

Conclusion: Interferon therapy in COVID-19 in children has a high cure rate but needs to be evaluated in a larger sample of pediatric patients.

Keywords: Interferon, COVID-19, children

1. Introduction

In December 2019, the Chinese authorities made a preliminary determination of the coronavirus in a person hospitalized with pneumonia in Wuhan Hubei Province. Chinese authorities later reported that laboratory tests ruled out results related to SARS-CoV, MERS-CoV, influenza, avian influenza, adenovirus, and other common respiratory pathogens (WHO, 2020). The virus that causes this disease belongs to the Coronaviridea coronavirus family group that caused two other outbreaks, namely severe acute respiratory syndrome (SARS) in 2002 and Middle East Respiratory Syndrome (MERS) in 2012. This disease has been named by WHO, namely Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) (Basha, 2020).

All ages, including children, are susceptible to COVID-19. However, the sample size in available reports on clinical characteristics of children with COVID-19 is usually small. The antiviral drug for COVID-19 in children recommended in the consensus is nebulized interferon especially for children with mild pneumonia. Since most of the children are relatively mild, research tends not to be supported to test the efficacy of this drug on the results obtained (Peng *et al.*, 2020). This article can be used as a reference and consideration for using interferon because it describes the efficacy and safety of using interferon in children with COVID-19.

2. Methods

This article is a narrative study. The main databases in this literature review are PubMed and Google Scholar with keywords: Interferon AND Children OR Infant* OR "Neonate" OR "Child" (coronavirus OR covid* OR "SARSCoV-2" OR "2019-NCov"). All articles published during the last 3 years to November 2020 have the potential to be included in this study. Literature searches used as references in published articles were also carried out as an effort to enrich this study. The inclusion criteria in this study include articles that present qualitative, quantitative, effectiveness, safety, and side effects data that can be used as a reference. The articles excluded in this study were articles over the last 3 years, studies of cellular and molecular mechanisms, animal model studies, and absence of interferon intervention or insufficient data.

3. Results

There were 13 articles that match the inclusion criteria from total 28 articles found. It covers 9 articles that discussed the use of interferon in respiratory syndrome, 4 articles of interferon used in children, and one reference from literature search. The flowchart of identification and the articles showed in Figure 1 and Table 1.

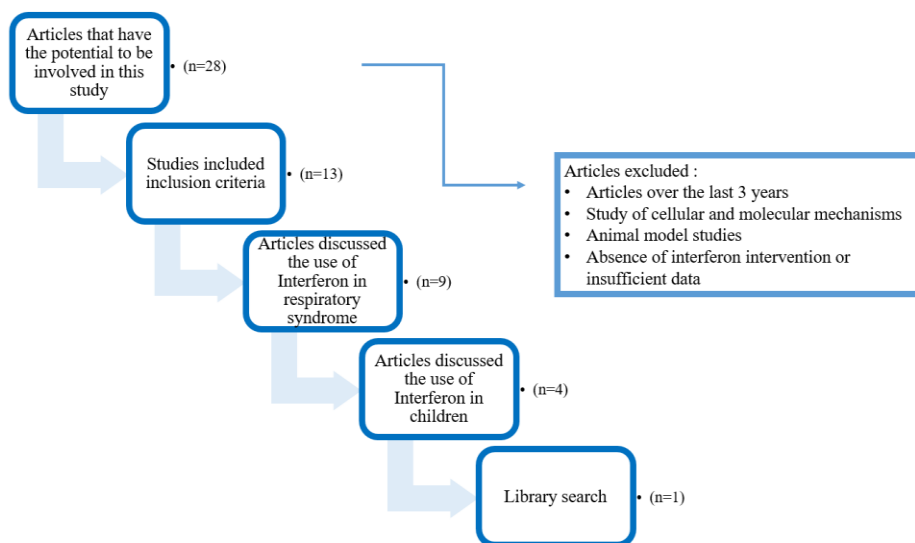


Figure 1. Flowchart of identification and inclusion articles

Table 1. Studies of interferon

No.	Author (year)	Result
1	Jiang <i>et al.</i> (2020)	A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial with a total of 163 patients at least 14 years old were included in the complete analysis set (FAS) and 151 patients were included in the per-protocol set (PPS), there were patients in the IFN α 1b group and patients in the control group shows that recombinant human interferon α 1b (IFN α 1b) inhaled aerosol is safe and can improve clinical symptoms of non-influenza viruses.
2	Liu <i>et al.</i> (2020)	In critical handling of COVID-19, most of it is a supportive therapy, giving interferon inhalation atomization can help and does not have a mortality rate.
3	Payandemehr <i>et al.</i> (2020)	Investigator-initiated, open-label, single-arm clinical trial research in 20 adult patients with suspected COVID-19 supports the use of interferon beta-1a as an adjunct to the antiviral treatment recommended in COVID-19 patients.
4	Peng <i>et al.</i> (2020)	Interferon α 1b therapy in 75 pediatric COVID-19 patients obtained a 100% cure rate. Most children recover within two weeks.
5	Sallard <i>et al.</i> (2020)	Interferon- β 1 has mixed efficiency against MERS-CoV and SARS-CoV viruses but <i>in vitro</i> studies have shown that SARS-CoV-2 is substantially more sensitive to interferon-I.
6	Sheahan <i>et al.</i> (2020)	Interferon is also used in MERS-CoV. Lopinavir/ritonavir prophylaxis plus interferon- β slightly reduces viral load without affecting other disease parameters and improves lung function.
7	Shen <i>et al.</i> (2020)	The use of interferon- α in treating bronchiolitis, viral pneumonia, acute upper respiratory tract infections, hand-mouth disease, SARS, and other viral infections in children. The recommended use of interferon is interferon- α nebulizer and interferon- α 2b spray.
8	Shen & Yang (2020)	Inhalation of recombinant human interferon- α 2b can effectively reduce the infection rate of respiratory viruses, influenza viruses, adenoviruses and SARS-CoV.
9	Sujaritha <i>et al.</i> (2020)	Interferon is safe and comfortable to enhance treatment in the early stages of COVID-19 infection and can protect the respiratory tract.
10	Tidwong <i>et al.</i> (2020)	Interferon- α and interferon- β have <i>in vitro</i> activity against SARS-CoV and MERS-CoV. Interferon- β showed the strongest <i>in vitro</i> inhibition against MERS-CoV.
11	Yellepeddi <i>et al.</i> (2019)	Interferon products such as Pegasys® (PEGylated interferon alpha-2a) exhibit 4-fold lower clearance, longer time to steady state, and 25-70% higher AUC in children compared to adults. Meanwhile, PegIntron® (PEGylated interferon alpha-2b) showed about a 50% increase in AUC compared to adults with the same dose.
12	Yu <i>et al.</i> (2020)	Interferon type I was well tolerated and did not increase any adverse effects. Interferon type I is therefore recommended as a first-line antiviral for SARS-CoV-2 infection in a local protocol, with timely administration and monitoring of side effects.
13	Zimmermann & Curtis ¹ (2020)	In the absence of specific antiviral drugs for CoV the use of broad-spectrum antiviral drugs such as alpha and beta interferon or ribavirin can be used for the treatment of SARS-CoV in children.

4. Discussion

4.1 Clinical and epidemiological conditions of COVID-19 in children

The main clinical symptoms of COVID-19 in children are fever, dry cough, pneumonia and just under a third are asymptomatic. In addition, one fifth had pneumonia and required radiographs for further identification. Symptoms seen in children on admission vary, including cough and fever. All asymptomatic patients and children without pneumonia require laboratory and radiographic examinations for further diagnosis (Qiu *et al.*, 2020). Children can be carriers of this virus. Children with severe clinical symptoms of COVID-19, especially those with pneumonia, should be hospitalized as adults, while mild clinical symptoms require quarantine. In children without clinical symptoms and infection, a home isolation protocol is recommended (Zare-Zardini *et al.*, 2020).

Clinical presentation and outcome are better in children. Most cases and critical occurrence of COVID-19 are in the group of children aged less than three years, so they need better attention while being treated in a hospital or children who are cared for at home (Zheng *et al.*, 2020). The clinical characteristics of cases of infected children can be divided into several clinical types, namely asymptomatic, mild, ordinary, and severe infections (Miao *et al.*, 2020). COVID-19 causes asymptomatic to severe illness, but the condition in children without comorbidities and neonates has mild symptoms. There is no specific antiviral drug treatment for neonates and children, therefore neonatologists need more virological, epidemiological, and clinical data for COVID-19 therapy (Lu & Shi, 2020)

Laboratory results in children with COVID-19 are leukocytes are usually normal or reduced with a decrease in the number of neutrophils and lymphocytes, thrombocytopenia occurs, meanwhile levels of C-reactive protein and procalcitonin are often normal. In severe cases, liver enzymes are elevated as well as levels of lactic dehydrogenase, abnormal coagulation, and an increasing level of D-dimers. Chest radiographs of most of the children showed bilateral air space consolidation in the peripheral lungs, peribronchial thickening, and ground-glass opacities. Chest CT predominantly shows airspace consolidation and ground-glass turbidity (Zimmermann & Curtis¹, 2020).

Children are susceptible to SARS-CoV-2 infection even if they do not have a congenital disease. Children can become facilitators of transmission of the virus. If children are important in transmitting the virus, it is advisable to avoid interactions with the elderly to slow

transmission and protect vulnerable populations (Kelvin & Halperin, 2020). Pediatric patients contracted COVID-19 with a clear route of transmissions such as close contact with family members, history of exposure to epidemic areas, or both. No other source of transmissions such as being in a hospital, or an unclear route of transmission was identified. This transmission means that the identification of these pediatric patients is very easy (Qiu *et al.*, 2020). COVID-19 in children is mainly caused by transmission from families with mild symptoms and a better prognosis than in adults. Symptoms in children are difficult to recognize early because the clinical process is mild or without symptoms (Su *et al.*, 2020).

The pattern of transmission of COVID-19 in children is generally similar to that of SARS and MERS. The mean incubation period between household exposure to symptomatic children and the onset of symptoms was 6.5 days which is longer than that observed in the adult case of 5.4 days. This difference suggests that the incubation period is longer in children with 2019-nCoV infection. The accumulation of the virus in the respiratory specimens takes longer in children with mild COVID-19 and 2019-nCoV RNA is not detected in serum samples (Jiehao *et al.*, 2020). The risk of transmission of the virus is lower in children than in adults (1.3 vs. 3.5%), the risk of a child developing a severe illness requiring hospitalization is 25 times lower than in adults (0.1% vs. 2.6%) and the risk of death is 500 times lower than in adults (0.001% vs. 0.5%). Presentation rates should be taken with caution because of possible bias, but it can be concluded that resistance to infection and resistance to disease in children is stronger than in adults (Fisher, 2020). There are several causes that may protect children from SARS-CoV-2 infection compared to adults including differences in innate and adaptive immunity, pre-existing immunity to the coronavirus, and lower intensity of SARS-CoV-2 exposure (Zimmermann & Curtis², 2020).

4.2 Overview of interferon

There are four types of interferons, namely alpha interferon, beta interferon, gamma interferon, and lambda interferon. Alpha interferon is also called leukocyte interferon because it is produced by leukocytes, IFN- α is produced by lymphocytes and macrophages due to virus-infected cells. Interferon beta is also called fibroblast interferon because it is produced by fibroblasts and epithelial cells. IFN- β arises due to the action of foreign nucleic acids such as viruses or other types. Gamma interferon is a subclass of interferon type II. IFN- γ is also called

immune interferon. IFN- γ is produced mainly by activated lymphocytes or T cells. IFN- γ increases macrophage activation, antiviral immunity, and antigen presentation. IFN- γ can also regulate activation of the innate immune system and coordinate lymphocyte-endothelial interactions. Lambda interferon is type III interferon. IFN- λ is induced by viruses and other interferons. IFN- λ has in vivo antiviral activity (Kingsley & Peace, 2020).

Interferons are a group of low molecular glycoproteins with a structure and function similar to those produced by the body in response to viruses. Interferons are the body's first innate immune defense against viral infections. Interferon acts as an antiviral in two ways, first, it induces the production of antiviral effector proteins so as to inhibit viral replication in cells and can protect normal cells from viral invasion; second, it activates cellular immunity by activating the proliferation and activation of cytotoxic T lymphocytes, activating natural killer cells (NK) and macrophages to eliminate viruses. Lack of endogenous interferon in the body can cause reduced activity as an antiviral. Children are susceptible to viral infections due to immature immune function and relatively low levels of humoral and cellular immunity and secretion of interferons (Shen & Yang, 2020). ACE2 expression and affinity increase with age. Therefore, in the nasal epithelium of the upper respiratory tract of children, lower expression of ACE2 may assist in reducing the transmission of SARS-CoV-2 infection (Patel & Verma, 2020).

Interferon- α can reduce the viral growth spurt in the early stages of infection, thereby reducing symptoms and shortening the course of the disease. Interferon- α is used in bronchiolitis, viral pneumonia, acute upper respiratory tract infections, oral diseases, SARS, and other viral infections in children. Interferon- α nebulization at a dose of 200,000–400,000 IU/kg or 2-4 μ g/kg in 2 mL of sterile water, nebulize twice a day for 5-7 days is the recommended use. In addition, the interferon- α 2b spray is used in high-risk populations with close contact with patients suspected of being infected with COVID-19 or patients who are in the early phase who only have symptoms in the upper respiratory tract. The nebulizer was used during treatment by giving patients a dose of 8000 IU interferon- α 2b per injection once every 1-2 hours and 8-10 sprays/day for 5-7 days on each side of the nasal cavity and 8-10 sprays on the oropharynx. (Shen *et al.*, 2020).

Supportive care such as fluids, adequate calories, and oxygen supplementation should be used in the care of children infected with human coronaviruses (HCoVs) to prevent acute respiratory distress syndrome, organ failure, and secondary nosocomial infections. If the

patient is suspected of having a bacterial infection, broad-spectrum antibiotics such as second or third generation cephalosporins can be given (Zimmermann & Curtis¹, 2020).

4.3 Effectivity of interferon

Critical management of COVID-19 is largely a supportive therapy by giving low-dose corticosteroids, lopinavir/ritonavir, and interferon inhalation atomization to decreased mortality rate (Liu *et al.*, 2020). A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial with a total of 163 patients at least 14 years old were included in the complete analysis set (FAS) and 151 patients were included in the per-protocol set (PPS). There were patients in the IFN α 1b group and patients in the control group. The control group showed that recombinant human interferon α 1b (IFN α 1b) aerosol is safe and reduces clinical symptoms of non-influenza viral pneumonia (Jiang *et al.*, 2020). Therefore, interferon can be used in the critical handling of COVID-19 by reducing clinical symptoms.

Interferon α 1b therapy in 75 pediatric COVID-19 patients obtained a 100% cure rate. Most children recover within two weeks. This is due to the less severity of children than adults (Peng *et al.*, 2020). During the SARS outbreak in 2003, an animal study revealed that human recombinant interferon- α 2b inhalation could prevent SARS-CoV infection in a Rhesus monkey model by inhibiting infection and viral replication. Population studies further reveal that human recombinant interferon- α 2b inhalation can effectively reduce the infection rates of respiratory viruses, influenza viruses, adenoviruses, and SARS-CoV (Shen & Yang, 2020).

Interferon- β 1 is a safe and easy treatment against COVID-19 in the early stages of infection. Similar treatments have mixed efficiency against the MERS-CoV and SARS-CoV viruses, but *in vitro* studies have shown that SARS-CoV-2 is substantially more sensitive to interferon-I than other coronaviruses. Research on animal interferon-I treatment for COVID-19 is lacking but its safety has been assessed in various independent clinical trials (Sallard *et al.*, 2020). Investigator-initiated, open-label, single-arm clinical trial research in 20 adult patients with suspected COVID-19 supports the use of interferon beta-1a as an adjunct to the antiviral treatment recommended in COVID-19 patients. However, a parallel two-armed randomized clinical trial is needed to ensure its efficacy and safety (Payandemehr *et al.*, 2020). As described above, only one study was conducted in children, and the others were over 14 years of age and adults therefore it is necessary to conduct studies in a larger sample of pediatric patients.

Interferon is also used in Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV). Comparison of the efficacy of remdesivir and the combination of lopinavir/ritonavir and interferon- β against MERS-CoV showed that remdesivir and interferon- β had better antiviral activity than lopinavir/ritonavir *in vitro*. Lopinavir/ritonavir prophylaxis plus interferon- β slightly reduces viral load without affecting other disease parameters and improves lung function but does not reduce viral replication or severe pulmonary pathology (Sheahan *et al*, 2020). Interferon- α and interferon- β have *in vitro* activity against SARS-CoV and MERS-CoV. Interferon- β showed the strongest *in vitro* inhibition against MERS-CoV with the lowest IC₅₀ of 1.3 U/mL compared to other subtypes. The efficacy of antiviral combinations and various interferon subtypes such as PegIFN- α 2b, IFN- α 1b, IFN- β 1a is still being studied in COVID-19 patients (ChiCTR2000029387, NCT04293887, NCT04254874) (Tidwong *et al.*, 2020).

Interferon products such as Pegasys® (PEGylated interferon alpha-2a) and PegIntron® (PEGylated interferon alpha-2b) induce an innate antiviral immune response against Hepatitis B and C. Pegasys® products are subject to pharmacokinetic studies in children aged 2-8 years with Hepatitis. C chronic. The results showed 4-fold lower clearances and take longer time to reach the steady-state (12 weeks compared to 5-8 weeks), and 25-70% higher of its AUC in children compared to adults. A study in children with the PegIntron® product evaluated pediatric patients aged 3-17 years and showed about a 50% increase in AUC compared to adults with the equivalent dose. Both nano-formulations showed increased total bioavailability and reduced clearance compared to non-PEGylated preparations (Yellepeddi *et al.*, 2019).

In PEGinterferon alpha-2b there is a urethane bond that is connected to PEG with interferon so that PEGinterferon alpha-2b is unstable and easy to hydrolyze and after being injected the original alpha-2b interferon circulates in the body. PEGinterferon alfa-2b can be considered a prodrug of interferon alpha-2b. Whereas in PEGinterferon alpha-2a, there is an amide chain connected to the PEG chain with interferon-alfa-2a which does not undergo hydrolysis. Despite these differences, the efficacy, safety, and tolerability of the two peginterferons are very similar (Noureddin & Ghany, 2010).

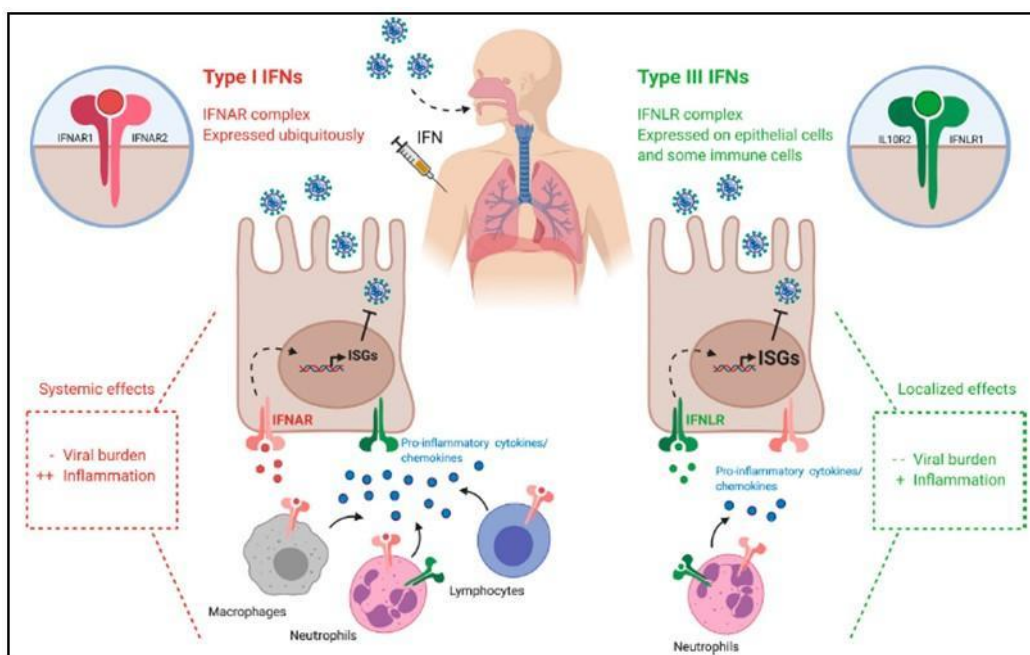


Figure 2. Potential mechanisms for using interferon as a preventive therapy and treatment of COVID-19. (Prokunina-Olsson *et al.*, 2020)

The potential mechanism for using interferon therapy is shown in Figure 2. IFN type I (IFN- α / β) signals through a heterodimeric receptor complex, namely IFNAR which consists of IFNAR1 and IFNAR2 subunits. IFNAR activation induces gene expression and triggers a pro-inflammatory response. IFNAR is expressed on all cells which can cause serious systemic side effects. In contrast, the IFN type III signal (IFN- λ 1-4) passes through a different receptor complex, namely IFNLR which consists of IL10R2 and IFNLR1 subunits. IFNLR1 expression is limited to epithelial cells and immune cell subsets, including neutrophils. Therefore, giving IFN type III as a prophylactic treatment or in the early stages of COVID-19 will induce gene expression and antiviral response only in epithelial cells, thereby reducing side effects and inflammation (Prokunina-Olsson *et al.*, 2020). Interferon type I can improve respiratory disorders, relieve lung disorders, establish better saturation, and reduce the need for additional oxygen. Interferon type I was well tolerated and did not increase any adverse effects. Interferon type I is therefore recommended as a first-line antiviral for SARS-CoV-2 infection in a local protocol, with timely administration and monitoring of side effects. A well-designed large-scale prospective randomized control trial is needed to provide stronger evidence on this topic (Yu *et al.*, 2020). Interferon is safe and comfortable to enhance treatment in the early stages of COVID-19 infection and can protect the respiratory tract. Interferon was combined with

Lopinavir/Ritonavir, and Hydroxychloroquine, and Remdesivir in the WHO's first clinical trial (Sujaritha *et al.*, 2020).

4.4 Adverse events of interferon

Adverse events of interferon- α include flu-like syndromes namely headache, fever, chills, myalgia, and malaise which usually occur within 6 hours of dosing. This flu syndrome occurs in more than 30% of patients during the first week of therapy and tends to recover after continued administration. Temporary liver enzyme elevations may occur in the first 8-12 weeks of therapy. Potential side effects during chronic therapy include neurotoxicity such as mood disorders, depression, drowsiness, confusion, and seizures. High doses of Interferon- α intramuscular injection of more than 2 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{time}$ can cause myelosuppression in children. Additionally, it can cause weight loss, rash, cough, myalgia, alopecia, tinnitus, reversible hearing loss, retinopathy, pneumonitis, and possibly cardiotoxicity. Autoantibody induction can occur which causes exacerbations (Wang & Zhu, 2020).

Contraindications of interferon- α include liver decompensation, autoimmune disease, and a history of cardiac arrhythmias. Caution is advised in psychiatric illness, epilepsy, thyroid disease, ischemic heart disease, and cytopenia. Interferon- α should not be given to children with creatinine (CrCl) below 50 mL/minute. Interferon- α nebulization should be used with caution in neonates and infants under 2 months of age. Suicidal ideation is more common in children, especially adolescents compared to adults (2.4% vs 1%) (Wang & Zhu, 2020). The combination of Interferon- α and Ribavirin can inhibit growth and development in children. Potential drug-drug interactions include elevated levels of theophylline and methadone. Co-administration with didanosine is not recommended because it has a risk of liver failure, and co-administration with zidovudine can worsen cytopenia. Interferon- α should be used with caution when combined with sleeping pills and sedatives.

The only adverse event in the Cohort study were mild flu-like symptoms such as low-grade pyrexia, rhinorrhea, and neutropenia, which were transient in some children in the early stages of treatment. There is no reduction in dosage or discontinuation of treatment in children with flu-like symptoms, and neutropenia disappears rapidly. There were no patients with hypothyroidism/hyperthyroidism side effects or dose modification required for thyroid dysfunction. No severe abnormal results were observed in other laboratory data. The sample

size in this study is small and the sample size needs to be expanded in future studies. In addition, in monitoring for side effects, growth parameters were not measured or recorded completely to monitor the impact of antiviral treatment on children's growth and development (Hu *et al.*, 2019).

5. Conclusions

Interferon is a safe treatment for children with COVID-19 because it can reduce clinical symptoms and decrease the mortality rates. The use of interferon in COVID-19 in children has a high cure rate because the severity of COVID-19 in children's cases is lower than in adults. However, the results of interferon therapy in COVID-19 need to be evaluated in a larger sample of pediatric patients.

References

- Basha, S. H. (2020). Corona virus drugs – a brief overview of past, present and future. *Journal of Peer Scientist*, 2(2), 1-16.
- Fisher, A. (2020). Resistance of children to Covid-19. How? *Mucosal Immunology*, 13, 563-565. doi:10.1038/s41385-020-0303-9
- Hu, Y., Ye, Y., Ye, L., Wang, X., & Yu, H. (2019). Efficacy and safety of interferon alpha therapy in children with chronic hepatitis B. *Medicine*, 98(32), e16683. doi:10.1097/MD.00000000000016683
- Jiang, R., Han, B., Song, M., Xue, B., Zhang, Y., Ding, Y., Chen J., Zhu, J., Liu, J., Nie, Q., Han, X., Jin, X., Shan, X., Guo, W., Zhang, E., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, L., Wang, B., Dong, S., Li, J., Li, X., Li, X. (2020). Efficacy and safety of aerosol inhalation of recombinant human interferon α 1b (IFN α 1b) injection for noninfluenza viral pneumonia, a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Inflammation*, 17, 19. doi:10.1186/s12950-020-000
- Jiehao C, Jin X, Daojiong L, Zhi Y, Lei X, Zhenghai Q, Yuehua Z, Hua Z, Ran J, Pengcheng L, Xiangshi W, Yanling G, Aimei X, He T, Hailing C, Chuning W, Jingjing L, Jianshe W, Mei Z. (2020). A case series of children with 2019 novel coronavirus infection: clinical and epidemiological features. *Clinical Infectious Diseases*, XX(XX), 1-5. doi:10.1093/cid/ciaa198
- Kelvin, A., & Halperin, S. (2020). COVID-19 in children: the link in the transmission chain. *The Lancet/infection*, 20, 633-634. doi:10.1016/S1473-3099(20)30236-X
- Kingsley, U., & Peace, O. N. (2020). Interferon: Role in health, current trends and therapeutic potentials. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*, 10(3), 227-230.
- Liu, Y., Li, J., & Feng, Y. (2020). Critical care response to a hospital outbreak of the 2019-nCoV infection in Shenzhen, China. *Critical Care*, 24, 56. doi:10.1186/s13054-020-2786-x
- Lu, Q., & Shi, Y. (2020). Coronavirus disease (COVID-19) and neonate: What neonatologist need to know. *Journal of Medical Virology*, 92, 564-567.

- Miao H, Li H, Yao Y, Wu M, Lu C, Wang J, Tian M, Li Y, Luo P, Gu J, Yuan B, Wang S, Zhao X, Gan W, Zhao D. (2020). Update on recommendations for the diagnosis and treatment of SARS-CoV-2 infection in children. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. doi:0.1007/s10096-020-03973-x
- Noureddin, M., & Ghany, M. (2010). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of peginterferon and ribavirin: implications for clinical efficacy in treatment of chronic hepatitis C. *Gastroenterol Clin North Am*, 39(3), 649–658. doi:10.1016/j.gtc.2010.08.008.
- Patel, A., & Verma, A. (2020). Nasal ACE2 levels and COVID-19 in children. *JAMA*, 323(23), 2386–2387. doi:10.1001/jama.2020.8946
- Payandemehr, P., Azhdarzadeh, M., Bahrami-Motlagh, H., Hadadi, A., Najmeddin, F., Shahmirzaei, S., Pasoki, M., Sotoodehnia, M., Rahimian, R. (2020). Interferon beta-1a as a candidate for COVID-19 treatment; an open-label single-arm clinical trial. *Advanced Journal Of Emergency Medicine*, 4(2), e51. doi:10.22114/ajem.v4i2s.454
- Peng, H., Gao, P., Xu, Q., Liu, M., Peng, J., Wang, Y., & Xu, H. (2020). Coronavirus disease 2019 in children: Characteristics, antimicrobial treatment, and outcomes. *Journal of Clinical Virology*, 128, 104425.
- Prokunina-Olsson L, Alphonse N, Dickenson RE, Durbin JE, Glenn JS, Hartmann R, Kotenko SV, Lazear HM, O'Brien TR, Odendall C, Onabajo OO, Piontkivska H, Santer DM, Reich NC, Wack A, Zanoni I. (2020). COVID-19 and emerging viral infections: The case for interferon lambda. *Journal of Experimental Medicine*, 217(5), e20200653. doi:10.1084/jem.20200653
- Qiu, H., Wu, J., Hong, L., Luo, Y., Song, Q., & Chen, D. (2020). Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. *Lancet Infectious Disease*. doi:10.1016/S1473-3099(20)30198-5
- Sallard, E., Lescure, F., Yazdanpanah, Y., Mentre, F., & Peiffer-Smadja, N. (2020). Type 1 interferons as a potential treatment against COVID-19. *Antiviral Research*, 178, 104791.
- Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, Schäfer A, Won J, Brown AJ, Montgomery SA, Hogg A, Babusis D, Clarke MO, Spahn JE, Bauer L, Sellers S, Porter D, Feng JY, Cihlar T, Jordan R, Denison MR, Baric RS. (2020). Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV. *Nature Communications*, 11, 222. doi:10.1038/s41467-019-13940-6
- Shen, K., & Yang, Y. (2020). Diagnosis and treatment of 2019 novel coronavirus infection in children: a pressing issue. *World Journal of Pediatrics*, 16, 219–221. doi:0.1007/s12519-020-00344-6
- Shen, K., Yang, Y., Wang, T., Zhao, D., Jiang, Y., Jin, R., Zheng, Y., Xu, B., Xie, Z., Lin, L., Shang, Y., Lu, X., Shu, S., Bai, Y., Deng, J., Lu, M., Ye, L., Wang, X., Wang, Y., Gao, L. (2020). Diagnosis, treatment, and prevention of 2019 novel coronavirus infection in children: experts' consensus statement. *World Journal of Pediatrics*, 16, 223–231.
- Su L, Ma X, Yu H, Zhang Z, Bian P, Han Y, Sun J, Liu Y, Yang C, Geng J, Zhang Z, Gai Z. (2020). The different clinical characteristics of corona virus disease cases between children and their families in China – the character of children with COVID-19. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 707-713. doi:10.1080/22221751.2020.1744483
- Sujaritha, J., Deepa sankar, N., Mathivathani, K., Aravindh, G., & Gnanasekaran, G. (2020). An overview of some drugs: Lopinavir, Ritonavir, Chloroquine, Hydroxychloroquine and

- interferon as a effective treatment against COVID-19. *International Journal of Research in Phytochemistry and Pharmacology*, 10(1), 20-24.
- Tidwong, N., Montakantikul, P., & Manosuthi, W. (2020). Pharmacological treatment for the Novel Coronavirus Disease 2019 (COVID-19 Infection). *Pharmaceutical Sciences Asia*, 47(2), 97-103. doi:10.29090/psa.2020.02.020.0026
- Wang, Y., & Zhu, L. (2020). Pharmaceutical care recommendations for antiviral treatments in children with coronavirus disease 2019. *World Journal of Pediatrics*, 16, 271-274. doi:10.1007/s12519-020-00353-5
- WHO. (2020). *WHO Statement Regarding Cluster of Pneumonia Cases in Wuhan, China*. Retrieved from <https://www.who.int/china/news/detail/09-01-2020-who-statement-regarding-cluster-of-pneumonia-cases-in-wuhan-china>
- Yellepeddi, V., Joseph, A., & Nance, E. (2019). Pharmacokinetics of nanotechnology-based formulations in pediatric populations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 151-152, 44-55.
- Yu, C., Kang, L., Chen, J., & Zang, N. (2020). Evaluation of safety, efficacy, tolerability, and treatment-related outcomes of type I interferons for human coronaviruses (HCoV)s infection in clinical practice: An updated critical systematic review and meta-analysis. *International Immunopharmacology*, 86, 106740.
- Zare-Zardini, H., Soltaninejad, H., Ferdosian, F., Hamidieh, A. A., & Memarpoor-Yazdi, M. (2020). Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) in children: prevalence, diagnosis, clinical symptoms, and treatment. *International Journal of General Medicine*, 13, 477-482.
- Zheng F, Liao C, Fan QH, Chen HB, Zhao XG, Xie ZG, Li XL, Chen CX, Lu XX, Liu ZS, Lu W, Chen CB, Jiao R, Zhang AM, Wang JT, Ding XW, Zeng YG, Cheng LP, Huang QF, Wu J, Luo XC, Wang ZJ, Zhong YY, Bai Y, Wu XY, Jin RM. (2020). Clinical characteristics of children with coronavirus disease 2019 in Hubei, China. *Current Medical Science*, 40(2), 275-280. doi:10.1007/s11596-020-2172-6
- Zimmermann, P., & Curtis, N.¹ (2020). Coronavirus infections in children including COVID-19. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 39, 355-368.
- Zimmermann, P., & Curtis, N.² (2020). Why is COVID-19 less severe in children? A review of the proposed mechanisms underlying the age-related difference in severity of SARS-CoV-2 infections. *Arch Dis Child*, 0, 1-11. doi:10.1136/archdischild-2020-320338

Mechanism and immunomodulator bioactive compounds of *Phyllanthus niruri* (meniran)

Mekanisme dan senyawa bioaktif imunomodulator *Phyllanthus niruri* (meniran)

Uzulul Hikmah¹, Asih Triastuti^{1,2*}

¹Prodi Magister Farmasi, Jurusan Farmasi, FMIPA, Universitas Islam Indonesia

²Pusat Studi Obat Herbal, Jurusan Farmasi, Universitas Islam Indonesia

*Corresponding author: asih.triastuti@uui.ac.id

Abstract

Background: *Phyllanthus niruri* (meniran) is a medicinal plant with antimicrobial, antioxidant, anticancer, anti-inflammatory, antiplasmodial, antiviral, hepatoprotective diuretic, and immunomodulator properties.

Objective: This review examined the activity, mode of action, and active compounds of *P. niruri* as an immunomodulator in various preclinical and clinical studies, along with the bioactive compounds and their mechanism.

Results: Flavonoids, lignans, terpenoids, and alkaloids, among other phytochemicals found in *P. niruri*, play an essential part in the pharmacological activity of the plant. The immunomodulation activity of *P. niruri* has been extensively researched in preclinical (*in silico*, *in vitro*, and *in vivo*) and clinical trials. A study *in silico* revealed the potential of *P. niruri* as an immunomodulator in COVID-19 infection by inhibiting the COVID-19 target receptors spike glycoprotein (6LZG) and major protease (5R7Y and M^{pro}). In addition, *P. niruri* boosted macrophage phagocytic activity, increased antibody total, and reduced inflammation *in vitro* and *in vivo* experiments. *P. niruri* also showed immunomodulatory effects in both healthy subjects and patients.

Conclusion: *P. niruri* exhibits pharmacological potential as an immunomodulator in preclinical and clinical trials, according to the findings of various investigations.

Keywords: *Phyllanthus niruri*, immunomodulator, immunostimulant

Intisari

Latar belakang: *Phyllanthus niruri* merupakan tanaman obat yang memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antimikroba, antioksidan, antikanker, antiinflamasi, antiplasmodium, antivirus, diuretik, hepatoprotektif, dan sebagai imunomodulator.

Tujuan: Melakukan tinjauan analisis mengenai aktivitas, mekanisme, dan senyawa aktif *P. niruri* sebagai imunomodulator pada uji preklinis maupun uji klinis.

Hasil: Kandungan kimia *P. niruri* seperti flavonoid, lignan, terpenoid, dan alkaloid berperan penting pada aktivitas farmakologi *P. niruri* sebagai imunomodulator. Uji *in silico* menunjukkan potensi *P. niruri* sebagai imunomodulator pada infeksi COVID-19 dengan berikatan pada protein *spike* dan protease yang bertanggungjawab pada replikasi dan pematangan virus. Uji *in vitro* dan *in vivo* menunjukkan bahwa *P. niruri* mampu meningkatkan aktivitas fagositosis dari makrofag, meningkatkan antibodi serum total, dan mengurangi inflamasi. Pengujian klinis membuktikan bahwa *P. niruri* memiliki aktivitas imunomodulator baik pada subjek uji sehat maupun pada pasien.

Kesimpulan: *P. niruri* memiliki aktivitas sebagai imunomodulator baik pada pengujian preklinis maupun klinis.

Kata kunci: *P. niruri*, imunomodulator, imunostimulan

1. Pendahuluan

Phyllanthus niruri (meniran) merupakan tanaman genus Phyllanthaceae dari famili Euphorbiaceae yang tumbuh tersebar di daerah tropis dan subtropik (Kaur *et al.*, 2017). *P. niruri* merupakan herba dengan tinggi sekitar 10-60 cm, memiliki banyak daun berbentuk elips dengan permukaan daun yang tipis dan ujung daun tumpul. Ukuran bunga *P. niruri* kecil dan berpasangan berwarna hijau pucat dan berubah menjadi merah. Buahnya berbentuk kapsul cekung dengan ukuran kecil (Jantan *et al.*, 2019).

P. niruri memiliki nama lokal yang berbeda-beda, seperti di India dikenal dengan *bhummyamalaki*, *chanca piedra* (Spanyol), dukong anak atau meniran (Indonesia), *enyikwonw* (Nigeria), *Quebra-Pedra* (Brazil), *Zhuzicao* (Cina) (Kaur *et al.*, 2017; Mao *et al.*, 2016; Nworu *et al.*, 2010). Di berbagai negara, *P. niruri* digunakan sebagai obat tradisional yang memiliki aktivitas farmakologi seperti penghancur batu ginjal, antimikroba, antioksidan, antikanker, antiinflamasi, anti-plasmodium, antivirus, diuretik, dan hepatoprotektif (Cealan *et al.*, 2019; Marhaeny *et al.*, 2021). Selain itu, *P. niruri* banyak diteliti karena aktivitasnya sebagai imunomodulator (Jantan *et al.*, 2019). Terlebih pada masa pandemi COVID-19, penggunaan *P. niruri* oleh masyarakat mengalami peningkatan seiring dengan meningkatnya ketertarikan peneliti akan aktivitas imunomodulator dari *P. niruri*.

Obat atau senyawa dengan efek imunomodulator mampu memodifikasi respon sistem imun dengan meningkatkan (imunostimulator) atau menurunkan (imunosupresi) produksi antibodi serum (Bascones-Martinez *et al.*, 2014). Konsep imunomodulasi berkaitan dengan aktivasi nonspesifik dari fungsi dan efisiensi makrofag, granulosit, komplemen, sel *natural killer* (NK cell) dan limfosit serta produksi berbagai molekul efektor yang dihasilkan oleh sel yang diaktifkan (Kajaria *et al.*, 2013). Penelitian terkait aktivitas imunomodulator *P. niruri* telah dilakukan dalam berbagai uji baik preklinis maupun klinis. Review ini bertujuan melakukan tinjauan aktivitas farmakologi dari *P. niruri* (meniran) sebagai imunomodulator serta kandungan senyawa yang bertanggung jawab pada mekanisme imunomodulator tersebut.

2. Kandungan kimia *P. niruri*

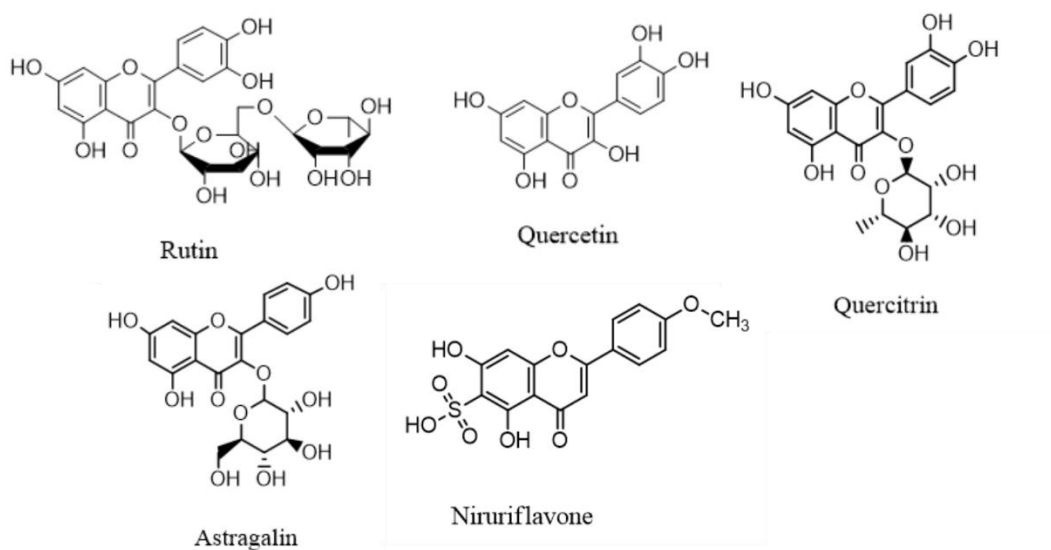
Penelitian menggunakan *P. niruri* umumnya dilakukan terhadap ekstrak menggunakan pelarut air, etanol, atau metanol. Beberapa golongan kimia berhasil dideteksi pada *P. niruri*

yang meliputi flavonoid, lignan, terpenoid, alkaloid, dan beberapa mineral serta vitamin. Berikut dijelaskan kandungan metabolit sekunder dari *P. niruri*.

2.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan senyawa polifenol yang terdapat dalam bentuk bebas maupun dalam bentuk glikosida. Flavonoid tersebar luas pada tanaman dengan berbagai aktivitas farmakologi seperti antioksidan, antikanker, antiinflamasi, antibakteri, anti alergi, dll (Hosseinzade *et al.*, 2019; Shukla *et al.*, 2019). Flavonoid pada *P. niruri* meliputi **(1) Rutin**, merupakan glikosida flavonol (kuersetin dan rutinosa) yang diketahui memiliki aktivitas sebagai antioksidan (Bagalkotkar *et al.*, 2006). Adanya gugus fenolik pada rutin merupakan donor hidrogen untuk menghentikan radikal bebas pada stres oksidatif. Selain itu, substitusi polihidroksilasi pada cincin A dan B, dan adanya substitusi 3-hidroksil bebas dan bagian 4-keto, memberikan sifat antiperoksidatif pada rutin (Ratty & Das, 1988). Potensi rutin sebagai senyawa antivirus COVID-19 juga telah dilaporkan. Berdasarkan studi komputasional, rutin dilaporkan memiliki aktivitas sebagai *inhibitor* ACE2 (*angiotensin converting enzyme 2*), pintu masuk virus SARS-CoV-2 ke dalam tubuh manusia (Mittal *et al.*, 2021). Selain itu, menggunakan metode simulasi *docking* dan dinamika molekul, rutin dapat berinteraksi dengan protein M^{pro} SARS-CoV-2 yang bertanggung jawab pada maturasi helikase dan replikasi pada proliferasi virus (Agrawal *et al.*, 2020). **(2) Quercetin**, merupakan gugus aglikon dari rutin yang telah dikenal memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antioksidan, anti-tirosinase, antiinflamasi, dan antivirus (Baranowska *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2020; Zhen *et al.*, 2016). Studi *in silico* dan *in vitro* menunjukkan bahwa *quercetin* dapat mengganggu pada tahapan masuknya virus corona dan replikasinya dengan berikatan pada protein virus seperti seperti *papain like protease* (Pl^{pro}), *3-chymotrypsin-like protease* (3Cl^{pro}), dan *NTPase/helicase* (Agrawal *et al.*, 2020). *Quercetin* juga memiliki aktivitas antiinflamasi dengan mekanisme penghambatan p38 MAPK dan aktivasi ERK yang berperan dalam induksi sitokin inflamasi (TNF- α , IL-1 β , and IL-6). *Quercetin* menekan produksi ROS dan juga menginduksi apoptosis dan migrasi dari neutrofil (Han *et al.*, 2022). Pada penelitian lainnya, *quercetin* mampu menekan produksi TNF- α dan nitrit oksida pada sel makrofag murin RAW 264.7 (Jantan *et al.*, 2019) yang selanjutnya dapat menurunkan reaksi inflamasi. Dalam rangka mencari senyawa adjuvan untuk vaksin, *quercetin* juga telah diuji potensinya pada mencit. *Quercetin* menunjukkan aktivitas sebagai adjuvan dengan meningkatkan respon imun sel Th2 pada mencit yang diimunisasi ovalbumin dan tidak

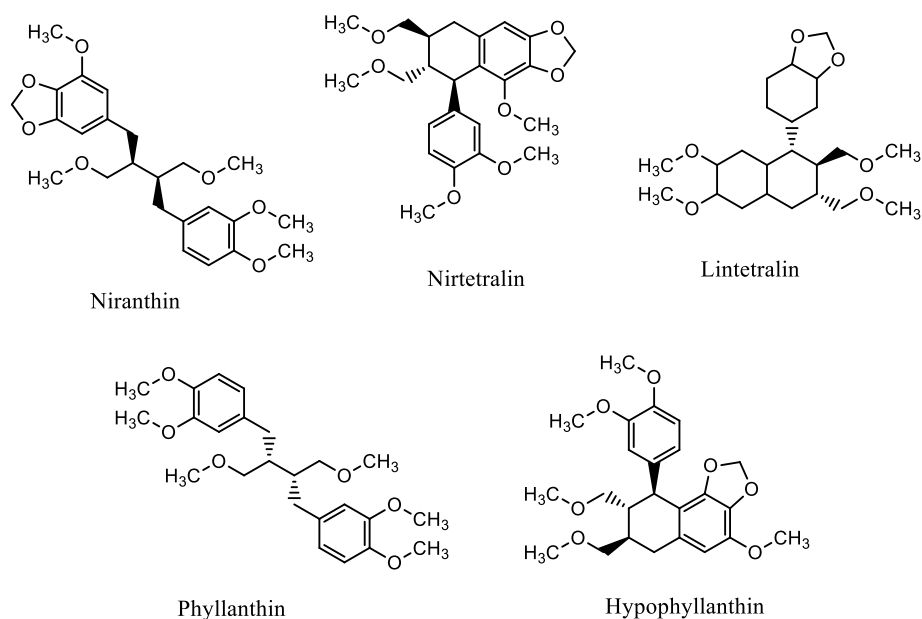
menimbulkan hemolisis pada sel darah merah manusia. **(3) Quercitrin** merupakan 3-*rhamnosylquercetin* yang memiliki aktivitas antiinflamasi dan antioksidan (Mao *et al.*, 2016). Beberapa penelitian melaporkan hubungan antara *quercetin* dan *quercitrin*. Senyawa *quercitrin* dilaporkan dapat melepaskan *quercetin* untuk yang berefek sebagai antiinflamasi yang dimediasi melalui penghambatan jalur NF- κ B (Comalada *et al.*, 2005). *Quercetin* dan *quercitrin* juga dilaporkan memiliki aktivitas anti *varicella-zoster virus* (VZV) dan *human cytomegalovirus* (HCMV) secara *in vitro* (Kim *et al.*, 2020). **(4) Astragalin** (kaempferol-3-O- β -D-glucosida) dilaporkan memiliki potensi antiinflamasi (Jia *et al.*, 2019), antioksidan, dan anti dermatitis atopik. *Astragalin* dapat menurunkan respon inflamasi yang diinduksi lipopolisakarida (LPS) dengan menekan jalur persinyalan NF- κ B (Riaz *et al.*, 2018; Shukla *et al.*, 2019). Senyawa *astragalin galaktosidase* dilaporkan lebih aktif daripada *astragalin* dalam proses maturasi sel dendritik untuk meningkatkan respon imun yang dimediasi oleh sel *helper* TH₁ (Jeon *et al.*, 2018). **(5) Niruriflavon**, merupakan *flavonon* yang memiliki aktivitas farmakologi sebagai hepatoprotektor dengan mekanisme menangkal radikal bebas yang berperan dalam proses hepatotoksik (Bagalkotkar *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2017). Struktur senyawa flavonoid dari *P. niruri* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur senyawa flavonoid dari *Phyllanthus niruri*

2.2 Lignan

(1) Phyllanthin dan (2) hypophyllanthin merupakan senyawa ligan utama dari *P. niruri* yang memiliki aktivitas antiinflamasi dengan efek penghambatan pada aktivitas fagositosis neutrofil terutama dalam menghambat produksi *reactive oxygen species* (ROS) dan *engulfment* dari bakteri (Yuandani *et al.*, 2013). *Phyllanthin* adalah lignan tipe *dibenzylbutan* dengan dua fenilpropanoid sederhana yang berupa turunan katekol. Sementara itu, *hypophyllanthin* adalah *lignan* yang terdiri dari arilnaftalen dan cincin 1,3-dioksolana. Studi *in silico* terbaru mengenai aktivitas antivirus *P. niruri* pada COVID-19, menunjukkan bahwa *phyllanthin* dan *hypophyllanthin* menghambat *spike glycoprotein* (6LZG) dan *main protease* (5R7Y). Reseptor 6LZG terlibat dalam menghambat masuknya virus sementara reseptor 5R7Y terlibat dalam penghambatan translasi dan replikasi virus sehingga hasil ini menunjukkan bahwa *P. niruri* dapat menjadi tanaman yang menjanjikan untuk menjadi kandidat potensial sebagai agen antivirus untuk COVID-19 (Marhaeny *et al.*, 2021). Penelitian mengenai (3) **Niranthin** dilaporkan oleh Harikrishnan *et al.*, (2018) memiliki aktivitas antiinflamasi dengan mekanisme menurunkan NF- κ B, aktivasi protein kinase mitogen, dan *phosphatidylinositol-3-kinase*. *Niranthin* juga mampu menekan level protein COX-2 sebagai mediator inflamasi sehingga TNF- α , PGE2, dan IL-1 β mengalami penurunan (Harikrishnan *et al.*, 2018). **Niranthin** dan **nirtetralin** memiliki aktivitas farmakologi sebagai antiinflamasi pada tikus. Pemberian *niranthin* dan *nirtetralin* terbukti mampu menghambat terjadinya pembengkakan pada tikus yang diinduksi karagenan (Bagalkotkar *et al.*, 2006). Struktur senyawa *lignan* dari *P. niruri* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur senyawa lignan dari *Phyllanthus niruri*

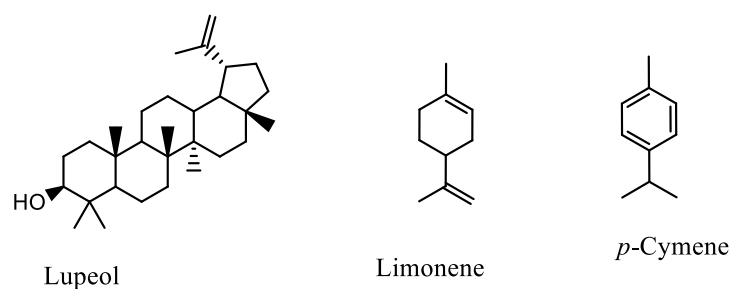
2.3 Terpenoid

P. niruri mengandung sejumlah terpenoid seperti **(1) limonene**, suatu monoterpen monosiklik dengan aktivitas imunomodulator (Bagalkotkar *et al.*, 2006; Kaur *et al.*, 2017). Studi menunjukkan *limonene* mampu menghambat produksi sitokin seperti TNF- α , IL-1 β , dan IL-6 pada proses inflamasi (Yoon *et al.*, 2010). Studi *in vitro* pada tikus yang mengalami limfoma menunjukkan pemberian *limonene* dengan dosis tinggi mampu meningkatkan aktivitas fagositosis dan menghambat proliferasi limfosit (Del Toro-Arreola *et al.*, 2005). Studi *in vivo* menunjukkan pemberian *limonene* mampu menekan produksi TH₁ dan TH₂ yang dimediasi oleh sitokin sel T CD4⁺ dan CD8⁺. Data tersebut menunjukkan bahwa *limonene* memiliki aktivitas sebagai imunomodulator (Lappas & Lappas, 2012).

(2) P-Cymene juga dikenal dengan nama *p-cymol* atau *p-isopropyltoluene* merupakan monoterpen alkil benzena yang memiliki aktivitas farmakologi sebagai imunomodulator (Balahbib *et al.*, 2021; Kaur *et al.*, 2017). Aktivitas imunomodulator *P-cymene* dihubungkan dengan kemampuannya sebagai antiinflamasi intestinal pada penelitian menggunakan tikus yang diinduksi *trinitrobenzene sulfonic acid* (TNBS). *P-cymene* mampu menurunkan skor lesi dan area lesi pada tikus dengan kolitis dengan cara menurunkan level IL-1 β , TNF- α , dan menjaga IL-10 pada level basal. Selain itu, *p-cymene* mampu memodulasi *T-cell*, menghambat

siklooksigenase (COX-2), IFN- γ , menekan sinyal sitokin 3 (SOCS3), dan menginduksi sintesis nitrit oksida (Formiga *et al.*, 2020).

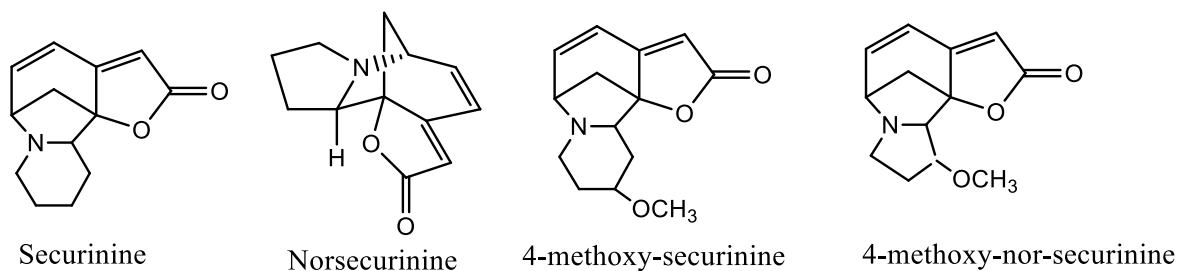
(3) **Lupeol** merupakan triterpen pentasiklik dengan aktivitas sebagai imunomodulator. Penelitian *in vitro* pada *latex beads* dengan dosis *lupeol* 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g/mL}$ menunjukkan peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dibandingkan dengan kontrol negatif (Wahdaningsih *et al.*, 2020). Penelitian lain menunjukkan kombinasi amfoterisin B dengan *lupeol* bekerja secara sinergi sebagai antileishmania pada hewan uji yang diinfeksi *Leishmania donovani*. Kombinasi *lupeol* dan amfoterisin B mampu meningkatkan produksi nitrit oksida, sitokin Th1 (IL-12 dan IFN- γ) dan menekan sitokin Th2 (IL-10 dan produksi TGF- β) (Das *et al.*, 2021). Struktur senyawa terpenoid dari *P. niruri* dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Struktur senyawa golongan terpenoid dari *Phyllanthus niruri*

2.4 Alkaloid

Alkaloid yang terdapat pada *P. niruri* diantaranya adalah **norsecurinine**, **securinine**, **4-methoxy-securinine**(**phyllanthine**) dan **4-methoxy-nor-securinine** (Bagalkotkar *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2001; Zhou *et al.*, 2011). **Norsecurinine** merupakan alkaloid dengan aktivitas antispasmodik yang poten sementara **securinine** memiliki beberapa aktivitas farmakologi seperti antimalaria, antitumor, antibakteri, dan aktivitas neuro-farmakologi (Bagalkotkar *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Selain itu studi menunjukkan bahwa **securinine** mampu menghambat ikatan GABA dengan reseptornya sehingga *P. niruri* potensial dikembangkan sebagai antagonis GABA (Bagalkotkar *et al.*, 2006). **Phyllanthine** dan **4-methoxy-nor-securinine** merupakan alkaloid yang diisolasi dari *P. niruri* dan dideteksi pertama kali menggunakan spektrofotometer (Mulchandani & Hassarajani, 1984). Struktur senyawa alkaloid dari *P. niruri* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur senyawa alkaloid pada *Phyllanthus niruri*

3. Aktivitas *Phyllanthus niruri* sebagai imunomodulator

Penelitian mengenai ekstrak meniran sebagai imunomodulator telah banyak diteliti. Studi menunjukkan *P. niruri* berperan sebagai imunomodulator pada proses penyembuhan pada beberapa penyakit diantaranya pulmonari tuberkulosis, kandidiasis vaginal, HIV, dan hepatitis B (Mohan *et al.*, 2015). Efektivitas imunomodulator dalam sistem imun sangat penting dalam keberhasilan pengobatan dan eradikasi patogen (Tjandrawinata *et al.*, 2017).

3.1. Studi *in silico* aktivitas imunomodulator *P. niruri*

Studi *in silico* telah banyak digunakan untuk mempelajari mekanisme penyakit, jejaring farmakologi, dan interaksi protein-senyawa obat. Studi *docking* mengungkapkan bahwa *quercetin* dan *quercitrin* dari *P. niruri* memiliki interaksi yang baik dengan HBV DNA Polymerase (Mohan *et al.*, 2015). Studi molekuler dan *docking* *P. niruri* dengan target protease COVID-19 M^{pro}, yang berperan dalam pemrosesan poliprotein virus dan pematangan virus di dalam sel inang yang terinfeksi. Penelitian Murugesan *et al.* (2021) yang menguji 35 senyawa dari *P. niruri* melaporkan bahwa senyawa *pectolarin*, *astragalin*, asam elagat, dan asam klorogenat, memiliki ikatan yang kuat dengan COVID-19 M^{pro} (Murugesan *et al.*, 2021). Selain itu, senyawa *phyllanthin* dan *hypophyllanthin* juga menunjukkan aktivitas antivirus *in silico* terhadap reseptor 6LZG dengan meniru interaksi ligan-protein asli pada tempat pengikatan yang sama yaitu Asp 364, Cys 336, Phe 338, dan Val 362 untuk *phyllanthin* dan Asp 364, Cys 336, dan Val 362 untuk *hypophyllanthin*. Kedua komponen tersebut juga telah terbukti memblokir reseptor target COVID-19 yaitu *spike* glikoprotein (6LZG) dan *protease* utama (5R7Y) (Marhaeny *et al.*, 2021).

3.2 Studi *in vitro* aktivitas imunomodulator *P. niruri*

Efek imunomodulator *P. niruri* pada sel imun mencit C57BL/6 telah dilakukan oleh Nworu *et al.* (2010). Ekstrak air *P. niruri* meningkatkan diferensiasi dan pematangan sel dendritik yang terlihat dari meningkatnya ekspresi MHC-II, CD40, CD83, dan penanda kostimulatori (CD86). Selain itu, ekstrak juga menunjukkan aktivitas mitogenik pada subset limfosit yang berbeda. Ekstrak air meningkatkan proliferasi yang signifikan dari total splenosit *murine*, limfosit T, dan limfosit B.

Uji *in vitro* menggunakan *peripheral blood mononuclear cell* (PBMC) dan makrofag dari pasien tuberkulosis paru juga telah dilakukan. Ekstrak air *P. niruri* menginduksi proliferasi PBMC, meningkatkan pelepasan NO, dan meningkatkan aktivitas fagositosis makrofag. Hal ini dapat menunjukkan peran potensial *P. niruri* sebagai terapi *adjuvant* imunomodulator untuk pasien tuberkulosis (Putri *et al.*, 2018).

3.3 Uji *in vivo* aktivitas imunomodulator *P. niruri*

Pengujian *in vivo* untuk mengamati respon imun spesifik dan non spesifik ekstrak metanol *P. niruri* pada tikus dilakukan oleh Eze *et al.* (2014). *P. niruri* pada dosis 200 dan 400 mg/kg mampu meningkatkan migrasi leukosit total dan PMN pada peritoneum tikus yang diinjeksi dengan suspensi agar. Respon imun humoral dapat diukur berdasarkan kadar serum antibodi total atau antibodi spesifik terhadap antigen non-patogen spesifik seperti SRBC (sel darah merah domba). Efektivitas *P. niruri* terhadap produksi antibodi primer dan sekunder antigen SRBC menunjukkan bahwa rata-rata antibodi anti-SRBC primer dan sekunder meningkat secara signifikan pada dosis 100, 200, dan 400 mg/kgBB.

Penelitian terhadap ekstrak etanol terstandar *P. niruri* telah dilakukan oleh Ilangkovan *et al.* (2016) yang mengukur penghambatan respon imun seluler dan humoral dari *P. niruri* melalui evaluasi fagositosis makrofag, produksi oksida nitrat (NO), aktivitas *myeloperoxidase* (MPO), dan produksi serum lisozim dan seruloplasmin. Ekstrak dilaporkan mampu menghambat aktivitas MPO dan pelepasan NO. Ekstrak juga menghambat aktivitas fagositosis makrofag terhadap *E. coli*. Selain itu, dilaporkan adanya penurunan yang signifikan dalam kekebalan humoral non-spesifik yang ditunjukkan melalui penghambatan produksi seruloplasmin dan lisozim. Efek penghambatan yang kuat dari ekstrak pada respon imun seluler dan humoral menunjukkan potensi tanaman untuk dikembangkan sebagai agen immunosupresif yang efektif.

Pengujian secara *in vivo* terkait dengan aktivitas antiinflamasi dari *P. niruri* juga telah dilakukan pada ekstrak *P. niruri* yang dibuat dengan *spray dryer*. Pemberian ekstrak dengan dosis 100, 200, 800, dan 1600 mg/kg menunjukkan penghambatan inflamasi secara signifikan pada tikus yang diinduksi karagenan ($p < 0,001$). Ekstrak dosis 100 atau 200 mg/kg mampu menghambat migrasi leukosit yang diinduksi dengan tioglikolat secara signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($p < 0,001$) (Porto *et al.*, 2013).

3.4 Uji Klinis aktivitas imunomodulator *P. niruri*.

Ekstrak *P. niruri* terbukti memiliki efek imunomodulator dan berperan penting dalam pengobatan penyakit tuberkulosis paru, kandidiasis vagina, dan varisela. Selama infeksi *M. tuberculosis*, IL-10, diproduksi dan dilepaskan terutama oleh makrofag dan sel T sitotoksik (CD8⁺) sehingga menghambat aksi sel NK melawan patogen. Pasien TB paru aktif terutama pasien anergik, menunjukkan peningkatan kadar IL-10, baik dalam serum dan cairan *bronchoalveolar*, menunjukkan bahwa *M. tuberculosis* merangsang produksi IL-10 yang pada gilirannya mengganggu respon imun yang efektif. Selain itu, pada pasien TB juga ditemukan adanya peningkatan limfosit CD8⁺ perifer dan penurunan rasio CD4⁺/CD8⁺. Setelah pemberian ekstrak *P. niruri* 50 mg/mL secara per oral selama 2-6 bulan, IL-10 menurun dan kadar IFN- γ dan plasma TNF- α meningkat secara signifikan dan terjadi peningkatan rasio CD4⁺/CD8⁺. Hal ini menunjukkan efek *P. niruri* pada pemulihan respon sel T pada pasien TB.

Vaginitis adalah kondisi ginekologi yang paling dominan di seluruh dunia, yang umumnya berupa kandidiasis vagina, yang disebabkan oleh *Candida albicans*. Sebesar 75% wanita mengalami kandidiasis vagina setidaknya sekali selama hidup mereka (Tjandrawinata *et al.*, 2017) yang umumnya disebabkan oleh insufisiensi IFN- γ karena disfungsi T-limfosit. Peningkatan kadar IFN- γ menunjukkan peningkatan aktivitas respon imun seluler Th₁, dengan penekanan sekresi IL-4 dan IL-10 oleh subset Th₂, dan aktivasi makrofag yang diperlukan untuk eradikasi kandida dari jaringan vagina. Pada pasien kandidiasis vagina, setelah menerima *P. niruri* 100 mg/mL selama 1-3 bulan, terjadi peningkatan kadar IFN- γ dan IL-12. Selain itu, tingkat kesembuhan pasien yang menerima *P. niruri* sebesar (73,33%) pada 7 hari pengobatan dan juga diikuti oleh tingkat kekambuhan yang rendah setelah satu dan tiga bulan masa pemberian ekstrak (Tjandrawinata *et al.*, 2017).

Varicella (cacar air) merupakan infeksi yang sangat menular dan umum pada anak-anak. Pada orang dewasa, infeksi *varicella* biasanya bermanifestasi lebih parah dan pasien berisiko mengalami komplikasi. *Varicella-zoster*, yang diklasifikasikan sebagai virus herpes, adalah patogen penyebab cacar air serta infeksi herpes zoster. Pemberian sirup ekstrak *P. niruri* dosis 25 mg/5 mL tiga kali sehari pada anak usia 2-14 tahun bermanfaat untuk mempersingkat waktu pemulihan dari infeksi *varicella*. *P. niruri* menurunkan demam pada pasien dan mempercepat pembentukan dan penghilangan kerak. Munculnya banyak kerak selama proses penyembuhan *varicella* merupakan indikasi penting secara klinis bahwa infeksi tidak lagi menular (Mao *et al.*, 2016).

4. Toksisitas *P. niruri*

Uji toksisitas akut ekstrak air *P. niruri* dengan dosis 2000 mg/mL, tidak menunjukkan adanya ada toksisitas yang diamati pada tingkat bilirubin, ALT, AST, protein total, albumin, globulin, ALP, GGT, ureum, kreatinin, hitung darah lengkap, dan hemoglobin. Pada perlakuan ekstrak etanol *P. niruri* selama 90 hari pada dosis 30 dan 300 mg/kg, tikus tidak menunjukkan efek genotoksik. Studi toksisitas pada sistem reproduksi *P. niruri* diuji menggunakan nilai estrogen, nilai progesteron, dan kadar testosteron. Tingkat estrogen dan progesteron meningkat lebih dari 1,5 kali lipat di atas kelompok kontrol setelah menerima 50 dan 500 mg/kg ekstrak air selama 90 hari, yang menunjukkan kemungkinan adanya efek antifertilitas pria (Mao *et al.*, 2016). Pemberian ekstrak metanol *P. niruri* yang diberikan secara oral tidak menunjukkan kematian atau tanda-tanda toksisitas akut pada dosis hingga 5000 mg/kg setelah 24 jam pengamatan (Eze *et al.*, 2014; Ilangkovan *et al.*, 2016).

4. Kesimpulan

Secara keseluruhan, semua penelitian di atas menggambarkan potensi *P. niruri* sebagai imunomodulator baik pada pengujian preklinis maupun klinis. Senyawa aktif yang bertanggungjawab pada aktivitas imunomodulator diantaranya adalah flavonoid (rutin, *quercetin*, *quercitrin*, *astragal*in), lignan (*phyllanthin*, *hypophyllanthin*), terpenoid (*limonen*, *p-cymen*), dan alkaloid (*securinine* dan derivatnya). Meskipun tidak ada potensi toksisitas akut atau reaksi yang merugikan dari *P. niruri*, perlu diperhatikan faktor penentu variabilitas

kandungan kimia dan keamanan dari *P. niruri* agar dapat dikembangkan dalam pengobatan formal.

Daftar pustaka

- Agrawal, P. K., Agrawal, C., & Blunden, G. (2020). Quercetin: Antiviral Significance and Possible COVID-19 Integrative Considerations. *Natural Product Communications*, 15(12), 1934578X20976293. <https://doi.org/10.1177/1934578X20976293>
- Bagalkotkar, G., Sagineedu, S. R., Saad, M. S., & Stanslas, J. (2006). Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *J Pharm Pharmacol*, 58(12), 1559-1570. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.12.0001>
- Balahbib, A., El Omari, N., Hachlafi, N. E., Lakhdar, F., El Menyiy, N., Salhi, N., Mrabti, H. N., Bakrim, S., Zengin, G., & Bouyahya, A. (2021). Health beneficial and pharmacological properties of p-cymene. *Food Chem Toxicol*, 153, 112259. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112259>
- Baranowska, M., Koziara, Z., Suliborska, K., Chrzanowski, W., Wormstone, I., Namieśnik, J., & Bartoszek, A. (2021). Interactions between polyphenolic antioxidants quercetin and naringenin dictate the distinctive redox-related chemical and biological behaviour of their mixtures. *Scientific Reports*, 11, 12282. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-89314-0>
- Bascones-Martinez, A., Mattila, R., Gomez-Font, R., & Meurman, J. H. (2014). Immunomodulatory drugs: oral and systemic adverse effects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 19(1), e24-31. <https://doi.org/10.4317/medoral.19087>
- Cealan, A., Coman, R. T., Simon, V., Andras, I., Telecan, T., Coman, I., & Crisan, N. (2019). Evaluation of the efficacy of *Phyllanthus niruri* standardized extract combined with magnesium and vitamin B6 for the treatment of patients with uncomplicated nephrolithiasis. *Med Pharm Rep*, 92(2), 153-157. <https://doi.org/10.15386/mpr-1246>
- Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., & Zarzuelo, A. (2005). In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappaB pathway. *Eur J Immunol*, 35(2), 584-592. <https://doi.org/10.1002/eji.200425778>
- Das, A., Jawed, J. J., Das, M. C., Parveen, S., Ghosh, C., Majumdar, S., Saha, B., & Bhattacharjee, S. (2021). Lupeol and amphotericin B mediate synergistic anti-leishmanial immunomodulatory effects in *Leishmania donovani*-infected BALB/c mice. *Cytokine*, 137, 155319. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155319>
- Del Toro-Arreola, S., Flores-Torales, E., Torres-Lozano, C., Del Toro-Arreola, A., Tostado-Pelayo, K., Guadalupe Ramirez-Deñas, M., & Daneri-Navarro, A. (2005). Effect of D-limonene on immune response in BALB/c mice with lymphoma. *Int Immunopharmacol*, 5(5), 829-838. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2004.12.012>
- Eze, C. O., Nworu, C. S., Esimone, C. O., & Okore, V. C. (2014). Immunomodulatory activities of methanol extract of the whole aerial part of *Phyllanthus niruri* L. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 6, 41-46.
- Formiga, R. D., Alves Júnior, E. B., Vasconcelos, R. C., Guerra, G. C., Antunes de Araújo, A., Carvalho, T. G., Garcia, V. B., de Araújo Junior, R. F., Gadelha, F. A., Vieira, G. C., Sobral, M. V., Barbosa Filho, J. M., Spiller, F., & Batista, L. M. (2020). p-Cymene and Rosmarinic Acid Ameliorate TNBS-Induced Intestinal Inflammation Upkeeping ZO-1 and MUC-2: Role of

- Antioxidant System and Immunomodulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(16). <https://doi.org/10.3390/ijms21165870>
- Han, L., Fu, Q., Deng, C., Luo, L., Xiang, T., & Zhao, H. (2022). Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scandinavian Journal of Immunology*, 95(1), e13106. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/sji.13106>
- Harikrishnan, H., Jantan, I., Haque, M. A., & Kumolosasi, E. (2018). Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. through inhibition of NF- κ B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages. *BMC Complement Altern Med*, 18(1), 224. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2289-3>
- Hosseinzade, A., Sadeghi, O., Naghdipour Biregani, A., Soukhtehzari, S., Brandt, G. S., & Esmailzadeh, A. (2019). Immunomodulatory Effects of Flavonoids: Possible Induction of T CD4+ Regulatory Cells Through Suppression of mTOR Pathway Signaling Activity. *Front Immunol*, 10, 51. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00051>
- Ilangkovan, M., Jantan, I., Mesaik, M. A., & Bukhari, S. N. (2016). Inhibitory Effects of the Standardized Extract of *Phyllanthus amarus* on Cellular and Humoral Immune Responses in Balb/C Mice. *Phytother Res*, 30(8), 1330-1338. <https://doi.org/10.1002/ptr.5633>
- Jantan, I., Haque, M. A., Ilangkovan, M., & Arshad, L. (2019). An Insight Into the Modulatory Effects and Mechanisms of Action of *Phyllanthus* Species and Their Bioactive Metabolites on the Immune System. *Front Pharmacol*, 10, 878. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00878>
- Jeon, J. H., Lee, B. C., Kim, D., Cho, D., & Kim, T. S. (2018). Hydrophilic Astragalin Galactoside Induces T Helper Type 1-Mediated Immune Responses via Dendritic Cells. *Int J Mol Sci*, 19(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103120>
- Jia, Q., Wang, T., Wang, X., Xu, H., Liu, Y., Wang, Y., Shi, Q., & Liang, Q. (2019). Astragalin Suppresses Inflammatory Responses and Bone Destruction in Mice With Collagen-Induced Arthritis and in Human Fibroblast-Like Synoviocytes. *Front Pharmacol*, 10, 94. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00094>
- Kajaria, D., Tripathi, J. S., Tiwari, S. K., & Pandey, B. L. (2013). Immunomodulatory effect of ethanolic extract of Shirishadi compound. *Ayu*, 34(3), 322-326. <https://doi.org/10.4103/0974-8520.123136>
- Kaur, N., Kaur, B., & Sirhindi, G. (2017). Phytochemistry and Pharmacology of *Phyllanthus niruri* L.: A Review. *Phytother Res*, 31(7), 980-1004. <https://doi.org/10.1002/ptr.5825>
- Kim, C. H., Kim, J. E., & Song, Y. J. (2020). Antiviral Activities of Quercetin and Isoquercitrin Against Human Herpesviruses. *Molecules*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/molecules25102379>
- Lappas, C. M., & Lappas, N. T. (2012). d-Limonene modulates T lymphocyte activity and viability. *Cellular Immunology*, 279(1), 30-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2012.09.002>
- Lin, Y., Wu, X., Feng, S., Jiang, G., Zhou, S., Vrijmoed, L. L. P., & Jones, E. B. G. (2001). A novel N-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain #2508) from the South China Sea. *Tetrahedron Letters*, 42(3), 449-451. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(00\)01948-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4039(00)01948-1)
- Mao, X., Wu, L. F., Guo, H. L., Chen, W. J., Cui, Y. P., Qi, Q., Li, S., Liang, W. Y., Yang, G. H., Shao, Y. Y., Zhu, D., She, G. M., You, Y., & Zhang, L. Z. (2016). The Genus *Phyllanthus*: An Ethnopharmacological, Phytochemical, and Pharmacological Review. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 7584952. <https://doi.org/10.1155/2016/7584952>

- Marhaeny, H. D., Widyawaruyanti, A., Widiandani, T., Fuad Hafid, A., & Wahyuni, T. S. (2021). Phyllanthin and hypophyllanthin, the isolated compounds of *Phyllanthus niruri* inhibit protein receptor of corona virus (COVID-19) through in silico approach. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 32(4), 809-815. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0473>
- Mittal, L., Kumari, A., Srivastava, M., Singh, M., & Asthana, S. (2021). Identification of potential molecules against COVID-19 main protease through structure-guided virtual screening approach. *J Biomol Struct Dyn*, 39(10), 3662-3680. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1768151>
- Mohan, M., James, P., Valsalan, R., & Nazeem, P. A. (2015). Molecular docking studies of phytochemicals from *Phyllanthus niruri* against Hepatitis B DNA Polymerase. *Bioinformation*, 11(9), 426-431. <https://doi.org/10.6026/97320630011426>
- Mulchandani, N. B., & Hassarajani, S. A. (1984). 4-Methoxy-nor-Securinine, a New Alkaloid from *Phyllanthus niruri*. *Planta Med*, 50(1), 104-105. <https://doi.org/10.1055/s-2007-969635>
- Murugesan, S., Kottekad, S., Crasta, I., Sreevathsan, S., Usharani, D., Perumal, M. K., & Mudliar, S. N. (2021). Targeting COVID-19 (SARS-CoV-2) main protease through active phytocompounds of ayurvedic medicinal plants - *Embllica officinalis* (Amla), *Phyllanthus niruri* Linn. (Bhumi Amla) and *Tinospora cordifolia* (Giloy) - A molecular docking and simulation study. *Comput Biol Med*, 136, 104683. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104683>
- Nworu, C. S., Akah, P. A., Okoye, F. B., Proksch, P., & Esimone, C. O. (2010). The effects of *Phyllanthus niruri* aqueous extract on the activation of murine lymphocytes and bone marrow-derived macrophages. *Immunol Invest*, 39(3), 245-267. <https://doi.org/10.3109/08820131003599585>
- Porto, C. R. C., Soares, L. A. L., Souza, T. P., Petrovick, P. R., Lyra, I. L., Araújo Júnior, R. F., Zucolotto Langassner, S. M., Ferreira, A. A. A., & Guerra, G. C. B. (2013). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Phyllanthus niruri* spray-dried standardized extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), 138-144. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000004>
- Putri, D. U., Rintiswati, N., Soesatyo, M. H., & Haryana, S. M. (2018). Immune modulation properties of herbal plant leaves: *Phyllanthus niruri* aqueous extract on immune cells of tuberculosis patient - in vitro study. *Nat Prod Res*, 32(4), 463-467. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1311888>
- Ratty, A. K., & Das, N. P. (1988). Effects of flavonoids on nonenzymatic lipid peroxidation: structure-activity relationship. *Biochem Med Metab Biol*, 39(1), 69-79. [https://doi.org/10.1016/0885-4505\(88\)90060-6](https://doi.org/10.1016/0885-4505(88)90060-6)
- Riaz, A., Rasul, A., Hussain, G., Zahoor, M. K., Jabeen, F., Subhani, Z., Younis, T., Ali, M., Sarfraz, I., & Selamoglu, Z. (2018). Astragalin: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities. *Adv Pharmacol Sci*, 2018, 9794625. <https://doi.org/10.1155/2018/9794625>
- Shukla, R., Pandey, V., Vadnere, G. P., & Lodhi, S. (2019). Role of Flavonoids in Management of Inflammatory Disorders. *Bioactive Food as Dietary Interventions for Arthritis and Related Inflammatory Diseases*.
- Tjandrawinata, R., Susanto, L., & Nofiarny, D. (2017). The use of *Phyllanthus niruri* L. as an immunomodulator for the treatment of infectious diseases in clinical settings. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 7, 132-140. <https://doi.org/10.12980/apjtd.7.2017D6-287>

- Wahdaningsih, S., Wahyuono, S., Riyanto, S., & Murwanti, R. (2020). Terpenoid-lupeol of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) and its immunomodulatory activity. *Pak J Pharm Sci*, 33(2), 505-510.
- Yoon, W. J., Lee, N. H., & Hyun, C. G. (2010). Limonene suppresses lipopolysaccharide-induced production of nitric oxide, prostaglandin E2, and pro-inflammatory cytokines in RAW 264.7 macrophages. *J Oleo Sci*, 59(8), 415-421. <https://doi.org/10.5650/jos.59.415>
- Yuandani, Y., Ilangkovan, M., Jantan, I., Mohamad, H., Husain, K., & Razak, A. (2013). Inhibitory Effects of Standardized Extracts of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria* and Their Marker Compounds on Phagocytic Activity of Human Neutrophils. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, 2013, 603634. <https://doi.org/10.1155/2013/603634>
- Zhang, W., Li, J.-Y., Lan, P., un, P.-H., Wang, Y., Ye, W.-C., & Chen, W.-M. (2011). Chemical synthesis and biological activities of Securinega alkaloids. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 20(3), 203-217. <http://www.jcps.ac.cn>
- Zhen, J., Villani, T. S., Guo, Y., Qi, Y., Chin, K., Pan, M.-H., Ho, C.-T., Simon, J. E., & Wu, Q. (2016). Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. *Food Chemistry*, 190, 673-680. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.06.006>
- Zhou, J., Xie, G., & Yan, X. (2011). *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines - Molecular Structures, Pharmacological Activities, Natural Sources and Applications*

Characterization and determination of total flavonoid content of extract and fraction of papaya jantan flower (*Carica papaya* L.) using UV-Vis spectrophotometry

Karakterisasi dan penetapan kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) dengan spektrofotometri UV-Vis

Dilla Nur Pratiwi¹, Nastiti Utami^{1*}, Diah Pratimasari¹

¹Program Studi S1 Farmasi, Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Nasional, Surakarta, Jawa Tengah

*Corresponding author: nastiti.utami@stikesnas.ac.id

Abstract

Background: The potential of pepaya jantan flowers (*Carica papaya* L.) as functional herbal ingredients, such as antioxidants, is influenced by the activity of secondary metabolites, one of which is flavonoids.

Objective: This study aims to determine the total flavonoid content and characterization of flavonoids in the ethanol extract and flower fraction of papaya jantan (*Carica papaya* L.).

Method: Pepaya jantan flower was extracted by maceration using ethanol 70% then fractionated using multilevel fractionation. The identification of flavonoids was tested using Taubeck, Wilstater, and TLC. Extract and fractions were determined of flavonoid content using the colorimetric method and identification of flavonoids based on the wavelength of cinnamoyl and benzoyl in the spectrum UV-Vis.

Results: The results of the determination of flavonoid content showed that ethanol extract was the highest at 0.6805 ± 0.0045 %QE and n-hexane fractions were the lowest at 0.4178 ± 0.0058 %QE. Identification of flavonoids using the UV-Vis spectroscopy method showed the absorption of substituted 3-OH flavonol and free 3-OH flavonol.

Conclusion: The highest flavonoid content was found in the ethanol extract of papaya jantan flower. The types of flavonoids in the extract and fractions of male papaya flower indicated the type of flavonol based on the wavelength of cinnamoyl and benzoyl.

Keywords: Carica, flavonoid, cinnamoyl, benzoyl, spectrophotometry UV-Vis

Intisari

Latar belakang: Potensi bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) sebagai antioksidan dipengaruhi metabolit sekunder, salah satunya flavonoid.

Tujuan: Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui kadar flavonoid total serta karakterisasi flavonoid dalam ekstrak etanol dan fraksi bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.).

Metode: Bunga pepaya jantan dilakukan maserasi dengan etanol 70%, dilanjutkan fraksinasi bertingkat. Identifikasi flavonoid dilakukan menggunakan metode Taubeck, Wilstater dan KLT. Kadar flavonoid ekstrak dan fraksi ditetapkan menggunakan metode kolorimetri serta identifikasi flavonoid berdasarkan pita *cinnamoyl* dan *benzoyl* pada spektrum UV-Vis.

Hasil: Hasil penetapan kadar flavonoid menunjukkan bahwa ekstrak etanol memiliki kadar tertinggi sebesar $0,6805 \pm 0,0045$ %QE, serta kadar terendah dalam fraksi n-heksan sebesar $0,4178 \pm 0,0058$ %QE. Identifikasi flavonoid metode spektrofotometri UV-Vis menunjukkan penyerapan flavonol 3-OH substitusi dan flavonol 3-OH bebas.

Kesimpulan: Kadar flavonoid tertinggi ditemukan dalam ekstrak etanol bunga pepaya. Jenis flavonoid dalam ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan mengindikasikan jenis flavonol berdasarkan panjang gelombang dari *cinnamoyl* dan *benzoyl*.

Kata kunci : carica, flavonoid, *cinnamoyl*, *benzoyl*, Spektrofotometri UV-Vis

1. Pendahuluan

Pengembangan obat tradisional harus memenuhi syarat yaitu aman, berkhasiat dan bermutu, sehingga pengembangan obat tradisional perlu didukung adanya bukti ilmiah untuk mengetahui

kandungan zat aktif dalam bahan obat berkhasiat. Bahan obat yang berasal dari alam memiliki kandungan senyawa kimia serta berkhasiat sebagai senyawa aktif adalah metabolit sekunder, senyawa tersebut saling berperan menimbulkan efek terapi (Yuslianti *et al.*, 2016).

Keberadaan senyawa dalam beberapa bagian tanaman *Carica papaya* seperti daun, akar, dan biji pepaya menunjukkan berbagai aktivitas biologis seperti antidiabetes (Juárez-Rojop *et al.*, 2014), anti-fertilitas (Nwaehujor *et al.*, 2014), anti-jamur (Tay & Chong, 2016), anti-bakteri (Baskaran *et al.*, 2012), anti-tumor (Zuhrotun Nisa *et al.*, 2017), dan antioksidan (Imaga *et al.*, 2010). Kandungan flavonoid dalam daun *Carica papaya* memiliki sifat antioksidan kuat jika dibandingkan dengan kontrol positif penisilamin (Nugroho *et al.*, 2017). Bunga pepaya jantan memiliki kandungan senyawa fenolik (*caricapapayol*) (Lien *et al.*, 2019), flavonoid (kuersetin, apigenin, dan kaempferol) (Andarwulan *et al.*, 2012), dan sterol (β -sitosterol 3-O- β -D-glukopiranosida dan 3-O-(6-O-tetradecanoyl- β -D-glukopiranosil)- β -sitosterol) (Nga *et al.*, 2020). Adanya kandungan flavonoid dalam bunga pepaya jantan, hal ini membuat bunga pepaya jantan berpotensi memiliki sifat antioksidan. Bunga pepaya jantan di masyarakat dimanfaatkan sebagai antidiabetik yaitu dengan mengkonsumsi air rebusannya, hal ini dikarenakan adanya kandungan flavonoid yang bekerja dengan meregenerasi dan merangsang pelepasan insulin oleh sel beta pankreas (Pongoh *et al.*, 2020). Senyawa flavonoid termasuk dalam golongan polifenol yang berpotensi memiliki fungsi sebagai antioksidan, antidiabetik, dan antiinflamasi (Manurung *et al.*, 2017).

Penelitian tentang kandungan senyawa dalam bunga pepaya jantan masih sangat terbatas. Eksplorasi kandungan senyawa diperlukan untuk mendukung pengembangan bunga pepaya jantan sebagai obat tradisional. Maka tujuan penelitian ini adalah sebagai langkah awal untuk mengembangkan obat tradisional dengan melakukan penetapan kadar flavonoid total dan melakukan karakterisasi jenis flavonoid dalam ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.).

2. Metodologi penelitian

2.1. Bahan dan teknik pengumpulan sampel

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bunga pepaya jantan, etanol 70%, etil asetat, n-heksan (Borneo kimia), HCl pekat, serbuk Mg, etanol p.a, AlCl₃ 10%, asam asetat, n-butanol, metanol p.a, *aquadest*, silika gel GF254 (Merck), kuersetin (Sigma Aldrich). Bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) segar sebanyak 3 kg diambil dari daerah Desa Kepanjen, Klaten, Jawa Tengah secara *random sampling*. Bunga dipanen saat pagi hari dan dipilih bunga yang berwarna kuning segar.

2.2. Penyiapan sampel

Sampel bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) yang telah dipanen dilakukan determinasi di Laboratorium Biologi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta, Jawa Tengah dengan mencocokkan ciri-ciri morfologi bunga pepaya jantan. Bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) disortasi basah dan dilakukan pencucian, selanjutnya sampel dikering-anginkan selama 1 hari untuk selanjutnya dilakukan pengeringan selama 3 hari di oven dengan suhu 40°C. Bunga pepaya jantan yang telah kering dilakukan pengecilan ukuran serta diayak pada *mesh* no. 60.

2.3 Ekstraksi

Serbuk bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) sebanyak 200 gram dilakukan maserasi dengan etanol 70% sebanyak 1,5 Liter selama 3 hari serta dan diaduk 1 kali tiap 24 jam. Hasil maserasi disaring, residu hasil maserasi kemudian ditambahkan 0,5 Liter etanol 70% untuk dilakukan remaserasi selama 2 hari. Filtrat hasil maserasi dan remaserasi digabung untuk selanjutnya dipekatkan agar didapatkan ekstrak kental menggunakan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C.

2.4 Fraksinasi cair-cair

Fraksinasi cair-cair dilakukan untuk memisahkan komponen berdasarkan tingkat kepolaran menggunakan n-heksan, etil asetat, *aquadest*. Ekstrak kental sebanyak 20 gram ditambahkan dengan *aquadest* hangat 100 mL, selanjutnya larutan ekstrak dipartisi dengan 100 mL n-heksan hingga terbentuk 2 lapisan, kedua lapisan tersebut dipisahkan. Partisi dilanjutkan dengan pelarut semi-polar yaitu 100 mL etil asetat dan dilakukan pemisahan antara fase etil asetat dengan fase yang lain. Partisi dilakukan hingga larutan berwarna bening. Selanjutnya hasil fraksinasi dipekatkan hingga didapatkan fraksi kental.

2.5 Skrining fitokimia flavonoid

2.5.1 Uji Wilstater

Sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi dari bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) ditambahkan serbuk magnesium (Mg) dan HCl pekat sebanyak 3-4 tetes. Perubahan warna menjadi merah-jingga pada ekstrak dan fraksi menunjukkan positif kandungan flavonoid (Asmorowati dan Lindawati, 2019).

2.5.2 Uji Taubeck

Sebanyak 0,1 gram ekstrak dan fraksi dari bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) ditambahkan *aquadest* selanjutnya diuapkan dengan *waterbath*, ditambah aseton, asam borat dan asam oksalat. Campuran diuapkan di atas *waterbath* dan ditambah 5 mL eter. Adanya fluoresensi kuning dibawah sinar UV 366 nm menunjukkan positif kandungan flavonoid (Djamil & Zaidan, 2016).

2.6 Uji kualitatif flavonoid secara KLT

Plat KLT sebelum ditotolkan sampel dilakukan aktivasi untuk menghilangkan kandungan air selama 30 menit pada suhu 110°C. Sebanyak 20 mg ekstrak dan fraksi-fraksi kental bunga pepaya ditambahkan 2 mL pelarut yang sesuai. Ekstrak, fraksi-fraksi bunga pepaya jantan, dan standar kuersetin ditotolkan pada plat KLT menggunakan *yellow tip*. Proses elusi dilakukan dengan fase gerak n-butanol: asam asetat: *aquadest* (4:1:5). Plat KLT yang telah terelusi sempurna dilakukan pengamatan bercak noda menggunakan sinar UV 254 nm, UV 366 nm, serta dicelup dengan penampak bercak KMnO_4 .

2.7 Uji kuantitatif kandungan flavonoid (Asmorowati dan Lindawati, 2019)

2.7.1 Pembuatan larutan baku induk 1000 ppm

Sebanyak 10,0 mg standar kuersetin dilarutkan dengan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL.

2.7.2 Pembuatan larutan intermediet 100 ppm

Larutan baku induk dipipet sebanyak 1 mL ditambahkan etanol p.a dalam labu ukur 10 mL hingga didapat konsentrasi 100 ppm.

2.7.3 Pembuatan larutan blangko

Dipipet 1 mL Larutan AlCl_3 10% dan asam asetat 5% sebanyak 8 mL, serta ditambahkan etanol p.a hingga tanda batas labu ukur 10 mL.

2.7.4 Penentuan operating time

Larutan intermediet dipipet sebanyak 1 mL, ditambahkan AlCl_3 10% sebanyak 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL. Pengukuran *operating time* dilakukan pada panjang gelombang teoritis kuersetin 415 nm selama 60 menit (Ipandi *et al.*, 2016).

2.7.5 Penentuan panjang gelombang maksimum kuersetin

Larutan intermediet dipipet sebanyak 1 mL dan direaksikan dengan 1 mL AlCl_3 10% dan 8 mL asam asetat 5%. Pembacaan dilakukan pada panjang gelombang 400-450 nm. Panjang gelombang maksimum yang dihasilkan digunakan untuk mengukur serapan sampel.

2.7.6 Pembuatan kurva baku kuersetin

Konsentrasi deret standar dibuat 50, 70, 90, 110, dan 130 ppm, sehingga larutan baku induk dipipet sebanyak 0,25; 0,35; 0,45; 0,55; dan 0,65 mL ditambahkan etanol p.a hingga 5 mL ke dalam labu ukur. Tiap konsentrasi seri baku dipipet sebanyak 1 mL, dan ditambahkan 1 mL AlCl₃ 10% dan 8 mL asam asetat 8%, dilakukan pendiaman selama 26 menit. Penentuan absorbansi kurva baku dilakukan pengukuran pada panjang gelombang 415 nm.

2.7.7 Penetapan kadar flavonoid total

Masing-masing ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan sebanyak 160 mg dilarutkan dengan etanol p.a hingga 10 mL dalam labu ukur. Masing-masing ekstrak dan fraksi dipipet 1 mL ditambahkan AlCl₃ 10% sebanyak 1 mL dan asam asetat 5% 8 mL, dilakukan pendiaman selama 26 menit untuk selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi sampel menggunakan spektrofotometri UV-Vis.

2.8 Karakterisasi flavonoid dengan spektrofotometer UV-Vis

Masing-masing ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan (*Carica papaya L.*) ditimbang 5 mg, sampel dilarutkan menggunakan metanol p.a dalam labu ukur 5 mL. Karakterisasi dilakukan dengan menganalisis larutan uji menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 200-400 nm. Hasil analisis ditandai adanya ikatan pertama (*band I*) 300-400 nm menunjukkan sistem *cinnamoyl* dan ikatan kedua (*band II*) 240-285 nm menunjukkan sistem *benzoyl*.

2.8 Analisis data

2.8.1 Perhitungan kadar flavonoid total

Perhitungan kadar flavonoid total dihitung menggunakan persamaan regresi linear hasil hubungan konsentrasi seri standar dan absorbansi. Kadar flavonoid dinyatakan dalam jumlah persentase ekuivalen kuersetin (QE) untuk tiap gram ekstrak dan fraksi, dengan rumus:

$$\text{Kadar Flavonoid Total (\%QE)} = \frac{\text{Konsentrasi } \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}}\right) \times \text{Volume Sampel (mL)}}{\text{Berat Sampel (gram)}} \times 100\%$$

2.8.2 Perhitungan koefisien variasi (% KV)

Perbandingan simpangan kadar flavonoid total dengan rata-rata kadar sampel dapat diketahui dengan melakukan perhitungan persentase koefisien variasi. Persentase koefisien variasi yang baik menunjukkan nilai persentase < 2% (Snyder *et al.*, 2009).

3. Hasil dan pembahasan

3.1 Penyiapan sampel

Bunga pepaya jantan dilakukan determinasi untuk mencocokkan morfologi tanaman dengan literatur, hasil determinasi menyatakan bahwa sampel merupakan tanaman pepaya dengan bunga berjenis kelamin jantan. Ekstraksi serbuk bunga pepaya jantan menggunakan metode maserasi. Ekstraksi dilakukan untuk menarik komponen senyawa kimia yang terdapat dalam sampel dengan kepolaran pelarut yang sesuai. Pada beberapa bagian tanaman *Carica papaya* lebih banyak mengandung senyawa polar dibandingkan senyawa non polar (Asghar *et al.*, 2016), sehingga pelarut yang dipilih adalah jenis pelarut polar. Pelarut ekstraksi yang digunakan adalah etanol 70% merupakan jenis pelarut polar, penggunaan etanol 70% mampu menarik senyawa flavonoid. Maserasi merupakan teknik ekstraksi dingin, sehingga teknik ini dapat meminimalkan kerusakan senyawa akibat proses pemanasan (Riwanti *et al.*, 2020). Simplisia hasil maserasi dilakukan remaserasi untuk mengoptimalkan proses penyarian senyawa. Proses pengadukan dilakukan agar terjadi kontak yang lebih optimal antara sampel dan pelarut (Ningsih *et al.*, 2015). Proses pemekatan ekstrak dan fraksi dilakukan dengan *rotary evaporator* dan *waterbath* pada suhu 50°C. Pemilihan suhu 50°C untuk menghindari kerusakan senyawa flavonoid, karena senyawa flavonoid salah satunya senyawa rutin dapat terdegradasi pada suhu 70°C sebanyak 10% setelah 2 jam pemanasan dan akan terdegradasi sebanyak 50% pada suhu 90°C. Senyawa flavonoid lain seperti luteolin menurun sebesar 30% pada suhu 70°C dan akan terdegradasi sebanyak 45% pada suhu 90°C (Chaaban *et al.*, 2017). Pemekatan ekstrak dan fraksi berfungsi menghilangkan pelarut, hal tersebut bertujuan agar pelarut tidak memengaruhi khasiat dari zat aktif apabila digunakan dalam pengobatan (Sa'adah & Nurhasnawati, 2017). Karakter fisik dari ekstrak kental yang didapat berwarna coklat kehitaman, tekstur kental, dan aroma menyengat pahit.

Fraksinasi cair-cair merupakan pemisahan senyawa berdasarkan tingkat kepolaran dengan pelarut yang tidak saling bercampur (Sembiring *et al.*, 2016). Pemilihan pelarut dalam fraksinasi bertingkat berdasarkan tingkat kepolaran suatu pelarut yaitu diawali dengan pelarut non polar, semi polar, dan polar. Tujuan fraksinasi bertingkat ini agar senyawa metabolit sekunder tertarik dalam pelarut yang sesuai. Pelarut n-heksan dapat menyari senyawa non polar seperti terpenoid dan sterol, sedangkan pelarut etil asetat dapat menyari senyawa semi polar seperti alkaloid flavonoid, dan saponin, sedangkan pelarut *aquadest* dapat menarik senyawa polar seperti saponin (Degu *et al.*, 2020). Oleh karena itu, pelarut n-heksan digunakan sebagai fraksinasi paling pertama untuk menghindari kompetisi penarikan senyawa dengan etanol. Apabila fraksinasi pertama

menggunakan etil asetat atau *aquadest* dapat menyebabkan kompetisi penarikan senyawa, sehingga penyarian zat aktif menjadi tidak optimal.

3.2. Skrining fitokimia flavonoid

Skrining fitokimia flavonoid dilakukan untuk melihat keberadaan senyawa flavonoid dalam ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan. Identifikasi flavonoid dalam penelitian ini menggunakan kontrol positif senyawa kuersetin karena senyawa ini termasuk golongan senyawa flavanoid. Hasil fitokimia flavonoid ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi *aquadest* positif menggunakan uji Taubeck dan Wilstater ditunjukkan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Skrining fitokimia flavonoid ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan

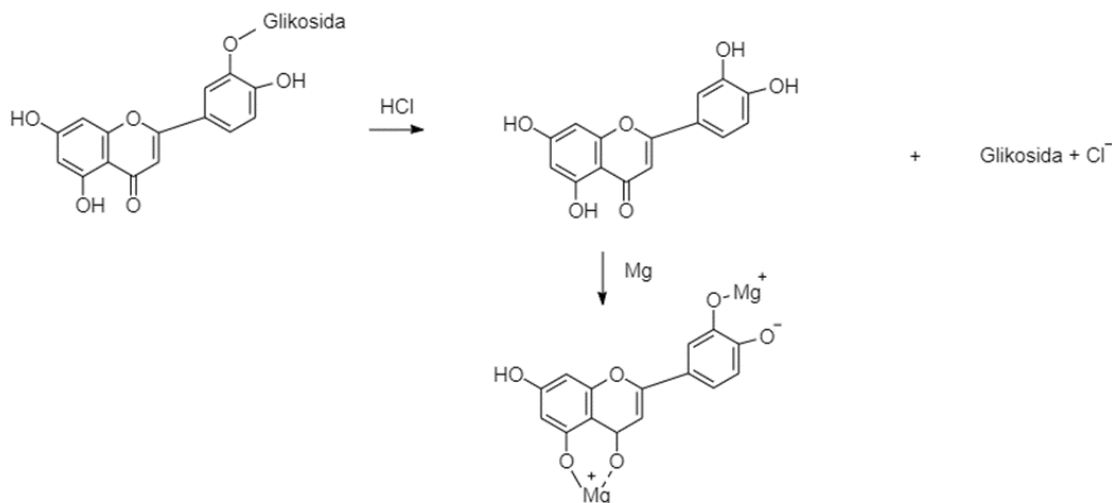
Sampel	Uji	
	Wilstater	Taubeck
Kuersetin	+	+
Ekstrak etanol	+	+
Fraksi n-heksan	+	+
Fraksi etil asetat	+	+
Fraksi air	+	+

Keterangan:

(+) = Positif (mengandung flavonoid)

(-) = Negatif (tidak mengandung flavonoid)

Penambahan serbuk Mg dan HCl pekat pada uji Wilstater menyebabkan proses reduksi pada ortohidroksi menghasilkan senyawa kompleks Mg-flavonoid yang warna merah atau jingga pada *flavonol*, *flavanon*, *flavanonol* dan *xanton*, reaksi dapat dilihat pada Gambar 1.

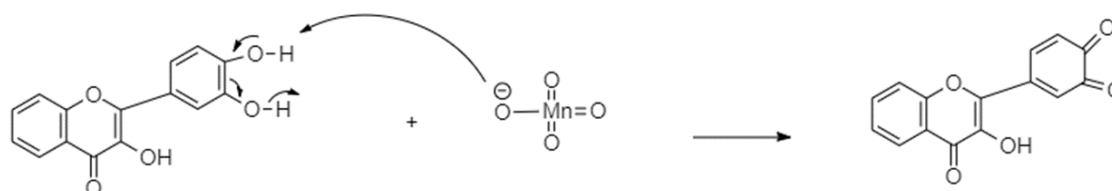


Gambar 1. Uji flavonoid dengan reaksi Wilstater

Penambahan aseton, asam borat, asam okasalat pada uji Taubeck berfungsi memperbesar pergeseran batokromik melalui kompleks flavonoid. Pembentukan kompleks memberikan fluoresensi kuning pada UV 366 nm (Mariana *et al.*, 2013).

3.3 Uji kualitatif flavonoid secara KLT

Hasil pengamatan diperoleh nilai *Rf* pada ekstrak etanol, fraksi n-heksan, fraksi etil asetat, fraksi *aquadest* sebesar 0,19 dan 0,94. Senyawa flavonoid diidentifikasi dengan penampak bercak $KMnO_4$. Setelah dicelupkan $KMnO_4$ akan menampakkan bercak berwarna kuning karena senyawa flavonoid sensitif terhadap oksidasi. Reaksi oksidasi flavonoid dengan $KMnO_4$ dapat dilihat pada Gambar 2. Nilai masing-masing *Rf* sampel ditunjukkan pada Tabel 2.



Gambar 2. Mekanisme reaksi oksidasi flavonoid

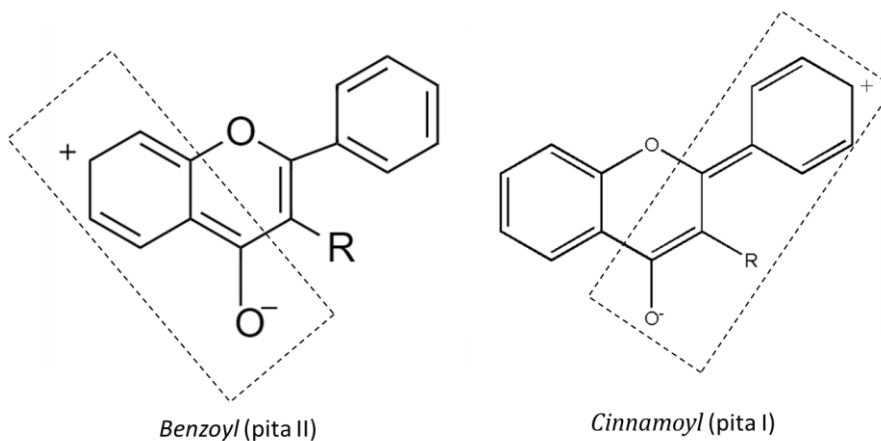
Tabel 2. Hasil pengamatan KLT ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan

Sampel	<i>Rf</i>	Sebelum dicelup $KMnO_4$		Setelah dicelup $KMnO_4$
		UV 254 nm	UV 366 nm	Tampak mata
Kuersetin	0,94	Kecoklatan	Biru	Kuning
Ekstrak etanol	0,19	Kecoklatan	Biru	Kuning
Fraksi n-heksan	0,94	Kecoklatan	Biru	Kuning
	0,19	Kecoklatan	Biru	Kuning
Fraksi etil asetat	0,94	Kecoklatan	Biru	Kuning
	0,19	Kecoklatan	Biru	Kuning
Fraksi <i>aquadest</i>	0,94	Kecoklatan	Biru	Kuning
	0,19	Kecoklatan	Biru	Kuning

Hasil elusi plat KLT ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan dengan fase gerak n-butanol : asam asetat : *aquadest* (4:1:5) menunjukkan adanya 2 pemisahan bercak pada nilai *Rf* 0,19 dan 0,94. Hal tersebut mendukung data identifikasi tentang adanya kandungan flavonoid, salah satunya seperti kuersetin dalam ekstrak maupun fraksi-fraksi, karena memiliki nilai *Rf* dan warna noda yang sama seperti kuersetin.

3.4 Karakterisasi senyawa flavonoid dengan spektrofotometri UV-Vis

Karakterisasi senyawa flavonoid dilakukan dengan melihat karakter spektrum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Adanya serapan pita I (*cinnamoyl*) pada daerah 300-400 nm berasal dari serapan cincin B pada molekul flavonoid, serapan pita II (*benzoyl*) pada daerah 220-280 nm berasal dari cincin A ($\pi \rightarrow \pi^*$) (Markham, 1988).



Gambar 3. Struktur *benzoyl* dan *cinnamoyl* pada flavonoid

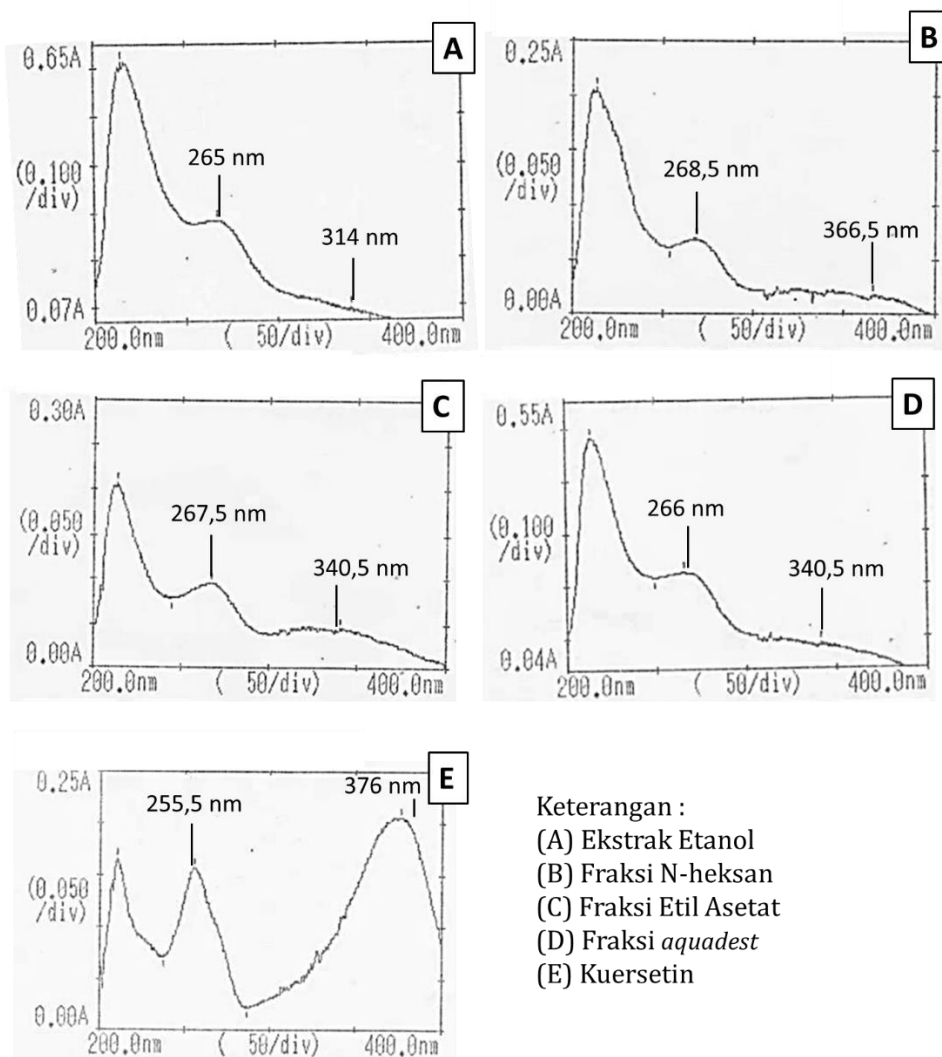
Serapan maksimum pita I (330-360 nm) dan pita II (250-280 nm) dalam ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi *aquadest* bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) menunjukkan adanya karakteristik *flavonol 3-OH* tersubstitusi, sedangkan spektrum pada fraksi n-heksan menunjukkan adanya karakteristik *flavonol 3-OH* bebas pada pita I (350-385 nm) dan pita II (250-280 nm), penjelasan ini dapat dilihat di Tabel 3.

Tabel 3. Hasil spektrum flavonoid ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan

No.	Sampel	Pita I (<i>cinnamoyl</i>)	Pita II (<i>benzoyl</i>)	Interpretasi Jenis Flavonoid (Feng, <i>et al.</i> , 2017)
1.	Ekstrak etanol	340,0 nm	265,5 nm	Flavonol 3-OH tersubstitusi
2.	Fraksi n-heksan	366,5 nm	268,5 nm	Flavonol 3-OH bebas
3.	Fraksi etil asetat	340,5 nm	267,5 nm	Flavonol 3-OH tersubstitusi
4.	Fraksi <i>aquadest</i>	341,0 nm	266,0 nm	Flavonol 3-OH tersubstitusi
5.	Kuersetin	376,0 nm	255,5 nm	Flavonol 3-OH bebas

Spektrum flavonoid dari ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan dapat dilihat pada Gambar 4. Berdasarkan hasil analisis terdapat serapan daerah 210-216 nm pada setiap fraksi dan ekstrak, hal tersebut diduga berasal dari serapan metanol, karena metanol dapat memberikan serapan terendah pada 205 nm (Rastuti & Purwati, 2012). Perbedaan polaritas penyari flavonoid menunjukkan perbedaan jenis flavonoid yang terekstraksi. Fraksi n-heksan menunjukkan adanya jenis flavonol yang memiliki polaritas yang lebih rendah seperti aglikon flavonoid, hal ini dapat

dibuktikan dari hasil karakterisasi dengan spektrofotometer UV-VIS yang menunjukkan jenis flavonol 3-OH bebas.



Gambar 4. Spektrum flavonoid dari ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan

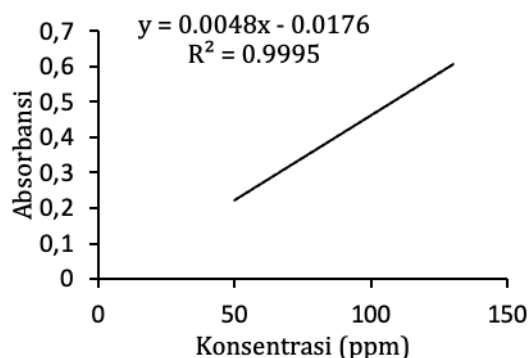
Perbedaan hasil spektrum dalam ekstrak etanol, fraksi etil asetat, dan fraksi *aquadest* mengandung senyawa flavonoid yang lebih polar seperti glikosida yang terikat pada molekul flavonoid, hal ini dapat dibuktikan dari hasil karakterisasi dengan spektrofotometer UV-VIS yang menunjukan jenis *flavonol 3-OH* tersubstitusi.

3.5 Penetapan kadar flavonoid total

Analisis kadar flavonoid total menggunakan metode kolorimetri yaitu dengan adanya dengan prinsip pembentukan warna karena terbentuknya senyawa kompleks antara $AlCl_3$ dengan gugus

keton pada atom C-3 atau C-5 yang bertetangga dari *flavonol* dan *flavon*. Standar yang digunakan yaitu kuersetin karena memiliki gugus keton pada atom C-4 dan gugus hidroksi pada atom C-3 dan C-5 yang bertetangga.

Penetapan kadar flavonoid diawali dengan penentuan *operating time* (OT). Penentuan OT dilakukan untuk mengetahui lama waktu yang tepat agar sampel bereaksi dengan reaktan membentuk senyawa yang stabil (Beda, 2018). OT reaksi kuersetin dengan $AlCl_3$ 10% didapatkan pada menit ke 26. Selanjutnya untuk mengetahui panjang gelombang saat mencapai serapan maksimum dan memiliki daya serap relatif konstan, dilakukan pengukuran panjang gelombang maksimum. Pengukuran dilakukan pada rentang panjang gelombang 400-450 nm dan memberikan nilai absorbansi optimum sebesar 0,558, absorbansi ini menunjukkan panjang gelombang maksimum berada pada daerah 415 nm.



Gambar 5. Kurva hubungan konsentrasi dengan absorbansi kuersetin

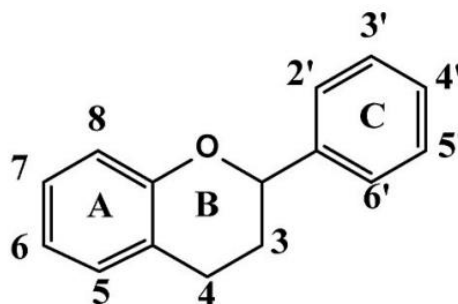
Kurva baku dibuat menggunakan konsentrasi 50, 70, 90, 110, dan 130 ppm, karena pada konsentrasi tersebut dihasilkan absorbansi yang baik antara 0,2-0,8. Hasil kurva hubungan konsentrasi dengan absorbansi kuersetin menunjukkan adanya perbandingan lurus yaitu semakin besar konsentrasi yang digunakan maka semakin besar pula nilai absorbansi yang dihasilkan. Persamaan linier yang dihasilkan $y = 0,0048x - 0,0176$ dengan nilai koefisien korelasi 0,9995 yang mendekati 1 menunjukkan adanya hubungan antara konsentrasi larutan dengan nilai absorbansi dan kurva kalibrasi linear serta memiliki korelasi sangat kuat yang sesuai dengan hukum *Lambert Beer*.

Kandungan flavonoid total dalam ekstrak tanaman obat dapat ditentukan kolorimetri, salah satunya menggunakan aluminium klorida. Ion $Al(III)$ digunakan sebagai agen pengompleks. Metode ini didasarkan pada pembentukan kelat $Al(III)$ -flavonoid. Karena banyaknya gugus okso dan hidroksil pada flavonoid memiliki afinitas yang besar untuk mengikat ion logam seperti $Al(III)$.

Tabel 3. Hasil kadar flavonoid total ekstrak dan fraksi bunga pepaya jantan

Sampel	Pengulangan	Absorbansi	Kadar Flavonoid (% QE)	Rata-rata Kadar Flavonoid±SD (% QE)	% KV
Ekstrak Etanol	I	0,503	0,6779	0,6805±0,0045	0,6613
	II	0,503	0,6779		
	III	0,509	0,6858		
Fraksi n-Heksan	I	0,299	0,4122	0,4178±0,0058	1,3882
	II	0,303	0,4174		
	III	0,308	0,4239		
Fraksi Etil Asetat	I	0,398	0,5411	0,5411±0,0052	0,9610
	II	0,394	0,5359		
	III	0,402	0,5463		
Fraksi aquadest	I	0,382	0,5203	0,5207±0,0007	0,1344
	II	0,382	0,5203		
	III	0,383	0,5216		

Penetapan flavonoid memerlukan agen pengompleks untuk meningkatkan nilai absorbansi dan menjadi pengoreksi larutan ekstrak yang umumnya berwarna hijau muda- coklat yang memberikan serapan 400-450 nm, sehingga diperlukan penambahan agen pengompleks aluminium klorida yang menghasilkan warna larutan kuning. Penambahan asam asetat dalam analisis kadar flavonoid dilakukan untuk membentuk suasana asam. Hal ini akan membuat C-4 keto dan 3 atau 5-OH tetap stabil membentuk kompleks dengan $AlCl_3$ sehingga terjadi pergeseran panjang gelombang ke arah batokromik yang maksimal (Ipandi *et al.*, 2016). Pengikatan flavonoid-Al dapat terjadi di tiga lokasi: gugus 3-hidroksi - 4-karbonil (situs 3-4 di cincin-B); gugus 5-hidroksi (cincin-A) - gugus 4-karbonil (cincin-C) (situs 4-5); dan 3',4' - gugus dihidroksi (situs 3' - 4'" dalam cincin-C) (Chang *et al.*, 2002).



Gambar 6. Struktur umum flavonoid

Kadar senyawa flavonoid tertinggi dapat dilihat pada Tabel 3 yaitu pada ekstrak etanol sebesar 0,6805±0,0045 %QE, kadar senyawa flavonoid terendah pada fraksi n-heksan sebesar 0,4178 ±0,0058 %QE. Berdasarkan hasil penetapan kadar flavonoid maka senyawa flavonoid dalam bunga pepaya jantan memiliki sifat semi polar, polar dan non polar. Ekstrak etanol memiliki kadar flavonoid tertinggi karena etanol dapat menyari senyawa metabolit sekunder dengan polaritas yang luas seperti glikosida flavonoid dan aglikon flavonoid.

Kandungan flavonoid dalam fraksi etil asetat menunjukkan senyawa flavonoid bersifat semi polar juga banyak terdapat pada bunga pepaya jantan. Flavonoid yang tersari dalam fraksi *aquadest* merupakan senyawa flavonoid yang berikatan dengan glikosida, yang umumnya bersifat polar larut dalam *aquadest*. Fraksi n-heksan menunjukkan kandungan flavonoid bersifat non polar yang paling rendah, flavonoid yang bersifat non polar ini dapat ikut menarik senyawa non polar seperti steroid dan lemak (Firnando, 2019).

4. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa bunga pepaya jantan (*Carica papaya* L.) mengandung flavonoid dengan jenis *flavonol 3-OH* tersubstitusi pada ekstrak etanol, fraksi etil asetat, fraksi *aquadest*, sedangkan fraksi n-heksan menunjukkan *flavonol 3-OH* bebas. Kadar flavonoid terdapat tertinggi terdapat dalam ekstrak etanol sebesar $0,6805 \pm 0,0045$ %QE, diikuti fraksi etil asetat $0,5411 \pm 0,0052$ %QE, fraksi *aquadest* $0,5207 \pm 0,0007$ %QE, kadar terendah dalam fraksi n-heksan $0,4178 \pm 0,0058$ %QE.

Daftar pustaka

- Andarwulan, N., Kurniasih, D., Apriady, R. A., Rahmat, H., Roto, A. V., & Bolling, B. W. (2012). Polyphenols, carotenoids, and ascorbic acid in underutilized medicinal vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4(1), 339-347. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.003>
- Asghar, N., Naqvi, S. A., Hussain, Z., Rasool, N., Khan, Z. A., Shahzad, S. A., Sherazi, T. A., Janjua, M. R., Nagra, S. A., Zia-Ul-Haq, M., & Jaafar, H. Z. (2016). Compositional difference in antioxidant and antibacterial activity of all parts of the *Carica papaya* using different solvents. *Chem Cent J*, 10, 5. <https://doi.org/10.1186/s13065-016-0149-0>
- Asmorowati, H., dan Lindawati, N. Y., 2019, Penetapan Kadar Flavonoid Total Alpukat (*Persea americana* Mill.) dengan metode spektrofotometri, *Jurnal Ilmiah Farmasi*, 15(2), 51–63.
- Baskaran, C., bai, V. R., Velu, S., & Kumaran, K. (2012). The efficacy of *Carica papaya* leaf extract on some bacterial and a fungal strain by well diffusion method. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2, S658-S662. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60239-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60239-4)
- Beda, T. O. (2018). *Penetapan Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol Daun Sisik Naga (Drymoglossum Piloselloides [L.] Presl) dengan Metode Kolorimetri AlCl3* Politeknik Kesehatan Kemenkes Kupang]. Kupang.
- Chaaban, H., Ioannou, I., Chebil, L., Slimane, M., Gerardin, C., Paris, C., Charbonnel, C., Chekir-Ghedira, L., & Ghoul, M. (2017). Effect of heat processing on thermal stability and antioxidant activity of six flavonoids: CHAABAN et al. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41, e13203. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13203>
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., & Chern, J. C. (2002). Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10, 178-182. <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2748>
- Degu, S., Negeri, N. G., Abebe, A., Berihun, A., Arega, E., Sisay, B., Gameda, H., Ashebir, R., Amano, A., Fekadu, N., Kasahun, T., Taye, S., & Bitew, A. (2020). In Vitro Antifungal Activity,

- Phytochemical Screening and Thin Layer Chromatography Profiling of *Impatiens tinctoria* A. Rich Root Extracts. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 8, 189-196.
- Djamil, R., & Zaidan, S. (2016). Isolasi Senyawa Flavonoid dari Ekstrak Metanol Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L.) Merr), Euphorbiaceae. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 14(1), 57-61.
- Firnando, H. (2019). Penetapan Kadar Total Fenolik Dan Flavonoid Fraksi Butanol Dan Fraksi Air dari Ekstrak Etanol Rimpang *Acorus Sp.* *Jurnal Mahasiswa Farmasi Fakultas Kedokteran UNTAN*, 4(1).
- Imaga, N., Gbenle, G., Okochi, I., Adenekan, S., Duro-Emmanuel, T., Oyeniya, B., Dokai, P., Oyenuga, M., Otumara, A., & Ekeh, F. (2010). Phytochemical and antioxidant nutrient constituents of *Carica papaya* and *Parquetina nigrescens* extracts. *Scientific Research and Essays*, 5(16).
- Ipandi, I., Triyasmono, L., & Budi, P. (2016). Penentuan Kadar Flavonoid Total dan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Kajajahi (*Leucosyke capitellata* Wedd.). *Pharmascience*, 3(1).
- Juárez-Rojop, I. E., Tovilla-Zárate, C. A., Aguilar-Domínguez, D. E., Fuente, L. F. R.-d. l., Lobato-García, C. E., Blé-Castillo, J. L., López-Meraz, L., Díaz-Zagoya, J. C., & Bermúdez-Ocaña, D. Y. (2014). Phytochemical screening and hypoglycemic activity of *Carica papaya* leaf in streptozotocin-induced diabetic rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(3), 341-347.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.012>
- Lien, G. T. K., Van, D. T. T., Cuong, D. H., Yen, P. H., Tai, B. H., & Kiem, P. V. (2019). A New Phenolic Constituent From *Carica papaya* Flowers and Its Tyrosinase Inhibitory Activity. *Natural Product Communications*, 14(7), 1934578X19850987.
<https://doi.org/10.1177/1934578X19850987>
- Manurung, H., Kustiawan, W., Kusuma, I., & Marjenah, M. (2017). Total flavonoid content and antioxidant activity of tabat Barito (*Ficus deltoidea* Jack) on different plant organs and ages. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 5, 120-125.
- Mariana, L., Andayani, Y., & Erin, R. G. (2013). Analisis Senyawa Flavonoid Hasil Fraksinasi Ekstrak Diklorometana Daun Keluwih (*Artocarpus camansi*) Universitas Mataram].
- Markham, K. R. (1988). Cara mengidentifikasi flavonoid. In K. Padmawinata & S. Niksolihin (Eds.): ITB.
- Nga, V., Trang, N., Tuyet, N., Phung, N., Ngo, T. T. D., & Nguyen-Thi-Hoai, T. (2020). Ethanol extract of male *Carica papaya* flowers demonstrated non-toxic against MCF-7, HEP-G2, HELA, NCI-H460 cancer cell lines. *Vietnam Journal of Chemistry*, 58, 86-91.
<https://doi.org/10.1002/vjch.2019000142>
- Ningsih, G., Utami, S. R., & Nugrahani, R. A. (2015). Pengaruh Lamanya Waktu Ekstraksi Remaserasi Kulit Buah Durian Terhadap Rendemen Saponin Dan Aplikasinya Sebagai Zat Aktif Anti Jamur. *Jurnal Konversi Universitas Muhammadiyah Jakarta*, 4(1).
<https://doi.org/10.24853/konversi.4.1.%p>
- Nugroho, A., Heryani, H., Choi, J. S., & Park, H.-J. (2017). Identification and quantification of flavonoids in *Carica papaya* leaf and peroxynitrite-scavenging activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(3), 208-213.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2016.12.009>
- Nwaehujor, C. O., Ode, J. O., Ekwere, M. R., & Udegbumam, R. I. (2014). Anti-fertility effects of fractions from *Carica papaya* (*Pawpaw*) Linn. methanol root extract in male Wistar rats. *Arabian Journal of Chemistry*.
- Pongoh, A. F., Queljoe, E., & Rotinslu, H. (2020). Uji Antidiabetik Ekstrak Etanol Bunga Pepaya (*Carica papaya* L.) terhadap Tikus Putih Jantan (*Rattus norvegicus*) yang Diinduksi Aloksan. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*, 9(1).
<https://doi.org/https://doi.org/10.35799/pha.9.2020.27423>

- Rastuti, U., & Purwati. (2012). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Kalba (*Albizia falcataria*) dengan Metode DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) dan Identifikasi Senyawa Metabolit Sekundernya. *Molekul*, 7(1), 33-42.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.20884/1.jm.2012.7.1.104>
- Riwanti, P., Izazih, F., & Amaliyah, A. (2020). Pengaruh Perbedaan Konsentrasi Etanol pada Kadar Flavonoid Total Ekstrak Etanol 50,70 dan 96% Sargassum Polycystum dari Madura. *Journal of Pharmaceutical Care Anwar Medika*, 2(2), 82-95. <https://doi.org/10.36932/jpcam.v2i2.1>
- Sa'adah, H., & Nurhasnawati, H. (2017). Perbandingan Pelarut Etanol dan Air pada Pembuatan Ekstrak Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine americana* Merr) menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, 1(2), 149-153.
<https://doi.org/https://doi.org/10.51352/jim.v1i2.27>
- Sembiring, E., Sangi, M. S., & Suryanto, E. (2016). Aktivitas Antioksidan Ekstrak dan Fraksi dari Biji Jagung (*Zea mays* L.). *Chemistry Progress*, 9(1), 16-24.
<https://doi.org/https://doi.org/10.35799/cp.9.1.2016.13908>
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2009). *Introduction to Modern Liquid Chromatography* 3 ed., John Wiley and Sons Inc
- Tay, Z. H., & Chong, K. P. (2016). The potential of papaya leaf extract in controlling *Ganoderma boninense*. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 36(1), 012027.
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/36/1/012027>
- Yuslianti, E. R., Bachtiar, B. M., Suniarti, D. F., & Afifah, B. S. (2016). Standardisasi Farmasitikal Bahan Alam Menuju Fitofarmaka Untuk Pengembangan Obat Tradisional Indonesia. *Dentika Dental Journal*, 19(2), 179-185.
- Zuhrotun Nisa, F., Astuti, M., Murdiati, A., & Mubarika Haryana, S. (2017). Anti-proliferation and Apoptosis Induction of Aqueous Leaf Extract of *Carica papaya* L. on Human Breast Cancer Cells MCF-7. *Pak J Biol Sci*, 20(1), 36-41. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2017.36.41>