



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

SKRIPSI

Oleh
Yessie Elin Santoso
122010101094

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**



**UJI AKTIVITAS FRAKSI METANOL 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
Kedokteran

Oleh
Yessie Elin Santoso
122010101094

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS JEMBER
2015**

PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan rahmat dan seluruh ketentuan-Nya yang telah diberikan kepada saya;
2. Papa Eko Santoso, mama Lena Wati yang senantiasa selalu memberikan doa, bimbingan, dukungan, harapan, dan kasih sayang tiada henti, serta pengorbanan yang tak ternilai hingga saya dapat berada pada kondisi saat ini;
3. Nenek, saudaraku tercinta Yolanda Elin Santoso dan keluarga yang selalu mendoakan dan mendukung sepenuh hati;
4. Para pahlawan tanpa tanda jasa yang telah memberikan ilmu dan mendidiku penuh kesabaran untuk menjadikanku manusia yang berilmu dan bertakwa;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

MOTO

“Dan Katakanlah: "Bekerjalah kamu, maka Allah dan Rasul-Nya serta orang-orang mukmin akan melihat pekerjaanmu itu, dan kamu akan dikembalikan kepada (Allah) Yang Mengetahui akan yang ghaib dan yang nyata, lalu diberitakan-Nya kepada kamu apa yang telah kamu kerjakan.”
(Terjemahan Q.S Al-Taubah [9]:105)*)

Sesungguhnya sesudah kesulitan itu ada kemudahan. Maka apabila kamu telah selesai(dari suatu urusan), kerjakanlah dengan sungguh-sungguh (urusan) yang lain.
(Terjemahan Q.S Al-Insyirah 6-7)**)

*) **) Departemen Agama Republik Indonesia. 1981. Al Qur'an dan Terjemahannya. Semarang: PT Kumudasmoro Grafindo

PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Yessie Elin Santoso

NIM : 122010101094

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Metanol 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, 11 Desember 2015

Yang menyatakan,

Yessie Ein Santoso
NIM 122010101094

SKRIPSI

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

Oleh

Yessie Ein Santoso
NIM 122010101094

Pembimbing :

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Jauhar Firdaus

PENGESAHAN

Skripsi berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Metanol 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. Yuli Hermansyah, Sp.PD
NIP 19660711 199601 1 001

dr. Ida Srisurani Wiji Astuti, M.Kes
NIP 19820901 200812 2 001

Penguji III,

Penguji IV,

dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed
NIP 19830405 200812 1 001

dr. Jauhar Firdaus
NIP 19830125 200812 1 001

Mengesahkan
Dekan,

dr. Enny Suswati, M.Kes
NIP 19700214 199903 2 001

RINGKASAN

Uji Aktivitas Fraksi Metanol Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In vivo*; Yessie Elin Santoso, 122010101094; 2015: 88 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Malaria merupakan penyakit infeksi yang morbiditasnya masih tinggi di dunia, penyakit ini menjadi penyebab kematian ketiga pada kasus penyakit infeksi. Di Indonesia, malaria terdapat di seluruh wilayah dengan endemisitas tertinggi berada di Indonesia Timur. Meningkatnya resistensi *Plasmodium berghei* terhadap obat antimalaria membutuhkan alternatif obat dari tanaman alam yang mempunyai potensi sebagai antimalaria. Bangle banyak ditemukan di Indonesia dan terbukti memiliki efek antimalaria. Tujuan umum penelitian ini adalah mengetahui aktivitas fraksi metanol ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria.

Penelitian ini merupakan penelitian *true eksperimental laboratories* secara *in vivo* dengan satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan lima kelompok eksperimental. Penelitian ini dilakukan di tiga tempat, yaitu di Laboratorium Farmakologi FK UNEJ, Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi UNEJ dan Laboratorium Parasitologi FK UNEJ. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 1 bulan. Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit galur Balb/c dengan jumlah sampel 28 ekor.

Sampel mencit diberikan perlakuan setelah diadaptasi selama tujuh hari. Perlakuan yang diberikan berupa stimulasi dengan fraksi metanol ekstrak metanol bangle pada kelompok perlakuan selama 14 hari secara per oral, kemudian dilanjutkan dengan induksi malaria dengan *Plasmodium berghei* pada semua kelompok penelitian. Setelah mencit terinfeksi diberikan terapi komplementer berupa

ACT (dihydroartemisinin dan piperakuin) selama tiga hari dan ditambahkan primakuin pada hari pertama dengan dosis yang sama bersama dengan fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan konsentrasi uji 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045 mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB pada kelompok perlakuan, sedangkan kontrol positif hanya diberikan terapi ACT dan kontrol negatif tanpa diberikan terapi.

Indikator aktivitas antimalaria ditunjukkan dengan perbedaan persen penghambatan yang didapat dari pengukuran derajat parasitemia selama tiga hari. Hasil menunjukkan bahwa persen penghambatan parasit dengan nilai tertinggi dimiliki oleh kombinasi ACT dan fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,09 mg/grBB dengan persen penghambatan sebesar 71,75 kemudian menurun diikuti oleh kelompok kombinasi ACT dan fraksi metanol ekstrak metanol bangle dosis 0,045mg/grBB, 0,0225 mg/gr BB, 0,01125 mg/gr BB, dan 0,005625 mg/gr BB dengan persen penghambatan 56,80%, 55,80%, 46,29%, 36,25%. Pada kelompok kontrol positif memiliki persen penghambatan parasitemia terendah (24,73%) dibandingkan lima kelompok perlakuan, sedangkan pada kelompok kontrol negatif persen penghambatannya adalah nol.

Data di uji normalitas dengan *Saphiro Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal ($p>0,05$), dilanjutkan dengan uji korelasi *Pearson* dengan nilai sig 0,000 yang menunjukkan korelasi bermakna ($p<0,01$). Nilai korelasi *Pearson* sebesar 0.911 menunjukkan korelasi positif dengan kekuatan korelasi yang sangat kuat. Dari analisis probit didapatkan nilai *Inhibitory Concentration of 50% (IC₅₀)* sebesar 0,017 mg/grBB.

Penelitian *in vivo* membuktikan bahwa fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer bersama ACT dengan dengan nilai IC_{50} 0,017 mg/grBB yang mampu menghambat pertumbuhan *P. berghei* sebesar 50%

PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Uji Aktivitas Fraksi Metanol 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;
2. dr. Bagus Hermansyah, M.Biomed dan dr. Jauhar Firdaus selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk membimbing dan memotivasi saya dalam melakukan penelitian dan menyusun skripsi ini sebaik-baiknya;
3. dr. Yuli Hermansyah, Sp.PD dan dr. Ida Srisurani Wiji Astuti, M.Kes sebagai dosen penguji yang berkenan memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Wiwien Sugih Utami, M.Sc., dr. Cholis Abrori, M.Kes., M.Pd.Ked, dr. Dini Agustina, M.Biomed. dan Dr.dr. Ancah Caesarina Novi M, Ph.D. yang telah memberikan bimbingan dan masukan dalam penelitian ini;
5. Edda Rachmadenawanti dan Sarah Andriani sebagai sahabat sekaligus rekan kerjaku dalam penelitian ini yang selalu memberikan semangat, dukungan dan bantuan yang luar biasa dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;

6. Teman dekatku Intan Palupi, Monica Bethari P, Defriyana Nyoman S, Bagus Dwi K, M. Avin Zamroni, Geraldi Kusuma W, Silvi Achmada C, dan Ivan Kristantya yang selalu memberikan motivasi dan masukan yang positif dalam mengerjakan skripsi ini;
7. Teknisi Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Mbak Lilik Maslian, Teknisi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Mbak Lilik Susilowati, Teknisi Laboratorium Preskripsi Fakultas Farmasi Universitas Jember, Bu Widi, Mbak Anggra dan Pak Nuri, Teknisi Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Mas Agus Murdojohadi, dan Teknisi Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Mbak Heni Indrawati, terima kasih atas bantuan dan kerjasama, dukungan serta masukan selama penelitian ini;
8. Dinas kesehatan Kabupaten Jember yang memberikan bantuan dalam penelitian ini;
9. Keluarga angkatan 2012 (PANACEA) yang selalu memberikan dukungan selama ini;
10. 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, 11 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 TABEL	xv
DAFTAR GAMBAR	xvi
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
BAB 1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Malaria	5
2.1.1 Definisi.....	6
2.1.2 Etiologi dan Hospes	6
2.1.3 Transmisi.....	7

2.1.4	Siklus Hidup.....	7
2.1.5	Patogenesis.....	10
2.1.6	Manifestasi Klinis	12
2.1.7	Diagnosis.....	13
2.1.8	Pengobatan	14
2.1.9	Resistensi Plasmodium terhadap Obat Anti Malaria (OAM)	18
2.2	<i>Plasmodium berghei</i>	19
2.2.1	Taksonomi.....	19
2.2.2	Morfologi	20
2.2.3	<i>P. berghei</i> sebagai Riset Malaria	20
2.3	Tanaman Bangle	22
2.3.1	Klasifikasi	22
2.3.2	Morfologi	23
2.3.3	Kandungan	23
2.4	Ekstraksi dan Fraksinasi	25
2.5	Kerangka Teori	27
2.6	Kerangka Konsep	28
2.7	Hipotesis	29
BAB 3.	METODE PENELITIAN	30
3.1	Jenis Penelitian	30
3.2	Tempat dan Waktu Penelitian	30
3.3	Populasi dan Sampel Penelitian	30
3.3.1	Populasi.....	30
3.3.2	Sampel.....	31
3.3.3	Jumlah Sampel	31
3.4	Variabel penelitian	32
3.4.1	Variabel Bebas	32

3.4.2	Variabel Terikat.....	32
3.4.3	Variabel Terkendali.....	32
3.5	Definisi Operasional.....	32
3.6	Rancangan Penelitian	34
3.6	Alat dan Bahan.....	36
3.7.1	Alat	36
3.7.2	Bahan	36
3.8	Prosedur Penelitian	37
3.7.1	Pemilihan Sampel Tikus.....	37
3.7.2	Persiapan Sampel Tikus	37
3.7.3	Pembuatan Ekstrak Metanol Bangle.....	37
3.7.4	Pembuatan Fraksi Metanol Bangle.....	38
3.7.5	Penetapan Dosis Bangle dan Artemisinin	38
3.7.6	Tahap Perlakuan	40
3.7.7	Pembuatan Hapusan Darah.....	42
3.8.8	Pengamatan Histopatologi.....	42
3.8.9	Perhitungan Persen penghambatan.....	43
3.9	Analisis Data	44
3.10	Alur Penelitian	45
BAB 4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	46
4.1	Hasil Penelitian	46
4.2	Analisis Hasil Penelitian.....	52
4.3	Pembahasan.....	53
BAB 5.	KESIMPULAN DAN SARAN	60
5.1	Kesimpulan	60
5.2	Saran	60
DAFTAR PUSTAKA		61
LAMPIRAN		68

DAFTAR TABEL

	Halaman
4.1 Rata-rata persen parasitemia.....	48
4.2 Rata-rata persen penghambatan.....	50
4.3 Hasil uji normalitas <i>shapiro-wilk</i>	52
4.4 Hasil uji korelasi <i>pearson</i>	52
4.5 Hasil IC50 dari analisis probit.....	53

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1	Gambaran siklus hidup malaria. 9
2.2	Gambaran patogenesis malaria berat 11
2.3	Alur penanganan penderita malaria di indonesia..... 14
2.4	Penatalaksanaan pengobatan malaria tanpa komplikasi 16
2.5	Alur penatalaksanaan pengobatan malaria berat 17
2.6	Sediaan hapusan darah parasit malaria 21
2.7	Bagian rimpang bangle 23
2.8	Kerangka teori..... 27
2.9	Kerangka konseptual..... 28
3.1	Skema rancangan penelitian 34
3.2	Lapang pandang untuk menghitung 43
3.3	Alur penelitian 45
4.1	Gambaran eritrosit terinfeksi. 47
4.2	Diagram hubungan dosis fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan rata-rata persen parasitemia..... 49
4.3	Grafik hubungan dosis fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan hasil persen penghambatan parasit..... 51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran A. Persetujuan Etik Penelitian	68
Lampiran B. Hasil Identifikasi Tanaman Bangle	69
Lampiran C. Hasil Perhitungan Dosis	70
Lampiran D. Hasil Perhitungan Derajat Parasitemia	74
Lampiran E. Hasil Perhitungan Persen Pertumbuhan dan Penghambatan	81
Lampiran F. Hasil Uji Statistik	83
Lampiran G. Dokumentasi Kegiatan Penelitian	86

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang morbiditasnya cukup tinggi di dunia, penyakit ini menjadi penyebab kematian ketiga pada kasus penyakit infeksi (Harijanto, 2014:595). Menurut Badan Kesehatan Dunia (WHO, 2015) diperkirakan insiden malaria di dunia mencapai 198 juta kasus pada tahun 2013 dan 584 ribu meninggal akibat malaria. Di Indonesia, penyakit malaria tersebar di seluruh pulau dan provinsi dengan derajat endemisitas yang berbeda-beda sehingga pemerintah melakukan pemantauan malaria dengan API (*Annual Parasite Incidence*). Berdasarkan API, dilakukan stratifikasi wilayah dimana Indonesia bagian Timur masuk dalam stratifikasi malaria tinggi, beberapa wilayah di Kalimantan, Sulawesi dan Sumatera termasuk stratifikasi sedang, sedangkan Jawa-Bali masuk dalam stratifikasi rendah (Kemenkes RI, 2011:2). Pada tahun 2012, didapatkan informasi lima orang meninggal akibat malaria dari 73 kasus di Kabupaten Jember. Hasil evaluasi Dinkes Jember mengatakan bahwa malaria di Jember tersebar di beberapa kecamatan dengan kasus terbanyak di kecamatan Kalisat, Ledokombo, dan Sumber Jambe dan pada tahun 2013 sudah ditemukan 46 kasus di kecamatan tersebut (Isnaeni, 2013).

Penyakit malaria ditetapkan sebagai salah satu indikator dari target Pembangunan Milenium (MDGs) sejak tahun 2010, target yang ingin dicapai pada tahun 2015 adalah menghentikan penyebaran dan mengurangi kejadian insiden malaria hingga mencapai satu dari 1000 penduduk. Berdasarkan data dari *Annual Parasite Incidence* (API), upaya untuk menurunkan angka kejadian malaria menunjukkan kecenderungan yang positif, hal ini dilihat dari penurunan kasus malaria sejak tahun 2000 (API 3,68/1000 penduduk) menurun menjadi 1,69/1000

penduduk pada tahun 2012, 1,38/1000 penduduk pada tahun 2013 dan telah mencapai target pada tahun 2014 dengan API dibawah satu (API 0,99/1000 penduduk) (Chaniago, 2015). *Global Malaria Programme* (GMP) menyatakan bahwa malaria merupakan penyakit yang harus terus menerus dilakukan pengamatan, monitoring dan evaluasi, serta diperlukan formulasi kebijakan dan strategi yang tepat dalam penanganan insidensi di suatu Negara (Kemenkes RI, 2011). Salah satu usaha yang dilakukan dalam penanganan malaria adalah pemberian obat antimalaria yang dapat menghambat perkembangbiakan parasit yang beredar dalam darah penderita malaria. Di Indonesia, pengobatan malaria menggunakan Obat Anti Malaria (OAM) kombinasi yaitu *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) (Depkes, 2012). Akan tetapi, pengendalian penyakit malaria mengalami kendala, antara lain terjadinya resistensi pengobatan malaria yang dapat mengakibatkan kematian maupun meluasnya kasus-kasus malaria (Yusuf, 2014). WHO merekomendasi penggunaan obat tradisional untuk memelihara kesehatan, mencegah dan mengobati penyakit. Tanaman obat menjadi salah satu pilihan terapi karena efek sampingnya lebih rendah, murah, dan mudah didapat. Selama ini kombinasi obat antimalaria dengan ekstrak bahan alam masih jarang dilakukan, padahal terapi kombinasi ini memiliki kelebihan mampu meningkatkan efektivitas ekstrak sebagai antimalaria juga mempunyai potensi memperlambat terjadinya resistensi parasit terhadap antimalaria standar (Hafid, 2011).

Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) termasuk dalam famili *zingiberaceae*. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa senyawa yang terkandung dalam bangle yaitu curcumin, alkaloid, flavonoid dan phenilbutanoid memiliki efek sitotoksik dan antiparasit yang dapat melawan protozoa, seperti *Leishmania*, *Trypanosoma*, dan *Plasmodium falciparum*. Curcumin juga dapat menghambat aktivitas inflamasi pada *Plasmodium berghei* yang diinfeksi pada

mencit model penelitian malaria (Ferreira., 2010; Ghosh *et al.*, 2014; Chairul *et al.*, 2009).

Berdasarkan latar belakang tersebut, penulis ingin melakukan penelitian mengenai aktivitas antimalaria fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria bersama terapi standar malaria yaitu *Artemisinin-based Combination Therapy* (ACT) pada hewan coba (mencit jantan galur balb/c) yang diinfeksi *Plasmodium bergheise* hingga dapat menghasilkan formula obat kombinasi baru yang mempunyai efek antimalaria lebih baik.

1.2 Rumusan Masalah

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

- a. Apakah fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*?
- b. Apakah fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125mg/grBB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB memiliki perbedaan persentase penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*?
- c. Berapakah nilai *Inhibitory Concentration of 50%* (IC50) dari fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125mg/grBB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini memiliki dua tujuan, yaitu tujuan umum dan tujuan khusus yang diuraikan sebagai berikut.

1.3.1 Tujuan Umum

Tujuan penelitian ini adalah mengetahui aktivitas fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementermalaria secara *in vivo*

1.3.2 Tujuan Khusus

Tujuan khusus penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Mengetahui perbedaan persentase penghambatan dari fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125mg/grBB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.
- b. Menentukan nilai *Inhibitory Concentration of 50%(IC50)* dari fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dari dosis 0,005625 mg/gr BB, 0,01125mg/gr BB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang didapatkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

- a. Bagi peneliti, mendorong para peneliti lain untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai tanaman obat yang dapat digunakan sebagai terapi komplementer malaria, guna meningkatkan derajat kesehatan masyarakat Indonesia dan tercapainya target MDG-s 2015.
- b. Bagi masyarakat, penelitian ini diharapkan dapat memberi tambahan informasi dan ilmu pengetahuan, khususnya di bidang kesehatan sehingga dapat bermanfaat sebagai dasar pengobatan alternatif untuk menurunkan komplikasi malaria yang menyebabkan kematian.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Malaria

Malaria merupakan penyakit tropis yang masih menjadi masalah utama karena semakin banyaknya kasus resistensi obat yang berkembang. Menurut Badan Kesehatan Dunia (WHO, 2015) diperkirakan insiden malaria di dunia mencapai 198 juta kasus pada tahun 2013 dan diantaranya 584 ribu meninggal akibat malaria. Di Indonesia, penyakit malaria tersebar di seluruh pulau dan provinsi dengan derajat endemisitas yang berbeda-beda sehingga pemerintah melakukan pemantauan malaria dengan API (*Annual Parasite Incidence*). Penyakit malaria ditetapkan sebagai salah satu indikator dari target Pembangunan Milenium (MDGs) sejak tahun 2010, dimana target yang ingin dicapai adalah menghentikan penyebaran dan mengurangi kejadian insiden malaria hingga mencapai satu dari 1000 penduduk pada tahun 2015. *Global Malaria Programme* (GMP) juga menyatakan bahwa malaria merupakan penyakit yang harus terus menerus dilakukan pengamatan, monitoring dan evaluasi, serta diperlukan formulasi kebijakan dan strategi yang tepat dalam penanganan insidensi di suatu Negara (Kemenkes RI, 2011).

Berbagai upaya telah dilakukan untuk menanggulangi parasit malaria, tetapi prevalensinya masih tetap tinggi. Hal tersebut dapat terjadi karena resistensi vektor terhadap insektisida dan adanya resistensi *Plasmodium sp.* terhadap obat antimalaria baik monoterapi maupun ACT. Resistensi timbul akibat penggunaan obat malaria tidak adekuat dan tidak sesuai dengan aturan cara pemakaian. Mekanisme terjadinya resistensi obat belum diketahui dengan pasti tetapi diduga bahwa resistensi terjadi karena mutasi gen karena tekanan obat atau penggunaan obat dalam dosis subkuratif (Cholis, 2009). Oleh karena itu, perlu upaya untuk mencari dan mengembangkan kombinasi obat malaria baru sebagai obat alternatif yang efektif,

aman, sedikit efek samping, murah dan mudah didapatkan terutama yang berasal dari tanaman. Selama ini kombinasi obat antimalaria standar dengan ekstrak bahan alam masih jarang dilakukan, padahal terapi kombinasi ini memiliki kelebihan mampu meningkatkan efektivitas ekstrak sebagai antimalaria juga mempunyai potensi memperlambat terjadinya resistensi parasit terhadap antimalaria standard (Hafid, 2011). Dari uraian di atas peneliti akan membahas tinjauan tentang malaria.

2.1.1 Definisi

Malaria adalah penyakit menular yang disebabkan oleh parasit (protozoa) dari genus *plasmodium* yang dapat ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina (vector borne disease). Istilah malaria diambil dari dua kata bahasa Italia, yaitu “mal” (buruk) dan “area” (udara) atau udara buruk (Arsin, 2012). Malaria termasuk dalam *phyllum Apicomplexa*, kelas *Sporozoa*, subkelas *Coccidiidae*, ordo *Eucoccidides*, sub-ordo *Haemosporidiidea*, famili *Plasmodidae*, genus *plasmodium*. Ciri utama famili *Plasmodiidae* adalah adanya siklus hidup aseksual yang dimulai pada vertebrata dan seterusnya berlanjut pada nyamuk (Hakim, 2011). Pada tubuh manusia, parasit membelah diridan bertambah banyak di dalam hati dan kemudian menginfeksi sel darah merah (Soedarto, 2011)

2.1.2 Etiologi dan Hospes

Protozoa darah genus *Plasmodium* merupakan agen penyebab infeksi malaria, sampai saat ini telah ditemukan sekitar 200 spesies di seluruh dunia, sedangkan di Indonesia masih dikenal ada lima spesies yang dapat menginfeksi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium knowlesi* (Perkins *et al.*, 2011; Arsin, 2012). *P. falciparum* dapat menyebabkan malaria tropika atau malaria tertiana maligna, *P. vivax* menyebabkan malaria vivax atau malaria tertiana benigna, *P. malariae* menyebabkan malaria malariae atau malaria quartana, dan *P. ovale* menyebabkan malaria ovale atau

malaria tertiana ovale. Kelima spesies *plasmodium sp.* tersebut, *P.falciparum* dan *P.vivax* merupakan penyebab terbanyak kasus malaria. *Plasmodium falciparum* juga merupakan penyebab malaria berat dan menjadi penyebab utama kematian akibat malaria (WHO, 2015). Parasit malaria memiliki dua hospes dalam siklus hidupnya, yaitu di dalam tubuh hospes definitif *Anopheles* betina dan di dalam tubuh manusia (hospes perantara). Di dalam hospes definitif, parasit mengalami pembiakan seksual (sporogoni), sedangkan pada manusia terjadi pembiakan aseksual (skizogoni) (Natadisastra dan Agoes, 2009).

2.1.3 Transmisi

Penularan penyakit malaria dapat terjadi melalui dua cara :

- a. Penularan secara alamiah (natural infection), melalui gigitan nyamuk *Anopheles*.
- b. Penularan bukan alamiah, melalui:
 1. Malaria bawaan (kongenital), bayi yang dikandung oleh ibu yang terinfeksi malaria akibat sawar plasenta yang rusak.
 2. Penularan secara mekanik terjadi melalui transfusi darah atau jarum suntik. Penularan melalui jarum suntik banyak terjadi pada para pencandu obat bius yang menggunakan jarum suntik yang tidak steril. Infeksi malaria melalui transfusi darah hanya menghasilkan siklus eritrosit saja sehingga dapat diobati dengan mudah.
 3. Penularan secara oral, pernah dibuktikan pada ayam (*P.gallinasium*). burung dara (*P. relection*) dan monyet (*P.knowlesi*). Pada umumnya sumber infeksi malaria pada manusia adalah manusia lain yang sakit malaria, baik dengan gejala maupun tanpa gejala klinis (Widoyono, 2011).

2.1.4 Siklus Hidup

Parasit malaria memerlukan dua hospes untuk siklus hidupnya, yaitu manusia dan nyamuk *Anopheles*. Pada manusia terjadi siklus hidup aseksual, sedangkan pada nyamuk terjadi siklus hidup seks

2.1.4.a Siklus Hidup Aseksual pada Manusia

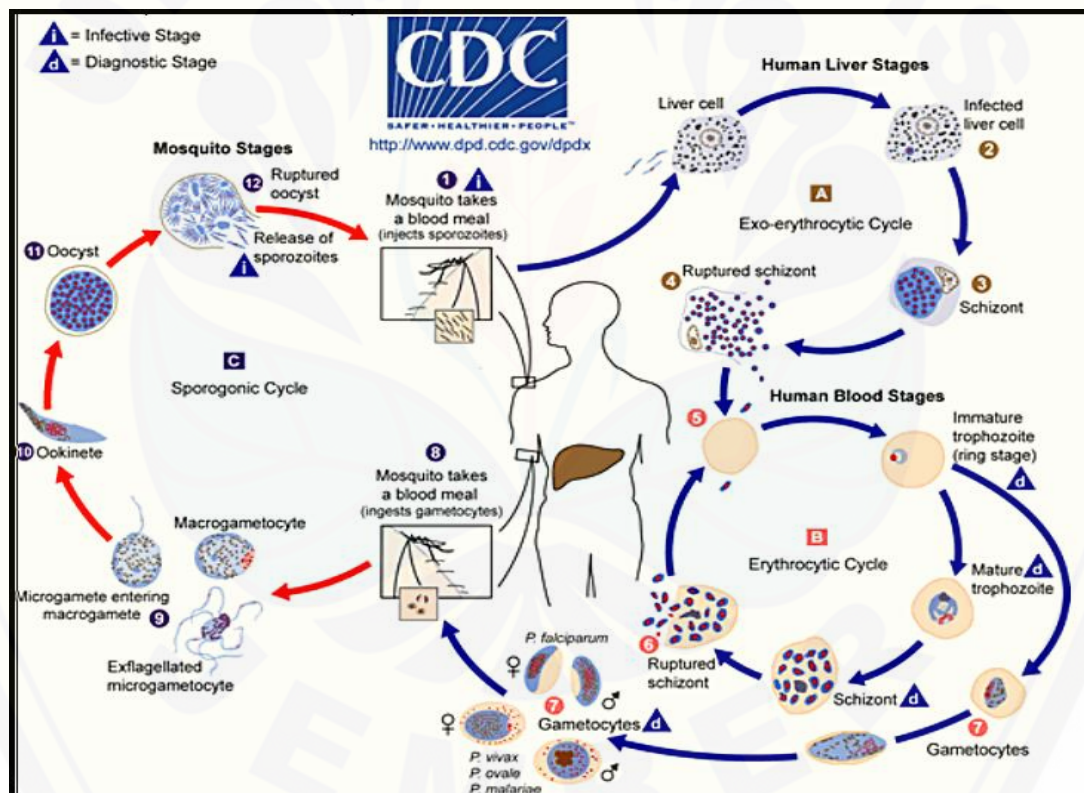
Daur hidup aseksual terdiri dari empat tahapan, yaitu tahap skizogonipreeritrositik, tahap skizogeni eksoeritrositik, tahap skizogeni eritrositik, dan tahap gametogoni. Fase skizogeni preeritrositik dimulai pada saat manusia terinfeksi melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina, sporozoit yang berada di kelenjar air liur nyamuk masuk ke dalam peredaran darah selama kurang lebih 1 jam, kemudian akan memasuki jaringan sel-sel *parenkim hati* dan menjalani fase eksoeritrositer. Pada fase eksoeritrositer, sporozoit dalam hati menjadi lebih bundar atau oval, dan intinya cepat membelah berkembang menjadi skizon hati yang terdiri dari 10000-30000 merozoit eksoeritrositer. Fase skizogeni eritrosit ditandai dengan melekatnya merozoit eksoeritrositer pada permukaan eritrosit. Setelah masuk ke dalam eritrosit, merozoit akan berubah menjadi merupakan fase terpanjang dan hingga saat ini *tropozoit*, *skizon*, dan *merozoit hati*. Eritrosit terinfeksi pecah dan mengeluarkan merozoit yang akan menyerang sel darah merah lainnya, siklus ini berulang hingga 2 atau 3 generasi. Setelah beberapa generasi, sebagian dari merozoit tidak masuk ke dalam fase skizogeni tetapi mengalami fase gametogoni yaitu fase untuk pembentukan sel kelamin jantan dan betina yang berlangsung selama 96 jam (Soedarto, 2011).

2.1.4.b Siklus Hidup Seksual pada Nyamuk *Anopheles*

Saat nyamuk *Anopheles* betina menghisap darah penderita malaria, semua stadium yang ada dalam darah akan terhisap masuk ke dalam lambung nyamuk. Untuk dapat menginfeksi seekor nyamuk *Anopheles*, sedikitnya dibutuhkan 12 parasit *gametosit Plasmodium* per milliliter darah. Pada lambung nyamuk terjadi fusi antara makrogametosit dan mikrogametosit membentuk *zigot*, dalam waktu 24 jam zigot akan berkembang menjadi ookinet. *Ookinet* akan menembus dinding lambung dan berubah menjadi *ookista*. Di dalam ookista yang bulat terbentuk ribuan *sporozoit* yang akan dikeluarkan saat ookista pecah. Sporozoit ini bersifat infeksius dan

menyebarkan ke berbagai organ nyamuk termasuk kelenjar ludah (*salivary glands*) (Soedarto, 2011).

Masainkubasi pada penyakit malaria dibedakan atas masa inkubasi ekstrinsik (stadium sporogoni) dan masa inkubasi intrinsik. Masa inkubasi ekstrinsik dimulai saat masuknya gametosit ke dalam tubuh nyamuk sampai terjadinya stadium sporogoni, yaitu terbentuknya sporozoit yang kemudian masuk ke dalam kelenjar liur. Masa inkubasi ekstrinsik dipengaruhi oleh suhu udara sehingga berbeda untuk setiap spesies. Masa inkubasi intrinsik dimulai saat masuknya sporozoit ke dalam darah sampai timbul gejala (Arsin, 2012).



Gambar 2.1 Gambaran siklus hidup malaria secara aseksual di tubuh manusia dan secara seksual di tubuh nyamuk (sumber : Public Health ImageLibrary of the Centers for Disease Control and Prevention)

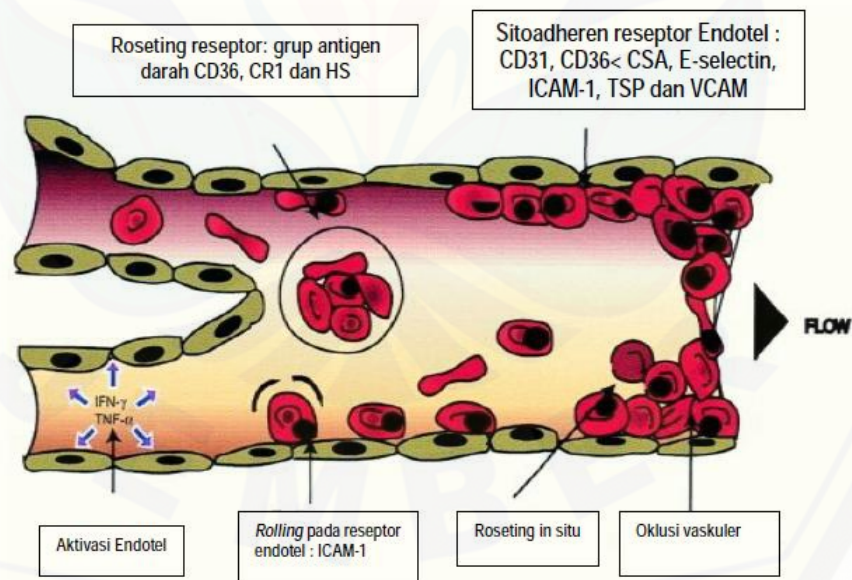
2.1.5 Patogenesis Malaria

Patogenesis malaria merupakan suatu interaksi kompleks antara parasit, hospes, dan lingkungan. Patogenesis pada malaria berkaitan dengan invasi merozoit ke dalam eritrosit sehingga menyebabkan eritrosit terinfeksi mengalami perubahan struktur dan biomolekular sel. Perubahan tersebut meliputi beberapa mekanisme antara lain transport membran sel, *sitoadherens*, sekuestrasi dan *rosetting* (Novita, 2009).

Patogenesis malaria yang dianut selama ini adalah terjadinya kerusakan sel darah merah karena invasi parasit, obstruksi mikrovaskuler karena sekuestrasi parasit (proses *sitoadherens* dan *rosetting*), kelainan regulasi sitokin dan oksida nitrit. *Sitoadherens* adalah melekatnya eritrosit yang terinfeksi parasit (*infected red blood cell* = IRBC) pada permukaan endotel vaskuler membran IRBC yang disebut *knob*. *Sitoadherens* merupakan suatu proses spesifik yang hanya terjadi pada kapiler dan venule post-kapiler. Molekul adesi pada IRBC yang berperan sebagai *ligand* adalah suatu protein yang terletak di permukaan *knob* yang dinamakan *Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein-1* (Pf-EMP-1), sedangkan reseptor yang berikatan dengan Pf-EMP-1 adalah CD36, trombospondin, *intercellular adhesion molecules-1* (ICAM-1), *vascular cell adhesion molecules-1* (VCAM-1), E-selektin, kondroitin sulfat. *Sitoadherens* merupakan mekanisme pertahanan yang memungkinkan parasit mengasingkan diri dari sirkulasi perifer (sekuester) sehingga dapat menghindari dari eliminasi oleh limpa. Mekanisme *Sitoadherens* dapat berpindah dari satu tempat ke tempat yang lain, menyebabkan sekuestrasi (penumpukan) IRBC pada mikrovaskuler organ vital seperti otak, paru, hati, ginjal, jantung, usus, limpa dengan sekuestrasi tertinggi terjadi pada otak yang berhubungan dengan komplikasi malaria serebral (Gunawan, 2014).

Eritrosit yang terinfeksi selain dapat melekat pada sel-sel endotel, juga mampu berikatan dengan eritrosit lain yang tidak terinfeksi, mekanisme ini disebut *rosetting*. *Rosetting* adalah fenomena perlekatan antara sebuah IRBC matang yang

diselubungi oleh 10 atau lebih eritrosit tak terinfeksi sehingga terbentuk susunan seperti bunga. *Rosetting* seperti halnya *sitoadherens* berperan dalam terjadinya obstruksi mikrovaskuler. *Rosetting* juga merupakan mekanisme interaksi antara ligan pada eritrosit terinfeksi dengan reseptor-reseptor pada permukaan eritrosit normal. Saat ini telah diidentifikasi lima reseptor *rosetting* pada eritrosit, yaitu: antigen golongan darah A dan B, CD36, *complement receptor 1* (CR1) dan *Heparan Sulfate-like Glycosaminoglycans* (HS-like GAGs). Selain PfEMP1 ligan eritrosit terinfeksi berperan dalam pembentukan roset lain, seperti *rosetting* (RIFINs). Beberapa protein serum, yaitu IgG dan IgM serta fibrinogen dan albumin, juga berperan dalam terjadinya *rosetting* dengan berpartisipasi dalam pembentukan *rouleaux* sehingga menghasilkan roset yang stabil ikatannya dengan ligan-roseting PfEMP1 dari parasit (Rowe *et al.*, 2009). Persentase IRBC yang melekat pada sel endotel vaskuler dan persentase IRBC yang membentuk roset mempunyai korelasi positif dengan derajat parasitemia dan merupakan faktor terpenting dalam virulensi parasit (Gunawan., 2014).



Gambar 2.2 Patogenesis pada malaria berat akibat *Plasmodium sp.* (sumber:Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2012)

2.1.6 Manifestasi Klinis

Malaria memiliki suatu gejala yang khas yang disebut *trias malariayaitu* demam periodik, anemia dan splenomegali. Gejala khas tersebut ditemukan pada penderita non imun yang dapat didahului dengan gejala prodormal berupa sakit kepala, hilangnya nafsu makan, nausea, atau malaise. Timbulnya gejala prodormal terkait dengan siklus eritrositik *Plasmodium sp.* di dalam tubuh manusia (Harijanto 2014).

Demam yang terjadi pada malaria disebabkan oleh pecahnya skizon darah yang mengeluarkan bermacam-macam antigen. Antigen yang dikeluarkan dalam darah berasal dari pigmen malaria dan produk samping parasit, seperti membran dan isi sel-sel eritrosit. Pigmen malaria tidak toksik, tetapi menyebabkan tubuh mengeluarkan produk-produk asing dan respon fagosit yang intensif. Antigen ini akan merangsang sel makrofag, monosit, dan limfosit untuk mengeluarkan berbagai macam sitokin. Sitokin utama yang dihasilkan adalah “ *Tumor Necrosis Factor*” (TNF-alfa) dan interleukin-1 (IL-1) yang akan menginduksi pelepasan sitokin-sitokin proinflamatori lain termasuk interleukin-6 (IL-6) dan interleukin-8 (IL-8). (TNF-alfa) dan IL-6 akan dibawa aliran darah ke hipotalamus yang merupakan pusat pengatur termostat tubuh dan mengubah titik setpoint termoregulator melalui stimulasi sintesis prostaglandin-E dalam pusat termoregulator di hipotalamus sehingga terjadi demam (Dirjen PP&PL Depkes RI, 2008).

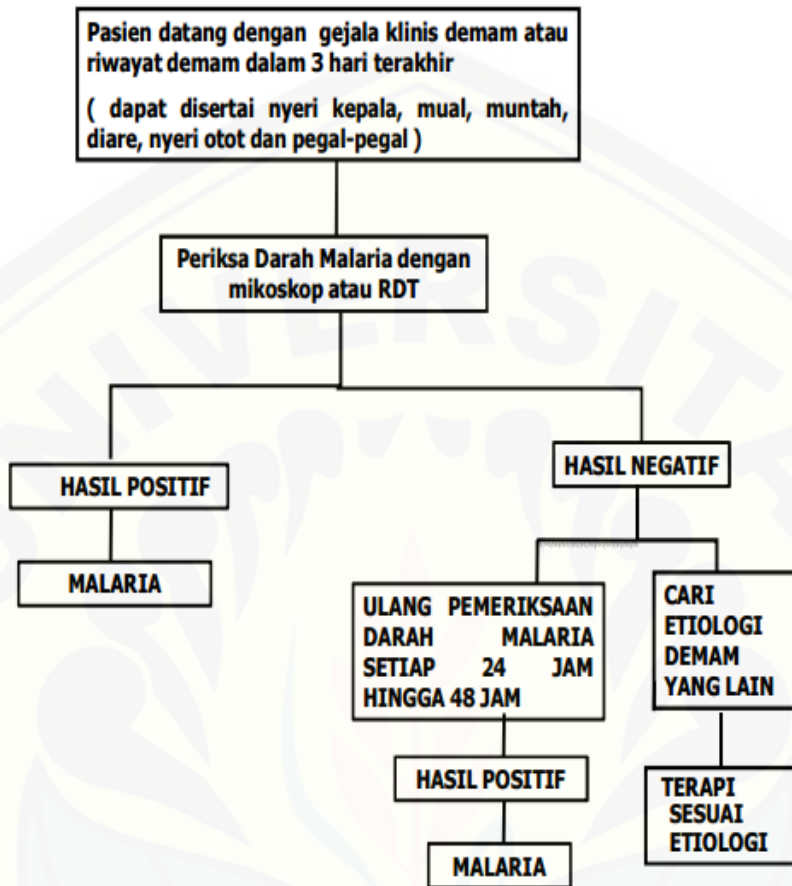
Anemia dapat terjadi pada infeksi akut maupun kronis, tergantung pada jenis *Plasmodium sp.* yang menyerang. *P.falciparum* menginfeksi semua jenis sel darah merah sehingga anemia terjadi pada infeksi akut maupun kronis. *P.vivax* dan *P.ovale* hanya menginfeksi sel darah merah muda yang jumlahnya 2 % dari seluruh jumlah sel darah merah. Sedangkan *P.malariae* menginfeksi sel darah merah tua yang jumlahnya 1% dari seluruh sel darah merah sehingga anemia yang disebabkan oleh *P.vivax*, *P.ovale*, dan *P.malariae* terjadi pada keadaan kronis (Dirjen PP&PL Depkes RI, 2008). Anemia terjadi akibat pengrusakan eritrosit oleh parasit, hemolisis oleh

karena proses *complement mediated immune complex*, eritrofagositosis, dan penghambatan pengeluaran retikulosit yang dipengaruhi oleh faktor intrinsik dan ekstrinsik. Faktor intrinsik berkaitan dengan deformabilitas pada eritrosit yang terinfeksi dan faktor ekstrinsik terjadi karena eritrosit yang tidak terinfeksi mengalami sensitasi melalui komplemen (C3 dan C4) atau imunoglobulin (IgG dan IgA) (Harijanto, 2014). Selain itu keadaan anemia semakin diperberat dengan adanya sitokin pro-inflamasi TNF- α yang menginduksi disieritropoesis dengan menghambat pertumbuhan prekursor eritroid, meningkatkan eritrofagositosis, merangsang pelepasan *reactive oxygenspecies* oleh sel fagosit teraktivasi yang menyebabkan kerusakan eritroblast dalam sumsum tulang (Buffet *et al.*, 2011)

Limpa merupakan organ retikuloendotelial sistem, organ ini penting untuk pertahanan tubuh melawan infeksi malaria. Limpa mengeliminasi eritrosit terinfeksi melalui mekanisme imun dan pengenalan perubahan deformabilitas yang diperankan oleh sel-sel makrofag dan limfosit. Pada gambaran histopatologi didapatkan eritrosit terinfeksi melekat pada makrofag melalui knob permukaan karena terjadi fagositosis aktif. Adanya retensi eritrosit terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi, peningkatan fagositosis oleh mononuklear limpa dan lisis yang dimediasi *complement-fixing malaria antigen-antibody*, menyebabkan hipertrofi RES (*Reticuloendothelial System*) dan berkontribusi terhadap terjadinya splenomegali (Buffet *et al.*, 2011).

2.1.7 Diagnosis Malaria

Diagnosis malaria pada umumnya didasarkan pada manifestasi klinis yaitu *trias malaria* (demam, anemia, dan splenomegali), uji imunoserologis dan ditemukannya parasit *Plasmodium sp.* dalam darah penderita. Dua metode yang digunakan untuk pemeriksaan parasit dalam darah yaitu melalui mikroskop dan tes diagnostik cepat. Pemeriksaan apusan darah tepi tipis dan tebal dengan menggunakan pewarnaan *Field* maupun *Giemsa* masih menjadi baku emas diagnosis malaria dengan sensitivitas dan spesifisitas yang tinggi (Depkes RI, 2012).



Gambar 2.3 Alur penemuan penderita malaria di Indonesia (sumber:Depkes RI, 2012)

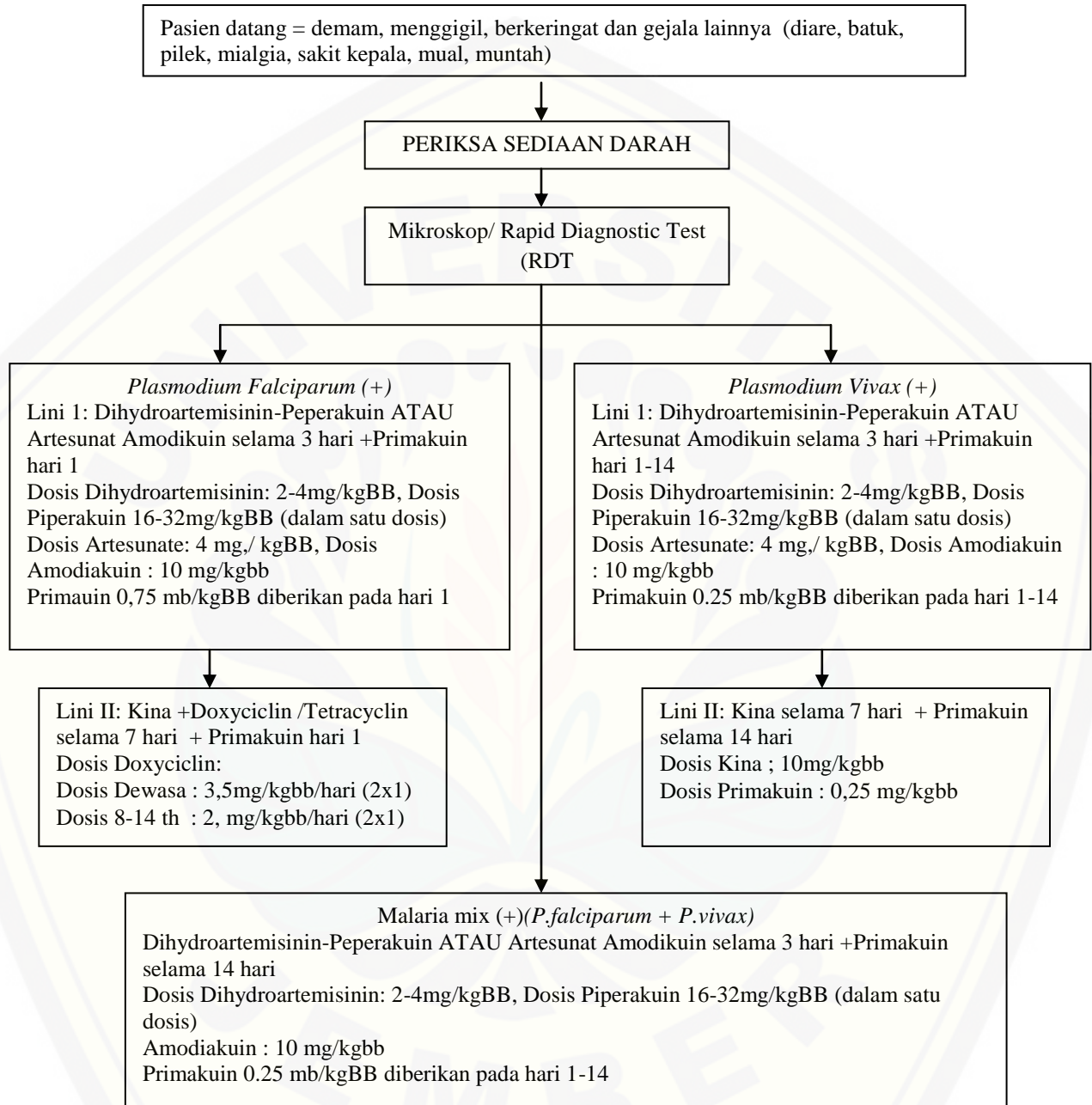
2.1.8 Pengobatan malaria

Artemisinin merupakan obat antimalaria yang telah dipakai sejak lama di berbagai negara di dunia.(WHO, 2011)merekomendasikan penggunaan derivat artemisinin (ART) untuk pengobatan malaria berat, malaria ringan tanpa komplikasi, dan malaria *mix* yangharus dipakai kombinasi bersama dengan obat malaria lain atau biasa disebut ACT (*Artemisinin Combination Therapy*). Derivat artemisinin yang ada di Indonesia adalah arte-misinin, artesunate, artemether dan dihydro- artemisinin, dan lain-lain. Senyawa dalam artemisinin menunjukkan sifat skizontosid darah yang cepat baik *in vitro* maupun *in vivo*. Adanya ikatan endoperoksida dalam senyawa ini

berperan dalam menghambat sintesis protein yang diduga merupakan mekanisme kerja antiparasit ini. Artemisinin adalah obat yang paling efektif, aman, dan kerjanya cepat untuk kasus malaria berat yang disebabkan oleh *P.falciparum* yang resisten terhadap klorokuin dan obat-obat yang lainnya, serta efektif untuk malaria serebral (Syarif, 2011).

Di Indonesia pengobatan malaria secara spesifik dibagi menjadi dua, yaitu pengobatan malaria tanpa komplikasi dan pengobatan malaria dengan komplikasi (Depkes RI, 2012). Pengobatan pada kasus malaria dilakukan berdasarkan jenis *Plasmodium sp.* yang menyerang manusia. Pada saat pasien datang dengan keluhan *trias malaria* disertai gejala prodormaldilakukan pemeriksaan sediaan darah dengan membuat hapusan darah tepi pasien maupun menggunakan *Rapid Diagnostic Test*. Setelah teridentifikasi jenis *Plasmodium sp.* yang menginfeksi dilakukan terapi sesuai *Plasmodium sp.* yang menyerang. Penyebab malaria terbanyak disebabkan oleh *Plasmodium falciparum*. Hal yang terpenting pada pengobatan kasus malaria dengan maupun tanpa komplikasi adalah penggunaan terapi kombinasi untuk mencegah dan menghambat kasus resistensi. Obat yang digunakan adalah ACT atau *Artemisinin Combination Therapy*.

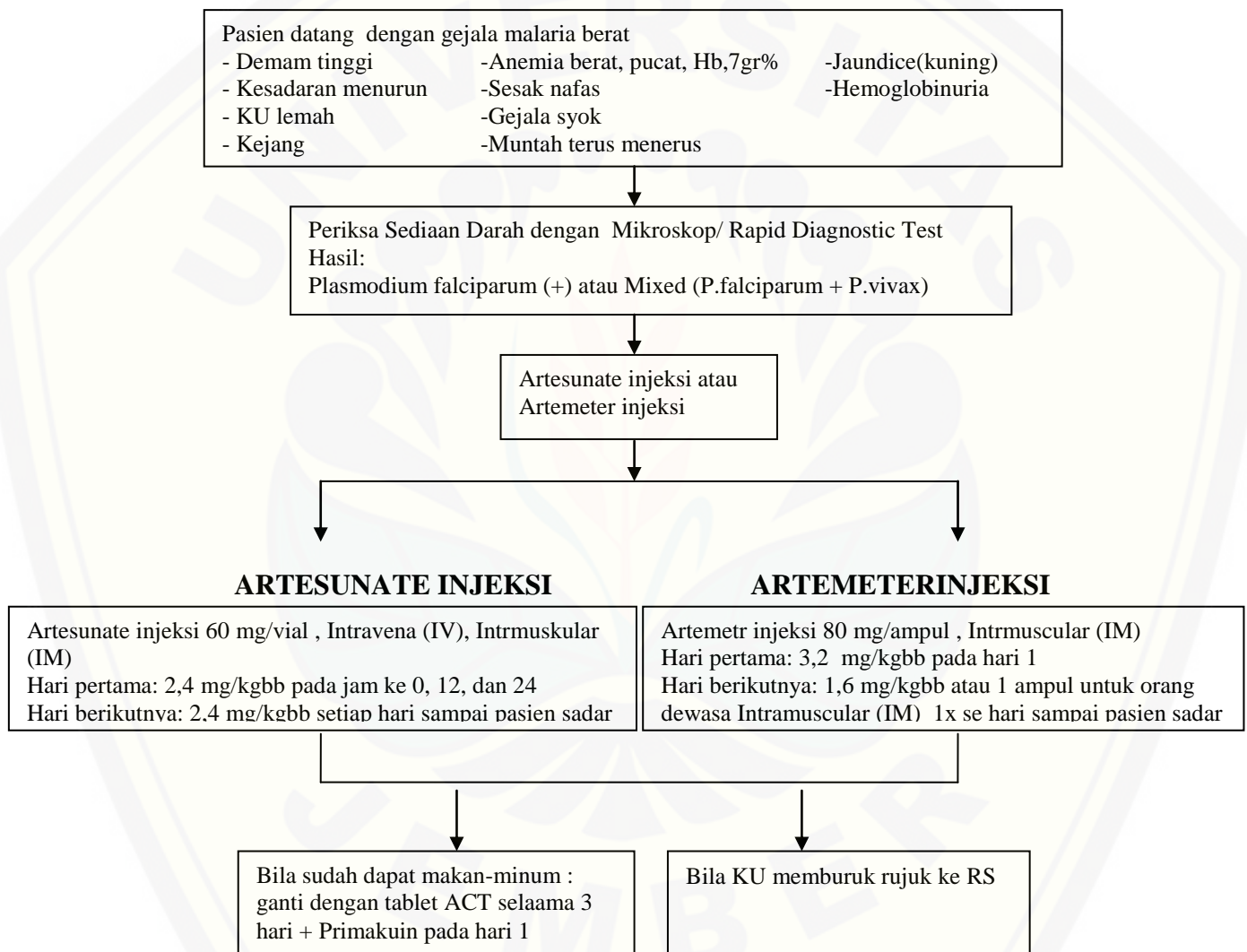
2.1.8.a Pengobatan Malaria tanpa Komplikasi



Gambar 2.4 Alur Penatalaksanaan Pengobatan malaria tanpa komplikasi oleh *P.falciparum* dan *P.vivax* (sumber : Depkes RI, 2012)

2.1.8.b Pengobatan Malaria berat

Pengobatan malaria berat di tingkat Puskesmas dilakukan dengan memberikan artemeter ataupun kina hidroklorida intramuskular sebagai dosis awal sebelum merujuk ke RS rujukan. Pengobatan malaria di RS dianjurkan untuk menggunakan artesunat intravena (Depkes RI, 2012).



Gambar 2.5 Alur Penatalaksanaan Pengobatan malaria berat (sumber : Depkes RI, 2012)

2.1.9 Resistensi *Plasmodium* terhadap Obat Anti Malaria (OAM)

Resistensi *Plasmodium* terhadap Obat Anti Malaria (OAM) merupakan masalah yang paling utama dalam pengendalian malaria. Hal tersebut terjadi karena penurunan sensitivitas parasit terhadap obat anti malaria yang dipakai dengan kata lain terjadi penurunan efikasi obat anti malaria. 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 timbul akibat penggunaan obat malaria tidak adekuat dan tidak sesuai dengan aturan cara pemakaian. Mekanisme terjadinya resistensi obat belum diketahui dengan pasti tetapi diduga bahwa resistensi terjadi karena mutasi gen dan mutasi ini terjadi karena tekanan obat atau penggunaan obat dalam dosis subkuratif (Cholis, 2009).

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 kliren 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, 2011).

2.2 *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei adalah hemoprotzoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil seperti mencit (*Mus Musculus*). *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. Beberapa hal lain yang dapat dipertimbangkan penggunaan *Plasmodium Berghei* karena adanya kemiripan sifat biokimiawi antara *Plasmodium berghei* dan *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium falciparum* dapat menyebabkan komplikasi pada malaria sehingga dipergunakannya *Plasmodium berghei* pada penelitian ini diharapkan memiliki manifestasi klinis seperti *Plasmodium falciparum*. *Plasmodium falciparum* tidak dapat digunakan pada penelitian ini karena parasit tersebut dapat hidup di manusia sehingga dapat membahayakan peneliti (Ngaliyatun, 2013). *Plasmodium berghei* juga memiliki siklus hidup maupun morfologi seperti parasit malaria pada manusia. Oleh karena itu, *Plasmodium berghei* oleh para peneliti digunakan sebagai model penelitian untuk mencari dan mengembangkan obat anti malaria. Pada mencit, *P. berghei* lebih cepat berkembang dari pada rodent jenis lainnya (Suryawati dan Suprapti, 2007).

2.2.1 Taksonomi *Plasmodium berghei*.

Plasmodium berghei adalah suatu jenis plasmodium yang dapat menginfeksi rodensia dengan taksonomi sebagai berikut (Ngaliyatun, 2013).:

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

2.2.2 Morfologi *Plasmodium berghei*

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

- a. Bentuk cincin : tampak sebagai cincin dengan sitoplasma biru dengan nukleus kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan *Giemsa* dari hapusan darah tepi.
- b. Bentuk trophozoit : berbentuk amuboid atau seperti pipa.
- c. Bentuk skizon : ukuran kira-kira 27 μ m pada hari keempat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak sebagai titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas.
- d. Bentuk gametosit. Ada dua bentuk gametosit yaitu makrogametosit dan mikrogametosit. Makrogametosit berbentuk pisang, bernoda biru mengandung kumpulan nukleus 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.

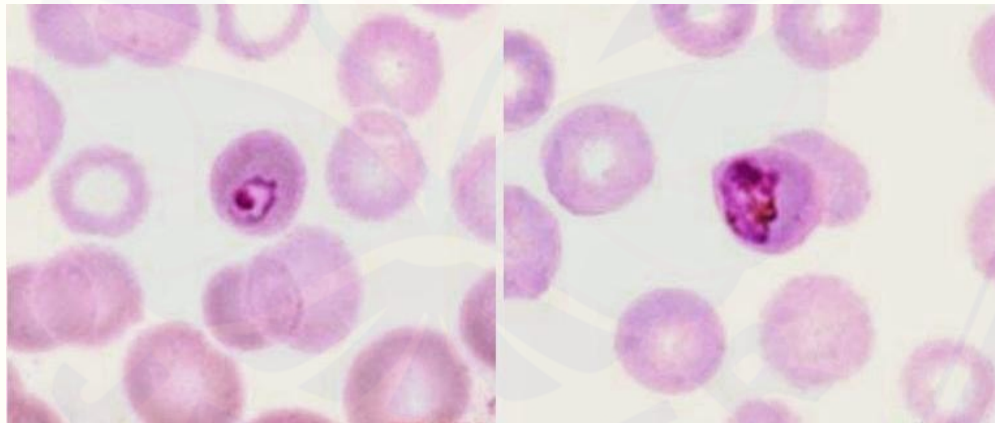
Pada pemeriksaan darah tepi, baik hapusan darah tebal dan tipis dijumpai terutama parasit muda berbentuk cincin (*ring form*). Pada sediaan darah tebal, sporozoit berbentuk cincin, gametosit berbentuk pisang, dan bentuk cincin banyak dijumpai disisi luar gametosit. Pada sediaan hapusan darah tipis trophozoit muda berbentuk tanda seru atau koma dan cincin terbuka, gametosit berbentuk pisang dan terdapat bintik *Maurrer* pada sel darah merah (Suryawati dan Suprapti, 2007).

2.2.3 *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 kecuali manusia. 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 karekteristik 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 perubahann



Gambar 2.6 Parasit malaria stadium *ring form* pada sediaan hapusan darah tipis yang ditunjukkan perbesaran 1000x mikroskop (sumber : histologylab FK UNAIR, 2004)

2.3 Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Bangle merupakan tanaman famili *zingiberaceae* yang berasal dari Asia tropika, tanaman ini banyak ditemukan di India, Asia tenggara, dan Indocina. Di Indonesia, tanaman ini tersebar di daerah Sumatra, Jawa, Kalimantan, Maluku, dan Nusa Tenggara. Bangle dibudidayakan atau ditanam di pekarangan pada tempat-tempat yang cukup mendapat sinar matahari, mulai dari dataran rendah sampai 1.300 m/dpl. *Zingiberaceae* disebut juga tumbuhan temu-temuan yang merupakan salah satu sumber plasma nutfah yang perlu dilestarikan. Tumbuhan ini memegang peranan penting dalam usaha peningkatan pendapatan petani dan pengembangan sumber bahan baku industri dalam negeri. Dengan mengetahui aspek-aspek botani, variasi morfologi, ekologi, penyebaran serta penggunaannya, diharapkan kecintaan terhadap sumber plasma nutfah tersebut akan lebih mendalam sehingga kelestarian jenisnya terjaga (Raharjojo, 2009).

2.3.1 Klasifikasi

Zingiber cassumunar Roxb. adalah suatu jenis temu-temuan dengan taksonomi sebagaiberikut (Media Medika Indonesiana UNDIP, 2009):

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.

2.3.2 Morfologi Rimpang Bangle

Zingiber cassumunar Roxb. memiliki batang yang tegak, berwarna hijau, dengan rimpang kuat, menjalar berdaging, tangkai daun pendek, daun tunggal, persilangan menyirip, pangkal tumpul, ujung sangat lancip, kedua permukaan berbulu halus, panjang helaian daun 23-25cm, lebar 20-25 cm. Bagian yang mengandung bunga berbentuk tandan, bentuk bundar telur atau seperti gelendong, panjang 6-10 cm, lebar 4-5cm. Daun kelopak tersusun seperti sisik tebal dan akar serabut berwarna putih kotor (Padmasari, 2013).



Gambar 2.7 Bagian rimpang bangle (sumber: Dokumentasi secara langsung)

2.3.3 Kandungan Rimpang Bangle sebagai antimalaria

Bangle adalah salah satu tanaman yang banyak tumbuh di Indonesia, tetapi belum dikembangkan menjadi produk yang bernilai ekonomis, padahal tanaman ini mempunyai manfaat yang banyak bagi kesehatan. Berdasarkan penelitian, kandungan kimia dari rimpang bangle adalah minyak atsiri (sineol, pinen), damar, pati dan tanin. Rimpang bangle mengandung saponin, flavonoid, tanin, steroid, triterpenoid, antioksidan seperti vitamin C, vitamin E, karoten, dan senyawa fenolik minyak atsiri (Iswantini, 2011). Senyawa golongan flavonoid yang terkandung di dalam bangle telah banyak dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria. Dari penelitian sebelumnya, senyawa flavonoid diketahui dapat menghambat pertumbuhan parasit

P.falciparum baik yang sensitif maupun resisten terhadap klorokuin, juga dapat melindungi menciit dari infeksi malaria pada uji *invivo*. Beberapa pustaka menyebutkan bahwa senyawa bioflavonoid yang mampu menghambat pertumbuhan parasit memiliki mekanisme aksi dengan dua target utama yaitu: 1) membran yang dibentuk parasit malaria stadium intraeritrositik yaitu Jalur Permeasi Baru (NPP = *New Permeation Pathway*) dengan cara menghambat transpor nutrisi yang dibutuhkan parasit dan 2) vakuola makanan parasit malaria yaitu dengan menghambat proses degradasi hemoglobin dan detoksifikasi heme (Ferreira *et al.*, 2010).

Phenilbutanoid yang diisolasi dari rimpang bangle juga menunjukkan aktivitas antioksidan melalui penangkapan radikal bebas. Pada keadaan malaria terjadi keadaan inflamasi karena adanya sitokin-sitokin pro-inflamasi seperti TNF- α , oleh karena itu pemberian bangle diharapkan dapat menghambat produksi sitokin-sitokin pro-inflamasi dan memperbaiki keadaan klinis malaria. Bangle juga menunjukkan aktivitas sebagai imunostimulan pada derivat phenylbutanoid dari rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb) yaitu : [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. Peningkatan aktifitas fagositosis makrofag, dapat meningkatkan imunitas terhadap parasit malaria (Chairul *et al.*, 2009).

Curcumin pada konsentrasi yang tinggi atau keadaan tertentu seperti adanya ion metal transisi dapat menyebabkan peningkatan ROS terutama dalam bentuk radikal hidroksil. Hal ini telah dibuktikan oleh penelitian yang dilakukan oleh Cui *et al.*, (2007), 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 yang menyebabkan *downregulation* sitokin-sitokin proinflamasi dan ekspresi molekul-molekul adesi di endotel yang berperan penting dalam patomekanisme

komplikasi pada malaria, yaitu pada proses *sitoadherens* dan *rosetting* (Mimche *et al.*, 2011).

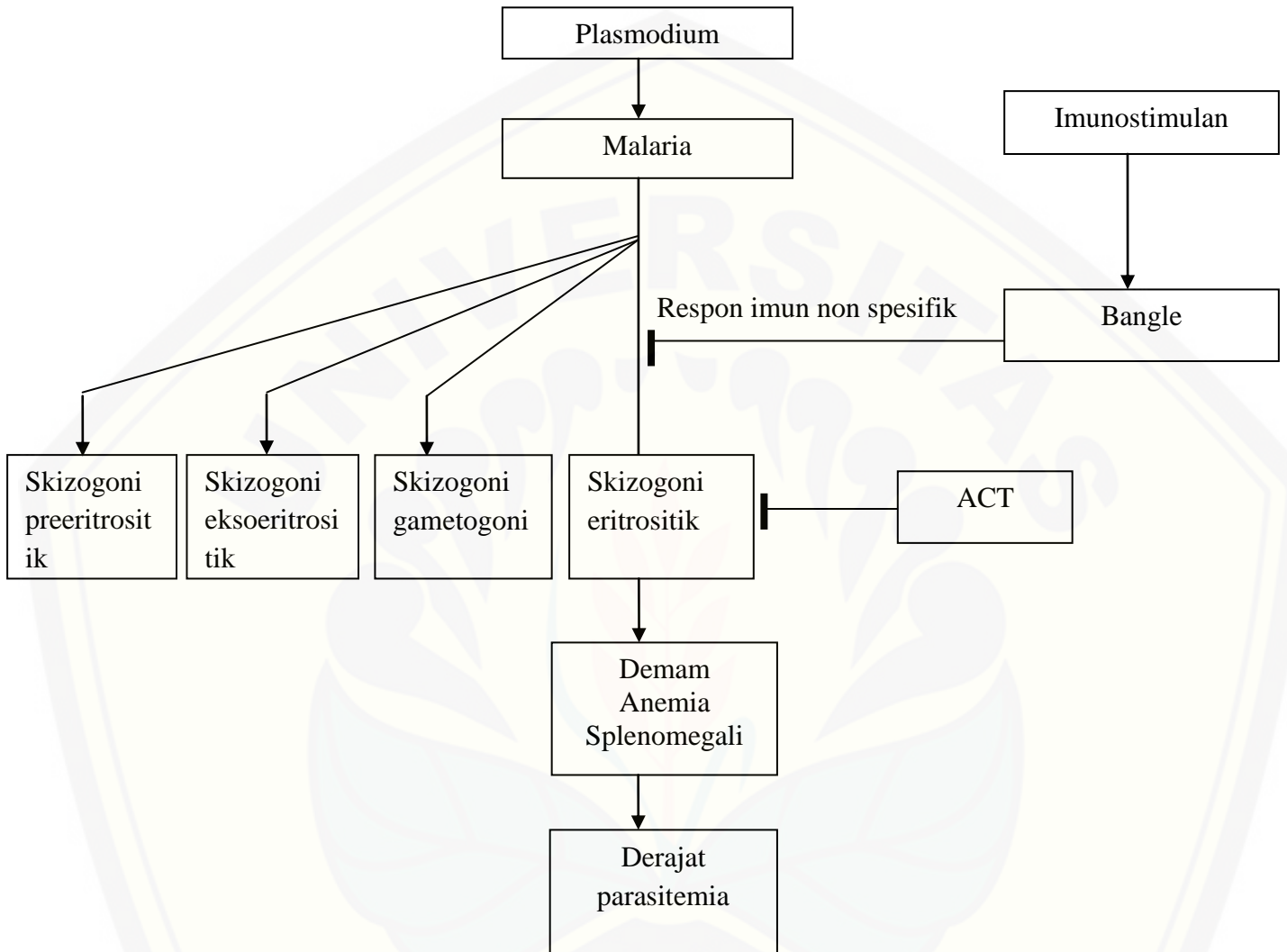
2.4 Ekstraksi dan Fraksinasi Metanol

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan substansi dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai (Sundari, 2010). Simplisia yang diekstrak mengandung senyawa aktif yang dapat larut dan senyawa yang tidak dapat larut seperti serat, karbohidrat, protein dan lain-lain (Soepomo, 2014). Metode ekstraksi yang umum digunakan antara lain maserasi, soxhletasi, penggodokan (refluks), ekstraksi cair-cair (partisi), dan ekstraksi ultrasonik (Sundari, 2010). Metode ekstraksi yang digunakan dalam penelitian ini adalah maserasi. Maserasi merupakan proses pengambilan komponen target yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia dalam pelarut yang sesuai dalam jangka waktu tertentu, yang digunakan di penelitian ini adalah pelarut metanol. Isi sel akan larut karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dan di luar sel. Larutan dengan konsentrasi tinggi akan terdesak keluar dan diganti oleh pelarut dengan konsentrasi rendah (proses difusi). Peristiwa tersebut berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel. Selama proses maserasi, sesekali dilakukan pengadukan dan juga dilakukan penggantian pelarut. Residu yang diperoleh dipisahkan kemudian filtratnya diuapkan. Keuntungan menggunakan metode maserasi adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Pada pembuatan ekstrak dengan metode maserasi, perlu dilakukan pengadukan. Pengadukan diperlukan untuk meratakan konsentrasi larutan di luar butir serbuk simplisia sehingga tetap terjaga derajat konsentrasi yang sekecil-kecilnya antara larutan di dalam sel dengan larutan di luar sel. Kelemahan metode ini antara lain membutuhkan waktu yang cukup lama dan menggunakan jumlah pelarut yang banyak sehingga tidak efektif dan efisien. Pemilihan pelarut yang digunakan untuk

proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam dalam pelarut tersebut (Sundari, 2010).

Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan senyawa – senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan melalui fraksi berbeda-beda tergantung pada jenis tumbuhan dan pelarut yang digunakan. Fraksinasi yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode fraksinasi bertingkat menggunakan corong pisah, yang akan menghasilkan senyawa yang tingkat kepolarannya sama seperti kepolaran pelarut yang digunakan (Saputri, 2014). Pada penelitian ini dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut metanol. Pelarut dapat dibedakan berdasarkan tingkat kepolarannya, yang tergolong pelarut polar adalah etanol, aseton, dan metanol sedangkan salah satu pelarut non-polar adalah n-heksana. Metanol juga dikenal sebagai metil alkohol, pada keadaan atmosfer metanol berbentuk cairan yang ringan, mudah menguap, tidak berwarna, mudah terbakar, dan beracun dengan bau yang khas (berbau lebih ringan daripada etanol). Metanol biasanya digunakan sebagai bahan pendingin anti beku, pelarut, bahan bakar dan sebagai bahan aditif bagi etanol industri (Tirtasari dan Suryanto, 2011). Secara umum, pelarut metanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam. Hal ini disebabkan metanol dapat melarutkan hampir seluruh golongan metabolit sekunder yang dapat melarutkan semua senyawa organik baik senyawa polar maupun nonpolar. Akan tetapi, pada proses fraksinasi menggunakan pelarut metanol senyawa yang terkandung dalam fraksi tersebut adalah senyawa yang bersifat polar (Astarina, 2013).

2.5 Kerangka Teori



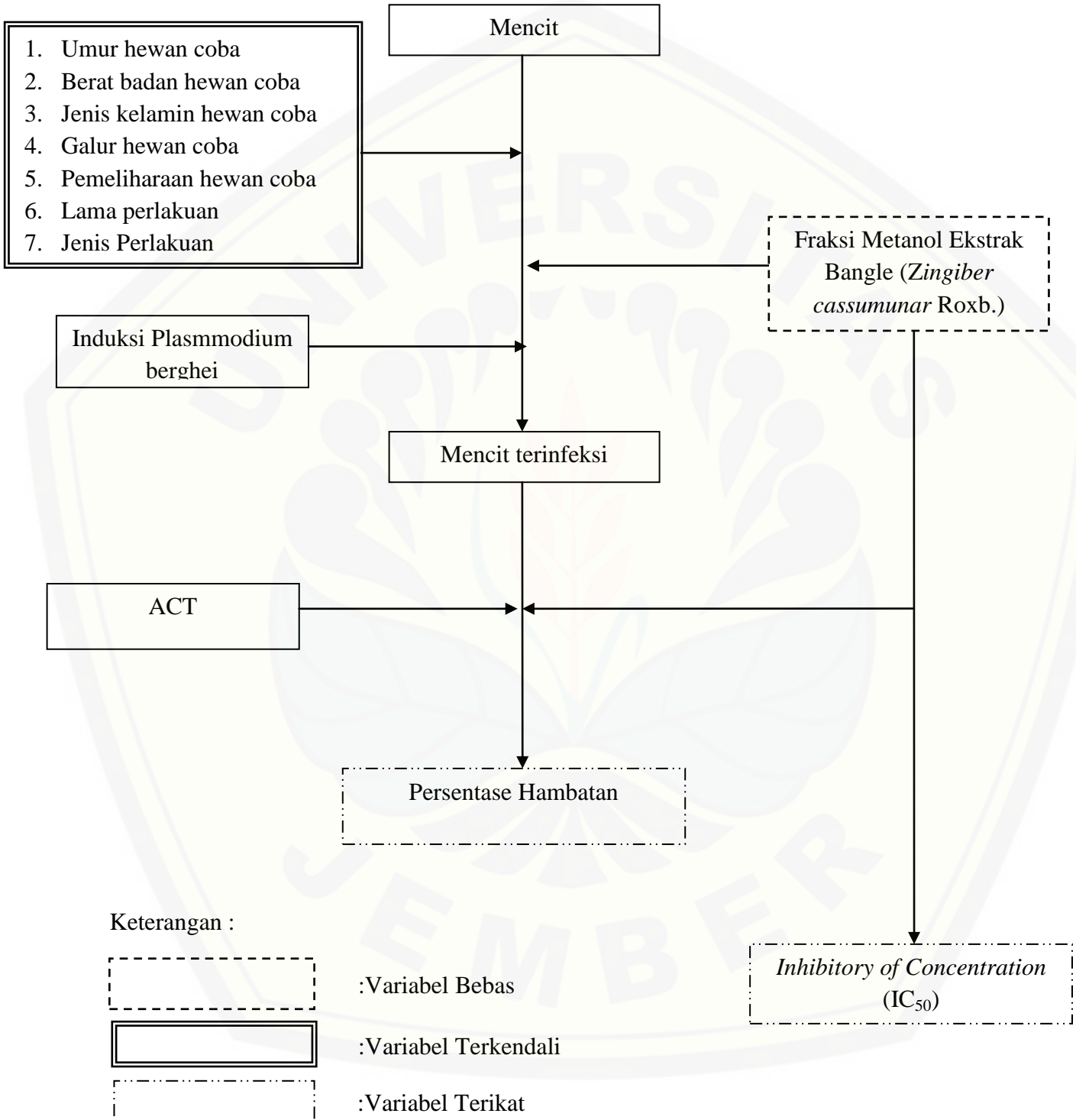
Keterangan :

→ = Hubungan yang Menstimulasi

—| = Menghambat

Gambar 2.8 Kerangka teori

2.6 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 2.9 Kerangka konsep

2.7 Hipotesis Penelitian

Pada penelitian ujiaktivitas fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*, peneliti memiliki hipotesis sebagai berikut.

- a. Fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitassebagai terapi komplementer penyakit malaria.
- c. Fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)dengan dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125mg/grBB, 0,0225 mg/gr BB, 0,045mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB memiliki persentase penghambatan yang berbeda terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

BAB 3. METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan dalam penelitian adalah *true experimental laboratories*, peneliti dapat mengontrol semua variabel luar yang mempengaruhi jalannya penelitian. Sehingga kualitas pelaksanaan rancangan penelitian (validitas internal) dapat menjadi tinggi. Ciri dari desain ini adalah sampel yang digunakan dalam kelompok eksperimental maupun kelompok kontrol dipilih secara acak (random). Penggunaan desain *post test only control group design* dengan satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan lima kelompok eksperimental (Jaedun, 2011).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di beberapa tempat. Pemeliharaan dan pemberian perlakuan dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pembuatan ekstraksi dan fraksinasi bangle dilakukan di Laboratorium Farmasetika Fakultas Farmasi Universitas Jember. Pembuatan hapusan darah tepi dan penghitungan derajat parasitemia pada mencit dilakukan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Waktu yang dibutuhkan untuk penelitian ini adalah 1 bulan.

3.3 Populasi dan Sampel Penelitian

3.3.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/c karena strain ini dapat menimbulkan respon imunitas pada infeksi *Plasmodium berghei*.

3.3.2 Sampel

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

- a. Mencit (*Mus musculus*) Balb/c jantan
- b. Berat badan 20-30 gr
- c. Umur dua sampai tiga bulan

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

3.3.3 Jumlah Sampel

Penelitian ini menggunakan 7 kelompok penelitian, yaitu 2 kelompok kontrol dan 5 kelompok perlakuan. Kelompok perlakuan berjumlah 5 kelompok yang disesuaikan dengan konsentrasi fraksi yang digunakan. Penghitungan jumlah sampel menggunakan rumus Federer didapatkan (Setiawan, 2010) :

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

Keterangan :

- t : jumlah kelompok
r : jumlah sampel dalam kelompok

Menurut penghitungan dengan menggunakan rumus Federer, besar sampel yang dibutuhkan minimal adalah 4 ekor untuk setiap kelompok, karena ada 7 kelompok penelitian maka jumlah sampel yang diambil sebanyak 28 ekor mencit.

3.4 Variabel Penelitian

3.4.1 Variabel Bebas

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

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah persen penghambatan pertumbuhan terhadap *Plasmodium berghei* setelah diberikan fraksi metanol ekstrak metanol rimpang bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*.

3.4.3 Variabel Terkendali

Jenis dan pemeliharaan hewan coba, umur hewan coba, galur hewan coba, berat badan hewan coba, pembuatan penyakit malaria, lama perlakuan, dan cara pengamatan

3.5 Definisi Operasional

- a. Uji aktivitas antimalaria diukur dengan cara menghitung persen penghambatan terhadap *Plasmodium berghei* yang diolah dari penghitungan derajat parasitemia masing-masing sampel hewan uji yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dari hari ke-0 sampai dengan hari ke-3.
- b. Terapi komplementer merupakan terapi konvensional yang digabungkan dengan terapi modern. Pada penelitian ini terapi yang digunakan adalah fraksi metanol ekstrak metanol bangle bersama dengan terapi standar malaria yang digunakan yaitu standar malaria lini pertama pada *Plasmodium falciparum*, Arterakin atau DHP (Dihydro Artemisinin dan Piperakuin) dan primakuin. DHP

atau Arterakin diberikan selama tiga hari dan pada hari pertama diberikan primakuin. DHP dan primakuin didapatkan Dinas Kesehatan Kabupaten Jember.

c. Fraksi metanol ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) adalah rimpang bangle yang diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol menggunakan metode maserasi kemudian dipisahkan lagi menurut kepolaran suatu senyawa dengan fraksinasi menggunakan metode corong pisah dengan pelarut metanol pula sehingga didapatkan senyawa polar murni yang terkandung bangle.

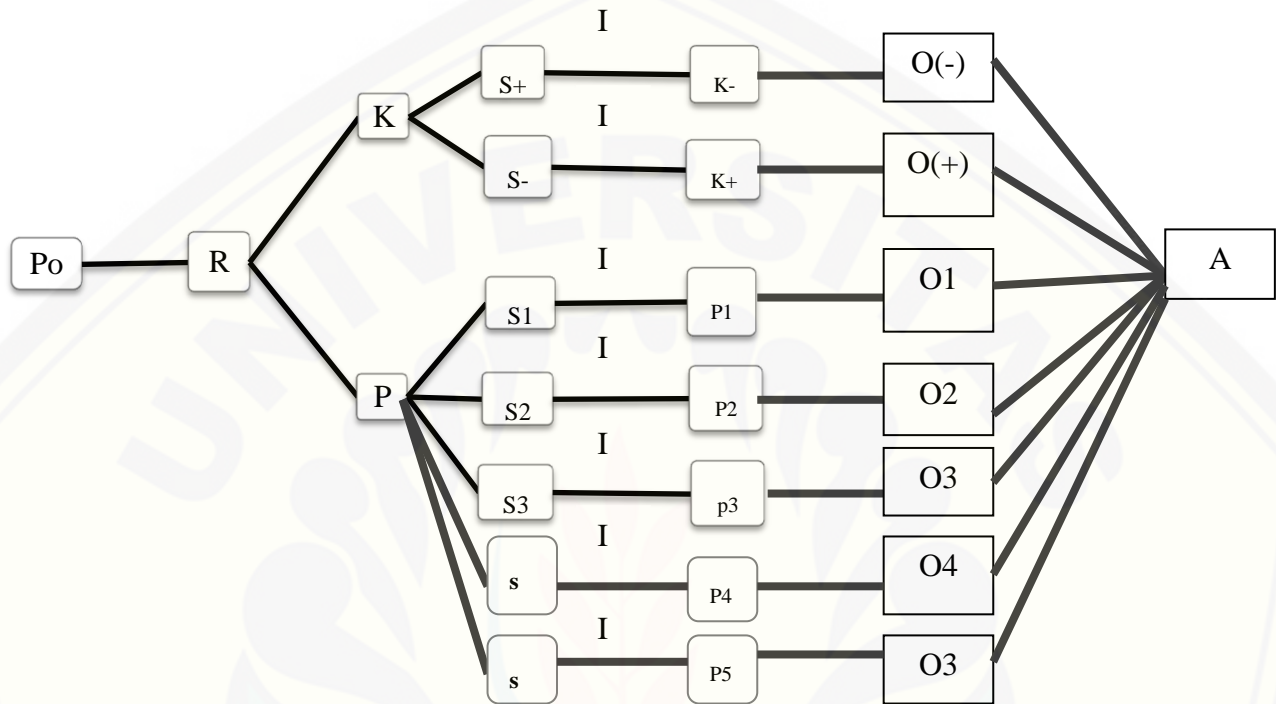
d. *Plasmodium berghei* merupakan parasit yang analog dengan parasit malaria pada manusia dengan segala aspek seperti struktur, fisiologi, dan siklus hidupnya yang didapatkan dari Laboratorium Parasitologi FK UB.

e. Derajat parasitemia merupakan jumlah kuantitatif parasit *Plasmodium berghei* dalam darah mencit yang dihitung dari ratio jumlah eritrosit terinfeksi tiap seribu eritrosit dan dinyatakan dalam persen (%). Penghitungan derajat parasitemia dilakukan secara histologi dengan pewarnaan *Giemsa* di bawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x.

f. Persen penghambatan adalah kemampuan setiap dosis dari fraksi metanol ekstrak metanol bangle dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* yang sudah diinfeksi pada mencit. Persen penghambatan merupakan perbandingan rata-rata persentase pertumbuhan parasit sampai hari ke-3 terhadap rata-rata parasitemia hari ke-0. Persentase penghambatan dapat dihitung setelah menghitung persentase pertumbuhan. Persen penghambatan parasit juga dianalisis dengan analisis probit untuk memperoleh nilai *Inhibitory Concentration of 50% (IC50)*.

g. *Inhibitory Concentration of 50% (IC50)* adalah dosis obat tertentu atau bahan lainnya yang dibutuhkan untuk menghambat 50% proses biologis tertentu.

3.6 Rancangan penelitian



Gambar 3.1 Skema rancangan penelitian

Po :Populasi dan jumlah sampel yang digunakan yaitu 28 ekor mencit

R :4 ekor mencit yang dipilih berdasarkan *simple random sampling*

K :Kelompok kontrol

P :Kelompok perlakuan

I :Induksi malaria dengan *Plasmodium berghei*

S₍₋₎ :Perlakuan kontrol negatif tidak distimulasi fraksi metanol ekstrakmetanol bangle

S₍₊₎ :Perlakuan kontrol positif tidak distimulasi fraksi metanol ekstrak metanolbangle

- S₍₁₎:Perlakuan pemberian stimulasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,005625 mg/grBB selama 14 hari
- S₍₂₎ :Perlakuan pemberian stimulasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,01125 mg/grBB 14 hari
- S₍₃₎ :Perlakuan pemberian stimulasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,0225 mg/grBB 14 hari
- S₍₄₎ :Perlakuan pemberian stimulasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,045 mg/grBB 14 hari
- S₍₄₎ :Perlakuan pemberian stimulasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle dengan dosis 0,09 mg/grBB 14 hari
- K- :Kelompok kontrol negatif, mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa terapi
- K+ :Kelompok kontrol positif dengan pemberian terapi ACT selama 3 hari
- P₁ :Kelompok perlakuan 1, mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diberikan fraksi dosis 0,005625mg/kg BB dan pemberian terapi ACT selama 3 hari
- P₂ :Kelompok perlakuan 2, mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diberikan fraksi dosis 0,01125mg/kg BB dan pemberian terapi ACT selama 3 hari
- P₃:Kelompok perlakuan 3, mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diberikan fraksi dosis 0,0225 mg/kg BB dan dan pemberian ACT selama 3 hari
- P₄ :Kelompok perlakuan 4, mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* diberikan fraksi dosis 0,045mg/kg BB dan pemberian terapi ACT selama 3 hari
- P₅ :Kelompok perlakuan 5, mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei*. diberikan fraksi dosis 0,09 mg/kg BB dan pemberian terapi ACT selama 3 hari
- O₍₋₎₍₊₎₍₁₎₍₂₎₍₃₎₍₄₎₍₅₎ :Pengamatan derajat parasitemia dari mencit yang sudah terinfeksi *Plasmodium berghei* kelompok kontrol negatif, kelompok kontrol positif, kelompok perlakuan satu, dua, tiga, empat, dan lima
- A :Analisis Data

3.7 Alat dan Bahan

3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari penghalus rimpang bangle, corong kaca, evaporator, rotavapor, dan beker kaca untuk proses ekstraksi rimpang bangle. Fraksi metanol membutuhkan alat corong pisah ukuran 5L lemari pendingin untuk menyimpan fraksi. Untuk uji *in vivo* dibutuhkan alat-alat seperti kandang hewan dan penutup, *hand scoon*, masker, alat cukur, gunting, spidol, sonde lambung, spuit 1 cc steril dengan jarum ukuran 20G, kaca obyek, bilik hitung *neubauer improve*, mikroskop cahaya, tabung reaksi, seperangkat alat bedah minor steril, inkubator CO2 5%, pipet pasteur, hematometer, laminar, *microplate 24 wells*, *microplate 96 wells* dasar rata, pH meter, *diff count*.

3.7.2 Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan adalah mencit jantan galur Balb/c berat badan 25-30 gram dan berumur 2-3 bulan, pakan standar untuk mencit Balb/C (turbo 521), *Plasmodium berghei strain ANKA* yang diperoleh dari Laboratorium Parasit Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, fraksi bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) yang dibuat di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember, ACT dengan dosis yang telah ditentukan yang didapatkan dari Dinas Kesehatan Jember. Reagen yang digunakan adalah metanol PA/absolut, *Phosphat Buffer Saline* (PBS), *larutan Roswell Park memorial Institute* (RPMI), pelarut fraksi *Twin*, antikoagulan *EDTA*, *Giemsa*, kloroform, aquades steril, dan *object glass*.

3.8 Prosedur Penelitian

3.8.1 Pemilihan Sampel Tikus

Hewan coba berupa mencit (*Mus musculus*) jantan yang sehat. Usia hewan coba adalah 2-3 bulan dengan berat badan antara 20-30 gram. Dua puluh delapan ekor mencit terbagi dalam tujuh kelompok yang diisi empat ekor mencit tiap kelompok.

Mencit yang dipilih harus memiliki tubuh yang sehat dan belum pernah diberikan perlakuan apapun.

3.8.2 Persiapan Sampel Tikus

Mencit diadaptasikan pada kondisi laboratorium selama 7 hari sebelum diberikan perlakuan, dalam satu kandang dipelihara 4 mencit dengan suhu kamar atau $20^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$. Pencahayaan ruangan diberikan secara artifisial dengan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Mencit diberi pakan standar dan air minum secara *ad libitum*.

3.8.3 Pembuatan Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Rimpang bangle Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) didapat dari Sentra Tanaman Obat Ponorogo, dicuci bersih kemudian dipotong potong, diangin-anginkan dan dikeringkan selama 7 hari, dari 25 kg rimpang bangle didapatkan 3 kg simplisia kering. Setelah kering potongan tersebut dimasukkan ke dalam penggilingan untuk mendapatkan serbuk rimpang bangle. Pembuatan ekstrak rimpang bangle dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 1,5 kg serbu rimpang bangle, dimaserasi dengan metanol 90% dengan perbandingan 1:6 selama 72 jam sebanyak 9L dan setiap hari diaduk. Ekstrak yang dihasilkan disaring dengan corong buchner sehingga diperoleh filtrat. Residu dimaserasi ulang dengan cara yang sama sampai dirasa sudah habis. Filtrat yang dihasilkan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental, dievaporasi menggunakan evaporator selama 3,5 jam dengan suhu 60°C dan menghasilkan ekstrak kental rimpang bangle.

3.8.4 Pembuatan Fraksi Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

Setelah mendapatkan ekstrak kental, dilakukan fraksinasi dengan menggunakan metode corong pisah. Fraksinasi adalah suatu proses pemisahan senyawa – senyawa berdasarkan tingkat kepolaran. Jumlah dan senyawa yang dapat dipisahkan menjadi fraksi berbeda – beda tergantung pada jenis tumbuhan. Fraksinasi

dilakukan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya di dalam corong pisah. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar *n*-heksanasehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi *n*-heksana diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental *n*-heksana. Fraksinasi berikutnya dengan pencampuran dengan pelarut semi polar diklorometana sehingga diperoleh fraksi diklorometana dan fraksi air. Fraksi diklorometana kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental diklorometana. Fraksi air selanjutnya difraksinasi dengan metanol diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi metanol dan fraksi air. Fraksi metanol diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental metanol. Hasil fraksi metanoldilakukan uji aktivitas pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diberikan terapi ACT.

3.8.5 Penetapan Dosis Bangle dan ACT

3.8.5.a Dosis Bangle

Penelitian Yunita Armiyanti *et al.* (2013) menyatakan dosis ekstrak bangle 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 metanol ekstrak bangle adalah sebagai berikut.

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

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

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

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

Berdasarkan uji pendahuluan yang dilakukan pada dosis 0,09 mg/grBB, dibuktikan sudah efektif dalam menurunkan derajat parasitemia namun memiliki toksisitas yang tinggi sehingga pada penelitian ini dosis diturunkan menjadi 0,045 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,005625 mg/grBB sesuai dengan cara pengenceran yaitu menaikkan setengah diatas atau setengan dibawahnya.

3.8.5.b Dosis ACT

Dosis tunggal harian yang diperlukan manusia sebagai obat antimalaria falciparum adalah 2-4 mg/kgbb dihidroartemisinin dan 16-32 mg/kgbb piperakuin serta 0,75 mg/kgbb primakuin. Nilai konversi dosis obat dari dosis manusia dengan berat badan 70kg menjadi dosis mencit 20gr adalah 0,0026. Rumus penghitungannya adalah sebagai berikut.

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

$$= (2 \times 0,0026 \times 70) : 20$$

$$= 0,0182 \text{ mg/grbb mencit (dosis tunggal harian).}$$

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

$$= (16 \times 0,0026 \times 70) : 20$$

$$= 0,1456 \text{ mg/grbb mencit (dosis tunggal harian)}$$

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

$$= (0,75 \times 0,0026 \times 70) : 20$$

$$= 0,006825 \text{ mg/grbb mencit (dosis tunggal harian).}$$

3.8.6 Tahap Perlakuan

3.8.6.a Pemberian Imunostimulan Fraksi Bangle pada Mencit

Sampel tikus dibagi secara acak menjadi tujuh kelompok, setiap kelompok terdiri dari empat hewan coba. Tiap mencit yang memenuhi kriteria ditimbang dan dicatat hasilnya. Setelah dilakukan aklimasi selama tujuh hari. Setiap kelompok mencit diberikan stimulasi berupa fraksi bangle dengan dosis 0,005625 untuk

kelompok perlakuan 1, 0,01125 untuk kelompok perlakuan 2, 0,225 untuk kelompok perlakuan 3, 0.045 untuk kelompok perlakuan 4, dan 0.09 untuk kelompok perlakuan 5. Pemberian stimulasi fraksi ini dilakukan selama empat belas hari yang diberikan secara peroral yaitu melalui sonde pada pukul 15.00.

3.8.6.b Induksi Malaria *Plasmodium berghei* pada Mencit

Setelah 14 hari, semua kelompok dilakukan induksi malaria dengan cara injeksi intraperitoneal, induksi *Plasmodium berghei* pada hewan coba disebut inokulasi. Parasit malaria yang diinjeksikan adalah jenis *Plasmodium berghei* yang didapatkan dari mencit donor yang telah terinfeksi dari Laboratorium Parasit FK UB yang dilakukan secara intraperitoneal. Setelah derajat parasitemia mencit donor mencapai 15% proses induksi ke mencit coba dapat dilakukan. Darah dari mencit donor diambil secara intrakardial sampai habis dengan jumlah kurang lebih 0,75cc dengan menggunakan *sprit* 1cc kemudian dimasukkan ke dalam tabung EDTA. Darah yang sudah tercampur dengan EDTA kemudian diambil sebanyak 10µl menggunakan mikro pipet dan dimasukkan ke dalam *eppendorf* berisi PBS 990µl untuk melakukan pengenceran 100 kali. Campuran tersebut kemudian diambil 10µl menggunakan mikro pipet untuk dimasukkan ke dalam *eppendorf* kedua berisi PBS 990µl 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 inokulasi.

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

- 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 RPMI 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. RPMI 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.

3.8.6.c Pemberian Terapi Komplementer

Setelah induksi *Plasmodium Berghei* pada hewan coba telah selesai dan menunjukkan bahwa hewan coba positif malaria, pemberian fraksi metanol 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 pada kelompok perlakuan. Terapi ACT juga diberikan sebagai terapi komplementerbersama fraksi metanol ekstrak metanol bangle pada kelompok perlakuan. Terapi ACT yang diberikan adalah dihidroartemisinin dengan dosis 0,0182 mg/grbb mencit dan piperakuin 0,1456 mg/grbb mencit selama tiga hari dan pada hari pertama diberi primakuin dengan dosis 0,006825 mg/grbb mencit. Pada kelompok kontrol positif yang tidak diberi stimulasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle, kelompok tersebut hanya diberikan terapi tunggal ACT. Pada kelompok kontrol negatif tidak diberikan stimulasi dan

terapi fraksi metanol ekstrak metanol bangle serta terapi ACT. Pemberian terapi disesuaikan dengan terapi standar malariasehingga pemberian terapi dilakukan selama 3 haridan untuk fraksi metanol yang diberikan sesuai dengan dosis masing masing kelompok.

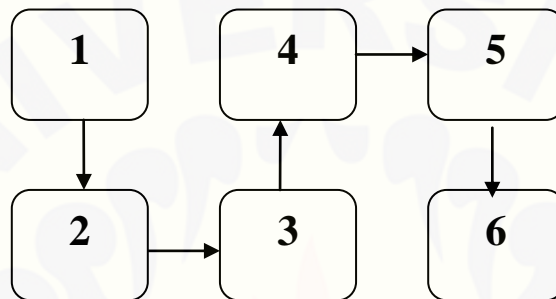
3.8.7 Pembuatan Hapusan Darah Sediaan Tetes Darah Tipis

Pembuatan hapusan darah tepi dilakukan di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Darah yang digunakan untuk membuat hapusan diambil dari ekor mencit atau supraorbita. Dalam penelitian ini darah diambil dari ekor kemudian ditetaskan di *objek glass* dengan jumlah secukupnya kemudian diratakan dengan *objek glass* atau *cover glass* dengan metode sliding, ditunggu hingga kering, kemudian difiksasi dengan metanol pa dan diberikan pewarnaan menggunakan *Giemsa* yang telah diencerkan dengan PBS dengan perbandingan 1:1 dan ditetaskan di atas hapusan sampai menutupi seluruh hapusan, pewarnaan ditunggu hingga 30 menit kemudian dibilas di air bersih.

3.8.8 Pengamatan Histopatologi

Pengamatan dilakukan untuk mengamati jumlah parasit pada sediaan hapusan darah tepi. Jumlah parasit dihitung dengan perbesaran 1000 kali dan ditambahkan minyak emersi ditetaskan di atas preparat. Jumlah parasit dihitung pada bagian *counting area* dengan susunan eritrositnya yang bagus dan tidak menumpuk. Sel darah merah normal berwarna ungu, sedangkan pada sel darah yang terinfeksi parasit berwarna merah dengan sitoplasma berwarna biru di sekitarnya dan terdapat gambaran *ring form* dalam eritrosit. Penghitungan parasit dilakukan oleh tiga pengamat menggunakan metode *blinding* pada beberapa lapang pandang hingga mencapai 1000 eritrosit, secara sistematis seperti gambar 3.1. Hasil penghitungan akan dirata-rata sehingga memperoleh jumlah parasit tiap lapang pandang. Tidak boleh pada lapang pandang yang sama.

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



Gambar 3.2 : lapang pandang yang digunakan untuk menghitung

3.8.9 Penghitungan Persen Penghambatan

Pengamatan hapusan darah tipis meliputi penghitungan jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit malaria tiap 1000 eritrosit (persen parasitemia) yang kemudian dihitung persentase pertumbuhan dan persen penghambatan dengan cara penghitungan sebagai berikut.

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

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(Xh_3) \times 100\%}{Xh_0}$$

Keterangan :

H_3 : hari ke-3 setelah terapi malaria

H_0 : hari ke-0 sebelum tarapi malaria

X_e : persen pertumbuhan rata-rata parasit sampai hari ke-3

X_k : persen rata-rata parasit pada hari ke-0

3.7.1 Analisis Data

Data yang diperoleh adalah persen penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Data diuji normalitas dengan uji *Saphiro Wilk* dan dilanjutkan dengan uji korelasi menggunakan uji *Pearson*. Setelah data terdistribusi normal dan memiliki korelasi yang bermakna data ini kemudian dianalisis dengan analisis probit hingga ditemukan nilai konsentrasi fraksi metanol ekstrak metanol bangle yang dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebanyak 50% atau *Inhibitory Concentration of 50% (IC₅₀)*. Analisis probit juga digunakan untuk mengetahui aktivitas pemberian fraksi metanol ekstrak metanol bangle pada masing-masing dosis. Hasil analisis tersebut dibuat dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dideskripsikan hasilnya.

3.10 Alur Penelitian

Rimpang Bangle