

POTENSI NUTRACEUTICAL SEBAGAI ANTIBAKTERI DAN ANTIINFLAMASI

Studi Disertasi:

Efek ekstrak kulit jeruk nipis (*citrus aurantifolia*) terhadap ekspresi mRNA gen *Toll-like Receptors 4* (TLR-4) dan *soluble* IL-6 pada mencit yang diinduksi *Salmonella typhi*

Vivien Novarina A.Kasim



UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO
FAKULTAS KEDOKTERAN



Sejarah Nutraceutical

- ❑ Diperkenalkan oleh Dr. Stefanus L. De Felice (1989).
- ❑ Nutraceutical : kombinasi istilah “nutrition” and “pharmaceutical”.
- ❑ Nutraceuticals dapat digolongkan :
 - dietary supplements
 - medical foods
 - fungsional foods
 - digunakan untuk pencegahan dan perawatan penyakit.



Nutraceutical

- Merupakan suplemen dari ekstrak bahan makanan tidak beracun yang secara ilmiah terbukti berguna bagi kesehatan (penyembuh atau mencegah penyakit).
- Vitamin, mineral zat gizi lain
- Ekstrak bahan makanan
- Substansi netral non makanan
- Dan lain-lain

Contoh Nutraceutical : Dietary Supplements

Dietary supplements dapat berupa :

- Vitamin , Mineral
- Asam amino
- Enzim
- Ekstrak hewan/organ hewan atau tumbuhan : glukosamin, kondroitin, curcumin, dll.
- Herbal : aloe vera, ginseng, ginkgo biloba



Dietary supplements

- Berisi satu atau lebih bahan makanan, termasuk yang berikut ini:
 - Macronutrien dan Micronutrien
 - Herbal dan tumbuhan
- Bahan Diet Baru, seperti :
 - Fitokimia, Serbuk sari lebah, Probiotik, Kelenjar
 - Beberapa hormon, termasuk melatonin dan DHEA
- Tidak mengandung bahan yang tidak disetujui, seperti:
 - Hormon tiroid, kortisol, estrogen, progesteron, atau testosteron
 - Bakteri patogen, Jaringan manusia

Dehydroepiandrosterone (**DHEA**) adalah sejenis hormon steroid yang dibuat oleh kelenjar adrenal pada laki-laki dan perempuan.



LATAR BELAKANG



DEMAM TYFOID

5 tahun terakhir **11,0–17,8 juta/tahun**
di seluruh dunia

Crump J. A. (2019). *An official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 68(Suppl 1), S4–S9.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciy846>

CFR = 3,5% (600rb/thn) - WHO 2009

Resistensi Antibiotik

Extensively Drug – resistant (XDR)

Javed et al, *BioMed Research International*, vol. 2020, Article ID 6432580, 7 pages, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/6432580>

Modalitas Terapeutik ↑

Adjuvant Therapy → Traditional Plant

KULIT JERUK NIPIS

Jeruk nipis setelah dipakai

Kulit → Sampah/limbah lingkungan

Banyak kandungan senyawa bioaktif :
minyak atsiri, flavonoid, tannin,
saponin, alkaloid, dll

Sumber nutraceutical

Biaya rendah dan banyak tersedia

**Platform efisien, murah dan
ramah lingkungan**

Penelitian2 in vitro sdh banyak

In vivo

**Biomolekuler → Reseptor TLR-4
agen pengikat LPS *S.typhi***

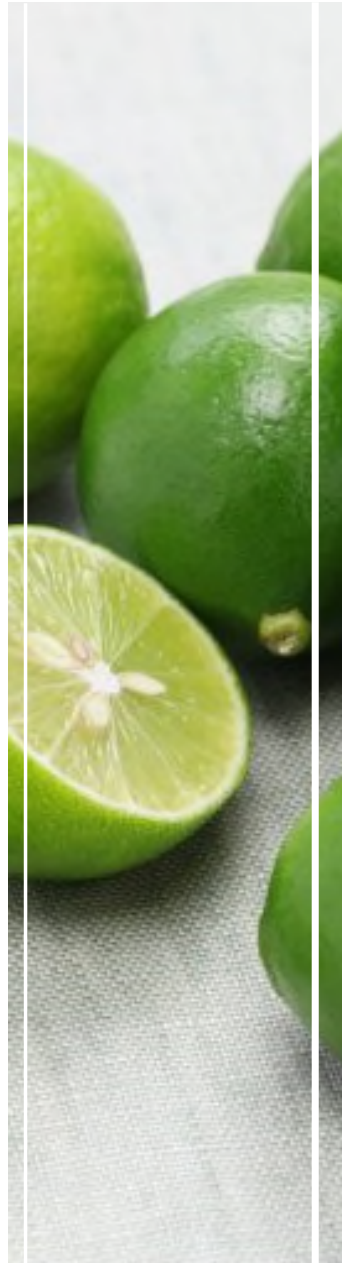
Persinyalan

Melepas sitokin inflamasi IL-6

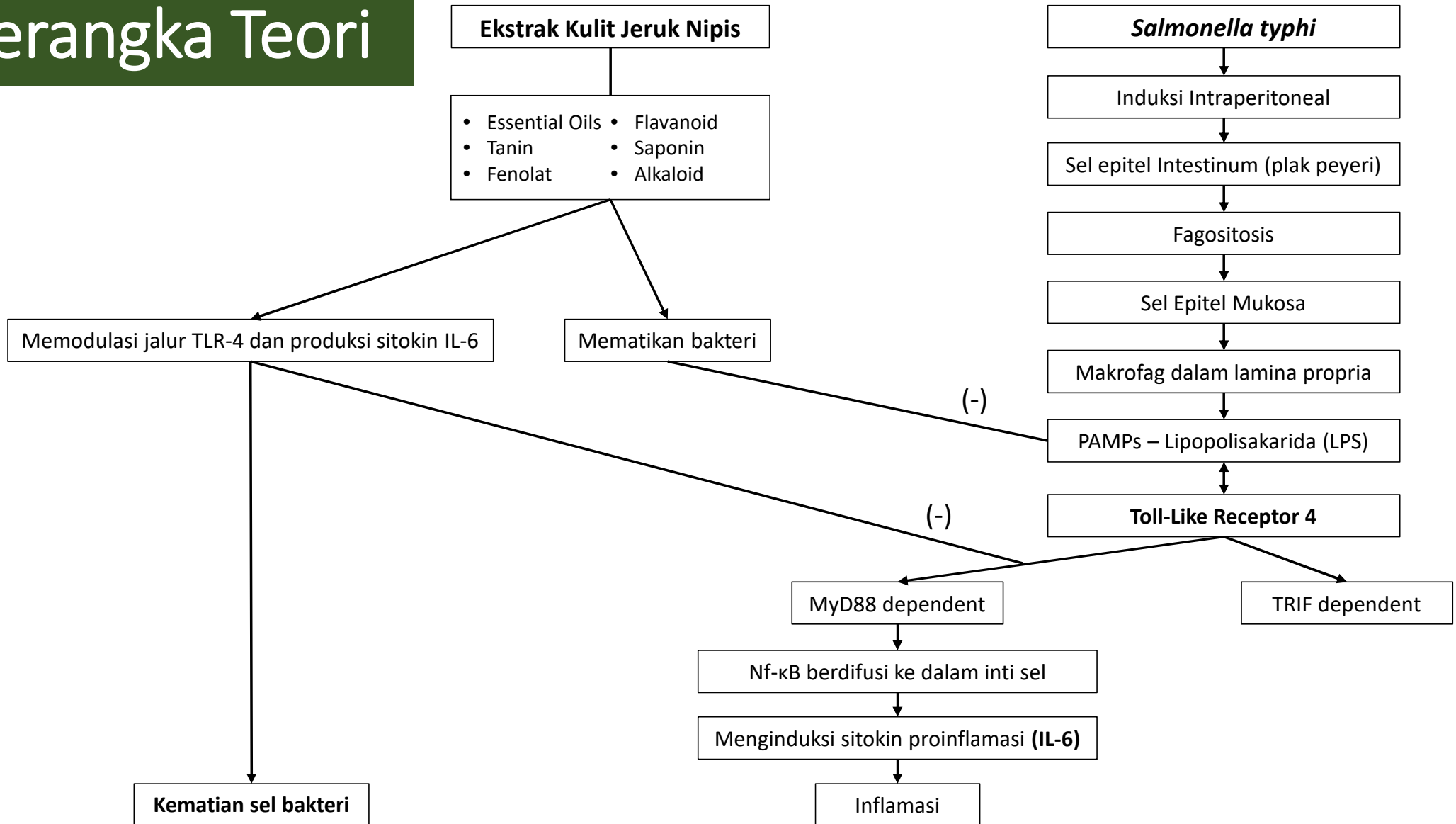


- 1) Studi in vivo tentang efektifitas ekstrak kulit jeruk nipis sebagai antibakteri dan antiinflamasi
- 2) Kulit jeruk nipis awalnya sebagai limbah lingkungan, untuk selanjutnya dapat dimanfaatkan sebagai salah satu bahan aktif herbal medicine
- 3) Ekstrak kulit jeruk nipis sebagai antimikroba dapat dijadikan sebagai terapi adjuvant, untuk mengatasi permasalahan resistensi antibiotik.
- 4) Mendukung program pemerintah dalam penanggulangan penyakit demam typhoid ataupun penyakit infeksi lainnya.

Mengapa penelitian ini penting?



Kerangka Teori

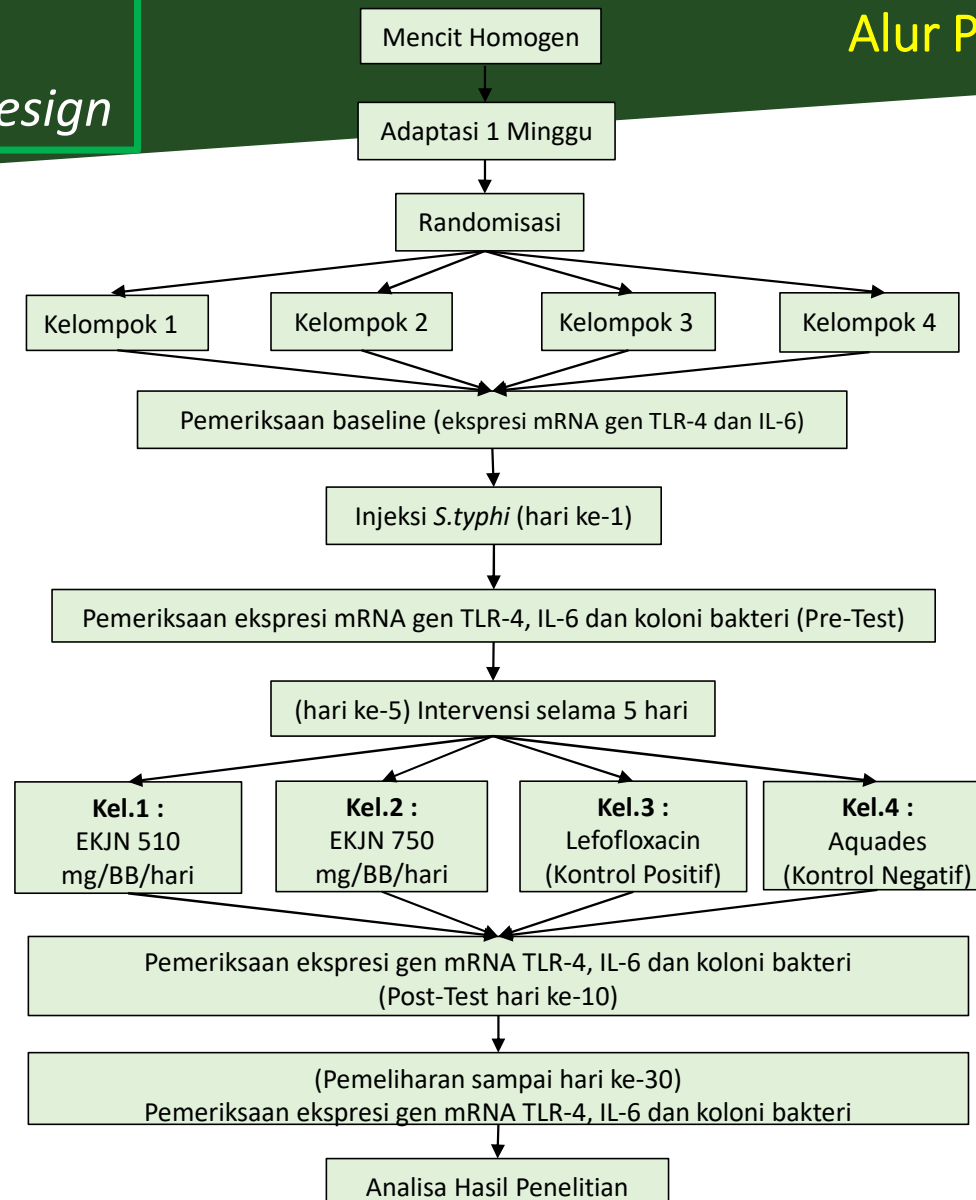


METODE PENELITIAN



Desain penelitian → True Experimental Design

Alur Penelitian



Tahapan Proses Penelitian



01

Pembuatan
ekstrak kulit
jeruk nipis

02

Skrining
fitokimia
Analisa
kualitatif

03

Skrining
fitokimia
Analisa
kuantitatif

04

Hitung
jumlah koloni
bakteri

05

Pemeriksaan
kadar IL-6
(ELISA) dan
ekspresi
mRNA TLR-4
(RT-PCR)



Persiapan pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis

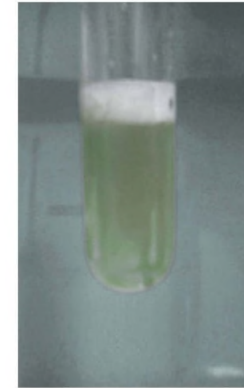
Pembuatan ekstrak kulit jeruk nipis



Skrining fitokimia Analisa kualitatif



(+) FLAVONOID



(+) SAPONIN



(+) ALKALOID



(+) TANIN



(+) TRITERPENOID

UJI FITOKIMIA
EKSTRAK KULIT
JERUK

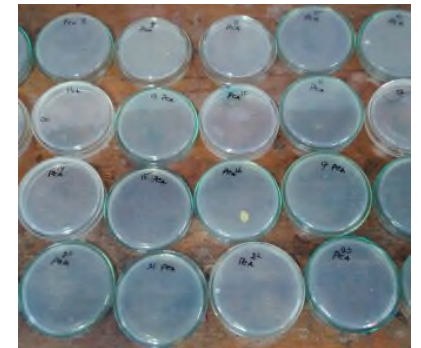
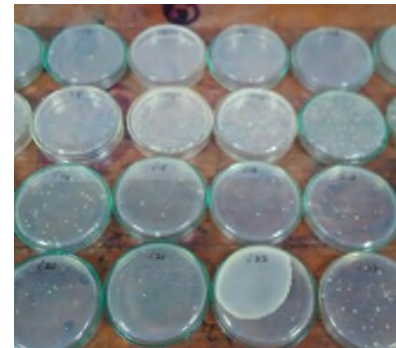


Skrining fitokimia Analisa kuantitatif





Hitung jumlah
koloni bakteri





Pemeriksaan kadar IL-6 (ELISA) dan ekspresi mRNA TLR-4 (RT-PCR)

HASIL PENELITIAN

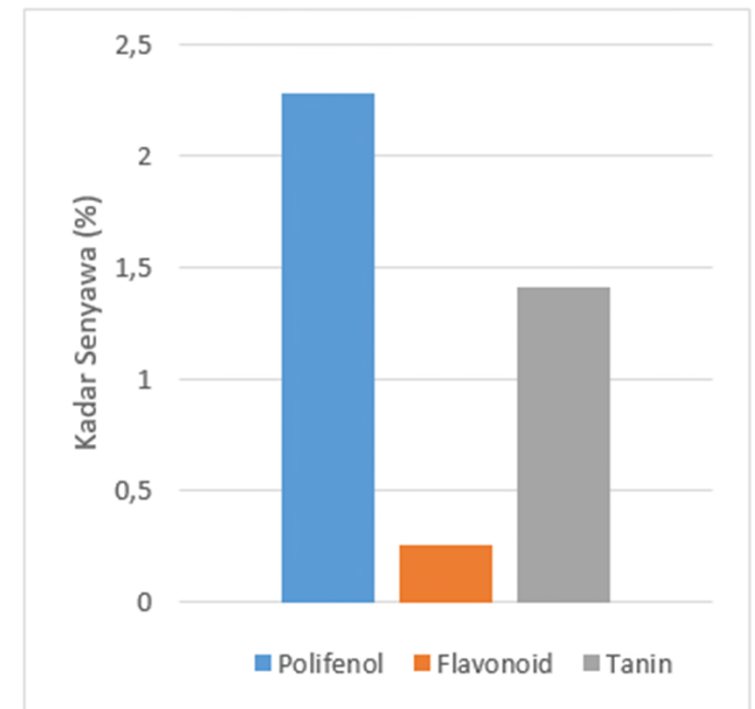


Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit jeruk nipis (EKJN)



Skrining Fitokimia	Sampel EKJN	Teridentifikasi
Uji flavonoid	+	Merah magenta dalam 3 menit
Uji Saponin	+	Emulsi yang stabil
Uji Alkaloid	+	Kekeruhan dan endapan
Uji Tanin	+	Hijau kehitaman
Uji Triterpenoid	+	Coklat kemerahan

Hasil skrining fitokimia ekstrak kulit jeruk nipis berdasarkan analisa kuantitatif didapatkan pada 0,01 gram ekstrak kulit jeruk nipis terdapat kandungan flavonoid sebesar 0.26 %, kemudian kadar polifenol adalah 2.29 % dan kadar tannin adalah 1.415 %. Pada masing-masing analisa kandungan senyawa digunakan larutan standar yaitu untuk flavonoid digunakan Quercetin, polifenol digunakan asam galat dan tanin digunakan asam tanat.



Efek EKJN terhadap **jumlah koloni bakteri** pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*



Kelompok	Jumlah Koloni Bakteri <i>S.typhi</i> (CFU/ml)					
	H5	H10	<i>p</i> value	H10	H30	<i>p</i> value
EKJN 510	24.60±3.85	3.00±2.92	0.001	3.00±2.92	0.00±0.00	0.830
EKJN 750	17.20±2.28	0.00±0.00	0.000	0.00±0.00	0.00±0.00	^a
Levofloxcacin (+)	30.40±7.40	1.60±1.36	0.001	1.60±1.36	0.00±0.00	0.306
Aquades (-)	22.60±6.07	6.00±2.83	0.009	6.00±2.83	1.20±0.58	0.014

Paired t-test; ^a The correlation and t cannot be computed because the standard error of the difference is 0; Values are mean±SD n=5; p-value < 0.05 is considered significant; EKJN ; Ekstrak Kulit Jeruk Nipis.
(+) kontrol positif ; (-) kontrol negatif

Efek EKJN terhadap jumlah koloni bakteri pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*



Tabel mean delta jumlah koloni bakteri sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan 3 minggu post intervensi (H30)

GROUPS	Calculation of Bacterial Colonization	
	5 th – 10 th day	10 th – 30 th day
LPE 510	21,60 ± 4,93	3,00 ± 2,91
LPE 750	17,20 ± 2,28	0,00 ± 0,00
Positive control	28,80 ± 8,23	1,60 ± 3,05
Negative control	16,60 ± 7,70	4,80 ± 2,58
<i>P value</i>	0,026	0,043



Efek EKJN terhadap kadar IL-6 pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*

Kelompok	Kadar Interleukin 6 (pg/ml)								
	H0	H5	p value	H5	H10	p value	H10	H30	p value
EKJN 510	157.3±59.7	358.5±59.5	0.007	358.5±59.5	338.7±64.9	0.003	338.7±64.9	284.7±60.6	0.05
EKJN 750	171.8±58.1	434.1±51.3	0.004	434.1±51.3	409.6±53.6	0.002	409.6±53.6	293.9±34.3	0.01
Levofloxacin (+)	121.1±35.9	502.0±35.4	0.000	502.0±35.4	477.9±41.5	0.006	477.9±41.5	204.5±40.7	0.001
Aquades (-)	130.3±47.7	248.5±27.2	0.003	248.5±27.2	236.9±31.8	0.15	236.9±31.8	194.9±38.5	0.08

Paired t-test; Values are mean±SD n=5; p-value < 0.05 is considered significant; EKJN ; Ekstrak Kulit Jeruk Nipis. (+) kontrol positif; (-) kontrol negatif



Efek EKJN terhadap kadar IL-6 pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*

Tabel 4.5 Pebandingan persentase kecepatan penurunan rerata kadar interleukin 6 pada kelompok pengamatan sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan pemeliharaan (H30)

Kelompok	Kadar Interleukin 6 (pg/ml)	
	(H10 – H5)*	(H30 – H10)**
EKJN 510 mg/kgBB	-5.47 %	-15.94 %
EKJN 750 mg/kgBB	-5.64 %	-28.24 %
Levofloxacin (+)	-4.80 %	-57.20 %
Aquades (-)	-4.67 %	-17.73 %

*Kecepatan penurunan rerata = $\frac{\text{mean (H10 – H5)} \times 100}{\text{mean H5}}$

**Kecepatan penurunan rerata = $\frac{\text{mean (H30 – H10)} \times 100}{\text{mean H10}}$



Efek EKJN terhadap kadar IL-6 pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*

Tabel mean delta interleukin 6 sebelum intervensi (H5), setelah intervensi (H10) dan 3 minggu post intervensi (H30)

GROUPS	Interleukin 6 (pg/ml)	
	5 th – 10 th day	10 th – 30 th <u>day</u>
LPE 510	19,63 ± 7,06	53,98 ± 43,38
LPE 750	24,54 ± 7,71	115,61 ± 56,92
Control (+)	24,07 ± 7,06	273,41 ± 68,26
Control (-)	11,62 ± 6,33	41,91 ± 18,87
<i>P value</i>	0,074	0,000

Efek EKJN terhadap **ekspresi mRNA gen TLR-4** pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*



Kelompok	Ekspresi gen mRNA TLR-4 (fold change)								
	H0	H5	<i>p</i> value	H5	H10	<i>p</i> value	H10	H30	<i>p</i> value
EKJN 510	6.61±0.95	9.25±0.31	0.002	9.25±0.31	8.96±0.38	0.06	8.96±0.38	7.50±1.13	0.05
EKJN 750	6.74±0.73	11.23±0.58	0.001	11.23±0.58	10.65±0.56	0.04	10.65±0.56	7.41±0.70	0.003
Levofloxacin (+)	5.89±0.44	13.32±0.46	0.000	13.32±0.46	12.87±0.47	0.24	12.87±0.47	6.71±0.47	0.000
Aquades (-)	7.03±0.51	9.39±0.77	0.003	9.39±0.77	7.92±0.56	0.006	7.92±0.56	7.59±0.74	0.05

Paired t-test; Values are mean±SD n=5; p-value < 0.05 is considered significant; EKJN ; Ekstrak Kulit Jeruk Nipis. (+) kontrol positif ; (-) kontrol negatif



Hubungan kadar interleukin 6, eksresi gen mRNA toll like receptor 4 dan jumlah kolonisasi bakteri

Tabel 4.8 Korelasi ekspresi mRNA gen TLR-4, kadar IL-6 dan kolonisasi bakteri

Variabel	Kolonisasi Bakteri (CFU/ml)	
	Korelasi Bivariat*	
	R	<i>p value</i>
Kadar Interleukin 6 (pg/ml)	0,362	0,025
Ekspresi mRNA gen TLR-4 (fold change)	0,408	0,013

* Pearson Correlation test (1-tailed); p signifikan bila $\leq 0,05$

Efek EKJN terhadap jumlah koloni bakteri, IL-6 dan ekspresi mRNA gen TLR-4 pada mencit Balb/c yang diinduksi *S. typhi*



Hasil penelitian menunjukkan bahwa EKJN 750 mg/kgBB memiliki efek yang lebih baik sebagai **bakterisid**, terlihat pada pengamatan hari ke-30 (tabel delta mean)

EKJN (Flavonoid, tannin, saponin, alkaloid dan fenol) dapat menurunkan **jumlah koloni bakteri *S. typhi***

Antibakteri

- **IL-6** (hari ke-10) post intervensi : $\searrow$; EKJN dosis 750 mg/kgBB (Δ mean=24,54).
- Laju kecepatan penurunan kadar **IL-6** paling besar terdapat pada EKJN 750 mg/kgBB (velocity=5,64%),

ANTI INFLAMASI

- EKJN mempunyai efek menghambat aktivitas sitokin pro inflamasi IL-6.
- Diasumsi bahwa efek penghambatan IL-6 karena kerja dari senyawa polifenol (flavonoid).

Haseeb A. (2017); efek penghambatan potensial dari polifenol terhadap ekspresi IL-6 dan stres oksidatif melalui mekanisme molekuler aktivasi NF- κ B

ekspresi mRNA TLR-4 hari ke-5 (post induksi *S. typhi*) : $\nearrow$

LPS $\rightarrow$ Merangsang pengaktifan reseptor TLR-4 $\rightarrow$ LPS $\gg$ $\rightarrow$ TLR-4 $\gg$

Terlihat perbedaan mean square TLR-4 baseline (m.q=1,18) dengan mean square TLR-4 hari ke-5 (m.q=18,18)

Post intervensi EKJN; **ekspresi mRNA gen TLR-4** $\downarrow$

Proses ini diasumsikan terjadi penyembuhan dari infeksi *S. typhi* dalam tubuh mencit.

Matthew C.J. Royle (2003); hal yang sangat vital dalam stimulasi respon imun non spesifik untuk melawan LPS adalah aktivitas TLR-4.

Penutup

- Ekstrak kulit jeruk nipis (EKJN) dosis 510 mg/kgBB dan dosis 750 mg/kgBB, mampu menurunkan **jumlah koloni bakteri *Salmonella typhi***, mampu menurunkan kadar **IL-6** dan mampu menurunkan ekspresi **mRNA gen TLR-4**, setelah intervensi selama 5 hari.
- Potensi Kulit Jeruk Nipis dapat dijadikan sebagai **Nutraceutical**
- Pemanfaatan limbah lingkungan yang berpotensi sebagai **Antibakteri** dan **Antiinflamasi**
- Ekstrak Kulit Jeruk Nipis (EKJN), merupakan platform **Murah**, **Efisien** dan **Ramah lingkungan**



TERIMA KASIH

Vivien Novarina A. Kasim

UNIVERSITAS NEGERI GORONTALO
FAKULTAS KEDOKTERAN

