

Efek Pemberian Kombinasi Artesunat Dengan Ekstrak Methanol Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) terhadap Ekspresi HSP70 Pada Jaringan Limpa Mencit Yang Diinfeksi Oleh *Plasmodium berghei*

Loeki Enggar Fitri*, Titik Cinthia Dewi**, Muhammad Reza Insanfadhil***

* Mahasiswa Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

** Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Brotowali (*Tinospora crispa*), dengan berbagai bahan aktif yang dikandungnya, seperti *berberin*, *palmatin* dan *tinokrisposid* diketahui memiliki aktivitas antimalaria dan antiinflamasi. Diharapkan dengan pemberian kombinasi ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) dan artesunat, maka respon inflamasi dan produksi radikal bebas yang berlebihan akibat infeksi malaria dapat dikendalikan. Sehingga proses pembesaran limpa dan peningkatan jumlah HSP70 dalam tubuh dapat dicegah. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan efek pemberian ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) terhadap ekspresi *Heat Shock Protein 70* (HSP70) jaringan limpa mencit yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* dan mendapatkan terapi artesunat injeksi. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan desain penelitian *post test only control group design*. Mencit penelitian dikelompokkan menjadi 6 kelompok, yaitu kontrol negatif, kontrol positif tanpa perlakuan, kelompok kombinasi artesunat dan ekstrak brotowali 50, 60, 70 mg/hari. Perlakuan dilakukan selama 14 hari. Gambaran ekspresi HSP70 dari jaringan limpa diperiksa secara imunohistokimia. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) memiliki potensi menurunkan ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dengan potensi efektif pada dosis 70 mg/hari dikombinasi dengan artesunat. Semakin tinggi dosis ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) semakin rendah ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. (P= 0,000 ; R= 0,900)

Kata kunci: Malaria, *Plasmodium berghei*, Artesunat, Batang Brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers), HSP70, Limpa,

ABSTRACT

Brotowali (*Tinospora crispa*), contain variety of active ingredients, such as *berberine*, *palmatin* and *tinokrisposid* known to have anti-malarial and anti-inflammatory activity. It is expected by administering a combination of extracts brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) and artesunate, the excessive inflammatory response and excessive production of free radicals as a result of malaria infection can be controlled. So that hypertrophy of the spleen and increase the amount of HSP70 in the body can be prevented. The goal of researchers was to prove the effect of methanol stem brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) extract on reducing the expression of *heat shock protein 70* (HSP70) spleen tissue of mice infected by *Plasmodium berghei* and artesunate injection therapy. This research was an experimental study with *post test only control group design*. Mice were grouped randomly into 6 groups, namely the negative control, positive control without treatment, the group treated with the extract brotowali 70 mg/day, and the group treated with administration of artesunate and extract brotowali 50, 60, 70 mg/day. The treatment was done for 14 days. Dependent variable was the HSP70 expression of tissue observed by immunohistochemistry. The results showed that methanol brotowali stem (*Tinospora crispa* (L) Miers) extract had the potential to reduce HSP70 expression in spleen tissue of mice infected by *Plasmodium berghei* and it was effective at a dose of 70 mg in combination with artesunate. The higher doses of methanol brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) stem extract, the lower the expression of HSP70 in spleen tissue of mice infected by *Plasmodium berghei*. (P= 0,000 ; R= 0,900)

Keywords: Malaria, *Plasmodium berghei*, Artesunat, Brotowali stem (*Tinospora crispa* (L) Miers), HSP70, Spleen

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh parasit dari genus *Plasmodium* dan ditularkan ke manusia melalui gigitan nyamuk Anopheles. Penyakit ini masih merupakan infeksi parasitik paling banyak di dunia, diperkirakan terdapat lebih dari 500 juta kasus malaria pertahun dengan 3 juta kematian. Prevalensi dan angka mortalitas di Indonesia masih tinggi terutama di daerah luar Jawa dan Bali. Kematian karena malaria terutama disebabkan oleh infeksi *Plasmodium falciparum* dengan berbagai komplikasinya, terutama pada anak-anak, wanita hamil, dan individu yang tidak memiliki kekebalan¹.

Limpa adalah organ yang berfungsi sebagai tempat pembuangan sel darah merah tua dan sebagai tempat penyimpanan darah serta trombosit. Limpa juga membersihkan bakteri dan penting untuk fungsi kekebalan tubuh, terutama dalam memerangi bakteri. Penyakit yang berhubungan dengan gangguan fungsi limpa termasuk malaria².

Heat Shock Protein 70 (HSP70) adalah *ATP-dependent molecul chaperone* yang mengatur fungsi sel yang beragam, termasuk melipat dan merakit protein yang baru disintesis, melipat protein yang gagal melipat, transportasi protein melalui membran intraseluler dan menjaga homeostasis protein dalam sel¹². Terdapat beberapa alasan mengapa penelitian HSP pada parasit malaria adalah hal yang sangat penting. Genome *P. falciparum* mengandung urutan gen (sekuens) yang meng-kode 6 HSP70 dan 43 HSP40. Jumlah besar dari HSP70 dan HSP40 pada parasit ini menimbulkan dugaan bahwa *chaperon* mungkin penting untuk ketahanan hidup parasit. Selain itu, gambaran dari siklus hidup parasit memberikan dugaan adanya kebutuhan yang sangat terhadap fungsi *chaperon*, terutama HSP70 dan HSP40³.

Terapi kombinasi artemisinin (ACT) saat ini dianjurkan untuk pengobatan malaria *Plasmodium falciparum* tanpa komplikasi oleh Organisasi Kesehatan Dunia dan telah diadopsi sebagai terapi lini pertama di sebagian besar negara endemis malaria⁴. Artemisinin termasuk ke dalam kelompok senyawa seskuiterpen lakton, bukan alkaloid atau amina seperti pada kuinin. Struktur molekul artemisinin mengandung jembatan peroksida, diyakini ampuh pada kerja obat dan dapat menginduksi stres oksidatif. Obat artemisinin diketahui bekerja secara spesifik pada tahap eritrositik⁵.

Brotowali banyak mengandung alkaloid, damar lunak, pati, glikosida pikroretosid, zat pahit pikroretin, harsa, berberin, palmatin dan kolumbin. Masyarakat Indonesia secara turun-temurun menggunakan tanaman brotowali untuk pengobatan rematik artritis, rematik sendi pinggul (*sciatica*), memar, demam, merangsang nafsu makan, demam kuning, kencing manis dan malaria⁶.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk membuktikan bahwa pemberian kombinasi ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) lebih menurunkan ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang diinfeksi oleh *Plasmodium berghei* daripada yang mendapatkan terapi ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) saja.

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental secara *in vivo* dengan desain penelitian *post test only control group*. Penelitian ini menggunakan parasit

Plasmodium berghei didapatkan dari Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Hewan uji yang dipakai adalah mencit galur C57BL/6J berjenis kelamin betina yang diperoleh dari Institut Eijkman Jakarta. Penelitian tersebut dilakukan setelah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Jumlah perlakuan pada penelitian ini adalah sebanyak 6 kelompok perlakuan masing masing menggunakan 3 ekor mencit. Pembagian kelompoknya adalah sebagai berikut:

1. Kelompok Kontrol negatif (K-) = Tidak diberikan perlakuan apapun
2. Kelompok Kontrol positif (K+) = kelompok mencit yang diinjeksi malaria tanpa diberikan ekstrak batang brotowali (*Tinospora crispera* (L) Miers) maupun injeksi artesunat
3. Kelompok Brotowali (Br) = Kelompok mencit yang diterapi ekstrak ethanol batang brotowali (*Tinospora crispera* (L) Miers) 70 mg/hari tanpa diinjeksi artesunat selama 14 hari
4. Kelompok Perlakuan DI = Kelompok mencit yang diterapi artesunat 32 mg/kgbb/hari dan ekstrak brotowali dosis 50 mg/hari selama 14 hari
5. Kelompok Perlakuan DII = Kelompok mencit yang diterapi artesunat 32 mg/kgbb/hari dan ekstrak brotowali dosis 60 mg/hari selama 14 hari
6. Kelompok Perlakuan DIII = Kelompok mencit yang diterapi artesunat 32 mg/kgbb/hari dan ekstrak brotowali dosis 70 mg/hari selama 14 hari

Prosedur penelitian:

Derajat parasitemia diperiksa melalui sediaan apus darah tipis dari ujung ekor mencit kemudian ditetaskan pada gelas obyek, diapus dengan gelas obyek yang lain, dikeringkan pada suhu kamar. Slide digenangi giemsa ± 45 menit, dicuci pada air mengalir, dikeringkan

pada suhu kamar dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 1000X dengan minyak emersi. Pemeriksaan pada lapangan pandang dengan susunan tidak menumpuk, dihitung eritrosit terinfeksi parasit per 1000 eritrosit.

1. Inokulasi *Plasmodium berghei* dengan menggunakan spuit dan jaum insulin 27 ½ G diambil bahan inokulan sebanyak 0,2 ml. Mencit yang akan diinokulasi dipegang tengkuk dan ekornya menggunakan ibu jari dan jari telunjuk (posisi tangan seperti menggenggam) dengan erat diposisikan dengan peritoneum mencit menghadap ke arah praktikan. Bagian mencit yang akan diinokulasi diolesi alkohol 70% Bahan inokulan disuntikkan intraperitoneal ke mencit. Masing- masing mencit disuntik bahan inokulasi sebanyak 0,2 ml. Menekan bagian peritoneum mencit pada tempat inokulasi dengan menggunakan kapas alkohol dan kemudian secara perlahan – lahan spuit dan jarum dicabut.
2. Pada pengambilan sampel jaringan, mencit dibunuh pada hari ke-14 dengan menggunakan ketamin perinhalasi. Organ limpa diisolasi dan direndam dalam larutan formalin 10% dalam tabung bekas film foto yang sudah diberi label.
3. Organ limpa yang telah difiksasi dengan formalin 10% diletakkan dalam kaset kemudian kaset yang berisi jaringan didehidrasi dengan direndam dalam alkohol bertingkat konsentrasi 30%, 50%, 70%, 85%, 95% , dan dua kali alkohol absolut, masing-masing 30 menit. Kemudian dilakukan clearing dengan xilol 2 kali selama 1 jam. Selanjutnya dilakukan infiltrasi dengan parafin lunak pada suhu 42-46°C selama 1 jam sebanyak 2 kali. Kemudian dilakukan blocking dengan parafin keras pada cetakan dan didiamkan selama sehari pada suhu 46-

52°C. Irisan dengan ketebalan 6 µm dibuat dengan menggunakan cryostat, ditempatkan pada obyek gelas (*glass-slide*) dan selanjutnya dikering-anginkan selama 30 menit. Slide selanjutnya dibungkus dalam aluminium foil dan ditempatkan dalam freezer untuk disimpan pada suhu -80°C sampai dilakukan proses lebih lanjut. Sebelum dilakukan pewarnaan, *slide-glass* dicairkan (*thawed*) selama 30 menit dan difiksasi dalam aseton pada suhu ruangan selama 10 menit. Selanjutnya direhidrasi dalam TBS (Tris buffered saline, 50 mM TRIS, 145 mM NaCl pH 7.6) selama 5 menit. Slide di proses untuk prosedur imunohistokimia lebih lanjut.

4. Pada prosedur imunohistokimia HSP70 dilakukan deparfinasi setelah itu diberikan antigen retrieval dengan buffer sitrat selama ± 20 menit, lalu dilakukan imunohistokimia dengan meneteskan antibodi primer (HSP70) pada hari pertama, dan antibodi sekunder pada hari kedua. Setelah itu dikeringkan dan dilihat dibawah mikroskop.

HASIL PENELITIAN

Melalui penelitian ini dilakukan pengujian potensi ekstrak methanol batang brotowali (*Tinosporacrispa (L) Miers*) sebagai terapi kombinasi terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit yang sudah diinjeksi artesunat. Dosis dari ekstrak methanol batang brotowali (*Tinosporacrispa (L) Miers*) yang digunakan adalah sebesar 50 mg, 60 mg, dan 70 mg perhari, sedangkan dosis artesunat sebesar 32 mg/kg/bb/hari. Hasil penelitian adalah sebagai tertera pada tabel berikut:

Tabel 1. Ekspresi HSP70 Pada Jaringan Limpa Mencit

Kelompok	Ekspresi HSP70 (Σ/10 Lapang Pandang)				Ekspresi HSP70 (Σ/10LP)
	R1	R2	R3	Skor Total	
K+	12	14	19	463	154.33 ± 35.64
Br	5	4	4	264	88.00 ± 5.57
D1	82	89	93	150	50.00 ± 8.19
D2	52	41	57	132	44.00 ± 5.00
D3	39	44	49	128	42.67 ± 4.16
K-	46	38	44	45	15.00 ± 6.24

Keterangan:

Kelompok K+ = Kontrol positif

Kelompok K- = Kontrol negatif

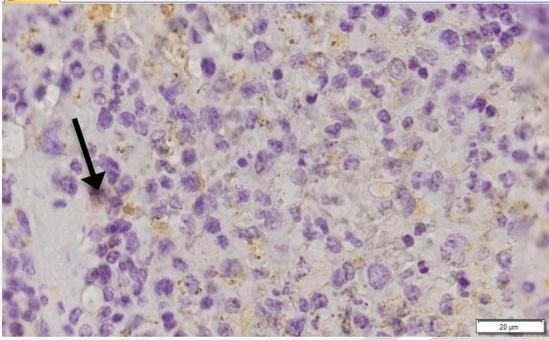
Kelompok Br = Brotowali 70 mg/hari

Kelompok D1 = Artesunat 32 mg/kgbb/hari + brotowali 50 mg/hari

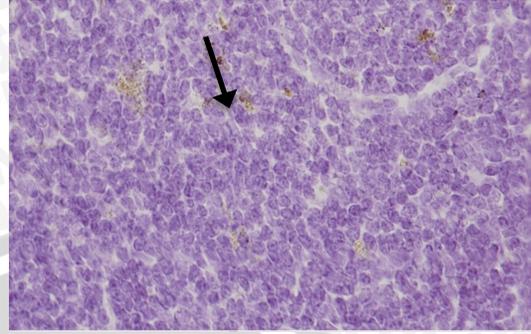
Kelompok D2 = Artesunat 32 mg/kgbb/hari + brotowali 60 mg/hari

Kelompok D3 = Artesunat 32 mg/kgbb/hari + brotowali 70 mg/hari

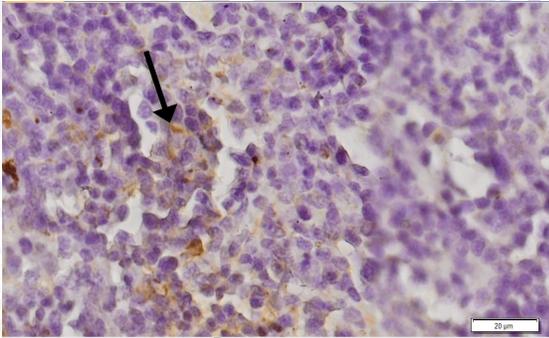
Berdasarkan tabel di atas, terlihat bahwa perbedaan perlakuan akan memberikan pengaruh yang berbeda terhadap pengurangan jumlah ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang di infeksi *P. berghei*. Jumlah ekspresi HSP70 terlihat dalam jumlah besar pada kontrol positif, sedangkan pada kontrol negatif ekspresi HSP70 hanya terlihat sedikit. Pada mencit yang diberikan ekstrak brotowali (*Tinosporacrispa (L) Miers*) saja tanpa artesunat didapatkan pengurangan ekspresi dari HSP70, pengurangan tersebut tidak sebanyak pengurangan pada terapi kombinasi dengan artesunat. Penurunan ekspresi HSP70 yang signifikan terlihat pada limpa mencit yang diinfeksi oleh *P. berghei* setelah diberikan ekstrak methanol batang brotowali (*Tinosporacrispa (L) Miers*) dosis 70 mg bersama dengan pemberian artesunat.



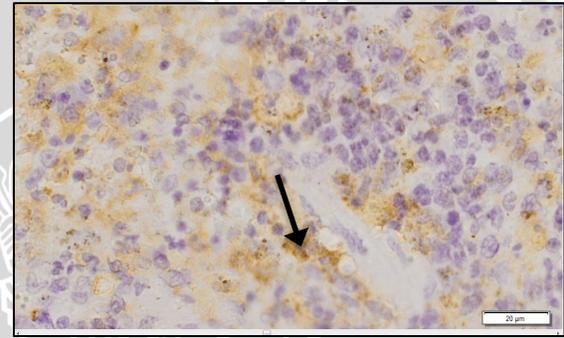
Gambar 1. Perhitungan ekspresi HSP70 dengan perbesaran 400x pada kelompok kontrol brotowali 70 mg/hari. Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi HSP70



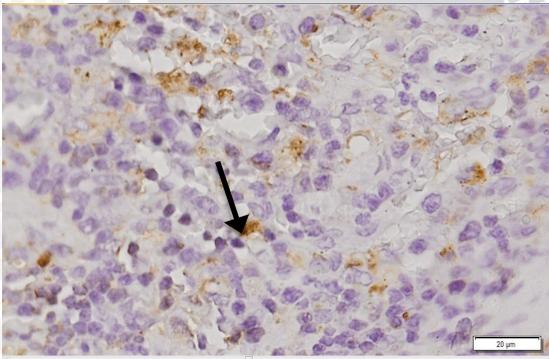
Gambar 4. Perhitungan ekspresi HSP70 dengan perbesaran 400x pada kelompok D3= Artesunat 32 mg/kgbb/hari + brotowali 70 mg/hari. Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi HSP70.



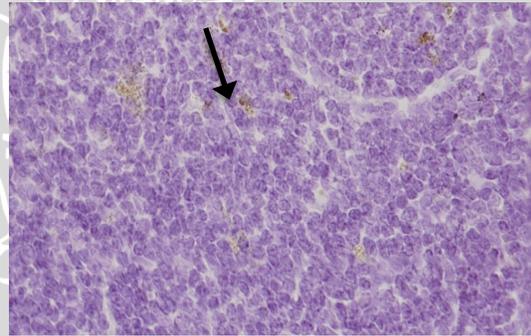
Gambar 2. Perhitungan ekspresi HSP70 dengan perbesaran 400x pada kelompok D1= Artesunat 32 mg/kgbb/hari + brotowali 50 mg/hari. Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi HSP70.



Gambar 5. Perhitungan ekspresi HSP70 dengan perbesaran 400x pada kelompok kontrol positif. Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi HSP70.



Gambar 3. Perhitungan ekspresi HSP70 dengan perbesaran 400x pada kelompok D2= Artesunat 32 mg/kgbb/hari + brotowali 60 mg/hari. Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi HSP70.



Gambar 6. Perhitungan ekspresi HSP70 dengan perbesaran 400x pada kelompok kontrol negatif. Tanda panah hitam menunjukkan ekspresi HSP70.

ANALISA DATA

Sebelum dilakukan pengujian dengan menggunakan ANOVA, data yang diperoleh untuk setiap perlakuan dianalisa kehomogenanragamnya dengan menggunakan uji *homogeneity of variance* (uji levene) dengan tujuan untuk mengetahui apakah data yang digunakan mempunyai ragam yang sama.

Pada hasil pengujian menunjukkan nilai dari levene test untuk HSP70 sebesar 2,999 dengan nilai signifikansi sebesar 0,055. dimana parameter memiliki nilai signifikansi yang lebih besar dari alpha 0,05. Oleh karena nilai 0,055, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai ragam yang homogen.

Selain uji kehomogenanragam juga dilakukan pengujian normalitas data untu mengetahui apakah data yang diuji mempunyai distribusi yang normal atau tidak dengan menggunakan uji *Kolmogorof Smirnof test*. Dari hasil pengujian normalitas menunjukkan nilai dari *Kolmogorof Smirnof test* dengan nilai signifikansi (p) untuk HSP70 sebesar 0,735. Oleh karena nilai $p > 0,735$, maka H_0 diterima dan dapat disimpulkan bahwa data yang digunakan mempunyai distribusi yang tersebar dengan normal. Dengan demikian pengujian dengan menggunakan ANOVA dapat dilanjutkan karena kedua asumsi sudah terpenuhi.

Untuk mengetahui apakah ada perbedaan yang bermakna di antara perlakuan, maka dilakukan analisis dengan menggunakan ANOVA. Berdasarkan pada hasil analisis ANOVA didapatkan bahwa nilai sig. F untuk HSP70 untuk kelompok sebesar 0.001. Karena untuk parameter HSP70 mempunyai nilai 0,01, maka H_0 ditolak, yang berarti bahwa terdapat perbedaan pengaruh yang signifikan antara perlakuan pada tingkat kesalahan 5%.

Setelah dilakukan Uji ANOVA, dilanjutkan dengan uji post hoc dengan

menggunakan metode *tukey* untuk mengetahui perbedaan antara kelompok.

Tabel 2. Uji Tukey atau Post Hoc test

Imunohistopatologi Jaringan Spleen

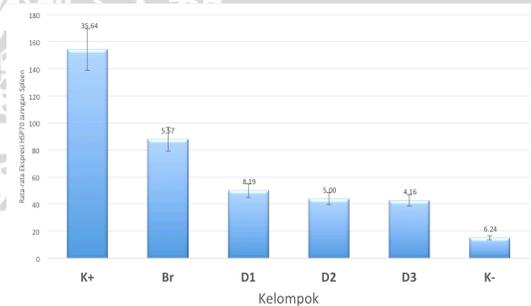
Tukey HSD^a

Kelompok	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
K-	3	3.8077			
D3	3		6.5263		
D2	3		6.6260		
D1	3		7.0547		
BR	3			9.3777	
K+	3				12.3693
Sig.		1.000	.950	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Adanya perbedaan kelompok perlakuan ditunjukkan jika perlakuan memiliki rata-rata yang terletak pada kolom berbeda. Kelompok BR memiliki perbedaan yang signifikan dengan kelompok D1, D2 dan D3. Namun untuk kelompok D1 memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan D2 dan D3 karena terletak pada kolom yang sama.



Grafik 1. Rerata Ekspresi HSP70 Jaringan Limpa pada semua kelompok. Notasi huruf yang berbeda menunjukkan perbedaan yang signifikan

Berdasarkan uji korelasi *product moment* didapat koefisien korelasi yang menunjukkan besarnya hubungan antara variabel Dosis dan ekspresi HSP70 pada jaringan limpa, nilai R (koefisien korelasi) sebesar -0,900. Nilai korelasi ini menunjukkan bahwa hubungan antara variabel dosis dan ekspresi HSP70 pada jaringan limpa termasuk kategori sangat kuat karena berada pada selang 0,8 – 1,0. Hubungan arah yang negatif menunjukkan jika semakin tinggi dosis maka akan diikuti penurunan ekspresi HSP70. Korelasi antara dosis dan ekspresi HSP70

memiliki nilai p sebesar 0,00 sehingga memiliki hubungan yang bermakna.

PEMBAHASAN

Artemisinin merupakan suatu *free radical generating antimalaria* karena merupakan senyawa endoperoksida siklik (*sesquiterpene endoperoxide*) yang akan mengoksidasi heme membentuk radikal bebas sehingga mencegah polimerisasi heme lebih lanjut menjadi hemozoin yang tidak toksik. Radikal bebas yang terbentuk ini akan merusak membran plasma parasit dan mengganggu enzim parasit sehingga menimbulkan kematian parasit tersebut⁷.

Overproduksi radikal bebas pada infeksi malaria menyebabkan keadaan stres oksidatif⁸. Stres oksidatif menyebabkan sekresi zat inflamasi seperti *tumour necrosis factor- α* (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), interferon- γ (IFN- γ). Zat-zat inflamasi ini dapat mengaktifkan jalur transduksi sinyal yang beragam termasuk menyebabkan peningkatan ekspresi HSP70⁸.

Heat Shock Protein 70 merupakan suatu protein yang terbentuk akibat adanya pemicu stres, terutama yang berasal dari radikal bebas. Semua organisme yang hidup bereaksi terhadap radikal bebas. Keadaan ini akan menginduksi pembentukan HSP70. Reaksi ini disebut sebagai *heat shock respon* (HSR). Respon ini merupakan mekanisme utama untuk melindungi sel terhadap berbagai pemicu stres pada organisme tersebut. HSP70 bekerja sebagai *chaperon*, suatu fungsi yang mengatur pelipatan kembali (*refolding*) protein-protein secara benar akibat pemicu stres, sehingga dapat melindungi kerusakan sel akibat perubahan fisiologis, patologis, dan lingkungan yang abnormal⁹.

Peningkatan ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diakibatkan oleh adanya stres oksidatif yang disebabkan oleh

meningkatnya radikal bebas pada infeksi penyakit malaria. HSP70 adalah molekul protein yang berperan mempertahankan homeostasis struktur dan fungsi sel keadaan normal maupun pada situasi stres. HSP70 mempunyai efek anti apoptosis, memperbaiki sel yang rusak agar bisa normal kembali¹⁰.

Dari hasil penelitian ini didapatkan bahwa ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crispa* (L.) Miers) yang digunakan sebagai terapi adjuvant artesunat dapat menurunkan ekspresi HSP70 pada limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dengan sehingga menurunkan stres oksidatif yang menyebabkan meningkatnya ekspresi HSP70. Ekstrak methanol batang brotowali aktif sebagai antioksidan sehingga dapat mengurangi unsur radikal bebas yang disebabkan oleh efek samping dari Artesunat¹¹. Tanaman brotowali memiliki senyawa anti oksidan yang berguna untuk mengurangi stres oksidatif sehingga dapat menurunkan ekspresi HSP70 pada limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*¹¹.

Penelitian ini mengamati ekspresi HSP70 di limpa. Hal tersebut karena salah satu gejala dari malaria adalah splenomegali atau perbesaran dari limpa. Penyebab dari splenomegali karena adanya suatu peningkatan pada jumlah eritrosit yang mengalami infeksi parasit sehingga akan terjadi suatu aktivasi pada *reticuloendothelial system* (RES) untuk bisa memfagositosis eritrosit baik yang mengalami infeksi parasit maupun tidak. Hal ini disebabkan oleh hematopoiesis ekstramedular yang mungkin terbentuk untuk mengisi kembali darah yang hilang oleh inflamasi kronik yang disebabkan oleh infeksi *Plasmodium berghei*. Selain itu, radikal bebas yang mengalir di dalam darah akan merangsang limpa untuk melakukan fungsinya, salah satunya dengan mengeluarkan respon antibodi. Infeksi *Plasmodium berghei* mengakibatkan inflamasi kronik yang dapat menyebabkan pembesaran limpa atau splenomegali¹³

KESIMPULAN

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa

1. Ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crisper* L. Miers) memiliki potensi menurunkan ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dengan potensi efektif pada dosis 70mg dikombinasi dengan artesunat.
2. Semakin tinggi dosis ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crisper* (L) miers) semakin rendah ekspresi HSP70 pada jaringan limpa mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang manfaat ekstrak batang brotowali (*Tinospora crisper* (L) miers) sebagai efek anti malaria terutama tentang zat aktif yang paling berpengaruh dan efek toksik pada uji klinis.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang efek lama penyimpanan ekstrak methanol batang brotowali (*Tinospora crisper* (L) miers) sebagai anti malaria dan pengaruh toksisitasnya terhadap manusia.

DAFTAR PUSTAKA

1. Dwithania, M., Irawati, N., Rasyid, R. 2013, 'Insiden malaria di puskesmas sungai durian dan puskesmas kalawi kota Sawahlunto bulan Oktober 2011 sampai Februari 2012', *Jurnal Kesehatan Andalas*, 2(2): 76-79
2. Brender, E 2005, 'The spleen', *The Journal of the American Medical Association*, 294, (20): 1-3
3. Bell, S., Chiang, AN., Brodsky, JL. 2011, 'Expression of a malarial Hsp70 improves defects in chaperone-dependent activities in ssal mutant yeast', *Plos One*, 6(5): 1-10
4. Bigira, V., Kapsi, J., Clark TD., Kinara, S., Mwangwa, F., Muhindo, MK., Osterbauer, B., Aweeka, FT., Huang, L., Achan, J., Havlir, DV., Rosenthal, PJ., Kanya, MR., Dorsey, G. 2014. 'Protective Efficacy and Safety of Three Antimalarial Regimens for the Prevention of Malaria in Young Ugandan Children: A Randomized Controlled Trial', *Plos One Medicine Journal*, 1371(10): 1-10
5. Simamora, D., Fitri, LE. 2007, 'Resistensi obat malaria: mekanisme dan peran obat kombinasi obat antimalaria untuk mencegah', *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23(2): 82-91
6. Suryawati, S. 2007, 'Efek antimalaria ekstrak brotowali (*Tinospora crisper*) pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*', *Wijaya Kusuma*, 1(1): 13-22
7. Tjahjani, S. 2009, 'Peningkatan radikal bebas pada eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium falciparum*', *Jurnal Kesehatan Masyarakat Universitas Kristen Maranatha Bandung*, 167-173
8. Armiyanti, Y., Fitri, LE., Widjajanto. 2007. 'Pengaruh Pemberian Minyak Buah Merah (*Pandanus conoideus*) Terhadap Stres Oksidatif Sel Endotel Yang Dipapar Dengan Serum Penderita Malaria Falciparum Dan Netrofil Individu Sehat', *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, 23: 6-14
9. Isa, M., Rinidar., Sugito. 2012. 'Aktivitas antiplasmodium daun sernai (*Wedelia Biflora*) berdasarkan evaluasi fungsi ginjal dan hati pada mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*', *Jurnal Veteriner*, 13(2): 167-175
10. Subakir, S., Santosa DIS., Arleni. 2008. 'Kadar MDA dan Hsp 70 pada plasenta penderita preeklampsia', *Makara Kesehatan*, 12,(2): 92-94

11. Irianti, T., Puspitasari, A., Suryani, E., 2011. 'Aktivitas penangkapan radikal 2,2-difenil-1-pikirilhidrazil oleh ekstraktanolik batang brotowali (*Tinospora crispa* (L) Miers) dan fraksi-fraksinya', *Majalah Obat Tradisional*, 16(3): 138-144
12. Adam, C., Baeurle, A., Brodsky, JL., Wipf, P., Schrama, D., Becker, JC., Houben, R. 2014. 'The HSP70 modulator MAL3-101 inhibits merkel cell carcinoma'. *Plos One*, 9(4): 1-7
13. Meira, L., Bugni, J., Green, S., Wei Lee, C., Pang, B., Borenshtein, D., Rickman, B., Rogers, A., Moroski-Erkul, C., McFaline, J., Schauer, D., Dedon, P., Fox, J., Samson, L. 2008. 'DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice', *The Journal of Clinical Investigation*, 118(7): 2516-2525

