



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

SKRIPSI

Oleh

**Sarah Andriani
NIM 122010101035**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**

2015



**UJI AKTIVITAS FRAKSI N-HEKSANA 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 Pendidikan Dokter (S1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh

**Sarah Andriani
NIM 122010101035**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER**


2015

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT atas rahmat dan hidayah-Nya yang telah diberikan kepada saya;
2. Nabi Muhammad SAW beserta sahabatnya yang telah memberikan pedoman kepada saya berupa agama Islam;
3. Ayahanda Subiyantoro dan juga ibunda Anik Ulfatin yang telah memberikan doanya, dukungan, pengorbanan, kasih sayang dan didikannya kepada saya;
4. Adik kandung Muhammad Rizal Fabio yang selalu mendukung perjalanan kuliah saya;
5. Para guru-guru sejak taman kanak-kanak hingga perguruan tinggi;
6. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTTO



Allah akan meninggikan orang-orang yang beriman di antaramu dan orang-orang yang diberi ilmu pengetahuan beberapa derajat. Dan Allah mengetahui apa yang kamu kerjakan.*)

*⁾ Qur'an Surat Al-Mujaadilah ayat 11

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Sarah Andriani

NIM :122010101035

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Fraksi N-Heksana 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,

Sarah Andriani

NIM.122010101035

SKRIPSI

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

Oleh

Sarah Andriani

NIM 122010101035

Pembimbing:

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Sugiyanta. M. Ked

PENGESAHAN

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

Hari, tanggal : Senin, 21 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. Desie Dwi Wisudanti, M. Biomed
NIP. 198212112008122002

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed
NIP. 198304052008121001

dr. Sugiyanta, M. Ked
NIP. 197902072005011001

Mengesahkan

Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 197002141999032001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Fraksi N-Heksana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In Vivo*; Sarah Andriani; 122010101035; 2015; 75 Halaman; Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Malaria saat ini masih menjadi penyakit endemis di beberapa daerah di Indonesia dan banyak menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, balita dan ibu hamil serta pada penduduk pendatang baru di daerah endemis malaria yang belum memiliki imunitas terhadap malaria. *Artemisinin-Based Combination Therapy* (ACT) masih menjadi terapi utama untuk malaria namun telah dilaporkan adanya resistensi sehingga perlu dilakukan penelitian untuk mencari terapi baru maupun terapi komplementer untuk malaria. Peranan imunitas tubuh dalam menghadapi malaria cukup penting sehingga terapi komplementer yang bekerja sebagai imunostimulan dapat dijadikan pilihan.

Pertahanan tubuh terhadap malaria melibatkan hampir seluruh komponen sistem imun spesifik dan non-spesifik dengan tujuan menghambat siklus aseksual *Plasmodium sp.* dan mengurangi keparahan malaria. Pada penelitian sebelumnya secara *in vivo* telah dibuktikan bahwa stimulasi ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,904 mg/gr BB dapat meningkatkan sistem imun non-spesifik dan dapat menurunkan derajat parasitemia pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* serta mendapatkan terapi standar ACT. Penelitian tersebut menggunakan ekstrak kasar, sehingga dalam penelitian ini akan dipergunakan metode fraksinasi untuk menghasilkan fraksi n-heksana dari ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) untuk memperoleh senyawa non-polar yang lebih murni sebagai terapi komplementer malaria bersama terapi standar ACT.

Jenis penelitian yang dilakukan adalah *true experimental design* dengan rancangan *Posttest-only Control Group Design* menggunakan sampel 28 ekor mencit yang dibagi menjadi 5 kelompok perlakuan, 1 kelompok kontrol positif dan 1 kelompok kontrol negatif. Dilakukan stimulasi fraksi n-heksana ekstrak metanol

bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada kelima kelompok perlakuan dengan dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB selama 14 hari sebelum diinduksi *Plasmodium berghei*. Setelah positif malaria kelompok kontrol positif diberi terapi ACT, kontrol negatif tidak diberi terapi, dan kelima kelompok perlakuan diterapi ACT bersama fraksi bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sesuai dosis stimulasi pada masing-masing kelompok selama tiga hari. Dilakukan pemeriksaan derajat parasitemia kepada seluruh hewan coba setiap hari mulai dari hari sebelum pemberian terapi (H_0) sampai hari ketiga pemberian terapi (H_3) kemudian dihitung persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada masing-masing kelompok. Data persentase penghambatan dianalisis dengan uji normalitas *Saphiro-Wilk* dilanjutkan dengan uji korelasi *Pearson* dan analisis probit.

Pada penelitian ini didapatkan persentase penghambatan pada kelompok kontrol positif sebesar 24,74% \pm 0,86; kelompok perlakuan dosis 0,005625 mg/grBB sebesar 30,37% \pm 2,88; kelompok perlakuan dosis 0,01125 mg/grBB sebesar 55,02% \pm 5,68; kelompok perlakuan dosis 0,0225 mg/grBB sebesar 59,63% \pm 2,53; kelompok perlakuan dosis 0,045 mr/grBB sebesar 74,95% \pm 3,18; dan kelompok perlakuan dosis 0,09 mg/grBB sebesar 85,72% \pm 1,58. Kelompok perlakuan yang diberi stimulasi dan terapi fraksi bersama terapi standar ACT memiliki persentase penghambatan lebih tinggi dibandingkan kelompok kontrol positif tanpa stimulasi dan hanya diberi terapi standar ACT. Dari uji normalitas *Saphiro-Wilk* didapatkan nilai signifikansi $>0,05$ yang menunjukkan data terdistribusi normal, dilanjutkan dengan uji korelasi *Pearson* yang menghasilkan nilai signifikansi 0,000 dan nilai korelasi 0,880 menunjukkan bahwa korelasi antara dosis fraksi dan persentase penghambatan pertumbuhan parasit adalah bermakna dan sangat kuat. Dari analisis probit didapatkan nilai IC_{50} fraksi sebagai terapi komplementer sebesar 0,013 mg/grBB. Berdasarkan penelitian ini fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terbukti memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria dengan konsentrasi penghambatan setengah maksimal (IC_{50}) sebesar 0,013 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 N-Heksana 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 selaku Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
2. dr. Rini Riyanti, Sp. PK selaku Dosen Pembimbing Akademik penulis yang senantiasa membimbing penulis selama menjadi mahasiswa;
3. dr. Bagus Hermansyah, M. Biomed selaku dosen pembimbing utama dan dr. Sugiyanta, M. Ked selaku dosen pembimbing anggota yang telah membimbing dan membantu penulis dalam menyusun skripsi ini;
4. dr. Wiwien Sugih Utami, M.Sc, dr. Dini Agustina, M. Biomed dan Pak Nuri, SSi., MSi., Apt yang telah memberikan waktu dan ilmunya untuk membantu penulis dalam menyusun skripsi ini;
5. Dr. rer. biol. hum. dr. Erma Sulistyaningsih, M. Si dan dr. Desie Dwi Wisudanti, M. Biomed selaku dosen penguji yang banyak memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
6. Lilik Maslian, A.Md analis Laboratorium Farmakologi dan Lilik Susilowati, A. Md analis Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember serta kepada mas Agus Murdojohadi, A. Md yang telah banyak membantu dalam penelitian sehingga penelitian dapat terlaksana dengan baik;

7. Ayah, Ibu, Adik, dan segenap keluarga besar yang telah memberikan doa, dukungan, pengorbanan dan kasih sayang yang tidak terhingga kepada penulis;
8. saudari-saudari Edda Rachmadenawanti dan Yessie Elin Santoso atas segala kasih sayang dan dorongan semangat yang senantiasa diberikan kepada penulis sehingga peneliti tetap tegar dan bersemangat dalam menyusun skripsi ini;
9. Muhammad Avin Zamroni, serta kepada sahabat-sahabat terbaik Intan Palupi, Monica Bethari Primanesa, Ivan Kristantya, Geraldi Kusuma Wijaya yang telah meluangkan waktu dan pikiran serta memberikan dorongan semangat kepada peneliti dalam menyusun skripsi ini;
10. teman-teman sekaligus keluarga besar Panacea;
11. seluruh analis dan civitas Fakultas Kedokteran Universitas Jember;
12. semua pihak yang tidak dapat dituliskan 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, 3 Desember 2015

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
HALAMAN MOTTO	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	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Malaria	6
2.1.1 Etiologi.....	6
2.1.2 Patogenesis.....	7
2.1.3 Manifestasi Klinis	11

2.1.4	Diagnosis	12
2.1.5	Tatalaksana	13
2.2	Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	18
2.2.1	Klasifikasi	19
2.2.2	Kandungan Bahan Aktif	19
2.2.3	Manfaat	20
2.3	<i>Plasmodium berghei</i>	21
2.3.1	Klasifikasi	23
2.3.2	Morfologi	23
2.3.3	<i>Plasmodium berghei</i> Sebagai Model untuk Riset Malaria	24
2.4	Artemisinin	25
2.5	Kerangka Teori.....	27
2.6	Kerangka Konseptual.....	29
2.7	Hipotesis.....	30
BAB 3.	METODE PENELITIAN.....	31
3.1	Jenis Penelitian.....	31
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian.....	31
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian.....	31
3.3.1	Populasi Penelitian.....	32
3.3.2	Sampel Penelitian	32
3.3.3	Jumlah Sampel	32
3.4	Variabel Penelitian.....	33
3.4.1	Variabel Bebas	33
3.4.2	Variabel Terikat	33
3.4.3	Variabel Luar	33
3.5	Definisi Operasional.....	34
3.5.1	Rimpang Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	34
3.5.2	Heksana.....	34
3.5.3	<i>Plasmodium berghei</i>	35

3.5.4 Artemisinin	35
3.5.5 Derajat Parasitemia	35
3.6 Rancangan Penelitian	35
3.7 Alur dan Teknik Perolehan Data	37
3.7.1 Alat dan Bahan.....	38
3.7.2 Ekstraksi Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	38
3.7.3 Fraksinasi Ekstrak Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).	39
3.7.4 Penentuan Dosis Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.) dan Artemisinin	39
3.7.5 Persiapan Hewan Coba	40
3.7.6 Stimulasi Fraksi Ekstrak Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	41
3.7.7 Induksi <i>Plasmodium berghei</i> pada hewan coba.....	41
3.7.8 Pemberian Fraksi Ekstrak Bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.) dan Artemisinin	43
3.7.9 Pembuatan Hapusan Darah dan Penghitungan Derajat Parasitemia	44
3.7.10 Penghitungan Persentase Penghambatan	44
3.8 Analisis Data.....	45
3.9 Alur Penelitian	46
BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN	47
4.1 Hasil Penelitian.....	47
4.2 Analisis Data.....	51
4.2.1 Hasil Uji Normalitas Saphiro-Wilk	51
4.2.2 Hasil Uji Korelasi Pearson.....	51
4.2.3 Hasil Analisis Probit.....	52
4.3 Pembahasan.....	52
BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1 Kesimpulan.....	57

5.2 Saran	57
DAFTAR PUSTAKA	58
LAMPIRAN.....	63



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Siklus transmisi malaria.....	7
2.2 Proses sitoaderensi, sekuestrasi dan <i>rosetting</i> pada malaria <i>falciparum</i>	10
2.3 Skema penatalaksanaan malaria tanpa komplikasi.....	15
2.4 Skema penatalaksanaan malaria berat	18
2.5 Rimpang bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	19
2.6 Kerangka teori	27
2.7 Kerangka konseptual	29
3.1 Skema rancangan penelitian	36
3.2 Skema alur penelitian	46
4.1 Grafik hubungan dosis fraksi dengan rata-rata derajat parasitemia hewan coba pada H ₀ sampai H ₃	48
4.2 Diagram persentase penghambatan fraksi terhadap pertumbuhan plasmodium berghei	50

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Pengobatan lini II malaria.....	17
4.1 Rata-rata derajat parasitemia hewan coba pada H ₀ sampai H ₃	47
4.2 Persentase penghambatan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (<i>Zingiber cassumunar roxb.</i>) terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei</i>	49

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. <i>Ethical clearance</i>	63
B. Hasil determinasi tumbuhan bangle (<i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.)	64
C. Perhitungan dosis	65
D. Data hasil perhitungan derajat parasitemia dan persentase penghambatan pertumbuhan parasit.....	69
E. Hasil analisis SPSS	74
F. Dokumentasi	77

BAB 1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria saat ini masih menjadi penyakit endemis di beberapa daerah di Indonesia. Pada tahun 2009, berdasarkan pantauan dengan indikator *Annual Parasite Index* (API) rata-rata angka kesakitan malaria di Indonesia adalah 1,85 per 1000 penduduk, namun pada bagian Timur Indonesia yaitu Provinsi Papua Barat, NTT dan 10 provinsi lainnya angka kesakitannya jauh melebihi angka rata-rata kesakitan malaria nasional, bahkan mencapai 48,1 per 1000 penduduk di Papua Barat (Kemenkes RI, 2011). Dalam Rencana Strategis Kementerian Kesehatan Tahun 2010-2014 malaria merupakan salah satu penyakit yang ditargetkan untuk diturunkan angka kesakitannya dari 1,85 menjadi 0,85 namun menurut laporan kasus malaria tahun 2013 rata-rata angka kesakitan malaria di Indonesia masih mencapai 1,4 per 1000 penduduk (WHO, 2014).

Malaria banyak menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, balita dan ibu hamil (Kemenkes RI, 2011). Kematian pada malaria biasanya disebabkan oleh infeksi *Plasmodium falciparum* sebagai akibat dari adanya komplikasi malaria pada malaria berat. Malaria berat didefinisikan sebagai malaria yang disertai bukti klinik ataupun laboratorium yang menunjukkan adanya disfungsi organ vital sebagai komplikasinya. Pada malaria berat terdapat satu atau lebih komplikasi-komplikasi meliputi adanya penurunan kesadaran (malaria serebral), kelemahan otot, konvulsi multipel, asidosis respiratorik, distress nafas, syok, gagal ginjal akut, ikterus dan perdarahan abnormal (WHO, 2012).

Imunitas individu terhadap infeksi malaria memegang peranan penting dalam patogenesis malaria terutama pada malaria berat. Menurut WHO, di daerah dimana transmisi *P. falciparum* intens dan stabil, malaria berat lebih sering terjadi pada anak dibawah lima tahun dan lebih jarang pada orang dewasa. Malaria berat juga sering

terjadi pada penduduk pendatang baru di daerah yang endemisitas malariannya tinggi karena mereka belum memiliki imunitas terhadap malaria (Willey, 2014). Hal ini disebabkan karena imunitas terhadap malaria didapatkan ketika terpapar dan terus meningkat apabila jumlah paparan malaria meningkat (Griffin, 2014).

Artemisinin-Based Combination Therapy (ACT) masih menjadi terapi utama untuk malaria. Tetapi saat ini telah dilaporkan adanya resistensi *Plasmodium falciparum* baik terhadap monoterapi artemisinin maupun terhadap ACT. Banyak usaha telah dilakukan untuk mencari antimalaria baru yang lebih efektif, selain itu berbagai cara juga dilakukan untuk mencari terapi ajuvan yang bisa membantu mereduksi keparahan malaria ketika resistensi terhadap terapi utama terjadi (Prato dan Giribaldi, 2012). Terapi ajuvan adalah terapi komplementer yang bekerja sinergi dengan terapi utama malaria. Peranan imunitas tubuh dalam menghadapi malaria cukup penting sehingga terapi ajuvan yang bekerja sebagai imunostimulan dapat dijadikan pilihan untuk membantu mengurangi keparahan malaria.

Kandungan bioaktif beberapa tanaman telah terbukti memiliki efek imunomodulator termasuk sebagai imunostimulan sehingga bisa dikembangkan sebagai terapi ajuvan pada malaria. Salah satunya adalah rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang saat ini banyak dipakai sebagai obat tradisional. Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) telah terbukti memiliki kemampuan sebagai imunostimulan dengan meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis makrofag (Chairul *et al.*, 2009). Dengan menggunakan skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terbukti mengandung golongan senyawa flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, triterpenoid, minyak atsiri, dan glikosida. Flavonoid yang terkandung pada rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) meningkatkan aktivasi sel limfosit T yang kemudian menghasilkan IFN- γ dalam jumlah yang banyak. IFN- γ akan meningkatkan aktivitas dan fungsi dari sel makrofag, sehingga kemampuan fagositosis juga meningkat (Nugroho, 2012). Flavonoid mempunyai tipe yang beragam dan terdapat dalam bentuk bebas (aglikon) maupun terikat sebagai glikosida. Aglikon polimetoksi bersifat non polar, aglikon

polihidroksi bersifat semi polar, sedangkan glikosida flavonoid bersifat polar karena mengandung sejumlah gugus hidroksil dan gula, oleh karena itu golongan flavonoid dapat tertarik dalam pelarut metanol yang bersifat universal (Astarina, 2013). Minyak atsiri juga terbukti dapat berfungsi sebagai imunostimulan. Kandungan minyak atsiri pada beberapa tanaman telah terbukti dapat meningkatkan aktivitas makrofag. Minyak atsiri menjaga integritas struktural sel akibat kuatnya efek antioksidan yang menjaga membran sel dari radikal bebas sehingga sistem imun menjadi lebih kuat (Awaad, 2010). Minyak atsiri tersusun atas senyawa triterpenoid. Triterpenoid tersusun dari rantai panjang hidrokarbon C₃₀ yang menyebabkan sifatnya non polar sehingga mudah terekstrak dalam pelarut yang bersifat non polar (Astarina, 2013).

Hasil penelitian terakhir yang dilakukan oleh Armiyanti *et al.*, (2014) membuktikan stimulasi ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,904 mg/gr BB selama 14 hari dapat meningkatkan fagositosis makrofag dan sekresi TNF- α serta menunjukkan derajat parasitemia yang rendah pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dibandingkan dengan mencit kontrol. Penelitian tersebut menggunakan ekstrak kasar hasil perkolasi, sehingga dalam penelitian ini akan dipergunakan metode fraksinasi terhadap senyawa dalam ekstrak kasar metanol tersebut untuk memperoleh senyawa yang lebih murni sesuai sifat kepolarannya sehingga dapat memperjelas pengaruhnya pada uji yang dilakukan.

Berdasarkan latar belakang di atas maka permasalahan penelitian yang diajukan dalam penelitian ini adalah bagaimana aktivitas senyawa hasil fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer pada malaria. Diharapkan dengan melakukan fraksinasi menggunakan larutan n-heksana yang bersifat non-polar didapatkan senyawa non-polar yang lebih murni dari ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sehingga pengaruhnya terhadap uji aktivitas menjadi lebih baik.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian latar belakang maka rumusan masalah pada penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Apakah fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria.
2. Apakah pemberian fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB bersama terapi standar ACT dapat meningkatkan persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*.
3. Berapakah nilai konsentrasi penghambatan setengah maksimal (IC_{50}) dari fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini terdiri dari tujuan umum dan tujuan khusus sebagai berikut.

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan umum dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria.

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Mengetahui hubungan antara pemberian fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB dengan persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

2. Mendapatkan nilai konsentrasi penghambatan setengah maksimal (IC_{50}) dari fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

1.4 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat sebagai berikut.

1. Memberikan informasi bagi ilmu pengetahuan mengenai manfaat fraksinasi n-heksana ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer pada malaria.
2. Memberikan informasi bagi masyarakat mengenai manfaat bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai tanaman obat dalam mencegah timbulnya malaria berat.
3. Memberikan informasi yang dapat menjadi dasar untuk penelitian selanjutnya.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

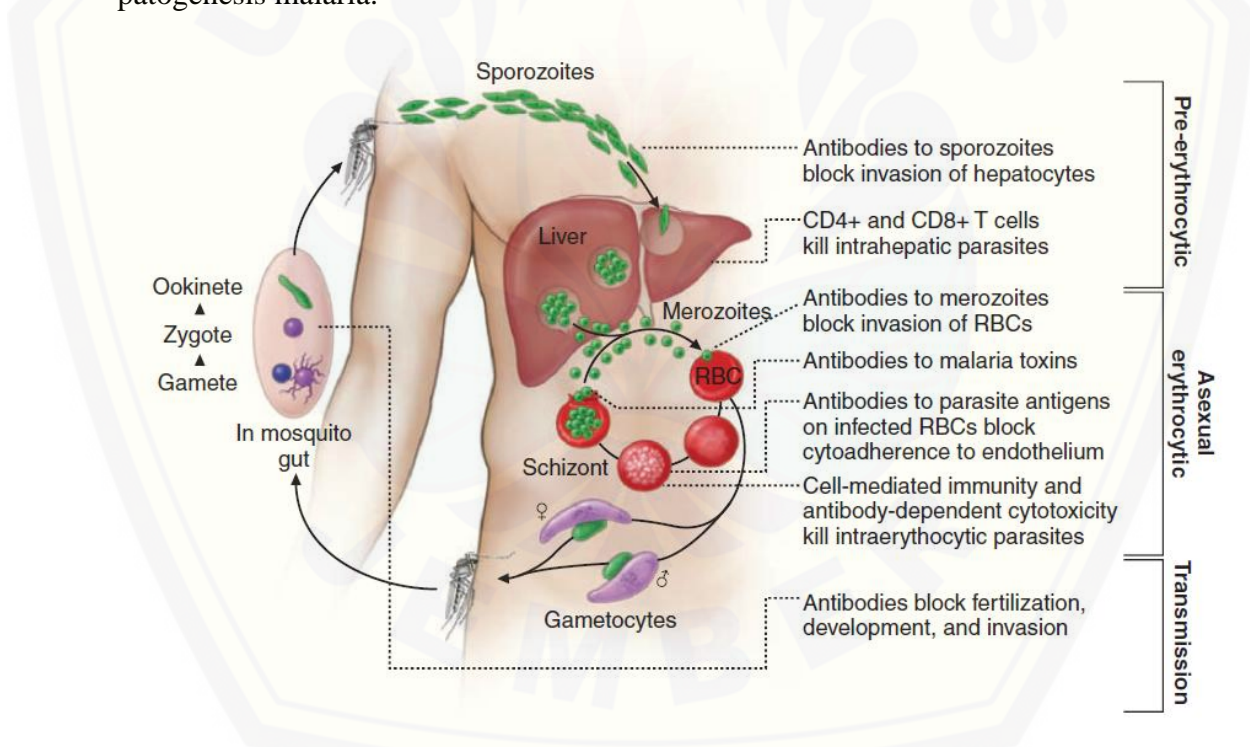
Malaria saat ini masih menjadi penyakit endemis di beberapa daerah di Indonesia. Pada tahun 2009, berdasarkan pantauan dengan indikator *Annual Parasite Index* (API) rata-rata angka kesakitan malaria di Indonesia adalah 1,85 per 1000 penduduk, namun pada bagian Timur Indonesia yaitu Provinsi Papua Barat, NTT dan 10 provinsi lainnya angka kesakitannya jauh melebihi angka rata-rata kesakitan malaria nasional, bahkan mencapai 48,1 per 1000 penduduk di Papua Barat (Kemenkes RI, 2011). Dalam Rencana Strategis Kementerian Kesehatan Tahun 2010-2014 malaria merupakan salah satu penyakit yang ditargetkan untuk diturunkan angka kesakitannya dari 1,85 menjadi 0,85 namun menurut laporan kasus malaria tahun 2013 rata-rata angka kesakitan malaria di Indonesia masih mencapai 1,4 per 1000 penduduk (WHO, 2014).

2.1.1 Etiologi

Malaria disebabkan oleh protozoa obligat intraselular dari genus *plasmodium*. Empat spesies *plasmodium* primer yang menyebabkan malaria pada manusia adalah *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, dan *P. malariae*. Infeksi yang disebabkan oleh *P. falciparum* biasanya lebih berat daripada yang disebabkan oleh *P. ovale*, *P. vivax* dan *P. malariae*. *P. falciparum* merupakan penyebab kasus-kasus malaria berat dan merupakan penyebab utama pada kematian akibat malaria. Selain keempat spesies tersebut saat ini dari studi yang dilakukan di kawasan Asia Tenggara ditemukan bahwa *P. knowlesi*, parasit yang biasa menyebabkan malaria pada monyet, dapat menginfeksi manusia dan menimbulkan penyakit yang cukup fatal (Perkins, 2011).

2.1.2 Patogenesis

Infeksi parasit malaria pada manusia dimulai ketika sporozoit masuk kedalam pembuluh darah manusia melalui gigitan nyamuk *anopheles* betina dimana sebagian besar dalam waktu 45 menit akan menuju ke hati dan sebagian kecil sisanya mati di darah (Harijanto, 2014). Di dalam sel parenkim hati dimulai reproduksi aseksual parasit malaria (*intrahepatic* atau *preerythrocytic schizogony* atau *merogony*) yang menyebabkan terbentuknya skizon hati pecahnya hepatosit terinfeksi yang mengeluarkan merozoit ke dalam darah. Merozoit kemudian menyerang sel darah merah dan melakukan perkembangbiakan aseksual (Harrison *et al*, 2012). Bentuk aseksual parasit malaria dalam eritrosit inilah yang bertanggung jawab terhadap patogenesis malaria.



Gambar 2.1 Siklus transmisi malaria (Sumber: Harrison *et al*, 2012)

Secara garis besar parasit dalam eritrosit mengalami dua stadium yaitu stadium cincin pada 24 jam pertama dan stadium matur pada 24 jam kedua

(Harijanto, 2014). Ketika memasuki stadium matur eritrosit yang terinfeksi mengalami merogoni dimana eritrosit tersebut pecah dan melepaskan toksin malaria berupa *glycosil-phosphatidil-inositol* (GPI) yang merangsang monosit/makrofag untuk melepaskan beberapa sitokin yang meliputi TNF- α , IL-1 dan IL-6. Sitokin-sitokin tersebut kemudian bekerja langsung pada hipotalamus anterior untuk mengubah titik set termoregulator melalui stimulasi sintesis prostaglandin E dalam pusat termoregulator di hipotalamus sehingga menimbulkan gejala demam (Harrison *et al*, 2012).

Bentuk aseksual parasit malaria dalam eritrosit menyebabkan terjadinya destruksi eritrosit yang melebihi kapasitas produksi eritrosit baru di sumsum tulang sehingga menimbulkan gejala anemia. Tingginya derajat parasitemia terutama pada penderita malaria yang non-imun dapat menyebabkan destruksi eritrosit masif dan pengurangan jumlah eritrosit normal dalam darah sehingga meningkatkan keparahan anemia pada malaria (Perkins, 2011). Beberapa mekanisme penyebab terjadinya anemia meliputi perusakan eritrosit, hambatan eritropoiesis sementara, hemolisis oleh karena proses *complement mediated immune complex*, eritrofagositosis, penghambatan pengeluaran retikulosit, dan pengaruh sitokin (Harijanto, 2014). Perusakan eritrosit tidak hanya terjadi pada eritrosit yang terinfeksi tetapi juga pada eritrosit normal. Eritrosit normal lebih banyak dirusak oleh aktivitas makrofag di limpa yang meningkat karena adanya perubahan intrinsik eritrosit normal berupa munculnya deformabilitas dan perubahan ekstrinsik eritrosit normal karena disensitisasi oleh sistem komplemen (C3 dan C4) dan atau imunoglobulin (IgG dan IgA). Keadaan anemia semakin diperberat karena adanya kerusakan parenkim sumsum tulang, terjadinya eritropoiesis inefektif, dan turunnya kemampuan proliferasi eritropoietik yang menyebabkan terjadinya supresi sumsum tulang terutama pada infeksi *P. falciparum* (Perkins, 2011).

Pembesaran limpa (splenomegali) sering terjadi pada penderita malaria, biasanya teraba setelah tiga hari dari serangan akut disertai rasa nyeri. Limpa merupakan organ retikuloendotelial yang penting dalam pertahanan tubuh terhadap

malaria dimana *Plasmodium* dihancurkan oleh sel-sel makrofag dan limfosit. Pada malaria terjadi peningkatan sel-sel makrofag, penimbunan pigmen eritrosit parasit, dan penambahan jaringan ikat di limpa (Ngaliyatun *et al.*, 2013). Adanya retensi eritrosit terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi, peningkatan fagositosis oleh makrofag menyebabkan hipertrofi sistem retikuloendotelial dan berkontribusi terhadap terjadinya splenomegali (Buffet *et al.*, 2011).

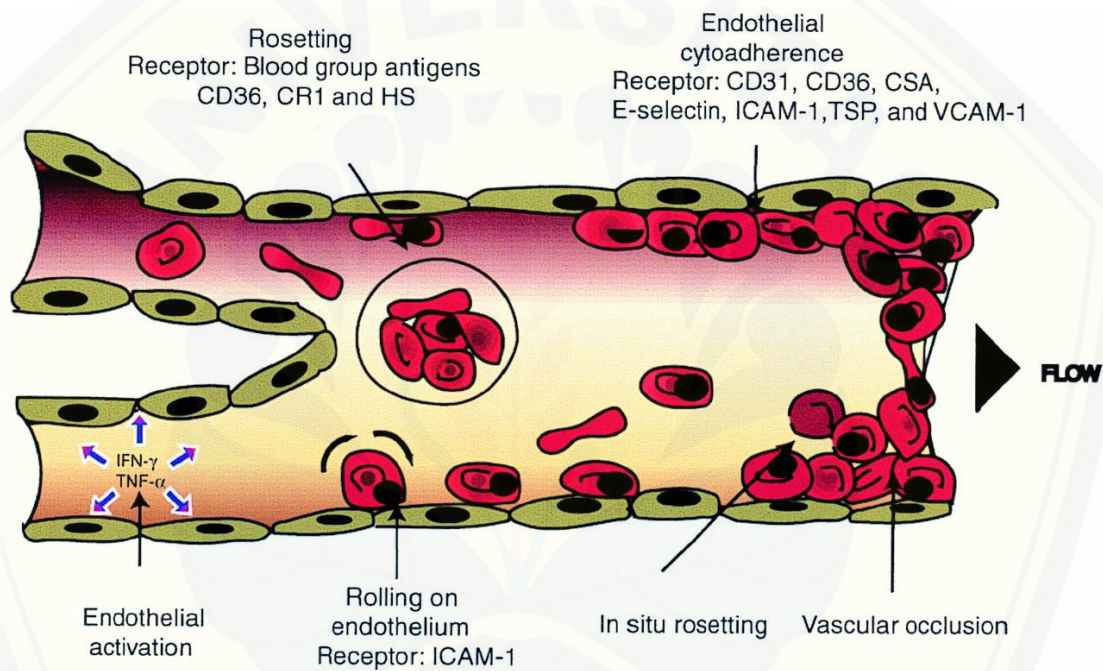
Komplikasi malaria umumnya disebabkan oleh *P. falciparum*, menyebabkan terjadinya malaria berat yang dapat mengakibatkan kematian pada penderitanya. *P. falciparum* mempunyai dalam melarikan diri dari sistem pertahanan tubuh inangnya melalui proses sitoadherensi, sekuestrasi, dan *rosetting* yang berperan besar dalam patogenesis malaria *falciparum*.

Eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* dapat mengalami penonjolan membran dan membentuk *knob* dengan *Histidin Rich-Protein-1(HRP-1)* sebagai komponen utamanya (Harijanto, 2014). Molekul adhesif yang ada di permukaan *knob*, *P. falciparum erythrocyte membrane protein-1 (PfEMP-1)*, melekat dengan molekul-molekul adhesif yang ada di permukaan sel endotel yang terdiri dari CD36, trombospondin, *intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*, *vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)*, *endothel leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1)* dan *glycosaminoglycan chondroitin sulfate A* menyebabkan terjadinya perlekatan antara eritrosit terinfeksi stadium matur pada permukaan endotel vaskuler yang disebut proses sitoadherensi (Harrison *et al.*, 2012). Melalui mekanisme sitoadherensi ini parasit terinfeksi yang matur dapat mengasingkan diri dari peredaran darah perifer sehingga dapat menghindari eliminasi oleh limpa.

Selain dapat melakukan sitoadherensi, di saat yang sama eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* juga dapat menarik dan melakukan perlekatan pada eritrosit yang tidak terinfeksi dari peredaran darah perifer. Mekanisme ini disebut dengan mekanisme *rosetting*. Selain itu eritrosit terinfeksi yang masih ada dalam peredaran darah juga tertarik dan ikut melekat yang disebut dengan proses aglutinasi (Harrison

et al., 2012). Mekanisme-mekanisme ini memberikan keuntungan bagi parasit karena dapat terhindar dari pengenalan sistem imun inang.

Mekanisme-mekanisme sitoadherensi, sekuestrasi, *rosetting* dan aglutinasi merupakan proses utama dalam patogenesis malaria *P. falciparum* karena menyebabkan penumpukan baik eritrosit terinfeksi maupun eritrosit normal pada pembuluh darah sehingga terjadi obstruksi pada sirkulasi perifer terutama di organ-organ vital terutama di otak (Harrison *et al.*, 2012).



Gambar 2.2 Proses sitoadherensi, sekuestrasi dan *rosetting* pada malaria *falciparum* (Sumber: Chen *et al.*, 2002)

Respon imun tubuh terhadap malaria sangat kompleks, melibatkan hampir seluruh komponen sistem imun spesifik dan non-spesifik, serta imunitas humoral dan seluler. Sporozoit yang masuk darah segera dihadapi oleh respon imun non-spesifik yang terutama dilakukan oleh makrofag dan monosit yang menghasilkan sitokin-sitokin seperti TNF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 yang secara langsung menghambat pertumbuhan parasit dan membunuh parasit (Harijanto, 2014). Respon imun spesifik muncul setelah paparan pertama malaria dan bersifat spesies spesifik,

strain spesifik, dan *stage* spesifik. Imunitas terhadap malaria baik non-spesifik maupun spesifik terus meningkat seiring bertambahnya intensitas paparan, sehingga pada penderita malaria yang tinggal di daerah yang transmisi malariannya tinggi dan stabil sering tidak bergejala (asimtomatik) atau bergejala namun ringan sedangkan pada penderita malaria di daerah yang transmisi malariannya rendah malaria yang diderita lebih berat dan terdapat kecenderungan kepada terjadinya malaria berat (Harrison *et al.*, 2012).

2.1.3 Manifestasi Klinis

Manifestasi klinis malaria tergantung pada imunitas penderita dan tingginya transmisi infeksi malaria. Berat ringannya infeksi dipengaruhi oleh jenis plasmodium, daerah asal infeksi, usia, dugaan konstitusi genetik, status gizi, kemoprofilaksis dan pengobatan sebelumnya.

a. Manifestasi Klinis Umum Malaria Tanpa Komplikasi

Gambaran karakteristik khas dari malaria adalah adanya demam periodik, anemia, dan splenomegali. Keluhan prodormal dapat terjadi sebelum terjadinya demam berupa kelesuan, malaise, sakit kepala, sakit belakang, merasa dingin di punggung, nyeri sendi dan tulang, demam ringan, anoreksia, perut tak enak, diare ringan dan kadang-kadang dingin (Arsin, 2012). Keluhan prodormal sering terjadi pada malaria *vivax* dan *ovale*, sedangkan pada malaria *falciparum* dan *malariae* keluhan prodormal tidak jelas bahkan gejala dapat mendadak.

Gejala klasik malaria disebut juga Trias Malaria yang secara berurutan terdiri dari periode dingin, periode panas dan periode berkeringat. Pada periode dingin muncul gejala menggigil dan kedinginan serta berlangsung selama 15-60 menit. Setelah mereda suhu mulai naik dan memasuki periode panas dimana penderita merasa panas, wajah memerah, nadi cepat, dan suhu tubuh tinggi selama beberapa jam diikuti dengan keadaan berkeringat. Periode berkeringat terjadi ketika suhu tubuh mulai turun, penderita berkeringat banyak dan merasa sehat (Hariyanto, 2014).

b. Manifestasi Klinis Malaria Berat (Malaria dengan Komplikasi)

Malaria berat merupakan malaria dengan adanya bukti klinis maupun laboratoris kegagalan organ. Manifestasi klinis dari malaria berat dapat berupa satu atau lebih dari;

1. penurunan kesadaran,
2. keadaan umum yang lemah,
3. kejang multipel (lebih dari dua episode dalam 24 jam),
4. distres nafas (pernapasan asidosis),
5. edema paru akut dan ARDS,
6. kolaps sirkulasi atau syok (tekanan darah sistolik $< 80\text{mmHg}$ pada dewasa dan $< 50\text{mmHg}$ pada anak),
7. gangguan ginjal akut,
8. ikterus disertai tanda disfungsi organ vital lain, dan
9. perdarahan abnormal (WHO, 2012).

2.1.4 Diagnosis

Diagnosis malaria ditegakkan berdasarkan anamnesis, pemeriksaan fisik dan laboratorium. Diagnosis pasti malaria harus ditegakkan dengan pemeriksaan sediaan darah secara mikroskopik atau tes diagnostik cepat (RDT – *Rapid Diagnostic Test*)

a. Anamnesis

Pada anamnesis sangat penting diperhatikan keluhan utama malaria, riwayat berkunjung dan bermalam satu hingga empat minggu sebelumnya ke daerah endemik malaria, riwayat tinggal di daerah endemik malaria, riwayat sakit malaria, riwayat minum obat malaria satu bulan terakhir dan riwayat transfusi darah (Kemenkes RI, 2013). Selain itu pada pasien yang dicurigai menderita malaria berat dapat ditemukan salah satu atau lebih gejala komplikasi malaria yaitu penurunan kesadaran, keadaan umum yang lemah, kejang multipel (lebih dari dua episode dalam 24 jam), distres nafas (pernapasan asidosis), edema paru akut dan ARDS, kolaps sirkulasi atau syok (tekanan darah sistolik $< 80\text{mmHg}$ pada dewasa dan $< 50\text{mmHg}$ pada anak),

gangguan ginjal akut, ikterus disertai tanda disfungsi organ vital lain, dan perdarahan abnormal (WHO, 2012)

b. Pemeriksaan fisik

Pada pemeriksaan fisik malaria dapat ditemukan adanya demam, konjungtiva anemis, splenomegali dan hepatomegali. Pada tersangka malaria berat dapat ditemukan tanda-tanda berupa temperatur rektal 40°C, nadi cepat dan lemah, tekanan darah sistolik <70 mmHg pada orang dewasa dan <50 mmHg pada anak-anak, frekuensi nafas >35 kali per menit, nilai GCS < 11, adanya manifestasi perdarahan, tanda dehidrasi, tanda anemia berat, mata ikterik, adanya ronki, hepatosplenomegali, gejala gangguan ginjal dengan oliguria sampai dengan anuria, dan adanya gejala neurologi seperti kaku kuduk dan reflek patologik) (Kemenkes RI, 2013).

c. Diagnosis atas dasar pemeriksaan laboratorium

Diagnosis malaria pada pemeriksaan laboratorium ditegakkan dengan melakukan pemeriksaan hapusan darah tebal maupun tipis untuk menentukan ada atau tidaknya parasit malaria, spesies dan stadium plasmodium, serta kepadatan parasit. Kepadatan parasit dapat dinilai dengan cara semi kuantitatif maupun kuantitatif (Kemenkes RI, 2013).

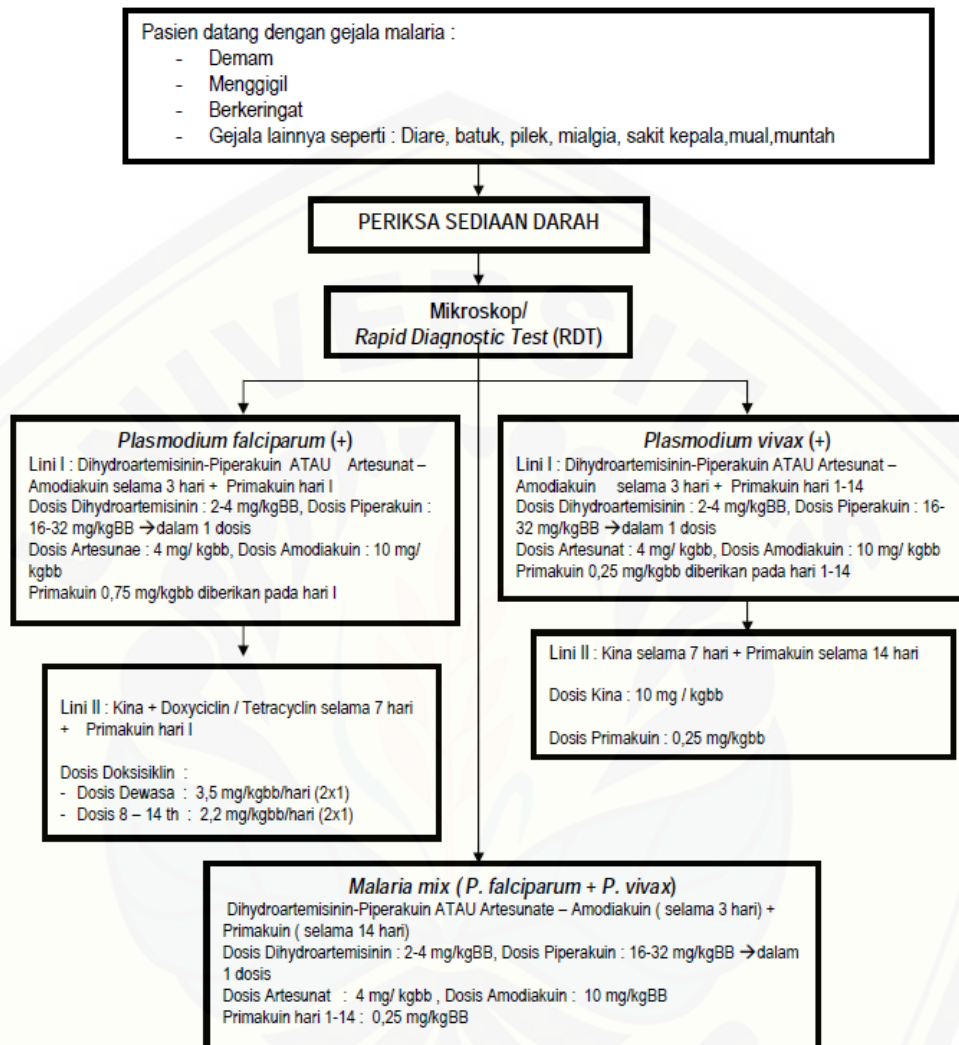
2.1.5 Tatalaksana

Pengobatan yang diberikan sebagai terapi pada malaria merupakan pengobatan radikal yang membunuh berbagai stadium parasit yang ada di dalam tubuh manusia. Tujuan pengobatan radikal untuk mendapatkan kesembuhan klinis dan parasitologik serta memutuskan rantai penularan (Kemenkes RI, 2013).

Tatalaksana kasus malaria untuk *Plasmodium falciparum* dan *P.vivax* pada dasarnya sama yaitu memakai obat golongan ACT, perbedaan terjadi pada pengobatan radikal, yaitu pemakaian primakuin pada *P. falciparum* dengan primakuin 45 mg/ hari sebagai dosis tunggal dan pada *P.vivax* primakuin dipakai dosis 15 mg (1 tablet) tiap hari selama 14 hari. ACT yang tersedia di Indonesia ialah kombinasi *artesunate + amodiakuin* (AS+AQ), kombinasi *artemether - lumefantrine* (AL), dan

kombinasi dihidroartemisinin - piperakuin (DHP). Kombinasi ACT (AS+AQ) dapat digunakan pada malaria ringan atau tanpa komplikasi. Dosis *artesunate* ialah 4 mg/kg BB/hari selama 3 hari dan dosis amodiakuin ialah 10 mg/kg BB/hari selama 3 hari. Kombinasi *Artemeter-lumefantrine* (*Coartem*) merupakan kombinasi tetap (*fixed dose combination*) yang dapat dipakai untuk malaria *falciparum* dan malaria *vivax*. Kombinasi ACT yang relatif baru yaitu dihidroartemisinin - piperakuin (DHP) dipilih untuk mengatasi kegagalan kombinasi sebelumnya yaitu *artesunate* + *amodiakuin*. Obat ini efektif untuk *P. falciparum* dan *P.vivax*, merupakan ACT yang dikemas secara *FDC* dan diberikan sebagai dosis tunggal selama 3 hari. Obat ini disiapkan untuk program dan dipakai di Puskesmas/ Rumah Sakit pemerintah (Kemenkes RI, 2013).

PENATALAKSANAAN KASUS MALARIA TANPA KOMPLIKASI

**KETERANGAN:**

Untuk prophylaksis gunakan Doxycyclin 1 kapsul/hari, diminum 2 hari sebelum sampai dengan 4 minggu setelah keluar dari daerah endemis.

Gambar 2.3 Skema penatalaksanaan malaria tanpa komplikasi (Sumber: Kemenkes RI, 2013)

Penderita perlu melakukan pemeriksaan sediaan darah untuk malaria pada hari ke 2, 3 dan hari 7, 14, 21 dan 28. Bila penderita rawat jalan dan tidak memungkinkan kembali hari ke-2 (48 jam setelah mulai pengobatan), boleh datang hari ke-3.

Penderita yang termasuk gagal pengobatan dini ataupun kasep harus diberikan pengobatan yang lain. Dikatakan gagal pengobatan, bila terdapat salah satu/lebih kriteria berikut (WHO, 2012).

a. Gagal pengobatan dini (*early treatment failure*) : didefinisikan sebagai berkembangnya menjadi 1 atau lebih kondisi berikut ini pada 3 hari pertama.

- Parasitemia dengan komplikasi klinis malaria berat pada hari 1, 2, 3.
- Parasitemia pada hari ke 2 > hari 0.
- Parasitemia pada hari ke 3 (>25 % dari hari 0).
- Parasitemia pada hari ke 3 masih positif + suhu aksila > 37,5 C.

b. Gagal pengobatan terlambat (*late treatment failure*) : didefinisikan sebagai berkembangnya menjadi 1 atau lebih kondisi berikut ini antara hari ke 4 s/d ke 28, dan dibagi dalam 2 sub grup.

- *Late Clinical (and Parasitological) Failure* (LCF), yaitu apabila terdapat parasitemia (spesies sama dengan hari ke 0) dengan komplikasi malaria berat setelah hari ke 3 dan suhu aksila > 37,5 C disertai parasitemia antara hari keempat sampai dengan hari ke-28.
- *Late Parasitological Failure* (LPF), yaitu apabila terdapat parasitemia (spesies sama dengan hari ke 0) pada hari ke 7 sampai hari 28 tanpa disertai peningkatan suhu aksila < 37,5 oC.

Bila terjadi kegagalan pada pengobatan ACT (lini I), diberikan pengobatan dengan ACT lain yang lebih efektif atau lini II yang terdiri dari kombinasi Kina + Doksisisiklin atau Tetrasiklin + Primakuin. Doksisisiklin 1 tablet 100 mg dosis 3 – 5 mg/kg BB satu kali sehari selama 7 hari, dan tetrasiklin 250 mg (dosis 4 mg/kg BB) 4 x sehari. Untuk wanita hamil dan anak dibawah 11 tahun tidak boleh memakai doksisisiklin/ tetrasiklin dan diganti menggunakan *clindamycin* 10 mg/grbb 2 x sehari selama 7 hari. Pengobatan lini II malaria dapat dilihat pada Tabel 2.1

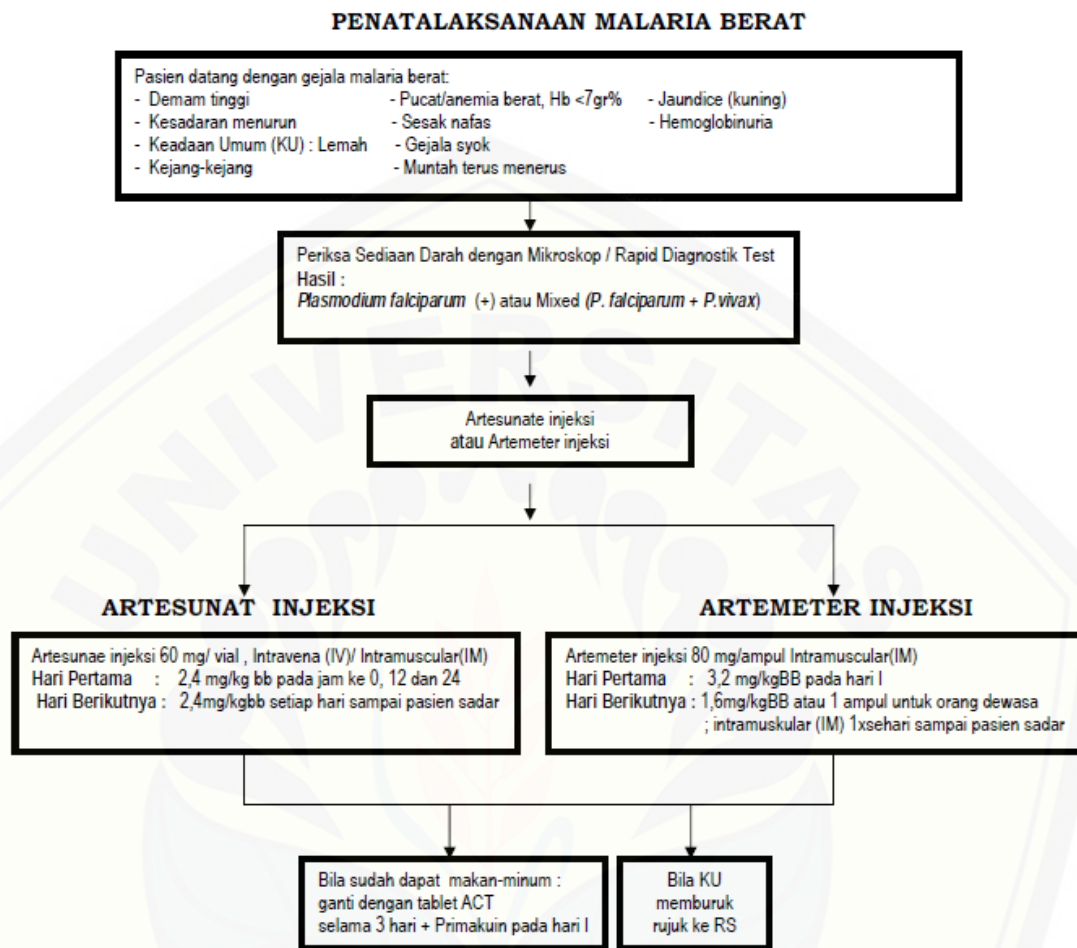
Tabel 2.1 Pengobatan lini II malaria

Hari	Jenis obat	Jumlah tablet menurut kelompok umur				
	Dosis tunggal	0 - 11 bulan	1 - 4 tahun	5 - 9 tahun	10 - 14 tahun	≥ 15 tahun
1	Kina	*)	3 x ½	3 x 1	3 x 1 ½	3 x (2-3)
	Doksisiklin	--	--	--	2 x 50 mg	2 x 100 mg
	Fal :Primakuin	-	¾	1 ½	2	2 - 3
2 - 7	Kina	*)	3 x ½	3 x 1	3 x 1 ½	3 x 2
	Doksisiklin	--	--	--	2 x 50 mg	2 x 100 mg
Dosis TETRASIKLIN		--	--	--	4x4 mg/kg BB	4 x 250 mg
Dosis CLINDAMYCIN		--	--	--	2x10 mg/kg BB	2x10 mg/kg BB

Sumber: Kemenkes RI, 2013

Tatalaksana malaria berat sebaiknya ditangani di RS Kabupaten. Bila fasilitas maupun tenaga di RS Kabupaten kurang memadai segera rujuk kepada RS Provinsi. Setiap merujuk penderita harus disertakan surat rujukan yang berisi tentang diagnosis, riwayat penyakit, pemeriksaan dan tindakan/pengobatan yang sudah diberikan dengan menggunakan contoh formulir sebagaimana terlampir. Apabila pemeriksaan sediaan darah malaria telah dilakukan maka harus dibawa ke tempat rujukan. Prognosis malaria berat tergantung kecepatan dan ketepatan diagnosis serta pengobatan (Kemenkes RI, 2013).

Penatalaksanaan kasus malaria berat pada prinsipnya meliputi pemberian obat antimalaria, penanganan komplikasi, tindakan penunjang dan pengobatan simtomatik. Pengobatan malaria berat di tingkat Puskesmas dilakukan dengan memberikan artemeter ataupun kina hidroklorida intramuskular sebagai dosis awal sebelum merujuk ke RS rujukan. Apabila rujukan tidak memungkinkan, pengobatan dilanjutkan dengan pemberian dosis lengkap artemeter intramuskular. Pengobatan malaria berat untuk ibu hamil di Puskesmas dilakukan dengan memberikan kina HCl pada trimester 1 secara intramuskular dan artemeter injeksi untuk trimester 2 dan 3.



Gambar 2.4 Skema penatalaksanaan malaria berat (Sumber: Kemenkes RI, 2013)

2.2 Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) adalah salah satu tanaman rempah-rempah anggota suku temu-temuan (*Zingiberaceae*). Rimpangnya dimanfaatkan sebagai bumbu dapur dan bahan pengobatan. Tumbuhan ini dikenal di berbagai tempat dengan nama yang bervariasi: mungle (Aceh), bungle (Tapanuli), kunik bolai (Rana Minang), banglee'iy (Rejang), panglai (Pasundan/Sunda), pandhiyang (Madura), bale (Makassar), panini (Bugis), unin makei (Ambon).



Gambar 2.5 Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

2.2.1 Klasifikasi

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae
Marga	: <i>Zingiber</i>
Jenis	: <i>Zingiber Cassumunar</i> Roxb.
Sinonim	: <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.
Nama umum	: <i>Bangle</i>

2.2.2 Kandungan Bahan Aktif

Dengan menggunakan skrining fitokimia ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terbukti mengandung golongan senyawa flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid, minyak atsiri, dan glikosida (Astarina *et al.*, 2013).

Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) mengandung berbagai komponen kimia penyusun minyak atsiri (triterpenoid, monoterpen dan seskuiterpen) (Surbakti, 2015) yang umumnya tersari kedalam fraksi heksana.

2.2.3 Manfaat

Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) telah lama dipakai di masyarakat Indonesia di berbagai daerah, sehingga mempunyai nama umum yang bermacam-macam seperti Bangle, Bengle, Mungle, Panglai dan Banglas. Tanaman herbal ini berkhasiat sebagai obat demam, obat perut nyeri, obat sembelit, obat masuk angin, obat cacing dan obat encok.

Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) menunjukkan aktivitas sebagai imunostimulan seperti penelitian yang dilakukan oleh Chairul *et al.*, (2009) yang menunjukkan derivat *phenylbutanoid* dari rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) meliputi : [1] [(E)-4-(3',4'-*dimethoxyphenyl*)but-3-en-1-ol], [2] [(E)-4-(2',4',5'-*trimethoxyphenyl*)but-3-en-1-ol] dan [3] [(E)-4-(3',4',1'-*trimethoxyphenyl*)but-3-en-1-ol] yang semuanya menunjukkan aktivitas imunostimulan dengan uji aktivitas fagositosis makrofag, namun yang tertinggi adalah derivat nomer 1. Dengan meningkatnya aktifitas fagositosis makrofag dapat meningkatkan imunitas terhadap parasit malaria.

Kandungan kurkumin yang tinggi dalam bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) menyebabkan tanaman ini mempunyai efek antioksidan dan pro-oksidan yang keduanya memberikan efek proteksi terhadap malaria. Sebagai antioksidan bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) mengandung senyawa fenolik yang mampu menangkap radikal bebas. Sebagai pro-oksidan, kurkumin dapat meningkatkan ROS yang mengaktifasi reseptor PPAR γ atau mengaktifasi faktor transkripsi Nrf2, sehingga terjadi upregulasi CD36 yang memediasi fagositosis secara non-opsonisasi oleh makrofag (Mimche *et al.*, 2011). Oleh karena itu, bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dapat berperan sebagai imunomodulator terhadap respon imun alami dengan meningkatkan fagositosis makrofag.

Kurkumin pada konsentrasi yang tinggi atau keadaan tertentu seperti adanya ion metal transisi dapat menyebabkan peningkatan ROS terutama dalam bentuk radikal hidroksil. Bahkan ROS yang tinggi pada penelitian tersebut dapat menghambat pertumbuhan parasit melalui efek sitotoksitas yang merusak sel parasit. Aktivasi PPAR γ karena peningkatan ROS juga dapat menghambat aktivasi NF- κ B, sehingga menyebabkan *down regulation* sitokin-sitokin proinflamasi dan ekspresi molekul-molekul adhesi di endotel yang berperan penting dalam patomekanisme komplikasi pada malaria, yaitu pada proses sitoaderen dan *rosetting* (Mimche *et al.*, 2011). Dengan demikian kurkumin dapat menghambat perlekatan eritrosit terinfeksi dengan sel-sel endotel, sehingga tidak terjadi sekuestrasi *P. falciparum* di mikrovaskuler organ-organ vital dan terjadinya komplikasi malaria dapat dicegah.

Flavonoid yang terkandung pada rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dapat meningkatkan aktivasi sel limfosit T yang kemudian menghasilkan IFN- γ dalam jumlah yang banyak. IFN- γ inilah yang dihasilkan meningkatkan aktivasi dari sel makrofag, sehingga kemampuan fagositosis juga meningkat (Nugroho, 2012).

Minyak atsiri yang juga terkandung dalam bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) juga terbukti dapat berfungsi sebagai imunostimulan. Kandungan minyak atsiri pada beberapa tanaman telah terbukti dapat meningkatkan aktivitas makrofag. Minyak atsiri menjaga integritas struktural sel akibat kuatnya efek antioksidan yang menjaga membran sel dari radikal bebas sehingga sistem imun menjadi lebih kuat (Awaad, 2010).

Oleh karena itu bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) mempunyai potensi yang besar untuk terapi komplementer pada malaria untuk mencegah terjadinya komplikasi dan pada akhirnya angka mortalitas karena malaria dapat diturunkan.

2.3 *Plasmodium berghei*

P. berghei adalah hemoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil seperti mencit. *P. berghei* banyak digunakan dalam

penelitian malaria pada manusia. Hal ini disebabkan karena melalui teknologi pembiakan secara *in vitro* dan pemurnian pada tahapan siklus hidup serta dari pengetahuan genom telah diketahui bahwa *P. berghei* memiliki kemiripan dengan *P. falciparum* (Goodman *et al*, 2013)

Selain genom, kemiripan sifat biokimiawi dan siklus hidup *P. berghei* juga digunakan sebagai pertimbangan yang kuat tentang penggunaan parasit tersebut dalam penelitian malaria pada manusia. *P. falciparum* tidak digunakan dalam penelitian karena parasit tersebut hidup di dalam tubuh manusia sedangkan model yang digunakan dalam penelitian adalah mencit. Manusia tidak dapat digunakan sebagai model dalam penelitian malaria dikarenakan alasan etika.

Sejak tahun 1978, studi tentang parasit malaria sangat meningkat terutama studi pada parasit *Plasmodium falciparum*. Peningkatan studi ini disusul dengan penelitian terhadap penyakit malaria pada manusia. *Plasmodium berghei* merupakan salah satu dari banyak spesies parasit malaria yang menginfeksi mamalia. Parasit pada hewan rodensia ini telah dibuktikan analog dengan malaria pada manusia dan primata lainnya terutama aspek struktur, fisiologi dan siklus hidup. *Plasmodium berghei* merupakan model yang sangat baik untuk penelitian perkembangan biologi dari parasit malaria karena secara biologis parasit pada manusia dan rodensia mempunyai kesamaan, susunan genom dan genetika antar parasit rodensia dan manusia tidak berubah-ubah, adanya kesamaan karakteristik molekuler terhadap sensitivitas dan resistensi obat, struktur dan fungsi antigen sebagai target vaksin yang tetap, manipulasi terhadap siklus hidup secara keseluruhan lebih mudah dan aman termasuk sejak dimulainya infeksi oleh gigitan nyamuk, kemampuan teknologi yang tersedia untuk pengembangan *Plasmodium* ini secara *in vitro*, proses penyusunan gen dan proses biokimiawi antar parasit rodensia dan manusia yang tidak banyak mengalami perubahan, modifikasi genetik yang telah tersedia, memungkinkan pengamatan terhadap interaksi parasit-inang baik secara *in vivo* dan *in vitro*, serta pengenalan yang baik terhadap *clones* dan *mutant lines* secara genetik (Suryawati dan Suprapti, 2007).

2.3.1 Klasifikasi

Plasmodium berghei diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisi	: Protozoa
Subdivisi	: Sporozoa
Kelas	: Telosporea
Bangsa	: Haemosporina
Suku	: Plasmodidae
Marga	: <i>Plasmodium</i>
Jenis	: <i>Plasmodium berghei</i>

2.3.2 Morfologi

Dalam darah rodensia bentuk *Plasmodium berghei* yang bisa ditemukan yaitu bentuk cincin, tropozoit, skizon dan gametosit.

- Bentuk cincin : tampak sebagai cincin dengan sitoplasma biru dengan nukleus kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan Giemsa dari hapusan darah tepi.
- Bentuk tropozoit : berbentuk amuboid atau seperti pipa.
- Bentuk skizon : ukuran kira-kira 27 cm pada hari keempat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak sebagai titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas.
- Bentuk gametosit. Ada dua bentuk gametosit yaitu makrogametosit dan mikrogametosit. Makrogametosit berbentuk pisang, bernoda biru mengandung kumpulan nucleus dan granul, sedangkan bentuk mikrogametosit seperti ginjal atau kacang, bernoda biru muda atau kemerahan mengandung nukleus yang mengkilat dengan granul yang lebih kecil dan tersebar.

Pada pemeriksaan darah tepi, baik hapusan darah tebal dan tipis dijumpai terutama parasit muda berbentuk cincin (*ring form*). Pada sedian darah tebal, sporozoit berbentuk cincin, gametosit berbentuk pisang, dan bentuk cincin banyak dijumpai disisi luar gametosit. Pada sediaan hapusan darah tipis tropozoit muda

berbentuk tanda seru atau koma dan cincin terbuka, gametosit berbentuk pisang dan terdapat bintik *Murer* pada sel darah merah (Suryawati dan Suprapti, 2007).

2.3.3 *Plasmodium berghei* Sebagai Model untuk Riset Malaria

Sejak tahun 1978, studi tentang parasit malaria sangat meningkat terutama studi pada parasit *Plasmodium falciparum*. Peningkatan studi ini disusul dengan penelitian terhadap penyakit malaria pada manusia. *Plasmodium berghei* merupakan salah satu dari banyak spesies parasit malaria yang menginfeksi mamalia. Parasit pada hewan rodensia ini telah dibuktikan analog dengan malaria pada manusia dan primata lainnya terutama aspek struktur, fisiologi dan siklus hidup. *Plasmodium berghei* merupakan model yang sangat baik untuk penelitian perkembangan biologi dari parasit malaria karena hal berikut.

- a. Secara biologis parasit pada manusia dan rodensia mempunyai kesamaan.
- b. Susunan genom dan genetika antar parasit rodensia dan manusia tidak berubah-ubah.
- c. Adanya kesamaan karakteristik molekuler terhadap sensitivitas dan resistensi obat.
- d. Struktur dan fungsi antigen sebagai target vaksin yang tetap.
- e. Manipulasi terhadap siklus hidup secara keseluruhan lebih mudah dan aman termasuk sejak dimulainya infeksi oleh gigitan nyamuk.
- f. Kemampuan teknologi yang tersedia untuk pengembangan *Plasmodium* ini secara *in vitro*.
- g. Proses penyusunan gen dan proses biokimiawi antar parasit rodensia dan manusia yang tidak banyak mengalami perubahan.
- h. Modifikasi genetik yang telah tersedia.
- i. Memungkinkannya pengamatan terhadap interaksi parasit-inang baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Pengenalan yang baik terhadap clones dan mutant lines secara genetik (Suryawati dan Suprapti, 2007).

2.4 Artemisinin

Artemisinin merupakan obat antimalaria kelompok seskuiterpen lakton yang bersifat skizontosida darah untuk *P. falciparum* dan *P. vivax*. Obat ini berkembang dari obat tradisional Cina untuk penderita demam yang dibuat dari ekstrak tumbuhan *Artemisia annua L* yang sudah dipakai sejak ribuan tahun lalu dan ditemukan peneliti Cina tahun 1971. WHO (2012) memberikan rekomendasi untuk penggunaan derivat artemisinin sebagai pengobatan malaria berat dan pengobatan malaria ringan/tanpa komplikasi. Untuk meningkatkan efikasi dan menghambat resistensi terhadap derivat artemisinin harus dipakai kombinasi dengan obat malaria lain. Perkecualian bila tidak bisa memakai obat lain/kombinasi, artemisinin diberikan dalam waktu 7 hari.

Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) adalah terapi malaria berupa kombinasi obat yang salah satu komponennya adalah artemisinin atau derivatnya. Masing-masing derivat artemisinin tidak mempunyai perbedaan absorpsi maupun bioavailabilitas yang signifikan. Derivat artemisinin tersedia baik dalam bentuk oral yaitu artemisinin, *artesunate*, *artemether* dan dihidroartemisinin maupun dalam bentuk injeksi seperti *artemether* (i.m), *artheether* (i.m), dan *artesunate* (i.v/i.m). Derivat artemisinin juga ada dalam bentuk *suppository* yaitu artemeter, artemisinin, *artesunate* dan dihidroartemisinin.

ACT merupakan kombinasi pengobatan yang unik, karena artemisinin memiliki kemampuan :

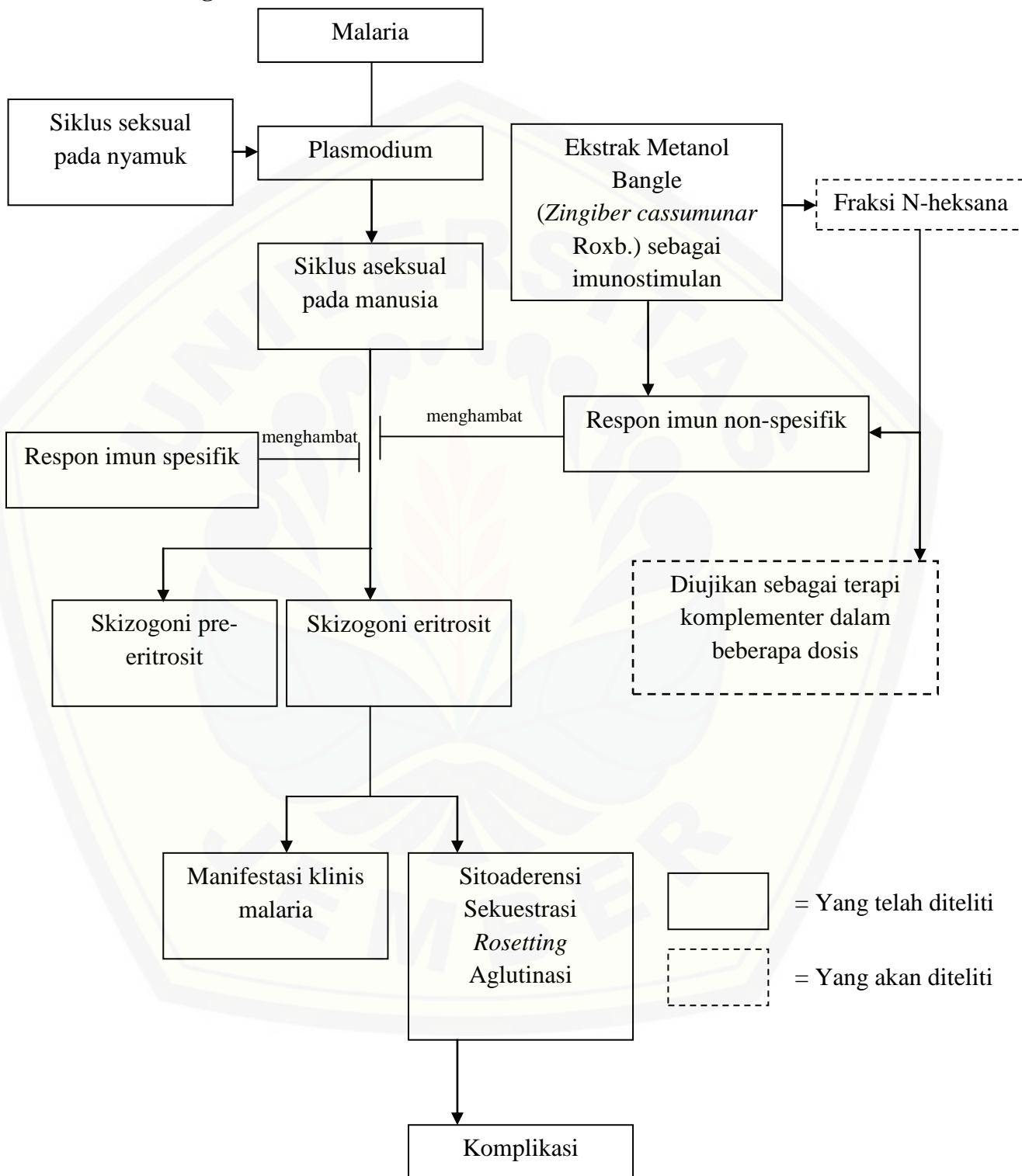
- a. menurunkan *biomass parasite* dengan cepat,
- b. menghilangkan simptom dengan cepat,
- c. efektif terhadap parasit resisten *multidrug*, semua bentuk/ stadium parasit dari bentuk muda sampai tua yang berkuestrasi pada pembuluh kapiler,
- d. menurunkan pembawa gamet dan menghambat transmisi,
- e. belum ada resistensi terhadap artemisinin, serta
- f. efek samping minimal (Harijanto, 2011).

ACT yang tersedia di Indonesia ialah kombinasi *artesunate* - amodiakuin (AS+AQ), kombinasi *artemether* - *lumefantrine* (AL), dan kombinasi

dihidroartemisinin - piperakuin (DHP) (Kemenkes RI, 2013). Kombinasi dihidroartemisinin - piperakuin (DHP) merupakan kombinasi yang terbaru dan saat ini menjadi pilihan pertama pada malaria tanpa komplikasi karena kombinasi obat ini berhasil mengatasi kegagalan kombinasi sebelumnya yaitu *artesunate* – amodiakuin. (Harijanto, 2011).



2.5 Kerangka Teori

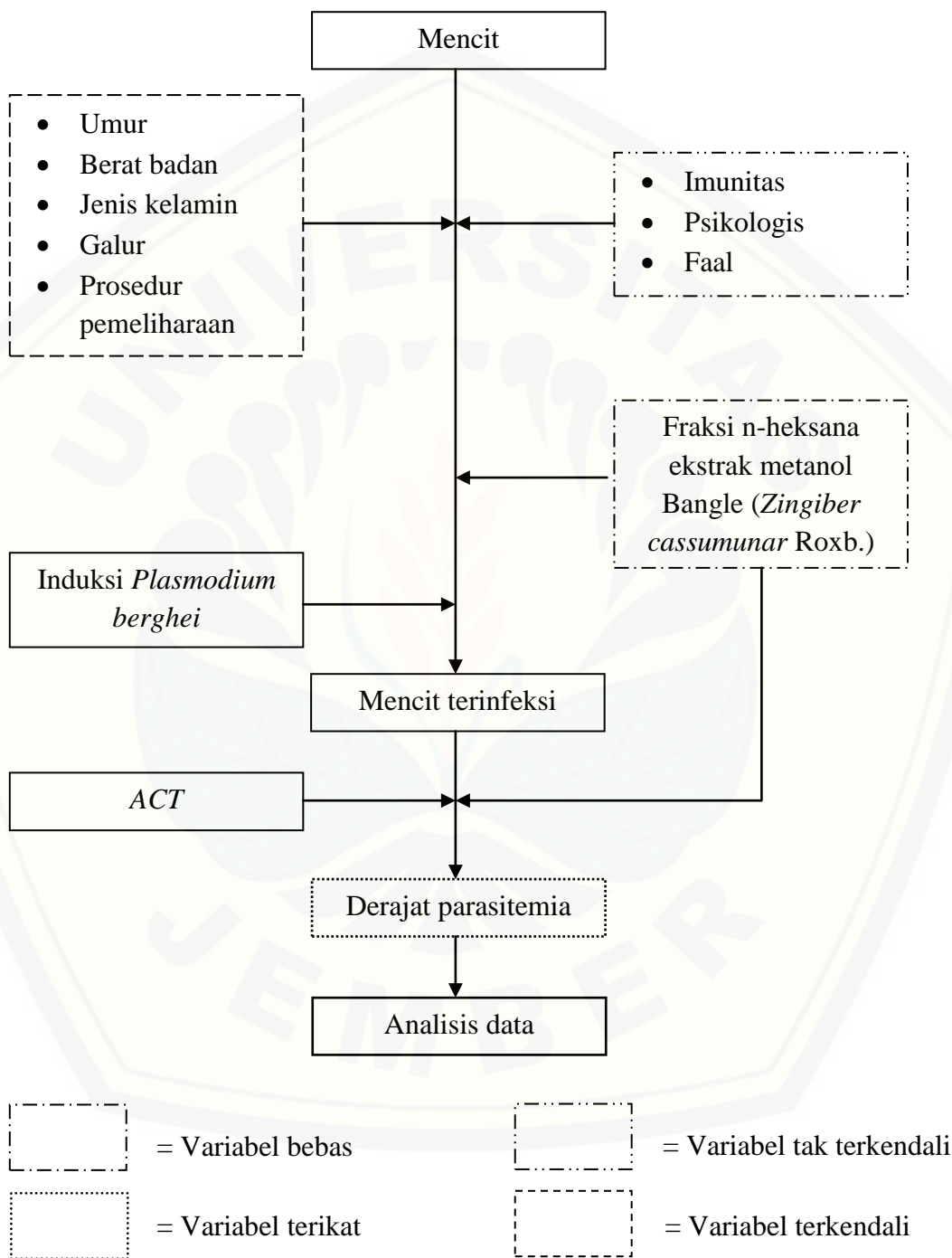


Gambar 2.6 Kerangka teori

Plasmodium sp. penyebab malaria mengalami siklus seksual pada nyamuk dan siklus aseksual pada manusia. Siklus aseksual *plasmodium sp.* pada manusia terjadi di dua tempat yaitu di hati (skizogoni pre-eritrositik) dan di eritrosit (skizogoni eritrosit). Siklus aseksual inilah yang bertanggung jawab terhadap patogenesis malaria, menimbulkan berbagai manifestasi klinis seperti demam, anemia, dan splenomegali serta apabila berlanjut melalui mekanisme sitoaderensi, sekuestrasi, *rosetting* dan aglutinasi dapat menimbulkan komplikasi pada malaria berat.

Ketika *plasmodium sp.* pertama kali masuk kedalam darah sistem kekebalan tubuh teraktivasi menimbulkan respon imun yang sangat kompleks, melibatkan hampir seluruh komponen sistem imun spesifik dan non-spesifik dengan tujuan menghambat siklus aseksual *plasmodium sp.* dan mengurangi keparahan malaria. Pada penelitian sebelumnya telah dibuktikan bahwa ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dapat meningkatkan sistem imun non-spesifik dengan meningkatkan fagositosis makrofag dan TNF- α serta dapat menurunkan derajat parasitemia pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan mendapatkan terapi standar ACT. Penelitian tersebut menggunakan ekstrak kasar hasil perkolasi, sehingga dalam penelitian ini akan dipergunakan metode fraksinasi untuk menghasilkan fraksi n-heksana dari ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) untuk memperoleh senyawa non-polar yang lebih murni sebagai terapi komplementer malaria bersama terapi standar ACT.

2.6 Kerangka Konseptual



Gambar 2.7 Kerangka Konseptual

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit galur *Balb/c* yang dikendalikan usia, berat badan, jenis kelamin, dan prosedur pemeliharannya. Mencit kemudian distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) selama 14 hari. Setelah hari ke-14 mencit diinduksi dengan *Plasmodium berghei*. Setelah mencit dinyatakan positif malaria terapi standar ACT dimulai bersama dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer selama tiga hari. Terapi ACT yang digunakan adalah kombinasi primakuin (hanya pada hari pertama) dan dihidroartemisinin-piperakuin selama tiga hari sesuai dengan standar regimen terapi pada malaria *falciparum* pada manusia karena *Plasmodium berghei* memiliki kemiripan dengan *Plasmodium falciparum*. Selama tiga hari derajat parasitemia dihitung setiap hari kemudian di analisis.

2.7 Hipotesis

1. Fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria.
2. Pemberian fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB bersama terapi standar ACT dapat meningkatkan persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah *true experimental design*. Ciri dari *true experimental design* adalah terdapat kelompok kontrol dan sampel yang digunakan sebagai eksperimen maupun sebagai kelompok kontrol diambil secara acak dari populasi tertentu (Sugiyono, 2010). Desain *true experimental* yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Posttest-only Control Design* dengan sampel yang dibagi menjadi satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif dan lima kelompok eksperimen yang diberi perlakuan. Ketujuh kelompok tersebut kemudian diberi *post-test* dan hasilnya saling dibandingkan.

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di tiga tempat yaitu Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember untuk pembuatan fraksi ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk perawatan dan perlakuan pada hewan coba dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember untuk penghitungan derajat parasitemia mencit yang diinduksi *Plasmodium berghei*. Penelitian dilakukan selama satu bulan pada bulan Oktober 2015.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi adalah wilayah generalisasi yang terdiri atas objek atau subjek yang mempunyai kualitas dan karakteristik tertentu yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari dan kemudian ditarik kesimpulannya. Sampel adalah bagian atau jumlah

dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi tersebut (Sugiyono, 2010). Populasi dan sampel dalam penelitian ini dijelaskan sebagai berikut.

3.3.1 Populasi Penelitian

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan coba yaitu mencit galur *Balb/C* karena galur ini dapat menimbulkan respon imunitas pada infeksi *Plasmodium berghei*.

3.3.2 Sampel Penelitian

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.

3.3.3 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

Penelitian ini membutuhkan kelompok perlakuan sejumlah 7 kelompok. Menurut perhitungan dengan menggunakan rumus Federer besar sampel yang dibutuhkan minimal adalah 4 ekor untuk masing-masing kelompok sehingga jumlah sampel yang diambil sebanyak 28 mencit.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel penelitian pada dasarnya adalah segala sesuatu yang berbentuk apa saja yang ditetapkan oleh peneliti untuk dipelajari sehingga diperoleh informasi tentang hal tersebut, kemudian ditarik kesimpulannya (Sugiyono, 2010). Terdapat berbagai macam variabel berdasarkan peranan atau hubungan antara variabel dengan variabel yang lain. Pada penelitian ini terdapat variabel bebas, variabel terikat dan variabel luar.

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Dosis fraksi yang digunakan yaitu 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah derajat parasitemia mencit akibat pemberian fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada mencit yang diinduksi *P. berghei*.

3.4.3 Variabel Luar

Variabel luar dibedakan menjadi variabel luar yang dapat dikendalikan dan variabel luar yang tidak dapat dikendalikan.

a. Variabel Luar Dapat Dikendalikan

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

b. Variabel Luar Tidak Dapat Dikendalikan

Variabel luar yang dapat dikendalikan dalam penelitian ini meliputi status imunologi dan psikologi hewan coba.

3.5 Definisi Operasional

Definisi operasional adalah penjelasan definisi dari variabel yang telah dipilih oleh peneliti. Definisi operasional variabel penelitian adalah suatu definisi yang diberikan kepada suatu variabel dengan cara memberikan arti, atau menspesifikasikan kegiatan, ataupun memberikan suatu operasional yang diperlukan untuk mengukur konstruk atau variabel tersebut (Sugiyono, 2010). Definisi operasional variabel dalam penelitian ini dijelaskan sebagai berikut.

3.5.1 Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) didapatkan dari Sentra Tanaman Obat UPT Materia Medika Batu Malang. Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang diambil adalah rimpang yang menjalar dan berdaging, bentuknya hampir bundar sampai tidak beraturan dengan tebal 2-5 mm. Permukaan luar tidak rata, berkerut, kadang-kadang dengan parut daun, warnanya coklat muda kekuningan, bila dibedah berwarna kuning muda sampai kuning kecokelatan.

3.5.2 N-Heksana

N-heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} (isomer utama n-heksana memiliki rumus $CH_3(CH_2)_4CH_3$) dan bersifat non-polar. Diharapkan dengan melakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana pada ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) senyawa yang bersifat non-

polar bisa didapatkan senyawa non-polar murni yang terkandung didalam bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

3.5.3 *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei merupakan parasit yang analog dengan parasit malaria pada manusia pada hampir semua aspek penting seperti struktur, fisiologi, dan siklus hidupnya. Pada penelitian ini *Plasmodium berghei* didapat dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3.5.4 Artemisinin

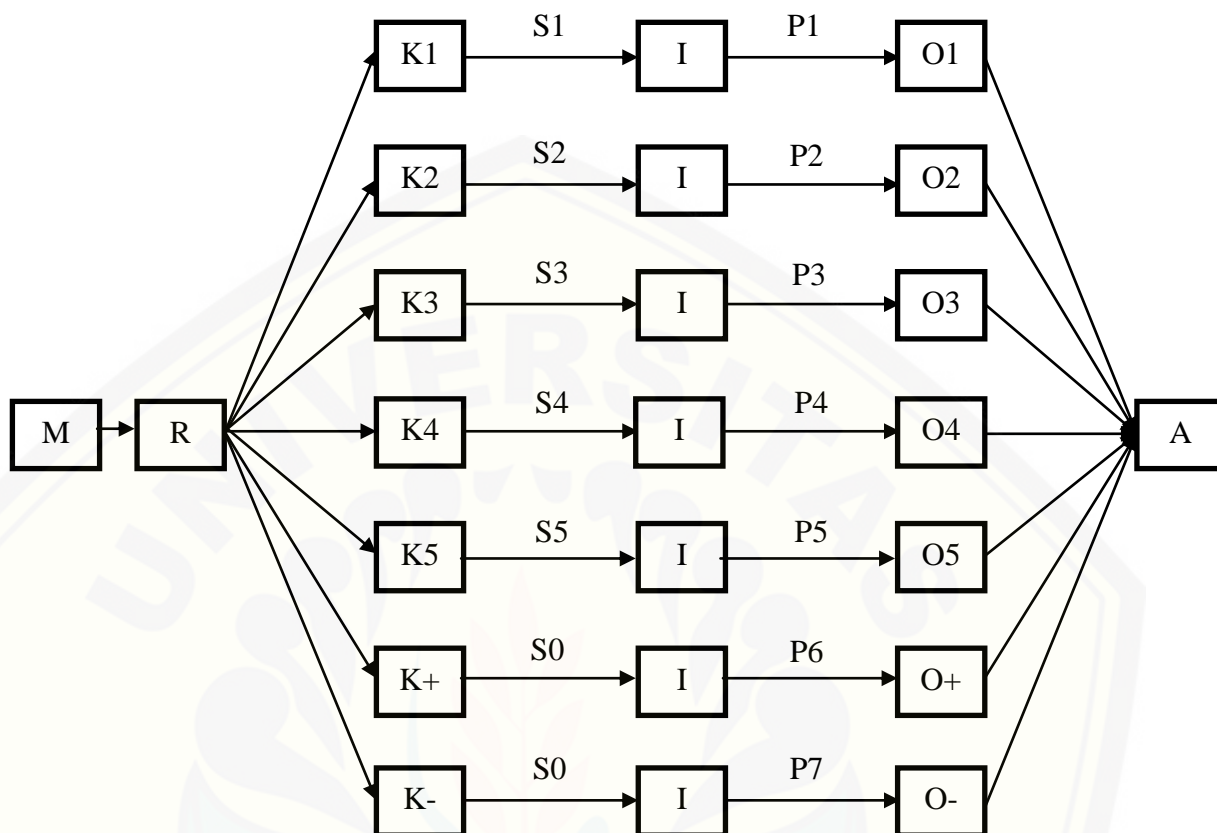
Artemisinin merupakan obat antimalaria kelompok seskuiterpen lakton yang bersifat skizontisida darah. Dalam penelitian ini digunakan derivatnya yaitu dihidroartemisinin.

3.5.5 Derajat Parasitemia

Derajat parasitemia adalah jumlah kuantitatif parasit *Plasmodium berghei* dalam darah mencit yang dihitung dari rasio jumlah eritrosit terinfeksi tiap seribu eritrosit dan dinyatakan dalam persen (%). Derajat parasitemia dilihat dari hapusan darah yang berasal dari ekor mencit yang diwarnai dengan pengecatan Giemsa. Penghitungan derajat parasitemia dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran objektif 100x menggunakan minyak imersi.

3.6 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah rancangan eksperimental sederhana dengan lima kelompok perlakuan, satu kelompok kontrol positif, dan satu kelompok kontrol negatif.



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Keterangan:

M : Mencit

R : Randomisasi

K_{1,2,3,4,5,+,-} : Kelompok perlakuan 1,2,3,4,5 kontrol positif dan kontrol negatif

S1 : Mencit distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,09mg/grbb setiap hari selama 14 hari

S2 : Mencit distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,045mg/grbb setiap hari selama 14 hari

- S3 : Mencit distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,0225mg/grbb setiap hari selama 14 hari
- S4 : Mencit distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,01125mg/grbb setiap hari selama 14 hari
- S5 : Mencit distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,005625mg/grbb setiap hari selama 14 hari
- S0 : Mencit tidak distimulasi
- I : Mencit diinfeksi *Plasmodium Berghei*
- P1 : Mencit diberi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,009mg/grbb dan diterapi ACT selama 3 hari
- P2 : Mencit diberi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,045mg/grbb dan diterapi ACT selama 3 hari
- P3 : Mencit diberi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,0225mg/grbb dan diterapi ACT selama 3 hari
- P4 : Mencit diberi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,01125mg/grbb dan diterapi ACT selama 3 hari
- P5 : Mencit diberi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,005625mg/grbb dan diterapi ACT selama 3 hari
- P6 : Mencit diterapi ACT selama 3 hari
- P7 : Mencit tidak diterapi
- O_{1,2,3,4,5,+,-} : Observasi kelompok 1,2,3,4,5 kontrol positif dan kontrol negatif
- A : Analisis data

3.7 Alur dan Teknik Perolehan Data

Alur penelitian ini terdiri dari persiapan alat dan bahan, ekstraksi bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), fraksinasi ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar*

Roxb.), penentuan dosis bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dan ACT, persiapan hewan coba, stimulasi hewan coba, induksi *Plasmodium berghei*, pemberian terapi dan pembuatan hapusan darah. Data diperoleh dari penghitungan derajat parasitemia. Alur dan teknik perolehan data pada penelitian ini dijelaskan sebagai berikut.

3.7.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *rotary evaporator*, neraca *Ohaus*, neraca analitik digital, seperangkat alat gelas, mikroskop, *object glass*, *cover glass*, *lens tissue*, bak pengecatan, laminair, pipet *disposable*, mikro tip, mikro pipet, spuit dengan jarum suntik, *dissecting set*, *handscoon*, *autoclave*, alat *sentrifuge*, *ependorf*, masker, dan alat sonde.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang didapat dari Sentra Tanaman Obat UPT Materia Medika Batu Malang yang telah diidentifikasi morfologinya di Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember, metanol p.a., n-heksana p.a., parasit *P. berghei* strain ANKA yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, mencit jantan galur Balb/C dengan berat badan 25-30 gram dan berumur 2-3 bulan, pengencer darah EDTA, pewarna Giemsa, etanol teknis, kloroform, minyak imersi, PBS, medium *plus*, medium *complete*, alkohol 70% dan aquadestilata.

3.7.2 Ekstraksi Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Bahan yang digunakan adalah rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Bahan didapat dari Sentra Tanaman Obat, UPT Materia Medika Batu, Malang yang telah diidentifikasi morfologinya di Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) setelah dicuci bersih, kemudian dipotong-potong kecil, selanjutnya dikeringkan dengan cara diangin-anginkan dan setiap hari dibalik untuk mempercepat pengeringan. Setelah kering

potongan tersebut dimasukkan ke dalam penggilingan dengan besar lubang untuk menyaring 0,75 mm.

Pembuatan sediaan ekstrak rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 1,5 kg simplisia kering rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.), dimaserasi dengan metanol sebanyak 1,5 L. Perendaman dilakukan selama selama 24 jam sambil sesekali diaduk. 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. Dari ekstraksi tersebut didapatkan hasil ekstrak sebanyak 138 gr.

3.7.3 Fraksinasi Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Fraksinasi dilakukan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya di dalam corong pisah. Fraksinasi dilakukan menggunakan 10gr ekstrak, pelarut non-polar n-heksana sebanyak 50ml, 25ml metanol dan 25ml akuades, sehingga diperoleh fraksi n-heksana dan fraksi air. Fraksi n-heksana diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental n-heksana sebanyak dua gram.

3.7.4 Penentuan Dosis Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dan ACT

Dari penelitian terakhir yang dilakukan oleh Armiyanti *et al.* (2013) didapatkan bahwa stimulasi ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,904 mg/grbb selama 14 hari dapat meningkatkan fagositosis makrofag dan TNF- α pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan mendapatkan terapi standar artemisinin. Dalam penelitian ini digunakan fraksi dari ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) tersebut sehingga dosis yang digunakan adalah 10% dari dosis ekstrak tersebut yaitu 0,0904 mg/grbb. Untuk menguji efektivitas dan mengetahui IC₅₀ fraksi sebagai terapi komplementer digunakan variasi dosis

0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

Dosis *ACT* yang diperlukan manusia sebagai obat antimalaria *falciparum* adalah 2-4 mg/kgbb dihidroartemisinin dan 16 mg/kgbb piperakuin 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:

$$\begin{aligned} \text{Dosis artemisinin} &= (\text{Dosis Dihidroartemisinin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB manusia}) : 20 \\ &= (2 \times 0,0026 \times 70) : 20 \\ &= 0,0182 \text{ mg/grbb mencit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis piperakuin} &= (\text{Dosis Piperakuin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB manusia}) : 20 \\ &= (16 \times 0,0026 \times 70) : 20 \\ &= 0,1456 \text{ mg/grbb mencit} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Dosis primakuin} &= (\text{Dosis Primakuin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB manusia}) : 20 \\ &= (0,75 \times 0,0026 \times 70) : 20 \\ &= 0,006825 \text{ mg/grbb mencit} \end{aligned}$$

3.7.5 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 dan diberi 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 4 ekor, yaitu sebagai berikut.

- a. Kelompok 1 : kontrol negatif, mencit yang akan diinduksi malaria tanpa diberi terapi.
- b. Kelompok 2 : kontrol positif, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan terapi standar *ACT*.

- c. Kelompok 3 : kelompok perlakuan 1, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/gr BB + diberikan terapi standar ACT.
- d. Kelompok 4 : kelompok perlakuan 2, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,01125 mg/gr BB + diberikan terapi standar ACT.
- e. Kelompok 5 : kelompok perlakuan 3, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,0225 mg/gr BB + diberikan terapi standar ACT.
- f. Kelompok 6 : kelompok perlakuan 4, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,045 mg/gr BB + diberikan terapi standar ACT.
- g. Kelompok 7 : kelompok perlakuan 5, mencit yang akan diinduksi malaria dan diberikan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,09 mg/gr BB + diberikan terapi standar ACT.

3.7.6 Stimulasi Fraksi Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Mencit coba diadaptasikan selama tujuh hari di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, setelah diadaptasi mencit kelompok perlakuan distimulasi dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB selama 14 hari. Tujuan dari dilakukannya stimulasi adalah untuk meningkatkan respon imun mencit pada kelompok perlakuan terhadap infeksi malaria.

3.7.7 Induksi *Plasmodium berghei* pada Hewan Coba

Setelah 14 hari pemberian stimulasi mencit diinduksi dengan *plasmodium berghei*. Isolat yang berisi darah hewan coba yang terinfeksi *P. berghei* dari simpanan beku dicairkan pada suhu kamar. Kemudian isolat dipindahkan kedalam *eppendorf*

dan disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Setelah itu lapisan *supernatant* diambil sehingga lapisan *pellet* tertinggal dalam eppendorf. *Pellet* dalam eppendorf kemudian dicuci dengan PBS dan disentrifugasi lagi selama 10 menit sampai kembali terbentuk lapisan *supernatant* dan *pellet*. Lapisan *supernatant* kemudian diambil dan lapisan *pellet* yang tertinggal diukur volumenya lalu dicampurkan dengan medium *complete* dengan volume yang sama. Sediaan tersebut diinjeksikan pada mencit donor sebanyak 0,2 ml secara intraperitoneal lalu dilakukan pemeriksaan derajat parasitemia setiap hari hingga derajat parasitemianya mencapai 15%.

Setelah derajat parasitemia mencit donor mencapai 15% proses induksi ke mencit coba dapat dilakukan. Darah dari mencit donor diambil secara intrakardial dengan menggunakan *sputit* 1cc kemudian dimasukkan kedalam tabung EDTA. Darah yang sudah tercampur dengan EDTA kemudian diambil sebanyak 10 μ l menggunakan mikro pipet dan dimasukkan kedalam eppendorf berisi PBS 990 μ l untuk melakukan pengenceran 100 kali. Dari campuran tersebut kemudian diambil 10 μ l menggunakan mikro pipet untuk dimasukkan kedalam eppendorf kedua berisi PBS 990 μ l untuk melakukan pengenceran 10.000 kali. Campuran dalam eppendorf kedua diteteskan ke hemositometer sebanyak satu atau dua tetes untuk menghitung jumlah eritrosit yang dibutuhkan untuk menentukan jumlah pengenceran yang dibutuhkan untuk induksi.

$$\text{Jumlah Pengenceran (A)} = \frac{\alpha \times \beta \times K1 \times \gamma}{K2}$$

- α : jumlah eritrosit
 β : pengenceran yang digunakan (10^4)
 γ : derajat parasitemia mencit donor
 K1 : konstanta (10^4)
 K2 : konstanta (5×10^6)

Volume campuran yang diinjeksikan untuk induksi ke tiap mencit coba adalah 0,2 ml sehingga darah mencit donor yang digunakan untuk induksi diperoleh dengan

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

3.7.8 Pemberian Terapi ACT Bersama Fraksi Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Setelah mencit dinyatakan positif malaria terapi standar ACT dimulai bersama dengan fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer selama tiga hari. Terapi ACT yang digunakan adalah kombinasi primakuin (hanya pada hari pertama) dan dihidroartemisinin-piperakuin selama tiga hari sesuai dengan standar regimen terapi pada malaria *falciparum* pada manusia. Dosis fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang digunakan adalah 0,005625 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB pada masing masing kelompok mencit eksperimen. Selama tiga hari perlakuan derajat parasitemia mencit diperiksa setiap hari.

3.7.9 Pembuatan Hapusan Darah dan Perhitungan Derajat Parasitemia

Hapusan darah dibuat dari satu tetes darah mencit diambil dari ujung ekor yang diteteskan diatas *object glass* kemudian diratakan dengan bantuan *cover glass*. Hapusan darah dibiarkan kering di udara terbuka kemudian difiksasi menggunakan etanol beberapa tetes di seluruh hapusan darah dan kembali dikeringkan di udara terbuka. Setelah kering hapusan darah yang telah terfiksasi diberi pewarna Giemsa dan dibiarkan selama dua puluh menit kemudian dibilas dengan air mengalir dan dibiarkan mengering di udara terbuka. Hapusan darah kemudian diamati dibawah mikroskop pada perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi. Pada sel darah merah yang terinfeksi parasit malaria akan tampak inti parasit berwarna merah dengan sitoplasma parasit berwarna biru di sekitarnya.

Derajat parasitemia didapatkan dengan menghitung jumlah total eritrosit yang terinfeksi pada tiap seribu eritrosit yang tampak lalu diukur menggunakan rumus:

$$\text{Derajat parasitemia (\%)} = \frac{\text{jumlah eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

3.7.10 Penghitungan Persentase Penghambatan

Setelah data derajat parasitemia telah didapat selanjutnya dihitung persentase pertumbuhan dan persentase penghambatan dengan cara perhitungan sebagai berikut.

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

Keterangan :

H_3 : hari ketiga terapi malaria

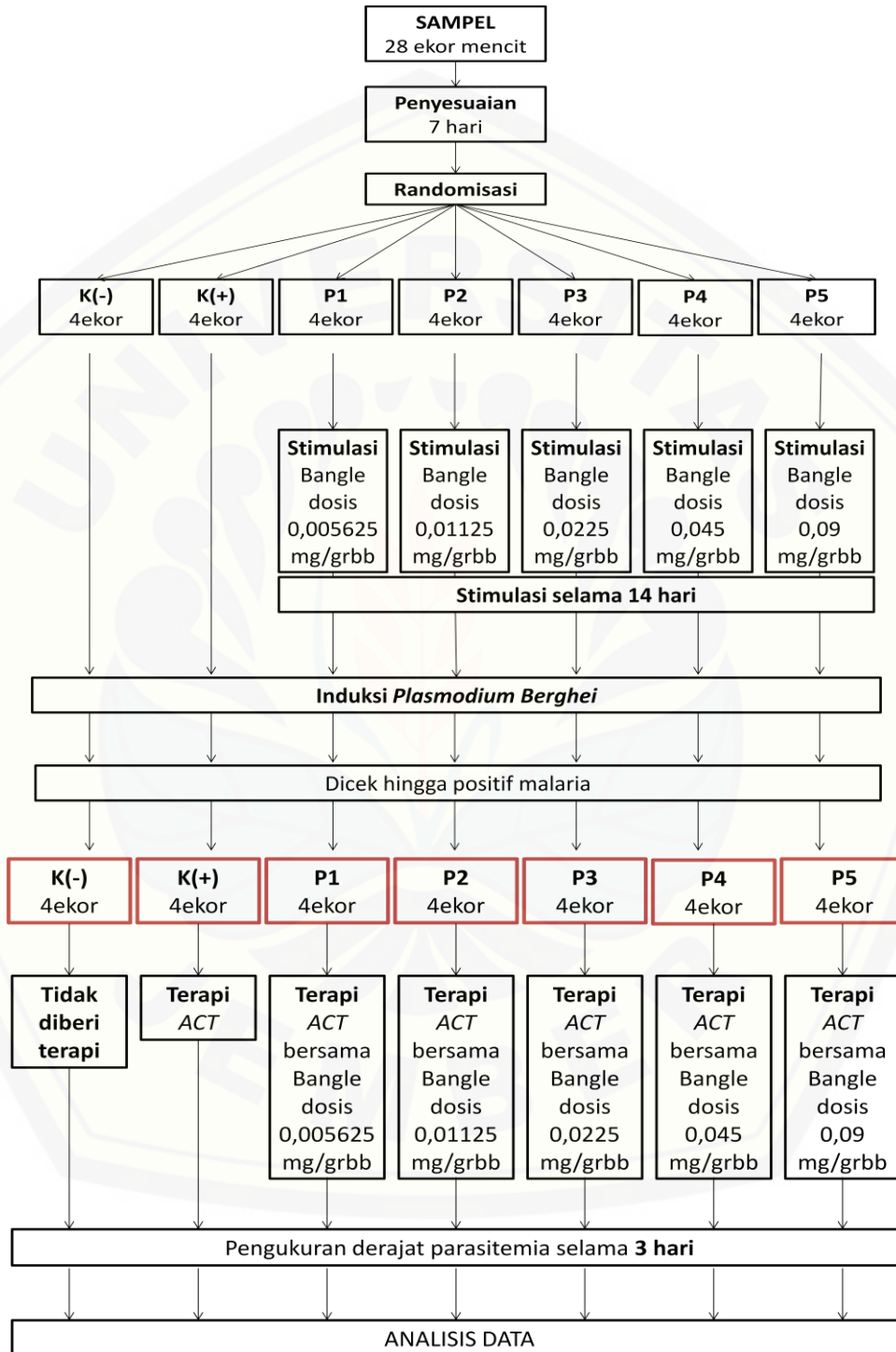
H_0 : hari pertama positif malaria

Persentase penghambatan dihitung dengan membandingkan persentase pertumbuhan pada kelompok tersebut dengan persentase parasitemia hari pertama terinfeksi malaria (Olasehinde *et al.*, 2012).

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh berupa derajat parasitemia dihitung persentase penghambatannya terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Kemudian dilakukan uji normalitas *Shapiro-Wilk* untuk menguji apakah data terdistribusi normal. Data kemudian dianalisis dengan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui hubungan antara pemberian fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* dan uji analisis probit untuk menemukan dosis fraksi n-heksana ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebanyak 50% (konsentrasi penghambatan setengah maksimal / IC_{50}). Hasil analisis tersebut disajikan dalam bentuk tabel dan dibahas dalam bentuk narasi.

3.9 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Skema alur penelitian