

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Hepatitis adalah kelainan hati berupa peradangan sel hati yang ditandai dengan peningkatan kadar enzim hati, dapat berkembang menjadi fibrosis, sirosis dan kanker hati, yang disebabkan oleh gangguan atau kerusakan sel hati (WHO, 2015). Beberapa faktor penyebab hepatitis bisa disebabkan oleh infeksi (virus, bakteri, parasit), obat-obatan (termasuk obat tradisional), konsumsi alkohol, lemak berlebih dan penyakit autoimun. Penyebab infeksi yang paling sering pada hepatitis adalah oleh karena virus hepatitis. Berbagai virus hepatitis telah ditemukan, yaitu virus hepatitis A, B, C, D, dan E namun yang sering menyebabkan kerusakan hati adalah virus hepatitis B dan C (Kemenkes RI, 2014).

Virus hepatitis C (VHC) adalah virus RNA positif *strand*, yang berdasar perbedaan susunan genom VHC diklasifikasikan dalam 7 genotip (genotip 1 sampai 7) yang selanjutnya dari genotip ini dapat dibedakan menjadi lebih dari 70 subtype, 1a, 1b, 2a, 2b, dan seterusnya (Wahyuni *et al.*, 2014). Infeksi VHC dapat menyebabkan hepatitis kronis, sirosis dan kanker hati (Aoki *et al.*, 2014). Sekitar 130-150 juta orang di seluruh dunia mengalami infeksi VHC kronik dan diantaranya 500.000 meninggal setiap tahunnya (WHO, 2016). Pada 2014, penduduk Indonesia terinfeksi VHC sekitar 1,284 juta, sekitar 9% (25,680) berpotensi mengalami sirosis hati, kanker hati dan memerlukan transplantasi hati. Pada tahun 2030 diperkirakan penduduk dunia yang terinfeksi VHC meningkat menjadi 15% (192,600) untuk sirosis dan kanker hati (Sibley *et al.*, 2015). Salah satu propinsi dengan kasus infeksi VHC adalah Propinsi Nusa Tenggara Timur

(Mulyanto, 2016). Penularan infeksi VHC terjadi melalui darah, antara lain dengan perantaraan jarum suntik, *intravenous drug users* (IUDs), tato, transplantasi organ, kecelakaan kerja (petugas kesehatan) dan hubungan seksual (Kemenkes RI, 2014).

Infeksi VHC ini menjadi penting untuk difikirkan penanganannya, mengingat 55-85 % infeksi VHC menjadi kronis (WHO, 2014). Beberapa contoh obat yang digunakan untuk terapi infeksi VHC antara lain adalah *pegylated interferon alfa* (IFN- α) dan ribavirin (RBV), obat golongan *protease inhibitor* (NS3 *inhibitor*) contohnya boceprevir, telaprevir dan simeprevir, NS5B *nukleotida inhibitor* yaitu sofosbuvir (WHO, 2014), dan NS5A *nukleotida inhibitor* yaitu daclatasvir (WHO, 2018).

Obat-obat yang digunakan tersebut mengalami hambatan dalam penggunaannya disebabkan oleh beberapa hal, yaitu harga yang (HCV advocate, 2015), efek samping yang mengganggu pasien (Aoki *et al.*, 2014), sulit digunakan karena ada produk yang tersedia berupa produk injeksi sehingga harus diinjeksikan bila akan digunakan (WHO, 2014) dan hingga saat ini belum tersedia secara merata di Indonesia dan dunia walaupun sudah masuk dalam program pemerintah. Selain beberapa masalah diatas, virus hepatitis C mudah/sering mengalami mutasi dan belum tersedia vaksin untuk infeksi VHC (Fransiscus, 2016), maka dibutuhkan solusi yaitu berupa pengembangan obat baru seperti dari kearifan lokal masyarakat berupa obat herbal untuk saat ini dan masa depan.

Obat baru terapi infeksi VHC yang sedang dikembangkan adalah senyawa pencegah masuknya (*entry site*) VHC ke dalam hepatosit yang merupakan tahap awal terjadinya infeksi VHC di hepatosit dan pada replikasi VHC yang merupakan tahap penggandaan RNA VHC yang kemudian akan menjadi sel virus baru.

Tahap infeksi VHC adalah masuknya VHC kedalam hepatosit dan replikasi

VHC dalam hepatosit (Calland *et al.*, 2012). Salah satu molekul penting pada permukaan hepatosit yang mempengaruhi masuknya VHC ke dalam hepatosit yaitu *tetraspanin Cluster of Differentiation 81 (CD81)* dan salah satu protein yang berperan penting dalam replikasi RNA VHC yaitu protein *non structural 3 protease (NS3 protease)* (Chevaliez and Pawlotsky, 2006; dan Kim and Chang, 2013). *Tetraspanin CD81* dan *NS3 helicase* RNA VHC menjadi target terapi infeksi VHC dalam pengembangan senyawa obat infeksi VHC, khususnya obat baru untuk preventif dan kuratif.

Berdasarkan beberapa hal tersebut di atas, dibutuhkan solusi untuk pencegahan infeksi VHC, antara lain dilakukan dengan menghindari beberapa faktor penyebab tertular infeksi VHC, dan untuk pengobatan diperlukan obat yang murah, tersedia, aman, dan mudah digunakan. Oleh karena itu, masih dibutuhkan penelitian tentang obat yang melawan infeksi VHC untuk membantu menyelesaikan masalah tersebut. Salah satu cara adalah dengan memanfaatkan sumber daya alam yang ada di sekitar kita yang diperoleh dari kearifan masyarakat lokal dalam melakukan pengobatan untuk memperoleh kesembuhan terhadap suatu penyakit.

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki banyak keanekaragaman obat yang berasal dari tradisi masyarakat lokal. Hal ini didukung hutan tropis Indonesia yang memiliki keanekaragaman hayati tertinggi kedua di dunia setelah Brazil. Dari sekitar 40.000 jenis flora yang ada di dunia 30.000 jenis dapat dijumpai di Indonesia. Sekitar 940 jenis tumbuhan obat terdapat di Indonesia diantaranya diketahui berkhasiat sebagai obat dan telah dipergunakan dalam pengobatan tradisional secara turun-temurun oleh berbagai etnis di Indonesia (Masyhud, 2010). Dalam beberapa tahun terakhir, minat pengembangan obat tradisional untuk pengobatan infeksi VHC semakin meningkat (Wahyuni *et al.*,

2014). Beberapa percobaan *in vitro* dan *in vivo* mengungkapkan bahwa berbagai metabolit sekunder yang ditemukan pada tumbuhan memiliki efek terapi terhadap infeksi VHC (Bachmetov *et al.*, 2012; dan Shibata *et al.*, 2014).

Senyawa-senyawa metabolit sekunder salah satunya golongan flavonoid dari tumbuhan yang banyak dikembangkan saat ini contohnya senyawa turunan katekin yaitu *epigallocatechin-3-gallat* (EGCG) telah digunakan untuk pengobatan infeksi VHC. *Epigallocatechin-3-gallat* (EGCG) dikemukakan dapat menghambat masuknya VHC pada *entry site* hepatosit (Ciesek *et al.*, 2011), dengan menyerang ke *envelope glycoprotein* E1 dan E2 VHC sehingga VHC tidak dapat masuk kedalam hepatosit (Calland *et al.*, 2012).

Selain EGCG, senyawa flavonoid turunan katekin lain adalah epikatekin dan procyanidin B2 yang berasal dari kulit batang tanaman *Sterculia tragacantha* famili *Sterculiaceae* telah berhasil diisolasi (Orisakeye *et al.*, 2014). Epikatekin dapat menghambat replikasi VHC (Takeshita *et al.*, 2009), menghambat replikasi RNA VHC JFH1 (Lin *et al.*, 2013) dan menurunkan inflamasi yang disebabkan VHC JFH1 (Lin *et al.*, 2013) serta secara *in silico* dapat berikatan dengan protein NS3 VHC (Fatima *et al.*, 2014). Procyanidin B2 dapat mengurangi apoptosis hepatosit dengan menekan ekspresi *upregulation Bax* dan menetralkan kembali ekspresi *downregulation Bcl-x* hepatosit (Yang *et al.*, 2015).

Sterculia quadrifida R.Br (Faloak) yang selanjutnya akan disebut faloak merupakan salah satu spesies dari Genus *Sterculia*, Famili *Sterculiaceae*, yang belum mendapatkan perhatian, walaupun secara tradisional memiliki potensi sebagai bahan obat. Tanaman faloak oleh masyarakat di Provinsi Nusa Tenggara Timur (NTT), khususnya di Kota Kupang, telah digunakan untuk menyembuhkan penyakit kuning atau hepatitis. Bagian tanaman yang digunakan sebagai obat adalah bagian kulit

batang faloak, yaitu dengan meminum air rebusan. Kegunaan faloak ini didukung dengan banyaknya kasus infeksi hepatitis di NTT sehingga kulit batang faloak terus digunakan oleh masyarakat untuk mengobati hepatitis tersebut.

Penelitian yang telah dilakukan oleh Siswadi dkk (2013) membuktikan bahwa pada kulit batang faloak mengandung beberapa golongan senyawa yaitu alkaloid, flavonoid dan terpenoid, steroid. Pada penelitian kulit batang faloak lainnya dilakukan penetapan kadar golongan senyawa flavonoid didapatkan kandungan flavonoid sebanyak 2.5 mg per 1gr ekstrak alkohol 96% kulit batang faloak (Siswadi, 2015).

Dengan mempertimbangkan berbagai hal tersebut di atas, peneliti ingin menguji khasiat ekstrak kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) terhadap *entry site* VHC kedalam hepatosit dan replikasi RNA VHC. Ekstraksi kulit batang faloak dilakukan dengan menggunakan beberapa pelarut yang kemudian dipilih salah satu ekstrak yang terbaik untuk digunakan pada uji berikutnya. Pelarut-pelarut tersebut yaitu pelarut bersifat non polar contohnya n-heksan dan pelarut polar contohnya alkohol 70% dan air.

Dalam uji *cytotoxicity concentration* (CC₅₀) akan digunakan *Cell line* hepatosit Huh7it dan dalam uji *inhibitory concentration* (IC₅₀) akan digunakan *Cell line* hepatosit Huh7it dengan paparan virus hepatitis C JFH1 (VHC JFH1) genotip 2a yang telah digunakan sebelumnya untuk uji sejenis (Aoki *et al.*, 2014). Uji awal yaitu uji CC₅₀ untuk melihat seberapa tingkat toksisitas ekstrak kulit batang faloak dan uji IC₅₀ untuk melihat seberapa daya hambat ekstrak kulit batang faloak terhadap paparan VHC JFH1 dalam kultur *Cell line* hepatosit Huh7it. Setelah diperoleh nilai CC₅₀ dan IC₅₀ dapat diperoleh nilai *selectivity index* (SI) yang baik. Nilai SI yang diperoleh dari rasio CC₅₀ dan IC₅₀ dengan kriteria >3 (Saptawati *et al.*, 2017).

Akan dipilih ekstrak kulit batang faloak yang memiliki nilai CC_{50} yang baik. Nilai CC_{50} yang baik adalah dengan viabilitas sel $>50\%$ dan IC_{50} yang baik yaitu $\leq 25\mu\text{g/mL}$ (Saptawati *et al.*, 2017). Pada ekstrak kulit batang faloak yang memiliki nilai CC_{50} dan IC_{50} yang baik akan dilakukan uji kualitatif dan uji kuantitatif dengan alat *Liquid Chromatography Mass Spectrophotometry/Mass Spectrophotometry Triple Quad 4000 System (LC MS/MS Triple Quad 4000 System)*

Ekstrak kulit batang faloak yang memiliki nilai SI yang baik yaitu >3 kemudian dilanjutkan ke uji aktivitas dengan metode *time addition*. Pengujian ini dilakukan untuk mengetahui tahapan penghambatan infeksi VHC oleh beberapa konsentrasi ekstrak dari kulit batang faloak, yaitu pada tahap *entry* dan *post entry*. Uji *entry* VHC JFH1 dilanjutkan dengan uji *western blotting* terhadap CD81 *Cell line* hepatosit Huh7it yang berperan penting pada masuknya VHC kedalam hepatosit (Feneant *et al.*, 2014). Uji *post entry* dilanjutkan dengan uji *western blotting* NS3 *helicase* VHC JFH1 yang ikut berperan pada replikasi RNA VHC JFH1 (Kim and Chang, 2013). Penggunaan VHC JFH1 dalam penelitian ini mengacu pada penggunaan VHC JFH1 oleh peneliti terdahulu (Aoki *et al.*, 2014). Hasil dari uji ini diharapkan dapat digunakan sebagai pertimbangan dalam pengembangan obat yang memiliki efektivitas yang baik, aman, murah, mudah diperoleh dan mudah digunakan untuk pencegahan dan penyembuhan pasien terinfeksi VHC.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Berapakah nilai CC_{50} pada *Cell line* hepatosit Huh7it, IC_{50} pada *Cell line* hepatosit Huh7it yang terpapar VHC JFH1, dan SI dari ekstrak n-heksan, alkohol 70% dan air kulit batang faloak?

- 1.2.2 Apakah senyawa epikatekin yang terkandung dalam ekstrak terpilih kulit batang faloak dengan metode LC MS/MS *Triple Quad 4000 System*?
- 1.2.3 Berapakah kadar senyawa epikatekin yang terkandung dalam ekstrak terpilih kulit batang faloak dengan metode LC MS/MS *Triple Quad 4000 System*?
- 1.2.4 Berapakah nilai persentasi hambatan ekstrak terpilih kulit batang faloak terhadap infeksi VHC JFH1 pada tahap *entry* dan *post entry* pada *Cell line* hepatosit Huh7it dengan metode *Time Addition*?
- 1.2.5 Apakah ekstrak terpilih kulit batang faloak memiliki pengaruh terhadap penurunan ekspresi reseptor CD81 pada tahap *entry* dalam kultur *Cell line* hepatosit Huh7it yang ditentukan dengan metode *Western Blotting*?
- 1.2.6 Apakah ekstrak terpilih kulit batang faloak memiliki pengaruh terhadap penurunan ekspresi NS3 *helicase* VHC JFH1 pada tahap *post entry* (replikasi RNA) dalam kultur *Cell line* hepatosit Huh7it yang ditentukan dengan metode *Western Blotting*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1. Tujuan Umum

Tujuan umum dalam penelitian ini adalah melakukan uji efek hambatan ekstrak kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) pada infeksi VHC JFH1 *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

- 1.3.2.1 Menentukan nilai CC_{50} pada *Cell line* hepatosit Huh7it, IC_{50} pada *Cell line* hepatosit Huh7it yang terpapar VHC JFH1, dan SI dari ekstrak n-heksan, alkohol 70% dan air kulit batang faloak.

- 1.2.2 Mengetahui hasil identifikasi senyawa epikatekin yang terkandung dalam ekstrak terpilih kulit batang faloak dengan metode LC MS/MS *Triple Quad 4000 System*.
- 1.2.3 Menentukan kadar senyawa epikatekin yang terkandung dalam ekstrak terpilih kulit batang faloak dengan metode LC MS/MS *Triple Quad 4000 System*.
- 1.2.4 Menentukan nilai persentasi hambatan ekstrak terpilih kulit batang faloak terhadap infeksi VHC JFH1 pada tahap *entry* dan *post entry* VHC dalam *Cell line* hepatosit Huh7it dengan metode *time addition*.
- 1.2.5 Mengetahui pengaruh ekstrak terpilih kulit batang faloak pada tahap *entry* VHC terhadap ekspresi reseptor CD81 dalam kultur *Cell line* hepatosit Huh7it yang ditentukan dengan metode *Western blotting*.
- 1.2.6 Mengetahui pengaruh ekstrak terpilih kulit batang faloak terhadap ekspresi NS3 *helicase* VHC JFH1 pada tahap *post entry* (replikasi RNA) dalam kultur *Cell line* hepatosit Huh7it yang ditentukan dengan metode *Western blotting*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Teoritis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk:

1. Memberikan informasi kandungan senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak terpilih kulit batang faloak dalam uji efek penghambatan terhadap VHC JFH1.

2. Menyajikan informasi ilmiah mekanisme kerja ekstrak kulit batang faloak yang telah digunakan sebagai obat secara tradisional sebagai obat hepatitis.
3. Menyajikan informasi ilmiah/kajian tentang mekanisme kerja ekstrak kulit batang faloak untuk pertimbangan pengembangan obat terapi infeksi VHC.
4. Menjadi bahan pertimbangan/landasan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa aktif untuk terapi infeksi VHC.

1.4.2 Manfaat Praktis

Hasil penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan untuk :

1. Menambah informasi kepada masyarakat Kota Kupang tentang efek kulit batang faloak sebagai obat hepatitis karena infeksi VHC.
2. Menginduksi pemerintah daerah dalam pelestarian dan pembudidayaan faloak sebagai tanaman obat.