



**UJI AKTIVITAS FRAKSI DIKLOROMETANA EKSTRAK METANOL
BANGLE (*Zingiber cassumunar* Roxb.) SEBAGAI TERAPI
KOMPLEMENTER MALARIA SECARA *IN VIVO***

SKRIPSI

Oleh

Edda Rachmadenawanti

122010101018

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS JEMBER

2015



**UJI AKTIVITAS FRAKSI DIKLOROMETANA EKSTRAK METANOL
BANGLE (*Zingiber cassumunar* Roxb.) SEBAGAI TERAPI
KOMPLEMENTER MALARIA SECARA *IN VIVO***

SKRIPSI

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran (S1) dan mencapai gelar Sarjana

Oleh

Edda Rachmadenawanti

122010101018

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2015

PERSEMBAHAN

Dengan segala ketulusan skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat, hidayah, anugrah, dan kesempatan yang diberikan kepada saya;
2. Nabi Muhammad SAW sebagai junjungan dan tauladan;
3. Orang tua saya tercinta, Ayah Edi Suswanto dan Mama Faridha Isnaini yang selalu memberikan bimbingan, kasih sayang, dan do'a tiada henti, serta pengorbanan yang dilakukan setiap waktu;
4. Adik kandung saya Vicky Satria Brammaysta yang selalu memberikan saya semangat yang memotivasi saya;
5. Keluarga besar Sastromihardjo dan Keluarga besar Abu Bakar yang selalu memberikan dukungan untuk saya;
6. Para guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi yang telah memberikan ilmu dan mendidik saya dengan penuh kesabaran untuk menjadikan manusia yang berilmu dan bertakwa;
7. Keluarga besar angkatan 2012 Panacea Fakultas Kedokteran Universitas Jember
8. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

Bertakwalah pada Allah maka Allah akan mengajarimu. Sesungguhnya Allah Maha Mengetahui segala sesuatu.
(terjemahan Surat *Al Baqarah* ayat 282) ^{*)}

^{*)} Departemen Agama Republik Indonesia. 2005. *Al-Quran dan Terjemahannya*. Bandung: PT Sygma

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Edda Rachmadenawanti

NIM :122010101018

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In Vivo*” adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali dalam pengutipan substansi yang sudah disebutkan sumbernya, dan belum pernah diajukan pada institusi manapun, serta bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa adanya tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember,03 Desember 2015

Yang menyatakan,

Edda Rachmadenawanti

NIM.122010101018

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS FRAKSI DIKLOROMETANA EKSTRAK METANOL
BANGLE (*Zingiber cassumunar* Roxb.) SEBAGAI TERAPI
KOMPLEMENTER MALARIA SECARA *IN VIVO***

Oleh

Edda Rachmadenawanti

NIM 122010101018

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Yuli Hermansyah, Sp. PD

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In Vivo*” telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Jumat, 11 Desember 2015

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji

Penguji I,

Penguji II,

Dr.rer.biol.hum.dr.Erma Sulistyaningsih,M.Si
NIP 197702222002122001

dr. Rena Normasari, M.Biomed
NIP 198305122008122002

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed
NIP 198304052008121001

dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD
NIP 196607111996011001

Mengesahkan
Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In Vivo*; Edda Rachmadenawanti, 122010101018; 78 halaman; 2015; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

World Malaria Report melaporkan bahwa kasus malaria telah mengancam 40% populasi dunia dan terjadi di enam regio dengan 97 negara endemik malaria. Pada tahun 2004–2006 kasus malaria di Indonesia menurun drastis, tetapi pada tahun 2006–2009 kasus malaria meningkat dua kali lipat. Stratifikasi malaria tertinggi pada tahun 2012 adalah wilayah Indonesia bagian timur. Resistensi obat antimalaria seperti ACT (*Artemisinin Combination Therapy*) terjadi di Thailand-Kamboja, Asia Tenggara. Pada penelitian ini dikembangkan terapi komplementer yang dapat digunakan untuk mengobati malaria, yaitu bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Kandungan bioaktif ditemukan pada bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah *curcumin*, *phenylbutanoid compound*, flavonoid, alkaloid, tanin, dan saponin. Fraksinasi lebih lanjut terhadap senyawa dalam ekstrak kasar metanol tersebut dilakukan untuk memperoleh senyawa yang lebih murni sesuai sifat kepolarannya sehingga dapat memperjelas pengaruhnya pada uji aktivitas yang dilakukan. Pelarut yang digunakan pada fraksinasi ini adalah diklorometana, karena dapat melarutkan senyawa bersifat semi polar pada bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.).

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eksperimental laboratoris (*True experimental design*). Penelitian ini menggunakan desain *Randomized Posttest Only Control Design*. Populasi dari penelitian adalah mencit jantan galur Balb/C. Jumlah sampel penelitian sebanyak 28 ekor yang dibagi menjadi tujuh kelompok. Kelompok pertama merupakan kelompok kontrol positif diberi terapi standar malaria

(dihidroartemisinin, piperaquin, dan primakuin). Kelompok kedua merupakan kelompok kontrol negatif tanpa perlakuan, dan lima kelompok lainnya merupakan kelompok perlakuan, yaitu diberi terapi standar malaria dan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045 mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

Data yang diambil berupa persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Hasil persentase penghambatan yang didapatkan pada kelompok kontrol positif adalah $24,74 \pm 0,87$ dan kelompok kontrol negatif adalah $0,00 \pm 0,00$. Persentase penghambatan pada kelompok perlakuan dengan dosis 0,005625 mg/grBB adalah $44,40 \pm 4,64$, kelompok perlakuan dengan dosis 0,01125 mg/grBB adalah $55,16 \pm 6,56$, kelompok perlakuan dengan dosis 0,0225 mg/grBB adalah $69,96 \pm 1,10$, kelompok perlakuan dengan dosis 0,045 mg/grBB adalah $79,52 \pm 4,23$, dan kelompok perlakuan dengan dosis 0,09 mg/grBB adalah $88,19 \pm 2,77$. Pada kelompok kontrol negatif tidak dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*, sedangkan pada kelompok perlakuan dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* lebih baik daripada kelompok kontrol positif.

Data persentase penghambatan dilakukan uji normalitas dengan menggunakan Shapiro-wilk menunjukkan keseluruhan kelompok dosis dalam penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* menunjukkan nilai signifikansi $>0,05$, yaitu setiap kelompok terdistribusi normal. Hasil uji korelasi Pearson juga menunjukkan angka koefisien korelasi pearson sebesar 0,880 artinya korelasinya sangat kuat, karena mendekati angka satu. Hubungan kedua variabel signifikan karena angka signifikansi $< 0,01$, yaitu memiliki hubungan dua arah (*two-tailed*) dengan arah korelasi kedua variabel adalah positif. Hal tersebut menunjukkan bahwa korelasi kedua variabel bersifat searah, yaitu semakin tinggi dosis yang diberikan akan semakin besar pula persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Hasil uji analisis probit menunjukkan nilai *Inhibitory Concentration of 50%* sebagai terapi komplementer adalah 0,008 mg/grBB.

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In Vivo*”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak, oleh karena itu penulis ingin menyampaikan ucapan terima kasih kepada:

1. dr. Enny Suswati, M.Kes selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember atas segala fasilitas dan kesempatan yang diberikan dalam menempuh Pendidikan Dokter di Universitas Jember;
2. dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed selaku Dosen Pembimbing Utama dan dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD selaku Dosen Pembimbing Anggota yang telah meluangkan waktu, pikiran, dan tenaga dalam proses penyusunan skripsi ini;
3. Dr.rer.biol.hum.dr.Erma Sulistyarningsih,M.Si selaku Dosen Penguji Utama dan dr. Rena Normasari, M.Biomed selaku Dosen Penguji Anggota yang memberikan kritik dan saran yang membangun dalam proses penyusunan skripsi ini;
4. dr. Wiwien Sugih Utami, M.Sc yang telah membantu dan memberi bimbingan, nasihat, dan saran yang membangun dalam proses penyusunan skripsi ini;
5. dr. Irawan Fajar Kusuma, M.Sc dan dr. Roni Prasetyo selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
6. dr. Cholis Abrori, M.kes, M.Pd Ked dan dr. Dini Agustina, M. Biomed selaku Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta Nuri, S.Si, Apt., M.Si selaku Dosen Fakultas Farmasi Universitas Jember yang selalu memberikan saran dalam penyusunan skripsi ini;

7. Ayah Edi Suswanto dan Mama Faridha Isnaini tercinta atas dukungan moril, doa, nasihat, dan semua curahan kasih sayang yang tak pernah putus;
8. Adikku Vicky Satria Brammaysta yang selalu memberikan semangat dan motivasi untuk menyelesaikan skripsi ini;
9. Kakekku tercinta Alm. Sastramihardja
10. , Alm. Abu Bakar Zaenal Abidin, Alm. Sumeri dan Nenekku tercinta Siti Rahayu dan Alm. Siti Aminah yang selalu memberikan dukungan pada penulis;
11. Keluarga besar Sastromihardjo dan Keluarga besar Abu Bakar yang selalu mendukung penulis;
12. Saudari-saudariku Sarah Andriani, Yessie Elin Santoso, dan Nadia Farhatika atas motivasi dan dukungannya dalam penyelesaian skripsi ini;
13. Sahabat-sahabatku Intan Palupi, Monica Bethari Primanesa, Nyoman Defriyana Suwandi, Anis Azizah Rahma, Silvi Ahmada Chasya, Deri Dwi Arista, Bagus Dwi Kurniawan, Ivan Kristantya, Geraldi Kusuma Wijaya, dan Muhammad Avin Zamroni yang selalu memberikan dukungan dalam penyelesaian skripsi ini;
14. Analis Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember, serta Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini;
15. Seluruh angkatan 2012 yang telah berjuang bersama-sama demi gelar Sarjana
16. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember
17. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran yang membangun dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 03 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTO	iv
HALAMAN PERNYATAAN	v
HALAMAN BIMBINGAN	vi
HALAMAN PENGESAHAN	vii
RINGKASAN	viii
PRAKATA	x
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Malaria	5
2.1.1 Definisi Malaria	5
2.1.2 Epidemiologi Malaria.....	5
2.1.3 Etiologi Malaria	6
2.1.4 Siklus Hidup Plasmodium.....	7

2.1.5	Patogenesis Malaria	10
2.1.6	Manifestasi Klinik Malaria	11
2.1.7	Diagnosis Malaria	13
2.1.8	Pengobatan Malaria di Indonesia	14
2.1.9	Kasus Resistensi Malaria	16
2.2	Bangle (<i>Zingiber Cassumunar Roxb.</i>).....	17
2.2.1	Klasifikasi Bangle (<i>Zingiber Cassumunar Roxb.</i>)....	17
2.2.2	Morfologi Bangle (<i>Zingiber Cassumunar Roxb.</i>)....	17
2.2.3	Kandungan Senyawa pada Rimpang Bangle (<i>Zingiber Cassumunar Roxb.</i>).....	18
2.3	Fraksi Diklorometana (DCM) Ekstrak Metanol Bangle (<i>Zingiber Cassumunar Roxb.</i>).....	19
2.4	<i>Plasmodium berghei</i>.....	20
2.4.2	Klasifikasi <i>Plasmodium berghei</i>	20
2.4.2	Alasan Penggunaan <i>Plasmodium berghei</i>	20
2.4.3	Siklus Hidup <i>Plasmodium berghei</i>	21
2.5	Kerangka Konsep Penelitian.....	22
2.7	Hipotesis	23
BAB 3.	METODE PENELITIAN	25
3.1	Jenis Penelitian	25
3.2	Rancangan Penelitian	25
3.3	Tempat dan Waktu Penelitian	27
3.4	Populasi dan Sampel Penelitian.....	27
3.4.1	Populasi.....	27
3.4.2	Sampel.....	28
3.4.3	Jumlah Sampel Penelitian	28
3.5	Variabel penelitian	29
3.5.1	Variabel Bebas	29
3.5.2	Variabel Terikat.....	29

3.5.3	Variabel Luar.....	29
3.6	Definisi Operasional	29
3.6.1	Uji Aktivitas Antimalaria.....	29
3.6.2	Terapi Komplementer Malaria.....	30
3.6.3	Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	30
3.6.4	Derajat Parasitemia.....	30
3.6.5	Persentase Penghambatan terhadap <i>Plasmodium</i>	31
3.6.6	<i>Inhibitory Concentration of 50% (IC₅₀)</i>	31
3.6.7	Kelompok Kontrol.....	31
3.7	Alat dan Bahan	32
3.7.1	Alat Penelitian	32
3.7.2	Bahan Penelitian.....	32
3.8	Prosedur Penelitian	33
3.8.1	Persiapan Hewan Uji	33
3.8.2	Pembuatan Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle	34
3.8.3	Penetapan Dosis Terapi Standar Malaria.....	35
3.8.4	Penetapan Dosis Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle.....	36
3.8.5	Stimulasi Pemberian Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle.....	36
3.8.6	Infeksi <i>Plasmodium berghei</i>	37
3.8.7	Pemberian Terapi.....	39
3.8.8	Pembuatan Hapusan Darah.....	39
3.8.9	Penentuan Derajat Parasitemia	39
3.8.10	Penghitungan Persentase Hambatan.....	40
3.9	Analisis Data	41
3.10	Alur Penelitian	42

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	42
4.1 Hasil Penelitian.....	42
4.1.1 Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Rimpang Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	42
4.1.2 <i>Pearson</i>	47
4.1.3 Analisis Probit	47
4.2 Pembahasan	48
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	54
5.1 Kesimpulan	54
5.2 Saran	54
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	61

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus hidup <i>Plasmodium</i>	8
2.2 Patofisiologi <i>cythoadherence</i>	11
2.3 Alur penatalaksanaan pengobatan malaria tanpa komplikasi di Indonesia	15
2.5 Kerangka konsep penelitian	22
3.1 Rancangan penelitian.....	25
3.2 Alur penelitian.....	41
4.1 Proses Fraksinasi Ekstrak Metanol Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.) dengan menggunakan corong pisah selama 2-3 jam.....	43
4.2 Gambaran hapusan darah mencit yang terinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dengan pewarnaan Giemsa dilihat dengan mikroskop perbesaran objektif 100 kali	43
4.3 Grafik hubungan masing-masing kelompok dengan rata-rata persen parasitemia hewan coba pada H ₀ sampai H ₃	44
4.4 Persentase penghambatang masing-masing kelompok terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei</i>	46

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Rata-rata persen parasitemia masing-masing kelompok pada H ₀ sampai H ₃	44
4.2 Persentase penghambatan masing-masing kelompok terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei</i>	45

LAMPIRAN

	Halaman
A. <i>Ethical Clearance</i>	61
B. Hasil Determinasi Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.)	62
C. Perhitungan Dosis Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.)	63
D. Tabel Persentase Parasitemia pada H_0 sampai H_3	67
E. Hasil Analisis SPSS	73
F. Dokumentasi Penelitian	76

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit infeksi yang menjadi masalah utama untuk beberapa negara tropis di dunia. Kasus malaria mengancam 40 persen kehidupan populasi di dunia (WHO, 2015). *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa berdasarkan *World Malaria Report* yang diadakan setiap penghujung tahun bulan Desember di tahun 2014, malaria terjadi di seluruh wilayah WHO yang berjumlah enam regio dengan 97 negara endemik malaria, negara – negara tersebut menjadikan kasus malaria sebagai *Highlight Progress*. Kasus malaria dilaporkan di dunia tahun 2013 mencapai 3,2 milyar orang beresiko untuk terinfeksi, 198 juta orang telah terinfeksi malaria, 584 ribu kematian dengan kasus malaria membunuh 453 ribu anak- anak di bawah usia lima tahun (World Malaria Report WHO, 2014).

Malaria adalah penyakit infeksi akibat protozoa genus *Plasmodium*, dengan terdapat lima jenis spesies parasitnya, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium knowlesi*. Transmisi penyebaran malaria dilalukan oleh vektor nyamuk *Anopheles* betina (Natadisastra dan Ridad, 2009). Transmisi penyebaran penyakit infeksi malaria di Indonesia sangat cepat terjadi pada perpindahan penduduk dari dan ke daerah endemis malaria. Hal ini disebabkan karena pendatang belum memiliki kekebalan terhadap infeksi ini (Prabowo, 2008). Sanitasi lingkungan yang buruk pada kelompok orang yang sosial ekonominya rendah adalah tempat perindukan potensial bagi nyamuk *Anopheles* untuk menyebarkan malaria (Laihad *et al.*, 2011).

Malaria memiliki gambaran trias gejala klasik, yaitu demam periodik, anemia, dan splenomegali. Dasar patogenesis malaria pada infeksi *Plasmodium* adalah kemampuannya menyebabkan *Parasit – Red Blood Cell* (PRBC) mengadakan *cytoadherence* (perlekatan eritrosit terinfeksi pada sel endotel) pada pembuluh darah

kecil baik kapiler atau venula. Interaksi antara P-RBC dengan sel endotel dapat terjadi karena berbagai reseptor yang tersedia untuk berikatan, antara lain ICAM-1, V-CAM 1, CD-36, dan trombospondin. P-RBC mengadakan *rosetting*, yaitu penempelan P-RBC terhadap eritrosit yang tidak terinfeksi. *Cytheadherence* dan *rosetting* pada akhirnya akan menimbulkan sumbatan pada pembuluh darah kapiler atau venula yang menyebabkan kerusakan pada organ yang divaskularisasi (Hariyanto, 2014).

World Health Organization (WHO) berdasarkan *Guideline for The Treatment of Malaria 2006* menyatakan bahwa pengobatan malaria yang tepat untuk mengontrol malaria adalah dengan obat *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) yang sekarang digunakan sebagai first line terapi malaria di seluruh dunia. Penggunaan ACT sebagai monoterapi yang direkomendasikan oleh WHO ternyata memiliki kelemahan. Pada tahun 2008, resistensi terhadap ACT telah dilaporkan di perbatasan Thailand-Kamboja Asia Tenggara (Yusuf, 2013). Terapi kombinasi antimalaria juga telah dicoba di Indonesia dengan tujuan meningkatkan efektivitas antimalaria, aktivitas sinergik antimalaria, dan memperlambat progresivitas resistensi parasit terhadap obat antimalaria.

Berkembangnya resistensi malaria terhadap berbagai macam obat antimalaria mendorong peneliti untuk menggunakan terapi adjuvan (terapi komplementer yang sinergis dengan obat antimalaria) untuk mengobati malaria. Para penelitian sebelumnya telah didapatkan bukti bahwa terdapat kandungan bioaktif pada tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Kandungan bioaktif pada bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), antara lain : phlobotannins, flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, terpenoid, steroid, *curcumin*, *phenylbutenoid compound* dan glikosida (Majaw dan Moirangthem, 2009). Pada penelitian ini kandungan bioaktif tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) akan dikembangkan menjadi terapi komplementer malaria. Pemberian terapi komplementer malaria dengan menggunakan bangle dan obat antimalaria diharapkan dapat menjadi terapi yang sinergis untuk melawan malaria.

Penelitian ini akan menggunakan metode fraksinasi terhadap ekstrak kasar metanol bangle. Fraksinasi adalah suatu prosedur pemisahan golongan utama senyawa kimia dengan golongan senyawa kimia yang lain, pemisahan didasarkan pada kepolaran. Penelitian ini menggunakan fraksinasi untuk menghasilkan senyawa yang lebih murni daripada ekstraksi. Proses fraksinasi menggunakan pelarut diklorometana (DCM), senyawa organik dengan rumus kimia CH_2Cl_2 . Diklorometana merupakan senyawa aromatik yang bersifat semipolar. Hal ini berarti pelarut diklorometana dapat menarik komponen senyawa kimia yang bersifat semi polar yang terkandung di dalam ekstrak metanol rimpang bangle (Artini, 2012).

Berdasarkan latar belakang tersebut, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian dalam uji aktivitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka rumusan masalah yang didapat adalah sebagai berikut.

- Apakah fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*?
- Apakah fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB memiliki korelasi dengan persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo* memiliki perbedaan?
- Berapakah nilai *Inhibitory Concentration of 50%* (IC_{50}) dari fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Mengetahui aktivitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*.
- b. Mengetahui korelasi antara fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB dengan persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*
- c. Menentukan *Inhibitory Concentration of 50% (IC₅₀)* dari fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Mengenalkan manfaat bangle dalam bentuk fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria.
- b. Memberikan pengetahuan baru bagi perkembangan penelitian selanjutnya, sebagai tinjauan pustaka yang berkaitan dengan peranan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

Indonesia merupakan salah satu negara endemik malaria. Penyakit malaria sering menimbulkan Kejadian Luar Biasa (KLB) di beberapa provinsi di Indonesia. Berikut peneliti akan membahas tinjauan tentang malaria.

2.1.1 Definisi Malaria

Pada awal 1717 Giovanni Lancisi membuat postulat bahwa malaria adalah sebuah racun yang dapat ditularkan oleh nyamuk (Arias, 2010). Kata malaria berasal dari istilah Italia “*Mala Aria*” yang artinya adalah udara buruk. Malaria memiliki arti udara buruk karena dahulu banyak terdapat di rawa-rawa dan mengeluarkan bau busuk. Penyakit ini memiliki nama lain, seperti demam roma, demam rawa, demam tropik, demam pantai, demam charges, demam kura, dan palludisme (Prabowo, 2008). Anggapan saat ini diperbaharui bahwa malaria adalah infeksi parasit pada sel darah merah yang disebabkan oleh suatu protozoa genus *Plasmodium* yang ditularkan melalui gigitan nyamuk (Handayani dan Haribowo, 2008).

2.1.2 Epidemiologi Malaria

Menurut data Rumah Sakit, angka kematian penderita yang disebabkan oleh malaria untuk semua kelompok umur menurun drastis dari tahun 2004 ke tahun 2006 dari 10,61% menjadi 1,34%. Pada tahun 2006 sampai 2009 angka kematian penderita yang disebabkan oleh malaria meningkat lagi bahkan sampai dua kali lipat. Pada tahun 2012, stratifikasi malaria tertinggi berada di Indonesia wilayah timur, antara lain Papua, Maluku, Sulawesi dan Nusa Tenggara. Wilayah endemik malaria di Indonesia bagian timur tersebar di 84 kabupaten atau kota dengan jumlah penduduk

beresiko 16 juta orang. Pengendalian malaria di wilayah Indonesia bagian timur sulit, disebabkan oleh penyebaran penduduk yang tidak merata dan faktor geografis yang menyebabkan akses pelayanan kesehatan sulit untuk dijangkau. Syarat sebuah daerah bebas malaria adalah *Annual Parasite Incident* (API) atau insiden parasit tahunan di bawah satu per seribu penduduk dan tidak terdapat kasus malaria pada penduduk lokal selama tiga tahun berturut-turut (Kemenkes RI, 2009).

2.1.3 Etiologi Malaria

Agen penyebab malaria adalah protozoa darah genus *Plasmodium*. Protozoa parasit jenis ini banyak tersebar di wilayah tropis, misalnya di Amerika, Asia, dan Afrika. Penyebaran malaria dilakukan oleh vektor nyamuk *Anopheles* betina infeksi, sebagian besar nyamuk *Anopheles* menggigit pada malam hari, puncak gigitan nyamuk dari malam sampai fajar (Shi *et al.*, 2007). Indonesia memiliki lima spesies genus *Plasmodium* antara lain sebagai berikut.

- a. *Plasmodium falciparum*, ditemukan oleh Welch pada tahun 1897. *Plasmodium falciparum* merupakan penyebab dari malaria tropika atau malaria tertiana maligna atau malaria pernisiiosa, secara klinik berat karena dapat menyebabkan malaria serebral dan fatal. Masa inkubasi dari *Plasmodium falciparum* adalah 12 hari dengan gejala nyeri kepala, demam tidak begitu nyata, dan terkadang dapat menyebabkan gagal ginjal (Chia, 2006).
- b. *Plasmodium vivax*, ditemukan oleh Labbe pada tahun 1899 dapat menyebabkan malaria vivax atau malaria tertiana benigna. Demam terjadi setiap 48 jam atau setiap hari ketiga pada siang hari atau sore hari. Masa inkubasi dari *Plasmodium vivax* adalah antara 12 hari sampai dengan 17 hari. Pembengkakan limpa merupakan salah satu gejala yang menonjol (Paniker, 2013).
- c. *Plasmodium ovale*, ditemukan oleh Stephens pada tahun 1922 dapat menyebabkan malaria ovale. Masa inkubasi dari *Plasmodium ovale* adalah antara 12 hari sampai dengan 17 hari. Demam terjadi setiap 48 jam atau setiap hari ketiga. Malaria ovale ini ringan dan dapat sembuh dengan cepat (Paniker, 2013).

- d. *Plasmodium Malarie*, ditemukan oleh Grassi dan Velletti pada tahun 1980 dapat menyebabkan malaria malariae atau malaria kuartana. Masa inkubasi adalah 28 hari sampai dengan 30 hari. Malaria malariae ini bersifat ringan dan ditemukan secara kebetulan saat pemeriksaan fisik (Achmadi, 2010).
- e. *Plasmodium knowlesi* ditemukan oleh Robert Knowles dan Biraj Mohan Das Gupta pada tahun 1931 di kera berekor panjang *Macaca fascicularis*. Pada tahun 1965, infeksi *Plasmodium knowlesi* dipublikasikan dapat menyerang manusia untuk pertama kalinya. Gejala klinis relatif ringan, tetapi keluhan gastrointestinal lebih menonjol (Arsin, 2012). Peningkatan infeksi malaria akibat *Plasmodium knowlesi* dilaporkan mengalami peningkatan di seluruh Asia Tenggara, kecuali Laos. Pada tahun 2009 kasus infeksi malaria akibat *Plasmodium knowlesi* dilaporkan di Kalimantan (Ompusunggu, 2014).

Berdasarkan cara penularan penyakit malaria, penularan dibedakan menjadi dua yaitu penularan secara alamiah (*natural infection*) dan penularan tidak alamiah (*non-natural infection*). Penularan secara alamiah adalah penularan malaria dari manusia ke manusia melalui vektor nyamuk *Anopheles* betina infeksi. Dalam tubuh nyamuk *Anopheles* betina dapat hidup lebih dari satu spesies *Plasmodium* secara bersamaan sehingga dapat menyebabkan terjadinya infeksi campuran atau *mixed infection*, paling banyak merupakan campuran antara *Plasmodium falciparum* dengan *Plasmodium vivax* atau *Plasmodium malariae* (Widoyono, 2011). Penularan secara tidak alamiah adalah penularan malaria tidak melalui vektor nyamuk *Anopheles* tetapi melalui transfusi darah, jarum suntik, maupun penularan dari ibu hamil ke janin yang dikandungnya.

2.1.4 Siklus Hidup Plasmodium

Dalam siklus hidupnya Plasmodium memiliki dua hospes, hospes definitif dan intermediet, seperti pada Gambar 2.1. Hospes definitif adalah nyamuk *Anopheles*, dimana terdapat siklus seksual yang membentuk sporozoit pada tubuh nyamuk

keluar dari kelenjar ludah. Perubahan dari mikrogametosit dan makrogametosit sampai menjadi sporozoit di dalam kelenjar ludah vektor disebut masa tunas ekstrinsik atau siklus sporogoni (Depkes RI, 2008).

Jumlah sporokista pada setiap ookista dan lamanya siklus sporogoni, pada masing-masing spesies *Plasmodium* adalah berbeda. Jumlah sporozoit *Plasmodium vivax* dalam ookista adalah 30-40 butir dengan siklus sporogoni selama 8-9 hari, sporozoit *Plasmodium falciparum* adalah 10-12 butir dengan siklus sporogoni selama 10 hari, serta sporozoit *Plasmodium malariae* adalah 6-8 butir dengan siklus sporogoni selama 26-28 hari (Widoyono, 2011).

b. Siklus Hidup *Plasmodium* pada hospes intermediet atau tubuh manusia

Siklus aseksual dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina infektif menghisap darah manusia, sporozoit yang berada dalam kelenjar ludah nyamuk *Anopheles* masuk kedalam aliran darah selama lebih kurang 30 menit. Sporozoit menuju ke hati dan menembus hepatosit, dan menjadi tropozoit. Tropozoit berkembang menjadi skizon hati yang terdiri dari 10.000 sampai 30.000 merozoit hati. Siklus ini disebut siklus eksoeritrositik yang berlangsung selama 9-16 hari. Pada *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae* siklus skizogoni berlangsung lebih cepat sedangkan *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* siklus ada yang cepat dan ada yang lambat (Depkes RI, 2013). Merozoit yang berasal dari skizon hati akan pecah dan menginfeksi sel darah merah. Eritrosit yang terinfeksi (skizon) akan pecah dan merozoit yang keluar akan menginfeksi sel darah merah lainnya. Siklus ini disebut siklus eritrositik. Sebagian tropozoit hati tidak langsung berkembang menjadi skizon, akan tetapi ada yang menjadi bentuk dorman yang disebut bentuk hipnozoit. Bentuk hipnozoit dapat tinggal di dalam sel hati selama berbulan-bulan bahkan sampai bertahun-tahun. Apabila penderita mengalami penurunan imunitas tubuh, maka parasit menjadi aktif sehingga menimbulkan kekambuhan (Widoyono, 2011).

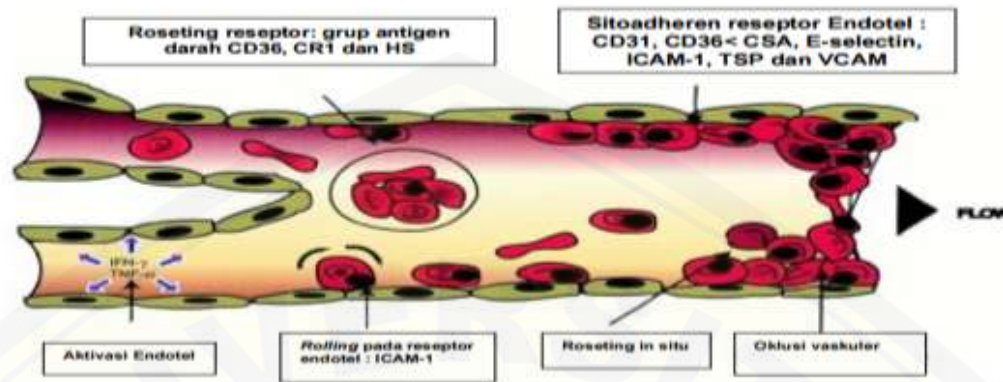
Masa inkubasi adalah rentang waktu sejak sporozoit masuk kedalam tubuh sampai timbulnya gejala klinis berupa demam. Lama masa inkubasi bervariasi

tergantungan spesies *Plasmodium*. Masa prapaten adalah rentang waktu sejak sporozoit masuk sampai parasit dapat dideteksi dalam darah dengan pemeriksaan mikroskopik.

2.1.5 Patogenesis Malaria

Patogenesis malaria terjadi akibat interaksi kompleks antara parasit, hospes, dan lingkungan. Pada malaria mekanisme patogenesisnya berkaitan dengan invasi merozoit ke dalam eritrosit, sehingga dapat menyebabkan eritrosit yang mengandung merozoit mengalami perubahan struktur dan biomolekuler sel untuk mempertahankan kehidupan parasit. Perubahan tersebut meliputi beberapa mekanisme, antara lain adalah transport membran sel, *cytho adherence*, *sequestration* dan *rosetting* (Novita, 2009).

Cytho adherence adalah peristiwa perlekatan eritrosit yang telah terinfeksi pada reseptor di bagian endotelium venula dan kapiler, seperti pada Gambar 2.2. *Cytoadherence* menyebabkan eritrosit terinfeksi matur tidak beredar kembali dalam sirkulasi. Proses *cytoadherence* memiliki dua keuntungan, yaitu proses maturasi akan lebih baik pada lingkungan *microaerophilic* dan eritrosit yang terinfeksi dapat terhindar dari pembersihan limpa. Proses *cytho adherence* diperantarai oleh reseptor endotel berupa molekul adhesi yang diaktifkan oleh toksin malaria. Reseptor *cytho adherence* tersebut adalah ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, trombospondin, CD31, dan CD36<CSA (Harijanto, 2014). Eritrosit terinfeksi yang berada di jaringan mikrovaskular ini disebut eritrosit terinfeksi yang mengalami *sequestration*. Proses *sequestration* ini memegang peranan utama dalam patofisiologi malaria berat. *Sequestration* hanya dapat dilakukan oleh *Plasmodium falciparum* dan terjadi pada organ vital dan hampir semua jaringan dalam tubuh. *Sequestration* tertinggi terjadi di otak, diikuti dengan hepar dan ginjal, paru, jantung, usus dan kulit. *Sequestration* dapat menyebabkan obstruksi perfusi jaringan mikrovaskular tersebut (Baeti, 2010; Harijanto 2014).



Gambar 2.2 Patofisiologi *cythoadherence* (Sumber : Depkes RI, 2013)

Rosetting adalah perlekatan antara satu eritrosit yang mengandung merozoit matang dengan diselubungi oleh sekitar sepuluh atau lebih eritrosit non parasit sehingga berbentuk seperti bunga. *Rosetting* menyebabkan obstruksi aliran darah lokal atau dalam jaringan sehingga mempermudah terjadinya *cythoadherence*. Beberapa reseptor rosetting telah diidentifikasi pada eritrosit, yaitu antigen golongan darah A dan B, CD 36, *Complement Receptor 1* (CR 1), dan HS like GAGs (Baeti, 2010).

2.1.6 Manifestasi klinik Malaria

Siklus hidup aseksual *Plasmodium* pada tubuh manusia bertanggung jawab pada terjadinya manifestasi klinik malaria. Malaria diawali gejala prodormal yang tidak spesifik diantaranya lesu, sakit, kepala, anoreksia, nousea, vomitus, dan demam yang tidak teratur. Malaria memiliki tiga gejala klinik utama demam paroksismal, anemia, dan hepatosplenomegali (Natadisastra dan Ridad, 2009).

Demam paroksismal dimulai ketika eritrosit yang mengandung parasit memicu makrofag yang sensitif endotoksin untuk melepaskan berbagai mediator. Endotoksin berasal dari parasit malaria menyebabkan pelepasan faktor nekrosis tumor (TNF) yang merupakan suatu monokin, dapat ditemukan dalam peredaran darah manusia dan hewan yang terinfeksi parasit malaria. TNF dan sitokin dapat

menimbulkan demam, hipoglikemia, dan sindrom penyakit pernapasan pada orang dewasa. Serangan demam malaria sangat khas terjadi selama 2 – 12 jam dengan tiga stadium. Stadium awal adalah rigoris (menggigil), penderita menggigil seperti kedinginan walaupun suhu terus menerus naik dan berlangsung selama 15 – 60 menit. Stadium akme (puncak demam), pada stadium ini suhu tetap tinggi mencapai 41⁰C (106⁰F) dan berlangsung selama 2-6 jam. Stadium sudoris, suhu mulai turun disertai banyak keringat sampai mencapai suhu normal dan berlangsung selama dua sampai dengan empat jam. Pada stadium ini penderita merasa seolah-olah sudah sembuh dari malaria, dilanjutkan stadium tanpa demam atau *aprexia* dengan suhu tubuh normal. Serangan demam ini akan berulang dua atau tiga hari kemudian, tergantung dari jenis *Plasmodium*. Jenis demam pada malaria menurut ulangan demamnya ada dua jenis, yaitu tertiana dan kuartana. Demam paroksismal tertiana adalah demam yang berulang setiap 48 jam atau setiap hari ketiga, terjadi pada malaria akibat *Plasmodium falciparum*, *vivax*, dan *ovale*. Demam paroksismal kuartana adalah demam yang berulang setiap 72 jam atau setiap hari keempat, terjadi pada malaria akibat *Plasmodium malariae* (Natadisastra dan Ridad, 2009).

Anemia dapat terjadi ketika penghancuran eritrosit. Fagositosis atau proses penghancuran tidak hanya pada eritrosit yang mengandung parasit tetapi juga terhadap eritrosit yang tidak mengandung parasit. Dearajat fagositosis RES meningkat menyebabkan lebih banyak eritrosit yang dihancurkan, umur eritrosit menjadi lebih pendek, dan depresi eritropoiesis (pembentukan eritrosit berkurang). Hal tersebut menimbulkan anemia dan hipoksemia jaringan. Anemia dapat memiliki tipe hemolitik, normokrom, normositer (Natadisastra dan Ridad, 2009). Beratnya anemia tidak sebanding dengan parasitemia menunjukkan adanya kelainan eritrosit terjadi juga pada eritrosit yang tidak mengandung parasit. Faktor lain yang menyebabkan terjadinya anemia adalah karena terbentuknya antibodi terhadap eritrosit (Harijanto, 2014).

Limpa merupakan salah satu organ yang penting dalam produksi limfosit. Limpa pada penderita malaria berfungsi sebagai filter untuk menghancurkan eritrosit

yang terinfeksi *Plasmodium*. *Plasmodium* pada eritrosit terinfeksi difagositosis secara aktif oleh makrofag limpa (Djanah, 2007). Splenomegali atau limpa mengalami pembesaran dan pembendungan, serta pigmentasi sehingga mudah pecah. Pada awalnya pembesaran limpa terasa lunak, mudah pecah, dan nyeri sehingga harus berhati-hati pada pemeriksaan fisik. Pada malaria kronis terjadi hiperplasia dari retikulosit disertai peningkatan makrofag (monositosis) (Natadisastra dan Ridad, 2009; Harijanto, 2014).

Eritrosit yang terinfeksi oleh *Plasmodium* dapat membentuk tonjolan-tonjolan pada permukaannya. Eritrosit yang terinfeksi ini berkaitan erat dengan patogenesis malaria. Tonjolan tersebut mengandung antigen dan bereaksi dengan antibodi malaria yang berhubungan dengan afinitas eritrosit yang mengandung parasit terhadap endotelium kapiler. Eritrosit yang terinfeksi menempel pada endotelium membentuk gumpalan yang menimbulkan anoksia dan edema jaringan berat. Anoksia dan edema pada otak menyebabkan malaria serebral yang dikategorikan malaria berat (Natadisastra dan Ridad, 2009; Harijanto, 2014).

Malaria serebral merupakan keadaan kegawatdaruratan malaria karena dapat menyebabkan kematian. Manifestasi klinis malaria serebral sangat beragam, namun hanya terdapat tiga gejala terpenting, baik pada anak dan dewasa, antara lain sebagai berikut.

- a. Gangguan kesadaran dengan demam non spesifik.
- b. Kejang umum dan sekuel neurologik.
- c. Koma menetap selama 24 – 72 jam, mula-mula dapat dibangunkan, kemudian tidak dapat dibangunkan.

2.1.7 Diagnosis Malaria

Diagnosis malaria diperlukan dalam pengobatan penderita malaria, karena itu kemampuan teknis dalam mendiagnosis malaria yang tepat sangat penting untuk menentukan langkah selanjutnya dalam pengobatan penderita malaria. Diagnosis malaria dapat ditegakkan melalui anamnesis, pemeriksaan fisik, dan pemeriksaan

penunjang. Anamnesis pada penderita malaria diperlukan untuk mengetahui riwayat pasien, seperti keluhan yang diderita oleh pasien, usia pasien, riwayat pasien berkunjung ke daerah yang endemik malaria, riwayat pasien tinggal di daerah endemik, riwayat pernah sakit malaria, riwayat minum obat anti malaria, riwayat kehamilan, dan riwayat pernah mendapatkan transfusi (Depkes RI, 2013).

Diganosis malaria klinis atau *clinical presumptive diagnosis* adalah diagnosis malaria berdasarkan pada pemeriksaan penderita secara klinis terdiri dari pemeriksaan gejala demam (berkala), panas, tingkat kesadaran, dan pusing. Gejala khas malaria sering kali tidak sama antara satu daerah dengan daerah lainnya, sehingga diagnosis klinis tidak bisa dijadikan acuan utama dalam pengobatan malaria sebab tingkat kesalahannya cukup tinggi (Depkes RI, 2013).

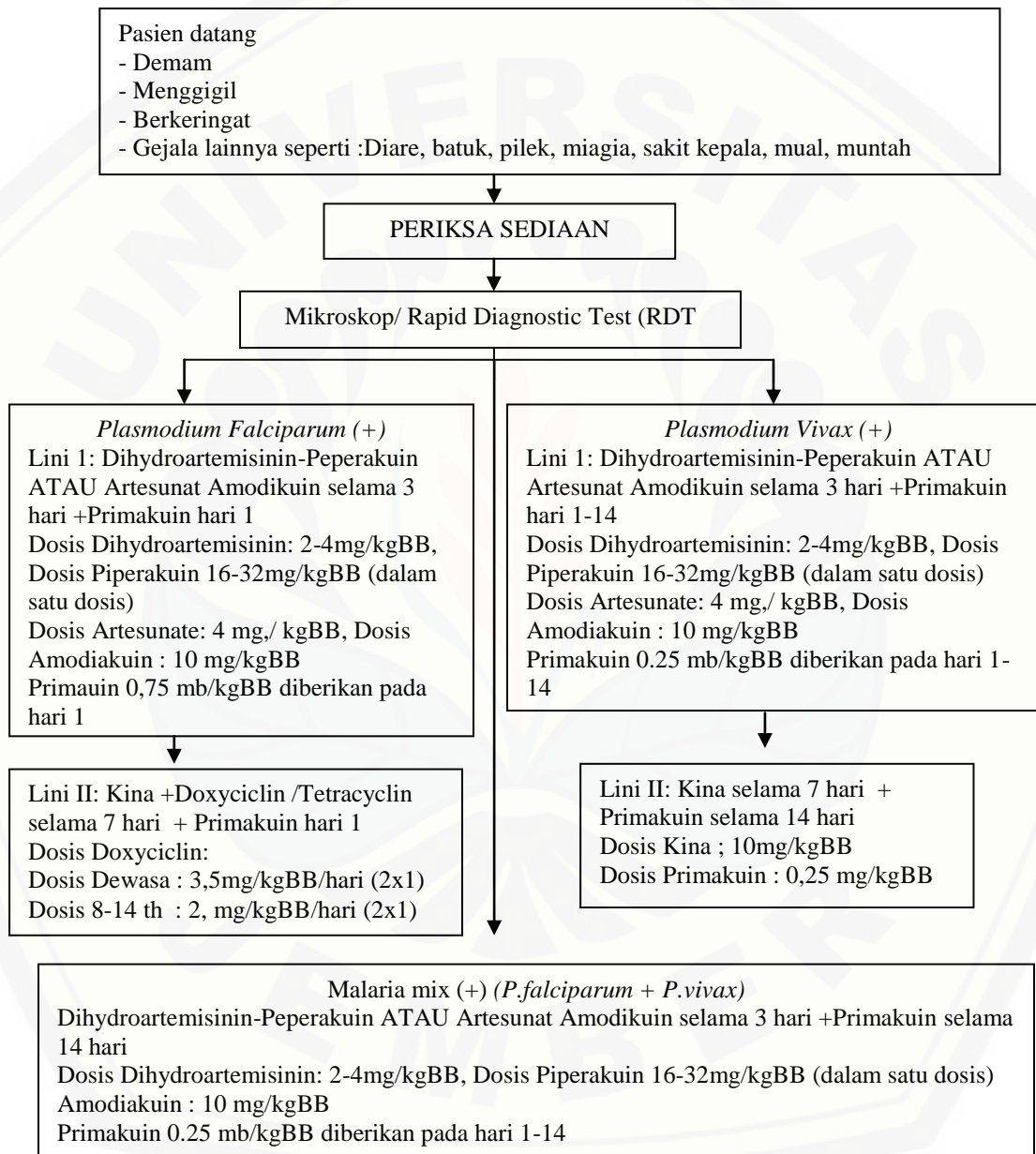
Pemeriksaan penunjang malaria sangat penting untuk menegakkan diagnosis dari malaria, antara lain adalah pemeriksaan mikroskopis, pemeriksaan imunoserologi, pemeriksaan serologi, pemeriksaan biomolekuler, dan pemeriksaan kimia darah. *Gold standart* penegakan diagnosis malaria adalah dengan pemeriksaan mikroskopis ditemukannya parasit dalam darah (Depkes RI, 2013).

2.1.8 Pengobatan Malaria di Indonesia

Pengobatan yang diberikan adalah pengobatan radikal malaria dengan membunuh semua stadium parasit yang ada di dalam tubuh. Dosis pemberian obat lebih baik berdasarkan berat badan. Pengobatan malaria di Indonesia menggunakan obat antimalaria kombinasi. Pengobatan kombinasi malaria adalah penggunaan dua atau lebih obat anti malaria yang farmakodinamik dan farmakokinetiknya sesuai, bersinergi dan berbeda cara terjadinya resistensi (Depkes RI, 2013). Tujuan terapi kombinasi ini adalah pengobatan yang lebih baik dan mencegah terjadinya resistensi *Plasmodium* terhadap obat anti malaria. Di Indonesia pengobatan malaria secara spesifik dibagi menjadi dua, yaitu pengobatan malaria tanpa komplikasi dan pengobatan malaria dengan komplikasi. Dalam pengobatan malaria juga dibedakan sesuai dengan jenis *Plasmodium* yang menyebabkan malaria tersebut.

a. Pengobatan Malaria tanpa Komplikasi

Pengobatan malaria tanpa komplikasi ditentukan oleh jenis *Plasmodium* dan ada atau tidaknya kasus resistensi pada obat yang akan digunakan pada daerah tersebut, seperti pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3 Alur Penatalaksanaan pengobatan malaria tanpa komplikasi di Indonesia (Sumber : Depkes RI, 2013)

b. Pengobatan Malaria dengan Komplikasi

Penanganan malaria berat yang cepat dan benar akan menyelamatkan penderita dari kematian. Pengetahuan yang luas tentang manifestasi malaria berat, evaluasi fungsi organ yang terlibat, deteksi parasit dengan cepat serta langkah-langkah tindakan dan pengobatan sangat diperlukan. Prinsip tindakan untuk malaria berat adalah sebagai berikut (Depkes RI, 2013).

- 1) Tindakan umum
- 2) Pengobatan terhadap malaria
 - a) Obat Anti Malaria
 - b) *Exchange Transfusion*
- 3) Pengobatan Komplikasi

2.1.9 Kasus Resistensi Plasmodium terhadap Obat Antimalaria

Resistensi *Plasmodium* terhadap obat antimalaria merupakan masalah yang paling utama dalam menghambat Malaria. Hal tersebut terjadi karena menurunnya sensitivitas parasit terhadap obat anti malaria yang dipakai atau terjadi penurunan efikasi obat antimalaria. Penderita dikatakan resisten pada parasit malaria apabila suatu galur parasit mampu untuk bertahan hidup atau berkembang biak pada pemberian dosis setara atau lebih tinggi dari dosis yang direkomendasikan, tetapi masih dalam batas toleransi dari pasien.

Resistensi *Plasmodium falciparum* ditemukan pada *Artemisinin Combination Therapy* (ACT). ACT merupakan pengobatan lini pertama terkini yang disarankan oleh WHO pada setiap negara untuk memberantas malaria. Beberapa studi dilakukan di Thailand dan Kamboja untuk menilai efikasi terapi artesunate-mefloquine, regimen ACT yang direkomendasikan di negara tersebut. Hasil dari studi tersebut menunjukkan bahwa tingginya tingkat kegagalan terapi ACT di beberapa provinsi di Thailand dan Kamboja ditandai adanya waktu klirens yang memanjang oleh strain parasit pada pasien malaria yang menunjukkan infeksi strain parasit yang resisten. Efikasi ACT harus tetap di monitor dan perlu dilakukan antisipasi kemunculan strain

parasit yang resisten, terutama *Plasmodium falciparum*. Beberapa usaha yang dapat dilakukan menjaga sensitivitas parasit terhadap obat tersebut, antara lain adalah menghindari monoterapi obat-obat yang termasuk dalam ACT dan penggunaan obat herbal atau alternatif sebagai terapi komplementer malaria (Yusuf, 2013).

2.2 Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Indonesia merupakan negara dengan tingkat biodiversitas tertinggi kedua di dunia setelah Brazil. Kekayaan flora yang tersebar di Indonesia memiliki potensi sebagai tanaman hias, obat-obatan, maupun makanan. Bangle merupakan salah satu dari sekian banyak flora yang tersebar di Indonesia, tetapi belum dimanfaatkan secara optimal (Sukewijaya *et al.*, 2013).

2.2.1 Klasifikasi Bangle

Klasifikasi Tanaman Bangle adalah sebagai berikut (Armiyanti *et al.*, 2014).

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledoneae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: <i>Zingiber</i>
Jenis	: <i>Zingiber purpureum</i> Roxb.
Sinonim	: <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.

2.2.2 Morfologi Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Herba semusim, tumbuh tegak, tinggi 1 - 1,5 m, membentuk rumpun yang agak padat, berbatang semu, terdiri dari pelepah daun yang di pinggir ujungnya berambut sikat. Daun tunggal, letak berseling. Helaihan daun lonjong, tipis, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi rata, berambut halus, jarang, pertulangan menyirip, panjang 23 - 35cm, lebar 20 - 40 mm, warna hijau. Bunganya bunga majemuk,

bentuk tandan, keluar diujung batang, panjang gagang sampai 20 cm. bagian yang mengandung bunga bentuknya bulat telur atau seperti gelondong, panjang 6 - 10 cm, lebar 4 - 5 cm Bibir bunga bentuknya bundar memanjang, warnanya putih atau pucat. Bangle mempunyai rimpang yang menjalar dan berdaging, bentuknya hampir bundar sampai jorong atau tidak beraturan, tebal 2-5 mm. permukaan luar tidak rata, berkerut, terdapat parut daun, berwarna coklat muda kekuningan, bila dibelah berwarna kuning muda sampai kuning kecokelatan (Armiyanti *et al.*, 2014).

2.2.3 Kandungan Senyawa pada Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Beberapa penelitian yang dilakukan terkait oleh rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), dikatakan dapat meningkatkan sistem imun dalam tubuh manusia dengan cara meningkatkan fagositosis. Tes efektivitas fagositosis dari Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dilihat dari manfaat senyawa bioaktivitas *phenylbutenoid compounds* (Chairul *et al.*, 2009). Fagositosis adalah salah satu proses mempertahankan tubuh yang tidak spesifik dalam melawan beberapa agen atau benda asing termasuk mikroorganisme yang patogen (Robbins, 2007). Sel yang berperan penting dalam mekanisme fagositosis disebut sel fagosit, yaitu mononuklear (monosit dan makrofag) dan polimorfonuklear atau granulosit (netrofil) (Chairul *et al.*, 2009).

Kerusakan sel tubuh akibat stress oksidatif yang dicetuskan oleh malaria dapat memperburuk gejala klinis malaria dan meningkatkan terjadinya resiko komplikasi malaria. Infeksi malaria menginduksi pengeluaran radikal hydroxyl (OH) dari hati yang bertanggung jawab dalam induksi stress oksidatif dan apoptosis. Parasit malaria sendiri dapat mengeluarkan sejumlah besar H_2O_2 dan O_2 . Stress oksidatif melalui peroksidasi lipid dapat menyebabkan kematian trombosit prematur karena membran trombosit kurang tahan terhadap stress oksidatif (Natalia, 2014). Hal tersebut dapat menyebabkan trombositopenia. Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki fungsi sebagai antioksidan untuk mencegah stress oksidatif yang berkelanjutan merusak sel, terutama trombosit. Kandungan senyawa *curcumin* pada

rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dapat digunakan sebagai antioksidan spesifik yang memiliki kemampuan menangkap radikal bebas dan *Reaktif Oksygen Species* (ROS) (Barzegar, 2012).

Curcumin memiliki efek sitotoksik dan efek paratissidal yang diperkirakan dapat melawan protozoa parasit seperti *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Giardia*, dan *Plasmodium falciparum* (Ghosh *et al.*, 2014). Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) juga memiliki kandungan senyawa lain, seperti saponin, flavonoid, minyak atsiri, tanin, steroid, triterpenoid, antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, karoten, dan senyawa fenolik. Flavonoid dapat berfungsi sebagai imunostimulan, selain alkaloid, tanin, dan saponin (Chanwitheesuk *et al.*, 2005; Iswantini *et al.*, 2011).

2.3 Fraksi Diklorometana (DCM) Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Proses fraksinasi dikerjakan setelah proses ekstraksi dilakukan, dengan tujuan mengambil senyawa yang lebih murni. Ekstraksi merupakan proses penarikan atau pemisahan komponen atau zat aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu. Tujuan ekstraksi adalah memisahkan bahan padat dan bahan cair suatu zat dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi dalam penelitian ini adalah metanol. Hasil skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang diperoleh dalam penelitian ini menunjukkan bahwa senyawa flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, minyak atsiri, serta glikosida dapat tertarik dalam pelarut metanol. Hal ini disebabkan karena metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH₃) sehingga dapat menarik analit-analit yang bersifat polar dan nonpolar (Astarina *et al.*, 2013).

Prinsip utama dalam fraksinasi penelitian ini adalah memisahkan senyawa aktif yang dapat larut dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarutnya. Pelarut dalam fraksinasi ini adalah diklorometana. Diklorometana atau metilen klorida memiliki rumus molekul CH₂Cl₂. Diklorometana merupakan senyawa

yang tidak berwarna, larutan yang mudah menguap, larut dalam alkohol dan eter, memiliki titik didih 40,1 °C, titik lebur -97 °C. Diklorometana pada penelitian ini merupakan senyawa semi polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa yang bersifat polar dan non polar. Golongan alkaloid termasuk senyawa semi polar yang dapat larut dalam pelarut semi polar. Penelitian terbaru menyatakan bahwa pelarut semi polar juga mampu mengekstrak senyawa fenol. Senyawa yang berstruktur alkohol yang memiliki gugus -OH menyebabkan sifatnya menjadi semi polar (Sriwahyuni, 2010). Flavonoid juga dapat larut dalam senyawa semi polar (Suciati *et al.*, 2012).

2.4 *Plasmodium Berghei*

Plasmodium berghei adalah hemoprotzoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia. Salah satu rodensia tersebut adalah seperti mencit (*Mus Musculus*). *Plasmodium berghei* banyak digunakan dalam penelitian malaria.

2.4.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

Klasifikasi *Plasmodium berghei* adalah sebagai berikut (Jerry, 2006).

Kerajaan	: Protista
Kelas	: Apicomplexa
Kelas	: Aconosida
Ordo	: Haemosporida
Famili	: Plasmodiidae
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Spesies	: <i>Plasmodium berghei</i>

2.4.2 Alasan Penggunaan *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei banyak digunakan dalam penelitian malaria, hal ini disebabkan genom *Plasmodium berghei* mempunyai ukuran genom yang paling mirip dengan genom *Plasmodium falciparum*, dibandingkan dengan jenis *Plasmodium* yang

lain *Plasmodium falciparum*, sehingga dipergunakannya *Plasmodium berghei* pada penelitian ini diharapkan memiliki manifestasi klinis seperti *Plasmodium falciparum* (Ngaliyatun, 2013).

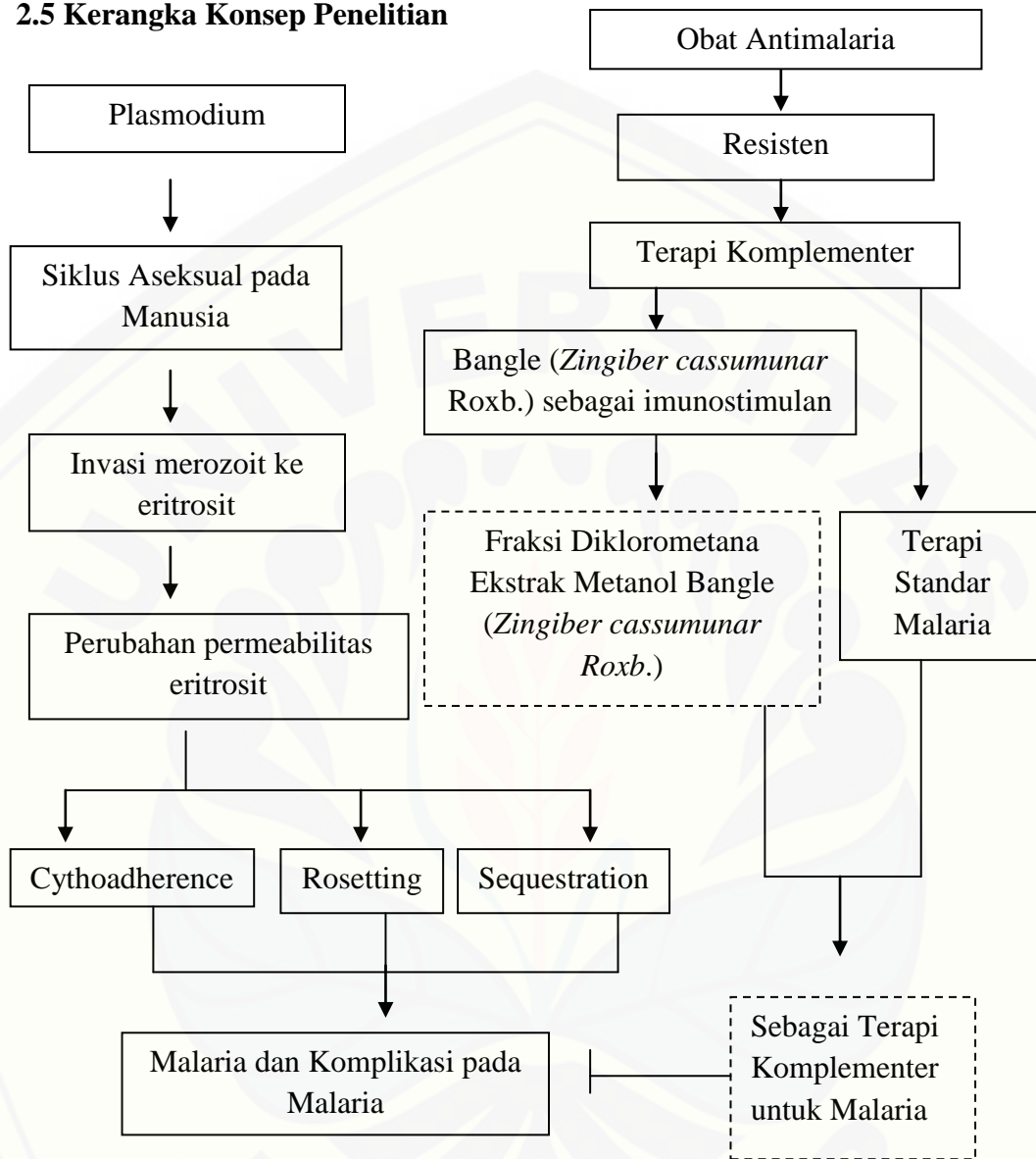
Alasan penggunaan *Plasmodium berghei* sebagai model penelitian adalah sebagai berikut.

- a. *Plasmodium berghei* belum pernah ditemukan dapat menyebabkan malaria pada manusia dan dalam penelitian laboratorium umumnya ditularkan melalui suntikan darah hewan pengerat terinfeksi ke hewan pengerat lainnya.
- b. Ketersediaan teknologi penanaman atau kultivasi in vitro dan produksi dalam skala besar terhadap berbagai fase siklus hidup.
- c. *Plasmodium berghei* memiliki kesamaan morfologi dengan *Plasmodium falciparum*.
- d. *Plasmodium berghei* juga memiliki kesamaan protein dengan *Plasmodium falciparum* pada permukaannya yang berperan pada invasi sel darah merah (Jerry, 2006).

2.4.3 Siklus Hidup *Plasmodium berghei*

Sporozoit dapat ditemukan di dalam hepatosit sejak beberapa menit sampai beberapa jam setelah di inokulasikan. Sporozoit akan berkembang selama 47-52 jam di dalam hepatosit dan sporozoit tersebut akan melewati beberapa fase yaitu dari mulai fase trophozoit sampai skizon matang. Hepatosit akan ruptur dan merozoit keluar dilepaskan ke aliran darah. *Plasmodium berghei* tidak dijumpai fase hipnozoit karena hewan pengerat terdapat respon imun yang melawan hipnozoit. Merozoit yang dikeluarkan akan mengulang fase aseksual, sebagian akan memasuki siklus seksual dan membentuk gametosit. Gametosit merupakan bentuk yang infeksius bagi nyamuk *Anopheles* dan dapat melanjutkan fase sporogoni (Jerry, 2006)

2.5 Kerangka Konsep Penelitian

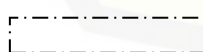


Gambar 2.5 Kerangka konsep penelitian

Keterangan :



: Penelitian yang telah diteliti



: Penelitian yang akan diteliti



: Menghambat

Plasmodium memiliki dua siklus hidup, siklus hidup aseksual pada tubuh manusia dan siklus hidup seksual pada nyamuk *Anopheles*. Siklus hidup aseksual pada tubuh manusia bertanggung jawab manifestasi klinik malaria yang terjadi pada manusia. Pada siklus hidup aseksual memiliki dua fase, yaitu fase eksoeritrositik dan fase eritrositik. Pada fase eritrositik, rupturnya skizon menjadi merozoit memicu makrofag yang sensitif toksin malaria untuk melepaskan berbagai mediator, sehingga timbul manifestasi klinik malaria. Merozoit juga dapat menginvasi eritrosit, yang dapat menyebabkan perubahan permeabilitas eritrosit. Perubahan permeabilitas eritrosit akan mempermudah eritrosit untuk menempel pada endotelium venula kapiler yang disebut proses *cytho adherence*, selain itu eritrosit yang terinfeksi juga dapat berikatan dengan eritrosit yang tidak terinfeksi disebut proses *rosetting*. Proses *cytho adherenc* yang terjadi di jaringan mikrovaskuler disebut *sequestration*. Ketiga mekanisme ini dapat menyebabkan komplikasi pada malaria.

Resistensi terhadap obat antimalaria yang sering digunakan membuat peneliti ingin mengembangkan suatu terapi komplementer dengan menggunakan tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) bersama terapi standar malaria yang ada untuk mengobati manifestasi klinik malaria dan komplikasi pada malaria. Kandungan senyawa pada tanaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) akan diambil melalui proses ekstraksi dengan menggunakan metanol dan proses fraksinasi dengan menggunakan diklorometana.

2.6 Hipotesis Penelitian

Pada penelitian uji aktivitas senyawa hasil fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer untuk mengobati malaria, peneliti memiliki hipotesis sebagai berikut.

- a. Fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas terapi komplementer malaria.
- b. Fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045mg/grBB, dan

0,09 mg/grBB memiliki korelasi dengan persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebagai terapi komplementer Malaria secara *in vivo*.



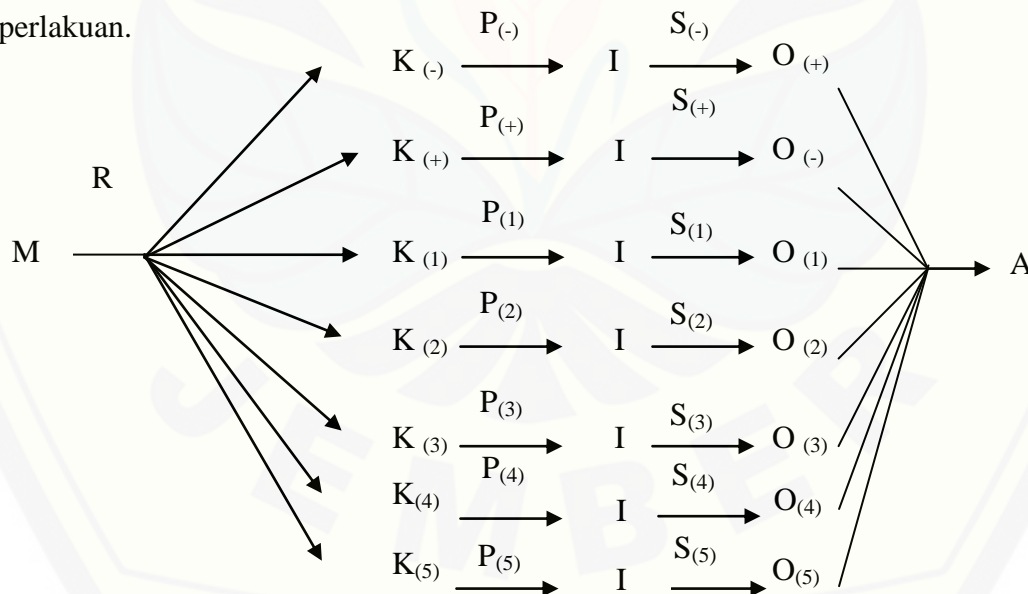
BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental laboratoris (*True experimental design*). Penelitian ini menggunakan desain *Randomized Posttest Only Control Design*. Dalam desain ini terdapat tujuh kelompok yang dipilih secara random (R). Kelompok pertama dan kedua sebagai kelompok kontrol, dan kelompok lainnya diberi perlakuan disebut kelompok eksperimen.

3.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan eksperimental *Randomized Posttest Only Control Design* dengan satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan lima kelompok perlakuan.



Gambar 3.1 Rancangan penelitian

Keterangan :

- M = mencit
- R = randomisasi
- K₍₋₎ = kelompok kontrol negatif
- K₍₊₎ = kelompok kontrol positif
- K₍₁₎₍₂₎₍₃₎₍₄₎₍₅₎ = kelompok perlakuan satu, dua, tiga, empat, dan lima
- P₍₋₎ = perlakuan kontrol negatif tidak diberikan stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle
- P₍₊₎ = perlakuan kontrol positif tidak diberikan stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle
- P₍₁₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,005625 mg/grBB selama 14 hari
- P₍₂₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,01125 mg/grBB selama 14 hari
- P₍₃₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,0225 mg/grBB selama 14 hari
- P₍₄₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,045 mg/grBB selama 14 hari
- P₍₅₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,09 mg/grBB selama 14 hari
- I = induksi malaria dengan *Plasmodium berghei*
- S₍₋₎ = perlakuan kontrol negatif tidak diberi terapi standar malaria dan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle
- S₍₊₎ = perlakuan kontrol positif dengan pemberian terapi standar malaria
- S₍₁₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,005625 mg/grBB dan pemberian terapi standar malaria selama 3 hari

- S₍₂₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,01125 mg/grBB dan pemberian terapi standar malaria selama 3 hari
- S₍₃₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,0225 mg/grBB dan pemberian terapi standar malaria selama 3 hari
- S₍₄₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,045 mg/grBB dan pemberian terapi standar malaria selama 3 hari
- S₍₅₎ = perlakuan pemberian stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,09 mg/grBB dan pemberian terapi standar malaria selama 3 hari
- O₍₋₎₍₊₎₍₁₎₍₂₎₍₃₎₍₄₎₍₅₎ = observasi kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan satu, dua, tiga, empat, dan lima
- A = analisis data

3.3 Tempat dan Waktu penelitian

Pemeliharaan hewan coba, induksi malaria, perlakuan pada hewan percobaan, dan pengambilan sampel dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pemeriksaan derajat parasitemia dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Proses ekstraksi dan fraksinasi dari bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dilaksanakan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember. Penelitian ini dilakukan Bulan Oktober sampai dengan November 2015.

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

3.4.1 Populasi

Populasi pada penelitian ini adalah mencit galur Balb/c jantan karena strain ini dapat menimbulkan respon imunitas terhadap induksi *Plasmodium berghei*.

3.4.2 Sampel

Pada penelitian ini terdapat kriteria inklusi dan eksklusi yang bertujuan untuk membuat homogen sampel yang akan digunakan. Kriteria inklusi sampel penelitian adalah sebagai berikut.

- a. Mencit galur Balb/c jantan.
- b. Umur dua sampai dengan tiga bulan.
- c. Berat rata-rata 25 gram sampai dengan 30 gram.

Kriteria eksklusi pada penelitian ini adalah mencit yang sakit sebelum proses randomisasi.

3.4.3 Jumlah Sampel

Perhitungan jumlah sampel menggunakan rumus Federer sebagai berikut.

$$\begin{aligned} (t-1)(r-1) &\geq 15 \\ (7-1)(r-1) &\geq 15 \\ 6(r-1) &\geq 15 \\ 6r-6 &\geq 15 \\ 6r &\geq 21 \\ R &\geq 3,5 \text{ dibulatkan } 4 \end{aligned}$$

Keterangan :

- t : jumlah kelompok
r : jumlah sampel dalam kelompok

Menurut perhitungan dengan menggunakan rumus Federer besar sampel yang dibutuhkan minimal adalah 4 ekor untuk masing-masing kelompok. Dalam 7 kelompok dalam penelitian ini akan ada 4 ekor mencit, sehingga jumlah sampel yang diambil sebanyak 28 mencit.

3.5 Variabel Penelitian

3.5.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis yang berbeda. Pemberian dosis dibedakan menjadi lima dosis, yaitu 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

3.5.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* akibat pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada hewan coba.

3.5.3 Variabel luar

Variabel luar dalam penelitian ini dibedakan menjadi variabel yang dapat dikendalikan dan variabel yang tidak dapat dikendalikan.

a. Variabel Luar Dapat Dikendalikan

Variabel luar yang dapat dikendalikan dalam penelitian ini meliputi umur hewan coba, berat badan hewan coba, jenis kelamin, galur hewan coba, pemeliharaan hewan coba, lama perlakuan, dan jenis perlakuan hewan coba.

b. Variabel Luar yang Tidak Terkendali

Variabel luar yang tidak dapat dikendalikan adalah stress psikologis hewan coba akibat perlakuan yang diberikan dan imun, karena setiap hewan coba memiliki ambang batas stress psikologis dan imun yang berbeda.

3.6 Definisi Operasional

3.6.1 Uji Aktivitas Antimalaria

Aktivitas antimalaria diukur dengan cara menghitung persentase penghambatan terhadap *Plasmodium* yang diolah dari perhitungan derajat parasitemia

masing-masing sampel hewan coba yang terinfeksi *Plasmodium berghei* selama 4 hari.

3.6.2 Terapi Komplementer Malaria

Pada penelitian ini pemberian terapi komplementer berupa pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai imunostimulan selama 14 hari sebelum terinfeksi dan sebagai terapi bersama terapi standar malaria selama 3 hari. Terapi malaria yang diberikan adalah kombinasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan terapi standar malaria pada lini pertama *Plasmodium falciparum*, berupa Arterakin atau DHP (Dihydroartemisinin dan Piperakuin) dan Primakuin. DHP atau Arterakin diberikan selama 3 hari dan pada hari pertama diberikan primakuin. DHP dan primakuin didapatkan Dinas Kesehatan Kabupaten Jember.

3.6.3 Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Fraksinasi dilakukan setelah ekstraksi dilakukan pada rimpang Bangle. Rimpang Bangle diekstrak menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi. Fraksinasi dilakukan dengan fraksinasi bertingkat. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar *n*-heksana, sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksinasi berikutnya dengan pencampuran dengan pelarut semi polar diklorometana sehingga diperoleh fraksi diklorometana dan fraksi air. Fraksi diklorometana diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental diklorometana ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.).

3.6.4 Derajat Parasitemia

Derajat parasitemia adalah jumlah persentase eritrosit yang terinfeksi dalam seribu eritrosit dihitung dengan menggunakan hand counter pada sediaan hapusan darah tipis yang diwarnai dengan pewarnaan Giemsa. Derajat parasitemia dihitung pada hari pertama masing-masing hewan coba terinfeksi *Plasmodium berghei* (empat

hari setelah induksi *Plasmodium berghei*), hari kedua (24 jam setelah terapi), hari ketiga (48 jam setelah terapi), dan hari keempat (72 jam setelah terapi).

3.6.5 Persentase Penghambatan terhadap *Plasmodium*

Persentase penghambatan adalah kemampuan setiap dosis dari fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* yang sudah diinfeksi pada mencit. Persentase penghambatan merupakan perbandingan rata-rata persentase pertumbuhan parasit pada kelompok tersebut dengan persentase parasitemia kelompok tersebut pada hari pertama. Persentase pertumbuhan parasit diperoleh dari perhitungan selisih persentase derajat parasitemia hari terakhir dengan hari pertama. Data persentase penghambatan parasit juga dianalisis dengan probit untuk memperoleh nilai *Inhibitory Concentration of 50%* (IC_{50}).

3.6.6 Nilai *Inhibitory Concentration of 50%* (IC_{50})

Inhibitory Concentration of 50% (IC_{50}) adalah konsentrasi obat atau bahan lain yang dibutuhkan untuk menghambat 50% proses biologis tertentu. Bahan yang diuji adalah fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dalam menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*.

3.6.7 Kelompok Kontrol

Pada penelitian ini kelompok kontrol digunakan sebagai pembanding kelompok perlakuan. Kelompok kontrol positif merupakan kelompok yang diberikan terapi standar malaria saja selama 3 hari setelah terinfeksi malaria, berupa Arterakin atau DHP (Dihydroartemisinin dan Piperakuin) dan Primakuin pada hari pertama. Kelompok kontrol negatif merupakan kelompok yang tidak diberi perlakuan.

3.7 Alat dan Bahan Penelitian

3.7.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Alat yang digunakan untuk pemeliharaan mencit, seperti kandang, tempat makan, tempat minum, dan sonde (sprit yang dimodifikasi digunakan untuk memasukan fraksi dan larutan obat malaria peroral).
- b. Instrumen yang digunakan untuk menimbang adalah timbangan untuk menimbang mencit dan Neraca OHAUS untuk menimbang dosis fraksi dan dosis obat malaria.
- c. Instrumen yang digunakan dalam pembuatan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle, seperti blender, *rotary evaporator*, saringan, *beaker glass*, kaki tiga, statif, *water bath*, *hot plate*, dan corong pisah.
- d. Tempat yang digunakan untuk penyimpanan fraksi adalah lemari pendingin.
- e. Instrumen yang digunakan untuk melarutkan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle, seperti gelas ukur, pengaduk, mikropipet, mikrotip, eppendorf, dan pipet.
- f. Instrumen yang digunakan untuk pengambilan sampel derajat parasitemia adalah objek glass, cover glass, dan gunting.
- g. Instrumen yang digunakan untuk pembedahan mencit adalah minorset, parafin, spuit 1 cc, dan tabung EDTA.

3.7.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Bahan penelitian adalah mencit jantan galur Balb/c berat badan 25-30 gram dan berumur 2-3 bulan.
- b. Bahan yang digunakan untuk pemeliharaan adalah pakan standar turbo 521.
- c. Bahan yang digunakan untuk induksi malaria adalah isolat *Plasmodium berghei* strain ANKA.

- d. Bahan yang digunakan untuk perlakuan adalah fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle, DHP, primakuin dan pelarut tween 80%, dan aquades.
- e. Bahan yang digunakan untuk membuat fraksi adalah rimpang bangle, metanol 90%, heksana dan diklorometana PA.
- f. Bahan yang digunakan untuk pembuatan dan penggunaan hapusan adalah pewarna giemsa, metanol, minyak imersi, dan aquades.
- g. Bahan yang digunakan untuk pembedahan adalah kloroform, PBS, dan medium RPMI.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Persiapan Hewan Coba

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan dengan galur Balb/c dengan berat badan 25-30 gram dan berusia 2-3 bulan. Hewan coba dipelihara dalam 7 kandang dan satu kandang berisi 4 mencit. Mencit diadaptasi selama 7 hari di laboratorium sebelum diberi perlakuan pakan standar turbo 521 dan diberi air secara *ad libitum*. Pada hari perlakuan, semua hewan uji ditimbang dan masing-masing diberi tanda pengenal pada ekornya, 28 mencit dibagi menjadi 7 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor, yaitu sebagai berikut.

- a. Kelompok 1 : kontrol negatif, mencit yang akan diinduksi malaria tanpa diberi perlakuan pemberian terapi.
- b. Kelompok 2 : kontrol positif, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan terapi standar malaria (dosis Dihydroartemisinin 0,0182 mg/grBB mencit, dosis Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit, dan dosis Primakuin 0,006825 mg/grBB mencit).
- c. Kelompok 3 : mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,005625 mg/grBB + terapi standar malaria (dosis Dihydroartemisinin 0,0182 mg/grBB mencit, dosis Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit, dan dosis Primakuin 0,006825 mg/grBB mencit).

- d. Kelompok 4 : mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,01125 mg/gr BB + terapi standar malaria (dosis Dihydroartemisinin 0,0182 mg/grBB mencit, dosis Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit, dan dosis Primakuin 0,006825 mg/grBB mencit).
- e. Kelompok 5 : mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,0225 mg/grBB + terapi standar malaria (dosis Dihydroartemisinin 0,0182 mg/grBB mencit, dosis Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit, dan dosis Primakuin 0,006825 mg/grBB mencit).
- f. Kelompok 6 : mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,045 mg/grBB + terapi standar malaria (dosis Dihydroartemisinin 0,0182 mg/grBB mencit, dosis Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit, dan dosis Primakuin 0,006825 mg/grBB mencit).
- g. Kelompok 7 : mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,09 mg/grBB + terapi standar malaria (dosis Dihydroartemisinin 0,0182 mg/grBB mencit, dosis Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit, dan dosis Primakuin 0,006825 mg/grBB mencit).

3.8.2 Pembuatan Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle

Bahan yang digunakan adalah rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), didapat dari Ponorogo Jawa Timur. Rimpang bangle dicuci bersih, dipotong-potong kecil, dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan tidak boleh dijemur di sinar matahari karena minyak atsiri yang terkandung di dalam rimpang bangle dapat menguap. Potongan tipis kering tersebut dimasukkan ke dalam penggilingan dengan besar lubang untuk menyaring 0,75 mm. Pembuatan sediaan ekstrak metanol rimpang bangle dilakukan dengan cara maserasi. Perendaman dilakukan selama selama 24

jam sambil sesekali diaduk. Pelarut yang digunakan dalam perendaman bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah metanol dengan perbandingan 1:6. Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong *buchner* sehingga diperoleh filtrat. Residu dimaserasi ulang dengan cara yang sama sebanyak empat kali. Filtrat yang dihasilkan dipisahkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental. Ekstrak dibiarkan dalam suhu ruang atau dipanaskan dalam pemanas suhu rendah agar sisa metanol bisa menguap sampai habis dan ekstrak menjadi kering. Fraksinasi bertingkat dilakukan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya di dalam corong pisah. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar *n*-heksana sebanyak sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksinasi berikutnya dengan pencampuran dengan pelarut semi polar diklorometana sehingga diperoleh fraksi diklorometana dan fraksi air. Fraksi diklorometana kemudian diuapkan dengan *water bath* sehingga diperoleh fraksi kental diklorometana.

3.8.3 Penetapan Dosis Terapi Standar Malaria

Dosis tunggal harian yang diperlukan manusia sebagai obat antimalaria falciparum adalah 2-4 mg/kgBB Dihidroartemisinin dan 16-32 mg/kgBB Piperaquin serta 0,75 mg/kgBB Primakuin. Nilai konversi dosis obat dari dosis manusia dengan berat badan 70kg menjadi dosis mencit 20g adalah 0,0026. Rumus perhitungannya adalah sebagai berikut.

$$\begin{aligned} \text{Dosis dihidroartemisinin} &= (\text{Dosis Dihidroartemisinin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB} \\ &\text{manusia}) : 20 \\ &= (2 \times 0,0026 \times 70) : 20 \\ &= 0,0182 \text{ mg/grBB mencit (dosis tunggal harian).} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis piperaquin} &= (\text{Dosis Piperaquin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB manusia}) : \\ &20 \\ &= (16 \times 0,0026 \times 70) : 20 \\ &= 0,1456 \text{ mg/grBB mencit (dosis tunggal harian).} \end{aligned}$$

$$\text{Dosis primakuin} = (\text{Dosis Primakuin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB manusia}) : 20$$

$$\begin{aligned} &= (0,75 \times 0,0026 \times 70) : 20 \\ &= 0,006825 \text{ mg/grBB mencit (dosis tunggal harian).} \end{aligned}$$

3.8.4 Penetapan Dosis Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle

Penelitian Armiyanti *et al.* (2013) menyatakan dosis ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang dapat diberikan pada mencit dengan berat badan rata-rata 25 gram adalah 22,6 mg/25grBB. Dosis fraksi adalah 10% dari dosis ekstrak karena senyawa fraksi lebih murni daripada senyawa dalam ekstrak. Dosis fraksi diklorometana ekstrak bangle adalah sebagai berikut.

Dosis fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle = 10% x dosis ekstrak bangle

Dosis fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle = 10% x 22,6 mg/25grBB.

Dosis fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle = 2,26 mg/25grBB mencit.

Dosis fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle = 0,09 mg/grBB mencit.

Berdasarkan trial yang pernah dilakukan dosis 0,09 mg/grBB efektif dalam menurunkan derajat parasitemia tetapi memiliki toksisitas yang tinggi, sehingga pada penelitian ini dosis diturunkan menjadi 0,045 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, dan 0,005625 mg/grBB.

3.8.5 Stimulasi Pemberian Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle

Pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dibagi dalam lima dosis, yaitu 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB pada kelompok perlakuan. Stimulasi pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dilakukan dengan tujuan untuk meningkatkan sistem imun pada mencit sebelum diinduksi malaria. Stimulasi ini dilakukan selama 14 hari setelah mencit diadaptasi selama 7 hari di laboratorium. Pada kelompok kontrol positif dan kontrol negatif tidak diberikan stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle.

3.8.6 Infeksi *Plasmodium berghei*

a. Pembiakan *Plasmodium berghei* pada mencit donor

Kegiatan pembiakan *Plasmodium berghei* dilakukan dalam laminer (LAV). Isolat yang berisi darah hewan coba yang sudah terinfeksi *Plasmodium berghei* dari simpanan beku dicairkan dalam suhu ruangan. Isolat dapat didapatkan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Isolat beku yang dipakai ada dua strain yaitu, *Plasmodium berghei* lokal dan *Plasmodium berghei* dari luar negeri. Isolat yang sudah cair disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 5 menit. Lapisan yang terbentuk ada dua, yaitu lapisan *supernatant* dan *pellet*. Lapisan *supernatant* diambil sehingga yang tertinggal hanya lapisan *pellet*.

Lapisan *pellet* dalam *ependorf* dicuci dengan PBS dan disentrifuge lagi selama 5 menit. Lapisan *supernatant* diambil kembali dan yang tertinggal hanya lapisan *pellet*. *Eppendorf* yang berisi lapisan *pellet* diukur volumenya kemudian dicampurkan dengan medium *complete* dengan volume yang sama. Sediaan tersebut diinjeksikan pada mencit sebanyak kurang lebih 200 μL (0,2) ml secara intraperitoneal untuk digunakan sebagai mencit donor. Setiap hari dilakukan pemeriksaan derajat parasitemia dari mencit donor sampai persen parasitemia 10%. Derajat parasitemia lebih dari 10% apabila diinokulasikan pada mencit lain ataupun diambil darahnya memiliki kemungkinan positif lebih besar. Darah yang terinfeksi dari mencit donor diambil melalui intrakardial dapat disimpan sebagai stok isolat dan diletakkan dalam lemari pendingin dengan suhu $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

b. Induksi *Plasmodium berghei* pada sampel mencit

Pembiakan pada hewan coba disebut inokulasi. Inokulasi dilakukan apabila derajat parasitemia pada hewan coba mencapai 10% - 15%. Darah yang terinfeksi diambil dari mencit donor secara intrakardial menggunakan spuit 1cc. Darah terinfeksi dimasukkan ke dalam tabung EDTA supaya tidak terjadi koagulasi. Darah dari EDTA diambil 10 μL dengan menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam *ependorf* pertama yang berisi PBS atau medium RPMI 990 μL (pengenceran 100 kali). Campuran darah dan PBS di dalam *ependorf* disuspensikan kemudian

diambil 10 μ L untuk dimasukkan ke dalam eppendorf kedua yang berisi PBS 990 μ L (pengenceran 10.000 kali). Campuran dalam eppendorf kedua diteteskan pada hemositometer untuk menghitung jumlah eritrosit. Hemositometer dilihat pada mikroskop, selanjutnya dihitung jumlah eritrositnya pada semua kotak yang berjumlah 25 buah yang dibatasi 3 garis di tiap kotak. Jumlah eritrosit yang terlihat menentukan jumlah pengenceran yang dibutuhkan untuk inokulasi.

$$\text{Jumlah Pengenceran} = \frac{n \times a \times b \times 10^4}{5 \times 10^6}$$

Keterangan :

- n : jumlah eritrosit yang dilihat
- a : pengenceran yang dilakukan
- b : persen derajat parasitemia

Volume campuran yang diinjeksikan untuk inokulasi ke tiap mencit coba adalah 0,2 ml sehingga darah mencit donor yang digunakan untuk inokulasi diperoleh dengan menghitung volume total campuran yang dibutuhkan sesuai jumlah mencit coba yang akan diinokulasi dibagi dengan jumlah pengenceran (A).

$$\text{Volume darah mencit donor (B)} = \frac{a \times 0,2 \text{ ml}}{A}$$

Keterangan:

- a : jumlah hewan coba yang akan diinduksi
- A : jumlah pengenceran

Setelah mengetahui jumlah darah yang diperlukan, jumlah medium RPMI yang digunakan untuk campuran darah yang akan digunakan untuk inokulasi diperoleh dengan menghitung volume total campuran yang akan diinjeksikan (sesuai jumlah mencit coba) dikurangi dengan jumlah darah yang diperlukan. Medium RPMI dan darah mencit donor dimasukkan ke dalam tabung *falcon* dan dicampur perlahan-lahan untuk menghindari hemolisis. Campuran tersebut dimasukkan kedalam *spuit* 1 cc dan diinjeksikan ke tiap mencit coba secara intraperitoneal sebanyak 0,2 ml.

3.8.7 Pemberian Terapi

Pemberian terapi dilakukan setelah hewan coba positif malaria. Pada kelompok perlakuan terapi yang diberikan berupa fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle tetap dilakukan dengan 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB bersama dengan terapi standar malaria. Pada kelompok kontrol positif tidak diberikan stimulasi fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle, kelompok tersebut hanya diberikan terapi standar malaria. Pada kelompok kontrol negatif tidak diberikan terapi, baik fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle maupun terapi standar malaria. Terapi standar malaria yang diberikan adalah Dihydroartemisinin dengan dosis 0,0182 mg/grBB mencit dan Piperaquin 0,1456 mg/grBB mencit selama 3 hari dan pada hari pertama diberi Primakuin dengan dosis 0,006825 mg/grBB mencit.

3.8.8 Pembuatan Hapusan Darah Sediaan Tetes Darah Tipis

Hapusan darah dibuat dari setetes darah dari vena lateral ekor mencit yang diletakkan di atas object glass kemudian diratakan dengan cover glass. Hapusan dikeringkan dan difiksasi dengan menggunakan metanol. Hapusan yang terfiksasi akan diwarnai dengan pewarnaan giemsa selama 20 menit, kemudian di bilas dengan air.

3.8.9 Penentuan Derajat Parasitemia

Hapusan darah yang telah dibuat diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100 kali menggunakan minyak imersi. Sel darah merah normal berwarna ungu, sedangkan pada sel darah yang terinfeksi parasit berwarna merah dengan sitoplasma berwarna biru di sekitarnya. Perhitungan jumlah parasit dilakukan hingga mencapai 1000 eritrosit dan tidak bergantung pada jumlah lapang pandang yang dilihat. Derajat parasitemia dihitung dengan rumus.

$$\text{Persentase parasitemia} = \frac{\text{jumlah eritrosit terinfeksi} \times 100\%}{1000 \text{ eritrosit}}$$

3.8.10 Perhitungan Persentase Penghambatan

Pengamatan hapusan darah tipis meliputi perhitungan jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit malaria setiap seribu eritrosit (persen parasitemia) yang kemudian dihitung persentase pertumbuhan dan persentase penghambatan masing-masing kelompok dengan cara perhitungan sebagai berikut (Olasehinde *et al.*, 2012).

$$\% \text{ pertumbuhan} = \% \text{ parasitemia rata-rata } H_3 - \% \text{ parasitemia rata-rata } H_0$$

$$\text{Persentase penghambatan} = \frac{\% \text{ pertumbuhan}}{\% \text{ parasitemia } H_0} \times 100\%$$

Keterangan :

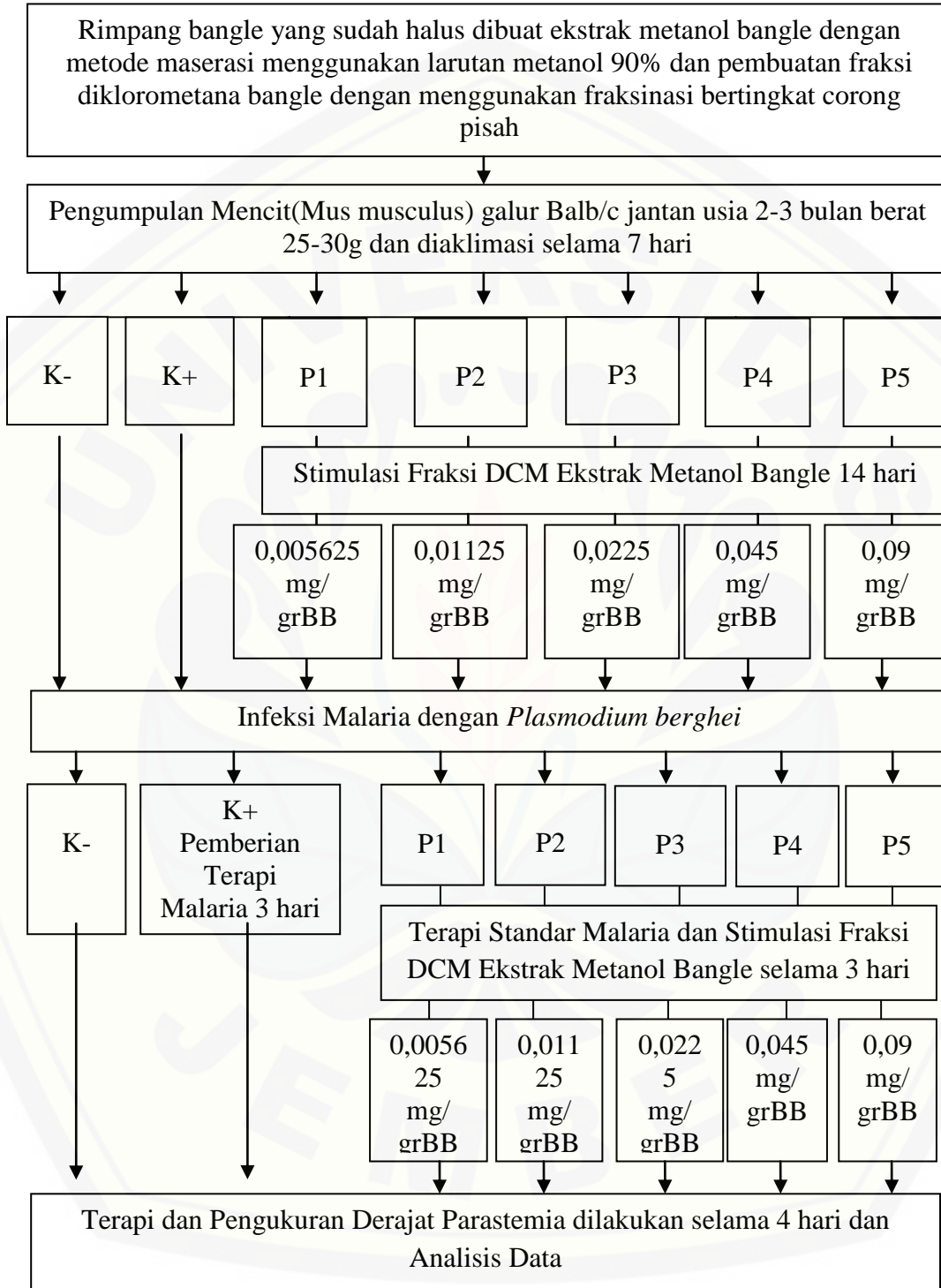
H_3 : hari keempat setelah terinfeksi malaria atau 72 jam setelah terapi

H_0 : hari pertama setelah terinfeksi malaria (empat hari setelah induksi *Plasmodium berghei*)

3.9 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Data tersebut diuji normalitas dengan menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk*. Korelasi antara kedua variabel dilihat dengan menggunakan uji korelasi *Pearson*. Penentuan nilai *Inhibitory Concentration of 50%* (IC_{50}) fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo* dengan menggunakan analisis probit. Hasil analisis tersebut disajikan dalam bentuk tabel dan dibahas dalam bentuk narasi.

3.10 Alur penelitian



Gambar 3.2 Alur penelitian