

**POTENSI RESVERATROL DALAM MENGURANGI
KEPARAHAN MALARIA SEREBRAL PADA MENCIT YANG
TERINFEKSI *Plasmodium berghei* ANKA**

***THE POTENTIAL OF RESVERATROL IN REDUCE THE
SEVERITY OF CEREBRAL MALARIA IN *Plasmodium berghei*
ANKA-INFECTED MICE***

Faizal Hermanto^{1*}, Puspa Sari Dewi¹, Fahmy Ahsanul Haq¹, Nur Melsandy¹

¹*Bagian Farmakologi dan Toksikologi, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani, Jl. Terusan Jenderal Sudirman, Cimahi.*

**Email Corresponding: faizal.hermanto@lecture.unjani.ac.id*

Submitted: 5 June 2023

Revised: 14 September 2023

Accepted: 18 October 2023

ABSTRAK

Malaria serebral (MS) adalah komplikasi neurologis yang parah dari infeksi *Plasmodium falciparum* menyebabkan ensefalopati dan bertanggung jawab atas sebagian besar kematian terkait malaria secara global. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi potensi resveratrol dalam mengurangi keparahan malaria serebral pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Mencit dikelompokkan menjadi beberapa kelompok yaitu kelompok normal (tidak terinfeksi), sedangkan mencit yang terinfeksi *P. berghei* dan menunjukkan gejala neurologis malaria serebral kemudian dikelompokkan menjadi kelompok kontrol; klorokuin 20 mg/kg; resveratrol dosis 25, 50, dan 100 mg/kg. Parameter pengamatan meliputi parasitemia, gejala neurologis, indeks otak, dan evaluasi integritas sawar darah otak. Hasil menunjukkan setelah pemberian resveratrol berbagai dosis terjadi hambatan pertumbuhan parasit, penurunan gejala neurologis, penurunan indeks otak, dan mengurangi kerusakan sawar darah otak akibat infeksi *P. berghei* dibandingkan dengan kelompok kontrol. Kesimpulan dari penelitian ini adalah resveratrol dapat mengurangi keparahan malaria serebral pada mencit yang terinfeksi *P. berghei* ANKA.

Kata kunci : malaria serebral, *Plasmodium berghei*, Resveratrol.

ABSTRACT

Cerebral malaria (CM) is a severe neurological complication of Plasmodium falciparum infection causing encephalopathy and is responsible for most malaria-related deaths globally. This study aimed to evaluate the potential of resveratrol in reducing the severity of cerebral malaria in Plasmodium berghei ANKA-infected mice. Mice were assigned into several groups, namely the normal group (uninfected), while mice infected with P. berghei and showing neurological symptoms of cerebral malaria were then grouped into the control group; chloroquine 20 mg/kg; resveratrol doses of 25, 50, and 100 mg/kg. Parameters for observation included parasitemia, neurological symptoms, brain index, and evaluation of the integrity of the blood-brain barrier. The results showed that after administration of various doses of resveratrol, there was inhibition of parasite growth, decreased neurological symptoms, decreased brain index, and reduced damage to the blood-brain barrier due to P. berghei infection compared to the control group. This study concludes that resveratrol can reduce the severity of cerebral malaria in mice infected with P. berghei ANKA.

Keywords: Cerebral malaria, *Plasmodium berghei*, Resveratrol

PENDAHULUAN

Malaria merupakan penyakit yang mengancam jiwa dengan perkiraan 241 juta kasus penyakit dan 672.000 kematian pada tahun 2021 (WHO, 2021). Penyebab malaria adalah *Plasmodium sp.* yang ditularkan oleh gigitan nyamuk anopheles betina. Malaria Serebral (MS) adalah komplikasi neurologis yang parah dari infeksi *Plasmodium falciparum* menyebabkan ensefalopati dan bertanggung jawab atas sebagian besar kematian terkait malaria secara global (Ghazanfari, Mueller and Heath, 2018).

Parasit *P. falciparum* memiliki karakteristik unik dan kemampuan untuk menginfeksi sel darah merah, menyebabkan sel darah merah yang terinfeksi menempel pada lapisan dalam pembuluh darah di otak menyebabkan sekuestrasi. Hal ini akan memicu pelepasan mediator sitokin proinflamasi seperti IL-1, IL-6, Tumor Nekrosis Faktor (TNF) serta nitrit oksida sehingga terjadi aktivasi sel endotel, apoptosis dan kerusakan sawar darah otak yang dapat menimbulkan udem otak dan koma (Brian De Souza *et al.*, 2002; Hora *et al.*, 2016). Tingkat kematian MS sebesar 15-20%, walaupun dilakukan penanganan intensif dengan pemberian antimalaria. Hal ini juga diperparah dengan *Plasmodium* mengalami resistensi terhadap antimalaria terkini. Untuk menanggulangi masalah resistensi perlu dilakukan pencarian senyawa baru yang berkhasiat sebagai antimalaria.

Berdasarkan data Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Indonesia memiliki peringkat ke dua kekayaan biodiversitas di dunia. Hal tersebut merupakan potensi untuk pengembangan antimalaria baru khususnya berasal dari tanaman. Tanaman yang memiliki metabolit sekunder seperti alkaloid, fenol, terpenoid dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria (Kaur *et al.*, 2009; O'Neill *et al.*, 2012). Resveratrol merupakan polifenol yang banyak terkandung pada anggur, nangka, mulberry. Berbagai efek farmakologi dari resveratrol seperti antikanker, antiinflamasi, antioksidan, antidiabetik, kardioprotektif, neuroprotektif, antiprotozoal (Shaito *et al.*, 2020). Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa resveratrol dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada model hewan malaria dan menunjukkan adanya perbaikan pada organ hati, limpa dan ginjal. (Hermanto *et al.*, 2022). Penelitian potensi resveratrol dalam mengurangi komplikasi malaria berupa malaria serebral masih belum banyak diketahui. Tujuan dari penelitian ini adalah mengevaluasi efek resveratrol terhadap model hewan malaria serebral.

METODE PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis (Shimadzu UV-1800 Pharmaspec), Mikroskop (Olympus BX-53). Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Resveratrol (No sertifikat : PRF-COA-BP-120401) diperoleh dari Chengdu Biopurify Phytochemicals, China. Klorokuin, pewarna giemsa, pewarna *evans blue*, *dimethylformamide*, *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC) diperoleh dari Merck.

Mencit

Mencit yang digunakan dalam penelitian adalah mencit Swiss Webster jantan berumur 7-8 minggu yang diperoleh dari Pusat Ilmu Biologi, Institut Teknologi Bandung (ITB). Mencit disimpan dalam kondisi cahaya dan suhu standar dan diberi air dan makanan. Percobaan dilakukan sesuai pedoman penanganan hewan dan mendapat persetujuan dari komite etik praklinis Fakultas Farmasi Universitas Jenderal Achmad Yani, Cimahi, Jawa Barat, Indonesia, Nomor: 9004.1/KEP-UNJANI/II/2022.

Parasit

Plasmodium berghei ANKA diperoleh dari Laboratorium Malaria, Fakultas Farmasi, Universitas Jenderal Achmad Yani, dan disuntikkan secara intraperitoneal ke mencit Swiss Webster.

Prosedur Penelitian

Inokulasi Parasit dan Persiapan Parasit

P. berghei ANKA beku dicairkan, kemudian sebanyak 200 μ L disuntikkan secara intraperitoneal ke mencit yang sehat. Persen parasitemia diamati dengan pemeriksaan

mikroskopis. Setelah mencit terinfeksi *P. berghei* mencapai tingkat parasitemia lebih dari 10%, mencit tersebut dapat digunakan sebagai donor.

Infeksi ulang pada mencit sehat dilakukan dengan menyuntikkan secara peritoneal sebanyak 200 μ L sel darah merah (10^6) yang terinfeksi parasit (Fidock *et al.*, 2004). Setelah mencit terinfeksi dan menunjukkan gejala neurologis, mencit siap untuk diberikan perlakuan dan pengelompokan.

Pengelompokan Hewan

Mencit dibagi menjadi enam kelompok ($n = 5$ pada setiap kelompok) sebagai berikut: mencit yang tidak terinfeksi sebagai kelompok normal; mencit yang terinfeksi diberikan *hydroxypropyl methylcellulose* (HPMC) 0,5% sebagai kelompok kontrol; mencit yang terinfeksi diberikan klorokuin 20 mg/kg sebagai kelompok pembandingan; mencit yang terinfeksi diberikan resveratrol dosis 25, 50, dan 100 mg/kg sebagai kelompok uji. Perlakuan diberikan secara oral selama empat hari.

Penilaian Parasitemia dan Gejala Neurologis

Darah dari ujung ekor diambil untuk membuat apusan darah tipis, yang kemudian digunakan untuk memeriksa parasitemia setiap hari selama empat hari. Apusan darah difiksasi dengan metanol, diwarnai dengan Giemsa 10% selama 20 menit dan diamati menggunakan mikroskop (Olympus BX-53) perbesaran 1000x dengan minyak imersi. Persen parasitemia dan persen penghambatan parasit dihitung dengan menggunakan rumus berikut:

$$\text{Persen parasitemia} = \frac{\text{jumlah sel darah merah yang terinfeksi}}{\text{jumlah total sel darah merah}} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Persen hambatan} = \frac{\text{rata rata parasitemia kontrol} - \text{rata rata parasitemia kelompok uji}}{\text{rata rata parasitemia kelompok kontrol}} \times 100 \quad (2)$$

Pengamatan gejala neurologis mencit yang mengalami malaria serebral dilakukan dengan menggunakan skoring. Gejala neurologis dinilai dan diberi skor sebagai berikut: 0 = tanpa gejala, 1 = bulu berantakan, 2 = membungkuk, 3 = gaya berjalan goyah, 4 = kelumpuhan anggota badan, 5 = kejang, 6 = koma (Schmidt *et al.*, 2018).

Evaluasi Integritas Sawar Darah Otak

Integritas sawar darah otak dievaluasi sesuai dengan metode yang dijelaskan oleh Schmidt *et al.* dengan beberapa modifikasi. Pada hari ke-4 mencit diinjeksi larutan pewarna *evans blue* (EB) 2% (4 mL/kg) secara intravena dan setelah 1 jam mencit dieuthanasi menggunakan CO₂ dalam wadah tertutup. Mencit dibedah untuk diambil otaknya yang kemudian ditimbang untuk dihitung indeks otak dengan persamaan sebagai berikut:

$$\% \text{ Indeks otak} = \frac{\text{obot otak (g)}}{\text{bobot badan hari ke-4}} \times 100 \quad (3)$$

Otak ditempatkan dalam wadah 4 mL dengan ditambahkan *dimethylformamide* dan diekstravasasi selama 48 jam. Kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 630 nm. Untuk menentukan kadar EB pada otak, hasil absorbansi di plot pada kurva kalibrasi EB (0,625 μ g/mL, 1,25 μ g/mL, 2,5 μ g/mL, 5 μ g/mL, dan 10 μ g/mL).

Analisis Data

Data disajikan sebagai rata-rata \pm standar error dan perbedaan bermakna dinilai dengan ANOVA satu arah menggunakan perangkat lunak GraphPad Prism 8.3. Nilai-P $\leq 0,05$ dianggap signifikan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

MS merupakan komplikasi neurologis yang disebabkan oleh infeksi *P. falciparum* pada manusia. Pengembangan model hewan uji MS sangat diperlukan untuk melengkapi keterbatasan penelitian. Parasit yang biasa digunakan untuk model hewan uji MS adalah *Plasmodium berghei* ANKA yang dapat dengan mudah menginfeksi berbagai galur mencit, seperti CBA atau C57BL/6, ICR, dan Swiss Webster (Hunt *et al.*, 2010). Pada pengujian ini

parameter pengamatan meliputi evaluasi persen parasitemia dan gejala neurologis, indeks otak, dan evaluasi integritas sawar darah otak.

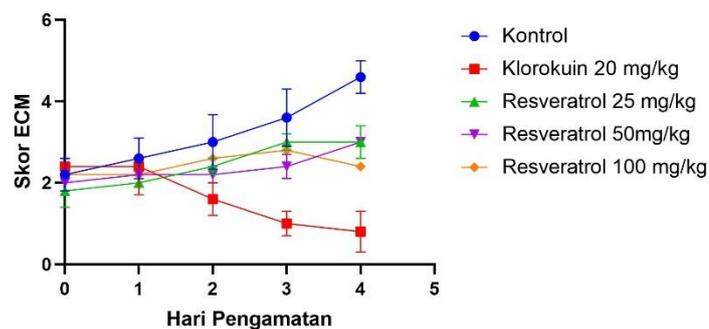
Hasil pertumbuhan parasit pada model hewan uji MS yang diberikan resveratrol disajikan pada **Tabel I**. Hasil menunjukkan persen parasitemia tertinggi ditunjukkan oleh kelompok kontrol, sedangkan persen parasitemia yang paling terendah ditunjukkan oleh kelompok klorokuin. Pada kelompok resveratrol persen parasitemia terendah ditunjukkan oleh resveratrol dosis 100 mg/kg. Persen penghambatan parasit pada resveratrol bergantung kepada peningkatan dosis. Senyawa dengan persentase penghambatan parasit di atas 30% dianggap aktif (*Gorobets et al., 2017*). Temuan kami menunjukkan bahwa resveratrol memiliki persentase penghambatan parasit di atas 30%, sehingga dapat disimpulkan bahwa resveratrol memiliki aktivitas antimalaria. Ini sesuai dengan penelitian sebelumnya bahwa resveratrol memiliki aktivitas antimalaria (*Moon and Sim, 2008; Hermanto et al., 2022*).

Tabel I. Aktivitas Antimalaria Resveratrol Pada Model Hewan Uji MS Di Hari Ke-4.

Kelompok	Parasitemia (%)	Hambatan parasit (%)
Kontrol	68,74±3,61	0.00
Klorokuin 20 mg/kg	0,88 ± 0,76 ^a	98.71
Resveratrol 25 mg/kg	46,30 ± 4,53 ^{ab}	32.64
Resveratrol 50 mg/kg	44,80 ± 5,75 ^{ab}	34.83
Resveratrol 100 mg/kg	41,12 ± 2,61 ^{ab}	40.18

Keterangan : Data ditampilkan sebagai rata-rata ± SEM, n=5, ^a= perbedaan signifikan dibandingkan dengan kontrol (P≤0,05), ^b= perbedaan signifikan dibandingkan dengan klorokuin (P≤0,05), MS = malaria serebral.

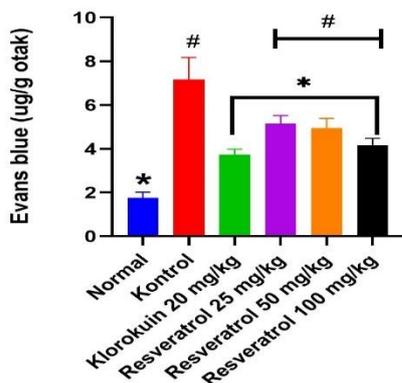
Penilaian skor gejala neurologis pada mencit dengan malaria serebral ditunjukkan pada **Gambar 1**. Kelompok kontrol memiliki skor *experimental cerebral malaria* (ECM) tertinggi, sedangkan skor ECM pada kelompok klorokuin dan resveratrol setiap harinya mengalami penurunan. Penurunan skor ECM pada kelompok klorokuin dan resveratrol berkorelasi dengan peningkatan hambatan parasit yang disebabkan oleh pemberian klorokuin dan resveratrol. Hasil temuan ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan tingkat parasitemia berkorelasi dengan skor ECM, menyebabkan akumulasi sel darah merah yang terinfeksi di otak dan menimbulkan gejala malaria serebral (*Amante et al., 2007*).



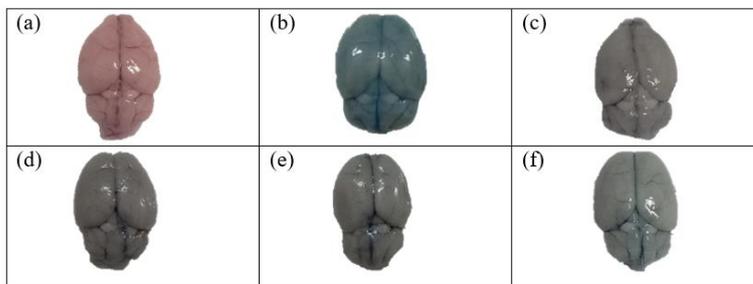
Gambar 1. Hasil Skor ECM Pada Mencit Yang Mengalami Malaria Serebral Setelah Pemberian Resveratrol. Data Ditampilkan Sebagai Rata-rata ± SEM, n=5.

Untuk melihat kerusakan sawar darah otak yang diakibatkan dari infeksi *P. berghei* pada mencit dilakukan analisis dan pengujian dengan menggunakan pewarna EB. Kadar EB yang terdapat dalam otak dibandingkan antar kelompok (**Gambar 2**). Pada kelompok kontrol, klorokuin dan resveratrol menunjukkan kadar EB yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok normal, hal ini dikarenakan mencit yang digunakan adalah mencit yang sakit. Pemberian klorokuin 20 mg/kg dan resveratrol 100 mg/kg menunjukkan kadar EB yang

lebih rendah dan berbeda bermakna dengan kelompok kontrol ($P \leq 0,05$). Intensitas variasi warna pada otak (Tabel II) menunjukkan perbedaan kadar EB. Jika sawar darah otak rusak, memungkinkan EB menembus otak dan intensitas EB yang terdeposit di otak (biru tua) berkorelasi dengan tingkat keparahan malaria serebral (Clark, Hunt and Cowden, 1988). Dalam penelitian ini, otak kelompok kontrol menunjukkan tingkat EB yang lebih tinggi dan intensitas warna yang lebih gelap, ini sejalan dengan penelitian sebelumnya tentang perubahan sawar darah otak pada mencit MS (Basir *et al.*, 2012).

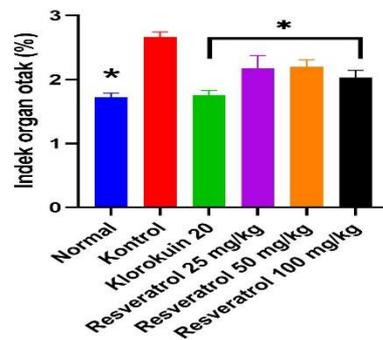


Gambar 2. Evaluasi Integritas Sawar Darah Otak Menggunakan Pewarna EB. Data ditampilkan sebagai rata-rata \pm SEM, $n=5$, * = Perbedaan signifikan dibandingkan dengan kelompok kontrol ($P \leq 0,05$), # = Perbedaan signifikan dibandingkan dengan kelompok normal ($P \leq 0,05$).



Gambar 3. Gambar Otak Utuh Pada Mencit Dengan Malaria Serebral Untuk Menguji Integritas Sawardarah Otak. Keterangan : a) kelompok normal; b) Kontrol; c) klorokuin 20 mg/kg; d) resveratrol 25 mg/kg; e) resveratrol 50 mg/kg; f) resveratrol 100 mg/kg.

Selain itu, edema serebral dapat terjadi akibat kerusakan sawar darah otak. Hal ini ditunjukkan pada organ indeks otak kelompok kontrol yang memiliki nilai tertinggi (Gambar 3). Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa peningkatan permeabilitas sawar darah otak yang disebabkan oleh kerusakan sawar darah otak dikaitkan dengan peningkatan edema otak (Ng *et al.*, 2022). Kelompok yang diberi klorokuin, dan resveratrol menunjukkan kadar EB dan indeks organ yang lebih rendah daripada kelompok kontrol. Selain itu kemungkinan resveratrol dapat mengurangi keparahan pada komplikasi malaria serebral berupa inflamasi melalui aktifitasnya sebagai antiinflamasi, antioksidan, serta dapat menurunkan ekspresi gen yang terlibat dalam inflamasi (Bo *et al.*, 2013; Pinheiro *et al.*, 2019). Pada penelitian berikutnya perlu dilakukan penelitian lanjutan mengenai evaluasi sitokin proinflamasi yang merupakan salah satu faktor berpengaruh pada tingkat keparahan malaria serebral.



Gambar 4. Indeks Masa Otak Mencit Pada Mencit Yang Mengalami Malaria Serebral Setelah Pemberian Resveratrol. Data Ditampilkan Sebagai Rata-rata \pm SEM, $n=5$, $*=P\leq 0,05$ Dibandingkan Dengan Kelompok Kontrol, $*=P\leq 0,05$ Dibandingkan Dengan Kelompok Normal.

KESIMPULAN

Resveratrol dapat mengurangi keparahan malaria serebral pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan cara menghambat pertumbuhan parasit, mencegah kerusakan sawar darah otak, dan udem otak.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Penelitian dan Pengabdian Pada Masyarakat (LPPM) Universitas Jenderal Achmad Yani yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Amante, F. H. (2007) 'A role for natural regulatory T cells in the pathogenesis of experimental cerebral malaria', *American Journal of Pathology*, 171(2), pp. 548–559.
- Basir, R. (2012) 'Plasmodium berghei ANKA infection in ICR mice as a model of cerebral malaria', *Iranian Journal of Parasitology*, 7(4), pp. 62–74.
- Bo, S. *et al.* (2013) 'Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Resveratrol in Healthy Smokers A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Cross-Over Trial', *Current Medicinal Chemistry*, 20(10), pp. 1323–1331.
- Brian De Souza, J. and Riley, E. M. (2002) 'Cerebral malaria: The contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis', *Microbes and Infection*, 4(3), pp. 291–300.
- Clark, I. A., Hunt, N. H. and Cowden, W. B. (1988) 'Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria', *Parasitology*, 96(3), pp. 579–589.
- Fidock, D. A. (2004) 'Antimalarial drug discovery: efficacy models for compound screening.', *Nature reviews. Drug discovery*, 3(6), pp. 509–520.
- Ghazanfari, N., Mueller, S. N. and Heath, W. R. (2018) 'Cerebral malaria in mouse and man', *Frontiers in Immunology*, 9(SEP), pp. 1–11.
- Gorobets, N. Y. *et al.* (2017) 'An Overview of Currently Available Antimalarials', *Current topics in medicinal chemistry*, 17(19).
- Hermanto, F. *et al.* (2022) 'Antiplasmodium Activity and The Effect of Resveratrol on Index Organs of Mice Infected with Plasmodium berghei ANKA', *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 19(1), p. 28.
- Hora, R. *et al.* (2016) 'Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis', *Metabolic Brain Disease*, 31(2), pp. 225–237.
- Hunt, N. H. *et al.* (2010) 'Murine cerebral malaria: the whole story', *Trends in parasitology*, 26(6), pp. 272–274.
- Kaur, K. *et al.* (2009) 'Antimalarials from nature.', *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(9), pp. 3229–3256.

- Moon, H. I. and Sim, J. (2008) 'Antimalarial activity in mice of resveratrol derivative from *Pleuropterus ciliinervis*', *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 102(5), pp. 447–450.
- Ng, F. C. *et al.* (2022) 'Microvascular Dysfunction in Blood-Brain Barrier Disruption and Hypoperfusion Within the Infarct Posttreatment Are Associated with Cerebral Edema', *Stroke*, 53(5), pp. 1597–1605.
- O'Neill, P. M. *et al.* (2012) 'Antimalarial natural products: a review.', *Avicenna journal of phytomedicine*, 2(2), pp. 52–62.
- Pinheiro, D. M. L. *et al.* (2019) 'Resveratrol decreases the expression of genes involved in inflammation through transcriptional regulation', *Free Radical Biology and Medicine*, 130, pp. 8–22.
- Schmidt, K. E. *et al.* (2018) 'Doxycycline inhibits experimental cerebral malaria by reducing inflammatory immune reactions and tissue-degrading mediators', *PLoS ONE*, 13(2), pp. 1–20.
- Shaito, A. *et al.* (2020) 'Potential adverse effects of resveratrol: A literature review', *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG. doi: 10.3390/ijms21062084.
- World Health Organization (2021) World Malaria Report 2021, 13(4), pp.15-38.

