



**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI METANOL BANGLE (*Zingiber cassumunar* Roxb.) TERHADAP KADAR SERUM BDNF MENCIT SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER MALARIA SEREBRAL**

**SKRIPSI**

Oleh  
**Cicik Tri Juliani**  
**132010101039**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2016**



**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI METANOL BANGLE (*Zingiber cassumunar* Roxb.) TERHADAP KADAR SERUM BDNF MENCIT SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER MALARIA SEREBRAL**

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan Program Studi Kedokteran (S-1) dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran

Oleh  
**Cicik Tri Juliani**  
**132010101039**

**FAKULTAS KEDOKTERAN**  
**UNIVERSITAS JEMBER**  
**2016**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Allah SWT dengan rahmat dan seluruh ketentuan-Nya yang telah diberikan kepada saya;
2. Orang tua saya Budi Waluyo dan Endang Sri Budiarti 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. Kakak dan adik tercinta Bintang Dwi Cahya dan Desi Catur Kurnia dan keluarga yang selalu mendoakan dan mendukung sepenuh hati;
4. Para pahlawan tanpa tanda jasa yang telah memberikan ilmu dan mendidikku penuh kesabaran untuk menjadikanku manusia yang berilmu dan bertakwa;
5. Almamater Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

## MOTO

Dan bahwasanya seorang manusia tiada memperoleh selain apa yang telah diusahakannya. dan bahwasanya usaha itu kelak akan diperlihatkan (kepadanya). Kemudian akan diberi balasan kepadanya dengan balasan yang paling sempurna.

(terjemahan Surat An-Najm ayat 39-41)\*)

Dan orang-orang yang berjihad untuk (mencari keridhaan) Kami, benar-benar akan Kami tunjukkan kepada mereka jalan-jalan Kami. Dan sesungguhnya Allah benar-benar beserta orang-orang yang berbuat baik.

(terjemahan Surat Al-'Ankabut Ayat 69)\*\*)

---

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

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Cicik Tri Juliani

NIM : 132010101039

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Fraksi Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap Kadar Serum BDNF Mencit sebagai Terapi Komplementer Malaria Serebral” 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, 6 Desember 2016

Yang menyatakan,

Cicik Tri Juliani

NIM 132010101039

**SKRIPSI**

**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI METANOL BANGLE (*Zingiber cassumunar* Roxb.) TERHADAP KADAR SERUM BDNF MENCIT SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER MALARIA SEREBRAL**

Oleh

Cicik Tri Juliani  
NIM 132010101039

Pembimbing

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

Dosen Pembimbing Anggota : dr. Rena Normasari, M.Biomed.

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Fraksi Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap Kadar Serum BDNF Mencit sebagai Terapi Komplementer Malaria Serebral” karya Cicik Tri Juliani telah diuji dan disahkan pada:

hari, tanggal : Selasa, 6 Desember 2016

tempat : Fakultas Kedokteran Universitas Jember

Tim Penguji:

Ketua,

Anggota I,

dr.Hairrudin, M.Kes  
NIP 19751011 200312 1 008

dr. Cicih Komariah, Sp.M.  
NIP 19740928 200501 2 001

Anggota II,

Anggota III,

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

dr. Rena Normasari, M.Biomed  
NIP 19830512 200812 2 002

Mengesahkan  
Dekan,

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

## RINGKASAN

**Pengaruh Pemberian Fraksi Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap Kadar Serum BDNF Mencit sebagai Terapi Komplementer Malaria Serebral;** Cicik Tri Juliani, 132010101039; 2016: 78 halaman; Jurusan Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Penyakit malaria sampai saat ini masih menjadi masalah yang utama dalam skala nasional maupun internasional. *Annual Parasite Incidence* (API) tahun 2013 menunjukkan pada tahun 2011 terdapat 256 ribu kasus malaria dan 388 kematian oleh malaria di Indonesia. WHO tahun 2015 melaporkan terdapat 214 juta kasus malaria dan 438 ribu kematian akibat malaria. Terdapat sekitar 3 juta kasus malaria berat dan kasus kematian akibat malaria. Dari kasus tersebut, paling banyak mortalitas pada malaria disebabkan oleh terjadinya komplikasi karena infeksi *Plasmodium falciparum*. Komplikasi yang paling berat dan banyak terjadi meliputi malaria serebral, anemia berat, *respiratory-distress* dan kombinasi dari ketiganya. Semakin meningkatnya gejala malaria serebral maka BDNF mRNA semakin berkurang di otak. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan dalam ketersediaan BDNF bisa terlibat dalam patogenesis serebral malaria. *Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) merupakan salah satu anggota dari faktor neutropin yang terdapat di otak yang berperan penting untuk kelangsungan hidup neuron. Produksi endogen BDNF diatur melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah melalui ekspresi endotel nitrat oksida sintase (eNOS).

Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) merupakan rempah-rempah yang sering digunakan sebagai minuman obat untuk kasus infeksi kronis seperti malaria. Kandungan curcumin yang tinggi dalam Bangle menyebabkan tanaman ini mempunyai aktivitas prooksidan yang memberikan efek proteksi pada malaria. Curcumin dapat meningkatkan *Reactive Oxygen Species* (ROS) yang menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B sehingga menyebabkan *down regulation* sitokin-sitokin proinflamasi. Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) diharapkan mampu menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B sehingga meningkatkan ekspresi eNOS yang pada akhirnya meningkatkan produksi endogen BDNF di otak. Tujuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap kadar serum BDNF mencit sebagai terapi komplementer malaria serebral.

Penelitian ini menggunakan *true experimental design* secara *in vivo* dengan rancangan *post test control group design* yang menggunakan hewan coba sebagai subyek penelitian. Kelompok perlakuan terdiri dari satu kontrol normal, dua kontrol negatif, dan dua kelompok perlakuan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember selama satu bulan. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah mencit galur Balb/C berjumlah 25 ekor.

Sampel mencit diberikan perlakuan setelah diadaptasi selama tujuh hari. Perlakuan yang diberikan berupa stimulasi dengan fraksi metanol Bangle pada kelompok perlakuan (D dan E) selama 14 hari per oral, kemudian dilanjutkan dengan induksi malaria dengan *Plasmodium berghei* pada semua kelompok penelitian kecuali kelompok normal (A). Setelah mencit terinfeksi, kelompok perlakuan 1 (D) diberikan terapi komplementer berupa ACT (Dihydroartemisinin dan Piperakuin) selama 48 jam dengan dosis 0,0364/gBB/hari bersama dengan fraksi metanol Bangle dengan dosis 0,017mg/gBB/hari. Kelompok perlakuan 2 (E) diberikan hanya fraksi metanol Bangle saja dengan dosis sama. Kelompok negatif 2 (C) diberikan hanya Artemisinin saja dengan dosis yang sama dan kelompok negatif 1 (B) terinfeksi tidak diberikan perlakuan apapun.

Pengaruh pemberian fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dalam meningkatkan ekspresi endogen BDNF didapat dari pengukuran kadar BDNF di dalam serum mencit dengan metode immunoassay menggunakan Elisa kit. Pengukuran dilakukan satu kali setelah 24 jam mendapatkan perlakuan sebelum dilakukan terminasi. Hasil menunjukkan bahwa kadar serum BDNF dengan nilai tertinggi dimiliki oleh kelompok normal dengan rata-rata nilai 8.67 ng/ml disusul dengan kelompok perlakuan 1 (D) yaitu kelompok yang mendapatkan kombinasi Artemisinin dan fraksi metanol Bangle dengan rata-rata nilai sebesar 8.17 ng/ml. Kelompok lain berturut-turut adalah kelompok negatif 2 (C), kelompok negatif 1 (B), kelompok perlakuan 2 (E) dengan rata-rata nilai berturut-turut 7.16 ng/ml, 5.91 ng/ml, 5.50 ng/ml.

Data diuji normalitas dengan *Saphiro Wilk* menunjukkan data terdistribusi normal ( $p>0.05$ ), dilanjutkan dengan ujian varian yang juga menunjukkan bahwa varian data sama ( $p>0.05$ ). Analisis data dilanjutkan menggunakan *One Way Anova* karena telah memenuhi syarat. *One Way Anova* menunjukkan tidak terdapat perbedaan signifikan minimal dua kelompok diantara kelima kelompok ( $p=0.257$ ).

Kelompok yang diberikan perlakuan berupa penyondean Artemisinin dan fraksi metanol Bangle baik secara masing-masing (kelompok C dan E) atau kombinasi (kelompok D) tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara analisis statistik baik terhadap kelompok normal maupun kelompok tanpa perlakuan (kelompok B). Namun secara deskriptif, Kelompok perlakuan 1 (D), yaitu kelompok yang mendapatkan kombinasi Artemisinin dan fraksi metanol Bangle memiliki rata-rata kadar serum BDNF yang lebih tinggi dibandingkan dua kelompok lain. Tidak adanya perbedaan yang bermakna secara statistik dapat disebabkan oleh beberapa hal, yaitu kandungan kompleks curcumin dalam fraksi metanol Bangle yang tidak murni dan waktu pemberian fraksi metanol Bangle yang kurang lama sehingga kurang maksimal dalam menimbulkan aktivitas antioksidan dan neuroprotektif.

Penelitian *in vivo* ini membuktikan bahwa fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dapat mempengaruhi peningkatan kadar serum BDNF mencit sebagai terapi komplementer malaria serebral meskipun perbedaannya tidak signifikan secara statistik.

## PRAKATA

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Fraksi Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap Kadar Serum BDNF Mencit sebagai Terapi Komplementer Malaria Serebral”. Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan strata satu (S-1) 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. Rena Normasari, M.Biomed selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu dan tenaga untuk membimbing dan memotivasi saya dalam melakukan penelitian dan menyusun skripsi ini sebaik-baiknya;
3. Penguji dr. Hairuddin, M.Kes. dan dr. Cicih Komariah, Sp.M. sebagai dosen penguji yang berkenan memberikan kritik, saran, dan masukan yang membangun dalam penulisan skripsi ini;
4. dr. Wiwien Sugih Utami, M.Sc., Dr.rer.biol.hum.dr. Erma Sulistyaningsih, M.Si. dan Dr.dr. Ancah Caesarina Novi M, Ph.D. yang telah memberikan bimbingan, bantuan, dan masukan dalam penelitian ini;
5. Asis Fitriana dan Pudyo Kriswardani sebagai sahabat sekaligus rekan kerja dalam penelitian ini yang selalu memberikan semangat, dukungan dan bantuan yang luar biasa dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini;
6. Teman dekatku Anindhita D. Sekartaji, Shinta Madyaning, Latifatu Choirunisa, Haqiqi Amira S., Andyn Robioleny S., Intan W.P., Khrisnayu Indraswari, Emma Enggar S., Cahya Kusumawardani, Revin Fiona C. yang selalu memberikan motivasi dan masukan yang positif dalam mengerjakan skripsi ini;

7. Teknisi Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Mbak Nuris, 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. Keluarga angkatan 2013 (VESALIUS) yang selalu memberikan dukungan selama ini;
9. 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, 6 Desember 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN SAMPUL</b> .....	i
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	ii
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	iii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iv
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	v
<b>HALAMAN BIMBINGAN</b> .....	vi
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vii
<b>RINGKASAN</b> .....	viii
<b>PRAKATA</b> .....	x
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	3
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	3
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
<b>2.1 Malaria</b> .....	4
2.1.1 Definisi.....	4
2.1.2 Etiologi dan Hospes .....	4
2.1.3 Transmisi.....	5
2.1.4 Siklus Hidup.....	6
2.1.5 Patogenesis.....	11
2.1.6 Manifestasi Klinis .....	13
2.1.7 Diagnosis.....	15
2.1.8 Komplikasi .....	16
2.1.9 Pengobatan .....	18
<b>2.2 Malaria Serebral</b> .....	21
2.2.1 Definisi.....	21
2.2.2 Patogenesis.....	22
2.2.3 Manifestasi Klinis .....	23
2.2.4 Diagnosis.....	24
2.2.5 Pengobatan .....	25
2.2.6 RMCBS ( <i>Rapid Murine Coma and Behavioral Scale</i> ) .....	26
<b>2.3 Plasmodium berghei</b> .....	27
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	28
2.3.2 <i>Plasmodium berghei</i> sebagai Riset Malaria.....	29
<b>2.4 Tanaman Bangle</b> .....	30
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	30

2.4.2	Kandungan Bahan Aktif.....	31
2.4.3	Manfaat .....	32
<b>2.5</b>	<b>Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)</b> .....	<b>33</b>
<b>2.6</b>	<b>Kerangka Teori</b> .....	<b>36</b>
<b>2.7</b>	<b>Kerangka Konsep</b> .....	<b>37</b>
<b>2.8</b>	<b>Hipotesis</b> .....	<b>38</b>
<b>BAB 3.</b>	<b>METODE PENELITIAN</b> .....	<b>39</b>
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Tempat dan Waktu Penelitian</b> .....	<b>39</b>
<b>3.3</b>	<b>Populasi dan Sampel Penelitian</b> .....	<b>39</b>
3.3.1	Populasi.....	39
3.3.2	Sampel.....	39
3.3.3	Jumlah Sampel .....	40
<b>3.4</b>	<b>Variabel penelitian</b> .....	<b>40</b>
3.4.1	Variabel Bebas .....	40
3.4.2	Variabel Terikat.....	40
3.4.3	Variabel Terkendali .....	41
<b>3.5</b>	<b>Definisi Operasional</b> .....	<b>41</b>
3.5.1	Kadar BDNF .....	41
3.5.2	Terapi Komplementer.....	41
3.5.3	Fraksi Metanol Ekstrak Metanol Bangle ( <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	41
3.5.4	Model Malaria Serebral .....	41
<b>3.6</b>	<b>Rancangan Penelitian</b> .....	<b>42</b>
<b>3.7</b>	<b>Alat dan Bahan</b> .....	<b>42</b>
3.7.1	Alat .....	42
3.7.2	Bahan.....	43
<b>3.8</b>	<b>Teknik Perolehan Data</b> .....	<b>43</b>
3.8.1	Ekstraksi dan Fraksinasi Bangle ( <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	43
3.8.2	Perlakuan pada Hewan Coba .....	44
3.8.3	Pengukuran Kadar BDNF Serum dengan ELISA..	47
<b>3.9</b>	<b>Analisis Data</b> .....	<b>47</b>
<b>3.10</b>	<b>Alur Penelitian</b> .....	<b>48</b>
<b>BAB 4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN</b> .....	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Hasil Penelitian</b> .....	<b>49</b>
4.1.1	Hasil Ekstraksi dan Fraksinasi Bangle ( <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	49
4.1.2	Hasil Kadar Serum BDNF Mencit .....	50
<b>4.2</b>	<b>Analisis Hasil Penelitian</b> .....	<b>51</b>
<b>4.3</b>	<b>Pembahasan</b> .....	<b>52</b>
<b>BAB 5.</b>	<b>PENUTUP</b> .....	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Kesimpulan</b> .....	<b>56</b>
<b>5.2</b>	<b>Saran</b> .....	<b>56</b>
	<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	<b>57</b>
	<b>LAMPIRAN</b> .....	<b>65</b>

DAFTAR TABEL

	Halaman
2.1 Skor RMCBS .....	27
3.1 Kelompok Perlakuan .....	40
4.1 Kadar serum BDNF pada tiap mencit .....	50
4.2 Hasil uji normalitas <i>Saphiro Wilk</i> .....	51
4.3 Hasil uji varian <i>Levene test</i> .....	52
4.4 Hasil analisis <i>One Way Anova</i> kadar serum BDNF .....	52

**DAFTAR GAMBAR**

	Halaman
2.1 Siklus di luar sel darah merah .....	07
2.2 Siklus dalam tubuh nyamuk .....	09
2.3 Patofisiologi sitoadheren .....	12
2.4 Alur penemuan penderita malaria di Indonesia .....	17
2.5 Alur penatalaksanaan pengobatan malaria tanpa komplikasi .....	20
2.6 Alur penatalaksanaan pengobatan malaria berat.....	21
2.7 Bentuk <i>P.berghei</i> dalam hapusan darah.....	29
2.8 Tanaman Bangle ( <i>Zingiber cassumunar</i> Roxb.).....	31
2.9 Kerangka teori .....	36
2.10 Kerangka konsep penelitian .....	38
3.1 Skema rancangan penelitian.....	42
3.2 Alur penelitian .....	48
4.1 Rata-rata kadar serum BDNF dalam satuan ng/ml .....	51

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
3.1 Persetujuan Etik Penelitian .....	65
4.1 Hasil Identifikasi Tanaman Bangle .....	66
4.2 Hasil Analisis Kadar Serum BDNF Mencit .....	67
4.3 Hasil Perhitungan Derajat Parasitemia.....	68
4.3.1 Kelompok B .....	68
4.3.2 Kelompok C .....	68
4.3.3 Kelompok D .....	68
4.3.4 Kelompok E .....	68
4.3.5 Tabel rata-rata derajat parasitemia mencit .....	69
4.3.6 Grafik rata-rata derajat parasitemia mencit.....	69
4.3.7 Tabel rata-rata pertumbuhan parasit.....	70
4.4 Hasil Analisis Data Rata-rata Pertumbuhan Parasit.....	71
4.5 Hasil Perhitungan Skor RMCBS.....	72
4.6 Dokumentasi Kegiatan Penelitian .....	73
4.6.1 Proses ekstraksi dan fraksinasi.....	73
4.6.2 Proses inokulasi <i>P. berghei</i> .....	76
4.6.3 Proses pembuatan hapusan darah tipis .....	77
4.6.4 Proses pengukuran kadar serum BDNF mencit .....	77

## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit malaria sampai saat ini masih menjadi masalah kesehatan utama dalam skala nasional maupun internasional. *Annual Parasite Incidence* (API) tahun 2013 menunjukkan pada tahun 2011 terdapat 256 ribu kasus malaria dan 388 kematian akibat malaria di Indonesia. Malaria masih ditemukan di semua provinsi dengan stratifikasi malaria tinggi di wilayah Indonesia bagian Timur (Kemenkes RI, 2011). Berdasarkan *world malaria report* tahun 2015, *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa pada tahun 2015 kasus malaria di dunia mencapai 214 juta dan diperkirakan 438 ribu orang meninggal.

Terdapat sekitar 3 juta kasus malaria berat dan kasus kematian akibat malaria. Dari kasus tersebut, paling banyak mortalitas pada malaria disebabkan oleh terjadinya komplikasi karena infeksi *Plasmodium falciparum* (Putera, 2002). Pada malaria *falciparum* dapat terjadi manifestasi malaria berat yang menurut WHO didefinisikan sebagai infeksi *P. falciparum* stadium aseksual dengan satu atau lebih komplikasi. Komplikasi yang paling berat dan banyak terjadi meliputi malaria serebral, anemia berat, *respiratory-distress* dan kombinasi dari ketiganya (WHO, 2011).

*Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) merupakan salah satu anggota dari faktor neutropin di otak yang berperan penting untuk kelangsungan hidup neuron (Skaper, 2012). Pemeliharaan tingkat BDNF di otak diperlukan untuk fungsi belajar normal dan fungsi memori (Bekinschtein *et al.*, 2008). Penelitian Linares *et al.* (2013) menyatakan bahwa semakin meningkatnya gejala malaria serebral maka kadar mRNA BDNF akan semakin berkurang di otak. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan ketersediaan BDNF terlibat dalam patogenesis malaria serebral. Peran faktor neurotropin pada integritas dari sistem saraf pusat (SSP) selama infeksi malaria serebral memang masih belum jelas, tetapi gejala sisa neurokognitif sering muncul pada anak-anak paska malaria. Hal ini dapat dikaitkan dengan modulasi hidup neuron dan plastisitas sinaps. Produksi endogen

BDNF diatur melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah melalui ekspresi endotel nitrat oksida sintase (eNOS). Penelitian yang dilakukan oleh Cui *et al.* (2013) menunjukkan tikus tanpa eNOS menunjukkan penurunan ekspresi BDNF.

Sekuestrasi eritrosit terinfeksi parasit dalam sistem mikrosirkulasi saraf pusat adalah fitur yang menonjol dari malaria serebral yang mengakibatkan obstruksi mekanik dan iskemia (Latifu *et al.*, 2001). Proses iskemia pada malaria serebral akan mengaktifkan faktor transkripsi *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B). Lee *et al.* (2014) memberikan bukti bahwa NF- $\kappa$ B merupakan regulator negatif ekspresi eNOS dalam kondisi inflamasi.

Berbagai cara dilakukan untuk mencegah terjadinya komplikasi malaria, salah satunya yaitu dengan mencari terapi tambahan (komplementer). Penelitian berbagai senyawa kimia tanaman tropis menunjukkan potensi yang cukup besar untuk dikembangkan sebagai obat (Sukara, 2000). Senyawa-senyawa yang mempunyai prospek cukup baik dalam meningkatkan aktivitas sistem imun yaitu dari golongan curcumin, flavonoid, limonoid, dan katekin (Hollman *et al.*, 1996). Fungsi imunomodulator adalah memperbaiki sistem imun yaitu dengan cara stimulasi (imunostimulan) atau menekan reaksi imun yang abnormal (imunopresan). Dikenal dua golongan imunostimulan yaitu imunostimulan biologi dan sintetik. Salah satu contoh imunostimulan biologi adalah tanaman obat (herbal) (Djauzi, 2003).

Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) merupakan rempah-rempah yang sering digunakan sebagai minuman obat untuk kasus infeksi kronis seperti malaria. Kandungan senyawa kimia di dalam rimpang Bangle antara lain: alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, saponin, pati, tanin, steroid/ trflavonoid, lemak, dan gula (Hanani *et al.*, 2000). Fatmawati *et al.* (2014) melakukan penelitian uji efektivitas tiga macam fraksi Bangle dengan tiga macam dosis menunjukkan bahwa jenis dan dosis fraksi Bangle terbaik adalah fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,017mg/gBB mencit/hari. Mimche *et al.* (2011) menyatakan kandungan curcumin yang tinggi dalam Bangle menyebabkan tanaman ini mempunyai efek antioksidan dan prooksidan yang keduanya memberikan efek proteksi pada malaria. Sebagai antioksidan, Bangle mengandung senyawa fenolik yang mampu menangkap radikal bebas. Sebagai

prooksidan, curcumin dapat meningkatkan ROS yang menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B sehingga menyebabkan *down regulation* sitokin-sitokin proinflamasi. Flavonoid memiliki efek sebagai imunostimulan. Sebuah penelitian mengenai fungsi imunitas seluler pada tikus membuktikan bahwa senyawa flavonoid dapat memacu proliferasi limfosit, meningkatkan jumlah sel T dan meningkatkan aktivitas IL-2 (Jiao *et al.*, 2004). Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) diharapkan mampu menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B sehingga meningkatkan ekspresi eNOS yang pada akhirnya meningkatkan produksi endogen BDNF di otak.

### 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas, rumusan masalah yang diajukan penulis dari penelitian ini adalah bagaimana pengaruh pemberian fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap kadar serum BDNF mencit sebagai terapi komplementer malaria serebral?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, tujuan yang diharapkan dari penelitian ini adalah mengetahui pengaruh pemberian fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap kadar serum BDNF mencit sebagai terapi komplementer malaria serebral.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Berdasarkan rumusan masalah diatas, manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah :

- 1) menjadi landasan teori dan sebagai dasar pengembangan penelitian selanjutnya khususnya dalam bidang kesehatan
- 2) menjadi bahan pertimbangan dalam pembuatan obat herbal sebagai terapi komplementer malaria serebral.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Malaria

Penyakit malaria disebabkan oleh parasit protozoa yang bersifat obligat intraselular dari genus *Plasmodium*. Ada lima spesies *Plasmodium* yang dapat menginfeksi manusia. *Plasmodium falciparum* merupakan penyebab kasus-kasus malaria berat (malaria dengan komplikasi) (Langhorne *et al.*, 2008). Komplikasi yang paling berat dan banyak terjadi meliputi malaria serebral, anemia berat, *respiratory-distress* dan kombinasi dari ketiganya, sehingga mengakibatkan tingginya angka mortalitas (WHO, 2011).

#### 2.1.1 Definisi

Malaria adalah kata yang berasal dari bahasa Italia, yang artinya *mal*: buruk dan *area*: udara, jadi secara harfiah berarti penyakit yang sering timbul di daerah dengan udara buruk akibat dari lingkungan yang buruk. Selain itu, juga bisa diartikan sebagai suatu penyakit infeksi dengan gejala demam berkala yang disebabkan oleh parasit *Plasmodium* dan ditularkan oleh nyamuk *Anopheles* betina (Hadidjaja, 1994).

#### 2.1.2 Etiologi dan Hospes

Malaria diinfeksi oleh parasit bersel satu dari filum Apicomplexa, kelas Sporozoa, ordo Eucudides, sub ordo Haemosporida, famili Plasmodiidae dan genus *Plasmodia* (Yawan, 2006). Penyebabnya oleh satu atau lebih dari empat *Plasmodia* yang menginfeksi manusia yaitu:

1. *Plasmodium falciparum* menyebabkan malaria falciparum atau malaria tertiana maligna/ malaria tropika/ malaria pernisiiosa.
2. *Plasmodium vivax* menyebabkan malaria vivax atau malaria tertiana benigna.
3. *Plasmodium ovale* menyebabkan malaria ovale atau malaria tertiana benigna ovale.
4. *Plasmodium malariae* menyebabkan malaria malariae atau malaria kuartana.

Penyebab terbanyak di Indonesia adalah *P. falciparum* dan *P. vivax*. *Plasmodium falciparum* menyebabkan suatu komplikasi yang berbahaya sehingga disebut juga dengan malaria berat. Malaria falciparum adalah penyebab sebagian besar kematian akibat malaria. Parasit ini menghalangi jalan darah ke otak, menyebabkan koma, mengigau, serta kematian. Selain empat spesies *Plasmodium* diatas, manusia juga bisa terinfeksi oleh *P. knowlesi*, yang merupakan *Plasmodium* zoonosis yang sumber infeksiya adalah kera di beberapa hutan di Asia Tenggara (Arsunan, 2012).

Parasit malaria disebarkan oleh nyamuk *Anopheles* betina. Nyamuk termasuk dalam filum Arthropoda, ordo Diptera, kelas Hexapoda, famili Culicidae, sub famili Anopheline dan genus *Anopheles* (Damar, 2008). Sebagian besar nyamuk *Anopheles* menggigit pada malam hari, puncak gigitan nyamuk dari malam sampai fajar (Hadidjaja, 1994). Terdapat sekitar 20 spesies *Anopheles* yang menjadi vektor malaria di seluruh dunia. Nyamuk *Anopheles* berkembang biak di air dan masing-masing spesies memiliki pilihan tempat bertelur, misalnya beberapa lebih suka bertelur di air tawar yang dangkal, seperti genangan air di sawah. Intensitas transmisi tergantung pada faktor-faktor yang berhubungan dengan parasit, vektor, tuan rumah manusia, dan lingkungan. Transmisi lebih intens di tempat-tempat di mana umur nyamuk lebih panjang sehingga parasit memiliki waktu untuk menyelesaikan siklus hidup seksual dalam nyamuk (Damar, 2008).

### 2.1.3 Transmisi

#### a. Penularan Alamiah

Penularan ini terjadi melalui gigitan nyamuk *Anopheles*. Nyamuk ini jumlahnya kurang lebih ada 80 jenis dan dari 80 jenis itu, hanya kurang lebih 16 jenis yang menjadi vektor penyebar malaria di Indonesia. Penularan secara alamiah terjadi melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang telah terinfeksi oleh *Plasmodium*. Setelah nyamuk *Anopheles* betina mengisap darah yang mengandung parasit pada stadium seksual (gametosit), gamet jantan dan betina bersatu membentuk ookinet di perut nyamuk yang kemudian menembus dinding perut nyamuk dan membentuk kista pada lapisan luar dimana ribuan sporozoit

dibentuk. Sporozoit-sporozoit tersebut siap untuk ditularkan. Pada saat menggigit manusia, parasit malaria yang ada dalam tubuh nyamuk masuk ke dalam darah manusia (Susanna, 2005).

#### b. Penularan Tidak Alamiah

##### a. Malaria bawaan (kongenital)

Terjadi pada bayi yang baru dilahirkan karena ibunya menderita malaria. Penularan terjadi melalui tali pusat atau plasenta.

##### b. Secara mekanik

Penularan terjadi melalui transfusi darah melalui jarum suntik. Penularan melalui jarum suntik banyak terjadi pada para morfinis yang menggunakan jarum suntik yang tidak steril.

##### c. Secara oral (melalui mulut)

Cara penularan ini pernah dibuktikan pada burung, ayam (*P. gallinatum*), burung dara (*P. relictum*) dan monyet (*P. knowlesi*). Pada umumnya sumber infeksi bagi malaria pada manusia adalah manusia lain yang sakit malaria, baik dengan gejala maupun tanpa gejala klinis (Susanna, 2005).

#### 2.1.4 Siklus Hidup

Untuk kelangsungan hidupnya, parasit malaria memerlukan dua macam siklus kehidupan yaitu siklus dalam tubuh manusia dan siklus dalam tubuh nyamuk.

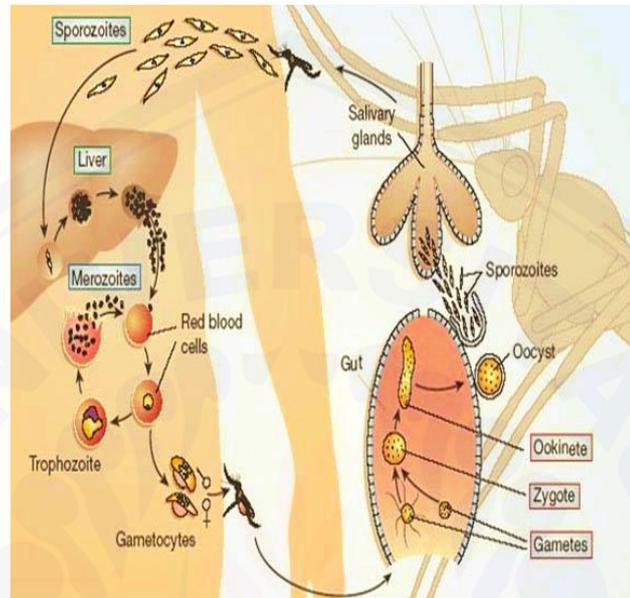
##### a. Siklus Aseksual dalam Tubuh Manusia

Siklus dalam tubuh manusia juga disebut siklus aseksual dan siklus ini terdiri dari:

###### 1. Siklus di luar sel darah merah

Siklus di luar sel darah merah berlangsung dalam hati. Pada *P. vivax* dan *P. ovale* ada yang ditemukan dalam bentuk laten di dalam sel hati yang disebut hipnosoit. Hipnosoit merupakan suatu fase dari siklus hidup parasit yang nantinya dapat menyebabkan kambuh atau rekurensi (*long term relapse*). *Plasmodium vivax* dapat kambuh berkali-kali bahkan sampai jangka waktu 3–4 tahun.

Sedangkan untuk *P. ovale* dapat kambuh sampai bertahun-tahun apabila pengobatannya tidak dilakukan dengan baik. Setelah sel hati pecah akan keluar merozoit yang masuk ke sel darah merah (fase eritrositer) (CDC, 2004). Hal ini seperti yang terlihat pada Gambar 2.1.



Gambar 2.1 Siklus di luar sel darah merah (sumber: CDC 2004)

## 2. Fase dalam sel darah merah (fase eritrositer)

Fase hidup dalam sel darah merah terbagi dalam:

1. Fase sisogoni yang menimbulkan demam.
2. Fase gametogoni yang menyebabkan seseorang menjadi sumber penularan penyakit bagi nyamuk vektor malaria. Kambuh pada *P. falciparum* disebut rekrudensi (*short term relapse*), karena siklus didalam sel darah merah masih berlangsung sebagai akibat pengobatan yang tidak teratur. Merozoit sebagian besar masuk ke sel darah merah dan sebagian kecil siap untuk diisap oleh nyamuk vektor malaria. Setelah masuk tubuh nyamuk vektor malaria, mengalami siklus sporogoni karena menghasilkan sporozoit yaitu bentuk parasit yang sudah siap untuk ditularkan kepada manusia (Depkes RI, 2003).

## b. Siklus Seksual dalam Tubuh Nyamuk

Fase seksual ini biasa juga disebut fase sporogoni karena menghasilkan sporozoit, yaitu bentuk parasit yang sudah siap untuk ditularkan oleh nyamuk kepada manusia. Lama dan masa berlangsungnya fase ini disebut masa inkubasi ekstrinsik, yang sangat dipengaruhi oleh suhu dan kelembaban udara. Prinsip pengendalian malaria, antara lain didasarkan pada fase ini yaitu dengan mengusahakan umur nyamuk agar lebih pendek dari masa inkubasi ekstrinsik, sehingga fase sporogoni tidak dapat berlangsung. Dengan demikian rantai penularan akan terputus (Achmad, 2005). Fase-fase siklus seksual diilustrasikan dalam Gambar 2.2.

Fase-fase yang berlangsung dalam siklus hidup nyamuk dalam badan manusia dan dalam tubuh nyamuk adalah sebagai berikut:

### a. Fase I: Fase Sporozoit

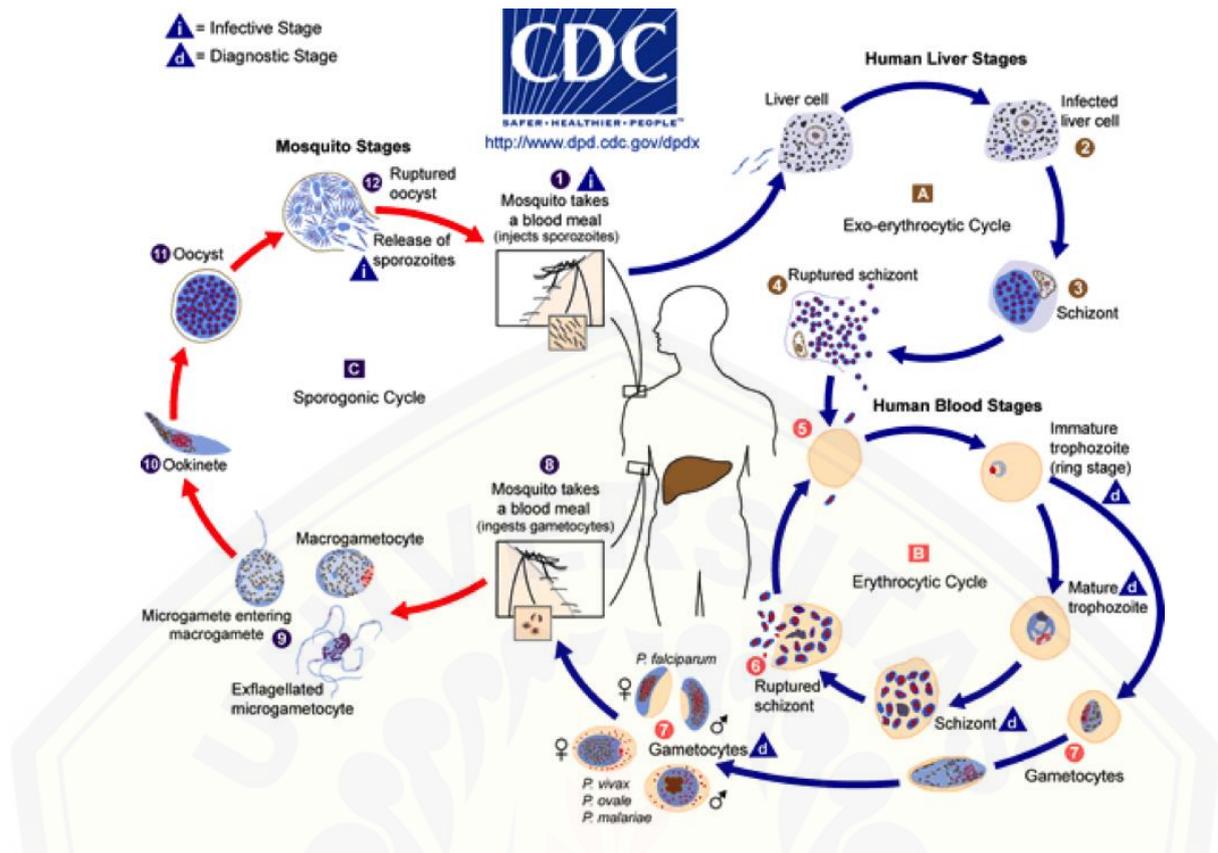
Pada saat nyamuk menggigit manusia, bersamaan dengan air liur nyamuk, masuk sporozoit yaitu bentuk infeksiif *Plasmodium* ke dalam darah manusia. Jumlah sporozoit dalam kelenjar liur nyamuk mencapai ratusan sampai ribuan. Sporozoit berada dalam darah hanya 30 menit kemudian masuk ke dalam hati dan menjalani fase eksoeritrositer.

### b. Fase II: Fase Eksoeritrositer

Sporozoit menjalani fase sisogoni yang menghasilkan merozoit eksoeritrositer. Sebagian dari merozoit masuk ke dalam sel darah merah dan sebagian lagi tetap dalam sel hati dan disebut hipnosoit untuk *P. vivax* dan *P. ovale*.

### c. Fase III: Terjadinya Hipnosoit

WHO pada tahun 1981 meragukan adanya siklus eritrositer sekunder dalam jaringan hati, dikatakan bahwa relapse pada *P. vivax* dan *P. ovale* disebabkan oleh bentuk jaringan yang dapat bertahan lama dalam sel hati.



Gambar 2.2 Siklus dalam tubuh nyamuk (sumber: CDC, 2004)

#### d. Fase IV: Fase Eritrositer

Fase eritrositer ini terbagi menjadi tiga yaitu trophozoit darah, skizon, dan merozoit yang meliputi:

##### 1. Trophozoit darah

Merozoit yang berasal dari sel hati yang telah pecah dan masuk ke dalam sel darah merah, trophozoit ini lambat laun membesar dan gerakannya banyak. Jika besarnya sudah mencapai separuh sel darah merah gerakannya akan berkurang. Selanjutnya intinya membelah menjadi dua, empat, dan seterusnya. Setelah terjadi pembentukan itu trophozoit berubah menjadi skizon.

##### 2. Skizon

Skizon bertambah besar, demikian juga intinya hingga sebagian mengisi sel darah merah dan disebut skizon dewasa. Bagian-bagian dari inti bertambah jelas dan dikelilingi oleh plasma. Akhirnya sel darah merah pecah dan bagian-bagian dari skizon tersebut berada dalam plasma darah. Tiap bagian ini disebut merozoit.

### 3. Merozoit

Merozoit akan menyerang lagi sel darah merah lain dan mengulangi fase sisogoni. Setelah beberapa generasi, maka sebagian dari merozoit tidak masuk ke dalam fase sisogoni tetapi mengalami fase gametogoni yaitu fase untuk pembentukan sel kelamin jantan dan betina.

#### e. Fase V: Fase Gametogoni

Hasil dari fase gametogoni adalah mikrogametosit dan makrogametosit. Gametosit pada infeksi *P. vivax* timbul pada hari ke 2-3 sesudah terjadinya parasitemia. Pada *P. falciparum* setelah delapan hari dan pada *P. malariae* beberapa bulan kemudian. Pada relapse, gametosit timbul lebih cepat bila tidak disertai demam. Apabila darah manusia dihisap oleh nyamuk, semua bentuk parasit malaria seperti trophozoit, skizon dan gametosit akan masuk ke dalam lambung nyamuk. Trophozoit dan skizon akan hancur sedangkan gametosit akan meneruskan siklus sporogoni.

#### f. Fase Siklus Sporogoni

Mikrogametosit dan makrogametosit berubah menjadi mikrogamet dan makrogamet sebelum terjadi siklus sporogoni. Makrogamet terbentuk setelah makrogametosit melepaskan sebutir kromatin. Mikrogamet akan memasuki badan makrogamet untuk menjadi satu dalam proses yang disebut pembuahan. Makrogamet yang telah dibuahi ini disebut zigot.

1. Zigot yang dalam beberapa jam bertambah bentuk menjadi lonjong dan bergerak yang disebut ookinet.
2. Ookinet berenang kian kemari dan akhirnya menuju dinding lambung nyamuk dan masuk diantara sel-sel epitel.
3. Ookista terlihat titik yang banyak sekali jumlahnya yang merupakan hasil dari pembelahan. Apabila sudah tua ookista pecah dan keluarlah sporozoit yang masuk ke dalam cairan rongga tubuh nyamuk sambil berenang kian kemari. Akhirnya sporozoit ini masuk ke dalam kelenjar liur nyamuk siap untuk ditularkan ke dalam tubuh manusia (CDC, 2004).

### 2.1.5 Patogenesis

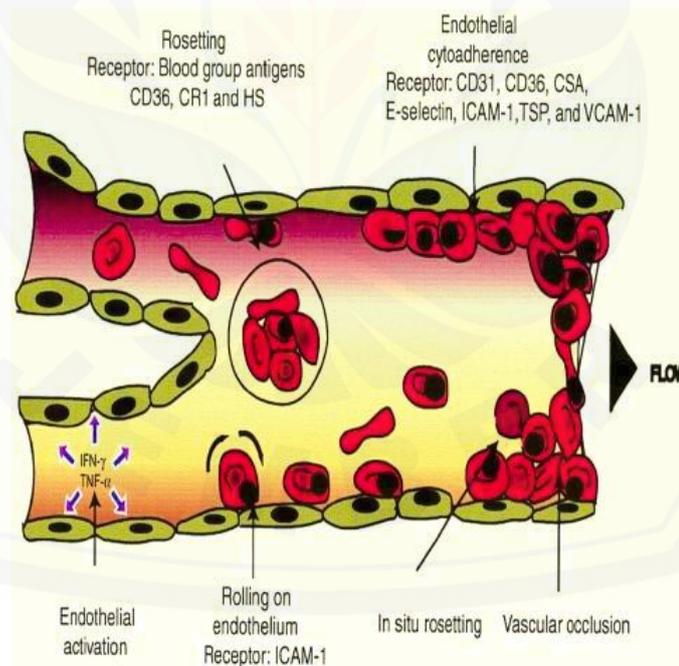
Patogenesis malaria yang dianut selama ini adalah terjadinya kerusakan sel darah merah karena invasi parasit, obstruksi mikrovaskuler karena sekuestrasi parasit (proses sitoadherensi dan *rosetting*), serta kelainan regulasi sitokin dan oksida nitrit. Hal ini seperti yang terangkum dalam Gambar 2.3. Malaria akibat *P. falciparum* mempunyai patogenesis yang khusus. Eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* akan mengalami proses sekuestrasi, yaitu tersebarnya eritrosit yang berparasit tersebut ke pembuluh kapiler organ dalam tubuh. Selain itu pada permukaan eritrosit yang terinfeksi akan membentuk knop yang berisi berbagai antigen *P. falciparum*.

Sitokin (*Tumour Necrosis Factor* (TNF), *Interleukin 6* (IL-6) dan lain lain) yang diproduksi oleh sel makrofag, monosit, dan limfosit akan menyebabkan terekspresinya reseptor endotel kapiler. Pada saat knop tersebut berikatan dengan reseptor sel endotel kapiler terjadilah proses sitoadherensi. Akibat dari proses ini terjadilah obstruksi (penyumbatan) pembuluh kapiler yang menyebabkan terjadinya iskemia jaringan. Terjadinya sumbatan ini juga didukung oleh proses terbentuknya *rosette*, yaitu bergerombolnya sel darah merah yang berparasit dengan sel darah merah lainnya. Pada proses sitoadherensi ini juga terjadi proses imunologik yaitu terbentuknya mediator-mediator antara lain sitokin (TNF, IL-6 dan lain lain), dimana mediator tersebut mempunyai peranan dalam gangguan fungsi pada jaringan tertentu (Buffet *et al.*, 2011).

Sitoadherensi adalah peristiwa perlekatan eritrosit yang telah terinfeksi *P. falciparum* pada reseptor di bagian endotel vena dan kapiler. Selain itu eritrosit juga dapat melekat pada eritrosit yang tidak terinfeksi sehingga terbentuk *rossette*. Sitoadherensi menyebabkan eritrosit matur tidak beredar kembali dalam sirkulasi. Parasit dalam eritrosit matur yang tinggal dalam jaringan mikrovaskuler disebut eritrosit matur yang mengalami sekuestrasi. Hanya *P. falciparum* yang mengalami sekuestrasi karena pada *Plasmodium* lainnya seluruh siklus terjadi pada pembuluh darah perifer. Sekuestrasi terjadi pada organ-organ vital dan hampir semua jaringan dalam tubuh. Sekuestrasi tertinggi terdapat di otak, diikuti dengan hepar dan ginjal, paru, jantung dan usus. Sekuestrasi ini memegang peranan utama dalam patofisiologi malaria berat (Akhyar, 2008).

*Rossetting* adalah suatu fenomena perlekatan antara satu buah eritrosit yang mengandung merozoit matang yang diselubungi oleh sekitar 10 atau lebih eritrosit nonparasit sehingga berbentuk seperti bunga. Salah satu faktor yang mempengaruhi terjadinya *rossetting* adalah golongan darah dimana terdapatnya antigen golongan darah A dan B yang bertindak sebagai reseptor pada permukaan eritrosit yang tidak terinfeksi parasit. *Rossetting* menyebabkan obstruksi aliran darah lokal atau dalam jaringan sehingga mempermudah terjadinya sitoadherensi (Akhyar, 2008).

Sitokin terbentuk dari sel endotel, monosit dan makrofag setelah mendapat stimulasi dari toksin malaria. Sitokin ini antara lain TNF *alfa* (TNF  $\alpha$ ), *Interleukin-1* (IL-1), IL-6, IL-3, *lymphotoxin* (LT) dan *Interferon gamma* (INF  $\gamma$ ) (Akhyar, 2008). Pengeluaran sitokin-sitokin pada saat siklus eritrositik *Plasmodium* di dalam tubuh manusia akan menimbulkan suatu gejala yang khas yang disebut *trias malaria* yaitu demam periodik, anemia, dan splenomegali (Hariyanto dan Gunawan, 2009).



Gambar 2.3 Patofisiologi sitoadheren (sumber: Permenkes RI nomer 5 tahun 2013)

### 2.1.6 Manifestasi Klinis

Keluhan dan tanda klinis merupakan petunjuk yang penting dalam diagnosa malaria. Gejala klinis ini dipengaruhi oleh spesies *Plasmodium*, imunitas tubuh, dan jumlah parasit yang menginfeksi. Waktu mulai terjadinya infeksi sampai timbulnya gejala klinis dikenal sebagai waktu inkubasi, sedangkan waktu antara terjadinya infeksi sampai ditemukannya parasit dalam darah disebut periode prepaten (Harijanto dan Gunawan, 2009).

#### a. Gejala Umum

Gejala malaria terdiri dari beberapa serangan demam dengan interval tertentu (disebut parokisme), diselingi oleh suatu periode yang penderitanya bebas dari demam disebut periode laten. Gejala yang khas tersebut biasanya ditemukan pada penderita non imun. Sebelum timbulnya demam, biasanya penderita merasa lemah, mengeluh sakit kepala, kehilangan nafsu makan, merasa mual, di ulu hati, atau muntah. Semua gejala awal ini disebut gejala prodromal (Arsunan, 2012).

Masa tunas malaria sangat tergantung pada spesies *Plasmodium* yang menginfeksi. Masa tunas paling pendek dijumpai pada malaria falciparum dan terpanjang pada malaria kuartana (*P. malariae*). Pada malaria yang alami, penularannya melalui gigitan nyamuk, masa tunas adalah 12 hari (9-14) untuk malaria falciparum, 14 hari (8-17 hari) untuk malaria vivax, 28 hari (18-40 hari) untuk malaria kuartana dan 17 hari (16-18 hari) untuk malaria ovale. Malaria yang disebabkan oleh beberapa strain *P.vivax* tertentu mempunyai masa tunas yang lebih lama dari strain *P.vivax* lainnya. Selain pengaruh spesies dan strain, masa tunas bisa menjadi lebih lama karena pemakaian obat anti malaria untuk pencegahan (kemoprofilaksis) (Arsunan, 2012).

Demam mulai timbul bersamaan dengan pecahnya skizon darah yang mengeluarkan bermacam-macam antigen. Antigen ini akan merangsang sel-sel makrofag, monosit atau limfosit yang mengeluarkan berbagai macam sitokin, antara lain TNF dan IL-6. Sitokin tersebut akan dibawa aliran darah ke hipotalamus yang merupakan pusat pengatur suhu tubuh dan terjadi demam. Proses skizogoni pada keempat *Plasmodium* memerlukan waktu yang berbeda-beda. *Plasmodium falciparum* memerlukan waktu 36-48 jam, *P. vivax*/*P. ovale* 48

jam, dan *P. malariae* 72 jam. Demam pada *P. falciparum* dapat terjadi setiap hari, *P. vivax*/*P. ovale* selang waktu satu hari, dan *P. malariae* demam timbul selang waktu 2 hari (Permenkes RI no.5 tahun 2013).

Anemia terjadi karena pecahnya eritrosit yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi. *Plasmodium vivax* dan *P. ovale* hanya menginfeksi eritrosit muda yang jumlahnya hanya 2% dari seluruh jumlah eritrosit, sedangkan *P. malariae* menginfeksi eritrosit tua yang jumlahnya hanya 1% dari jumlah eritrosit. Sehingga anemia yang disebabkan oleh *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae* umumnya terjadi pada keadaan kronis. *Plasmodium falciparum* menginfeksi semua jenis eritrosit sehingga anemia dapat terjadi pada infeksi akut dan kronis (Permenkes RI no.5 tahun 2013).

Limpa merupakan organ retikuloendotelial, dimana *Plasmodium* dihancurkan oleh sel-sel makrofag dan limfosit. Penambahan sel-sel radang ini akan menyebabkan limpa membesar. Limpa merupakan organ 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 knop 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).

#### b. Pola Demam

Demam pada malaria ditandai dengan adanya parokisme, yang berhubungan dengan perkembangan parasit malaria dalam sel darah merah. Puncak serangan panas terjadi berbarengan dengan lepasnya merozit-merozit ke dalam peredaran darah (proses sporulasi). Untuk beberapa hari pertama, pola panas tidak beraturan, baru kemudian polanya yang klasik tampak sesuai spesiesnya (Arsunan, 2012).

Pada malaria falciparum pola panas yang ireguler itu mungkin berlanjut sepanjang perjalanan penyakitnya sehingga tahapan-tahapan yang klasik tidak begitu nyata terlihat. Suatu parokisme demam biasanya mempunyai tiga stadium yang berurutan, terdiri dari:

a. Stadium Dingin

Stadium ini mulai dengan menggigil dan perasaan sangat dingin. Nadi penderita cepat tetapi lemah. Bibir dan jari – jari pucat kebiru – biruan (sianotik). Kulitnya kering dan pucat, penderita mungkin muntah dan pada penderita anak sering terjadi kejang. Stadium ini berlangsung selama 15 menit – 60 menit.

b. Stadium Demam

Setelah menggigil/ merasa dingin, pada stadium ini penderita mengalami serangan demam. Muka penderita menjadi merah, kulitnya kering, dan dirasakan sangat panas seperti terbakar, sakit kepala bertambah keras, serta sering disertai dengan rasa mual atau muntah-muntah. Nadi penderita menjadi kuat kembali. Biasanya penderita merasa sangat haus dan suhu badan bisa meningkat sampai 41°C. Stadium ini berlangsung selama 2–4 jam.

c. Stadium berkeringat

Pada stadium ini penderita berkeringat banyak sekali sampai membasahi tempat tidur. Namun suhu badan pada fase ini turun dengan cepat, kadang–kadang sampai di bawah normal. Biasanya penderita tertidur nyenyak dan pada saat terjaga, ia merasa lemah tetapi tanpa gejala lain. Stadium ini berlangsung selama 2-4 jam. Sesudah serangan panas pertama terlewati, terjadi interval bebas panas selama antara 48-72 jam, lalu diikuti dengan serangan panas berikutnya seperti yang pertama; dan demikian selanjutnya. Gejala–gejala malaria klasik seperti diuraikan di atas tidak selalu ditemukan pada setiap penderita dan ini tergantung pada spesies parasit, umur, dan tingkat imunitas penderita (Arsunan, 2012).

### 2.1.7 Diagnosis

Sebagaimana penyakit pada umumnya, diagnosis malaria didasarkan pada manifestasi klinis (termasuk anamnesis), uji imunoserologis, dan ditemukannya parasit (*Plasmodium*) di dalam darah penderita. Manifestasi klinis demam seringkali tidak khas dan menyerupai penyakit infeksi lain (demam dengue,

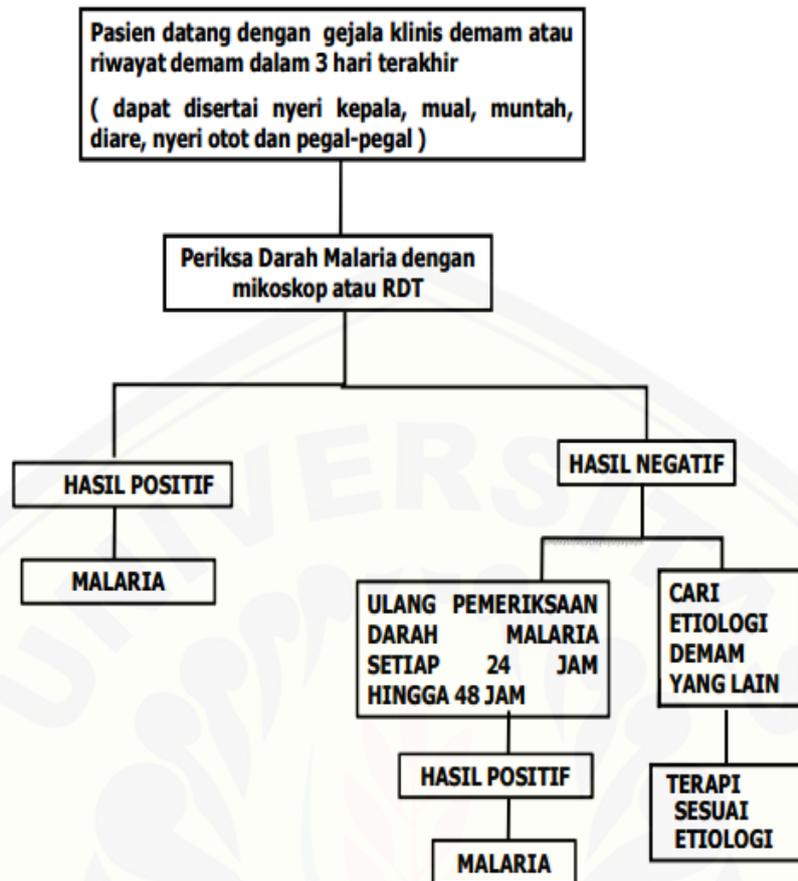
demam tifoid) sehingga menyulitkan para klinisi untuk mendiagnosis malaria dengan mengandalkan pengamatan manifestasi klinis saja, untuk itu diperlukan pemeriksaan laboratorium sebagai penunjang diagnosis sedini mungkin (Arsunan, 2012).

Secara garis besar pemeriksaan laboratorium malaria digolongkan menjadi dua kelompok yaitu pemeriksaan mikroskopis dan uji imunoserologis untuk mendeteksi adanya antigen spesifik atau antibody spesifik terhadap *Plasmodium*. Namun yang dijadikan standar emas (*gold standard*) pemeriksaan laboratorium malaria adalah metode mikroskopis untuk menemukan parasit *Plasmodium* di dalam darah tepi. 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 (Permenkes RI no.5 tahun 2013). Secara garis besar alur diagnosis malaria tercantum dalam Gambar 2.4. Uji imunoserologis dianjurkan sebagai pelengkap pemeriksaan mikroskopis dalam menunjang diagnosis malaria atau ditujukan untuk survey epidemiologi dimana pemeriksaan mikroskopis tidak dapat dilakukan. Sebagai diagnosis banding penyakit malaria ini adalah Demam Tifoid, Demam Dengue, ISPA, demam tinggi, atau infeksi virus akut lainnya (Depkes RI, 2003).

#### 2.1.8 Komplikasi

Menurut WHO, malaria berat adalah malaria yang disebabkan oleh infeksi *P. falciparum* dan *P. vivax* aseksual dengan satu atau lebih komplikasi, akan tetapi *P. vivax* jarang ditemukan pada kasus ini. Beberapa komplikasi sebagai berikut :

1. Malaria serebral terjadi akibat adanya kelainan otak yang menyebabkan gejala penurunan kesadaran sampai koma, GCS (*Glasgow Coma Scale*) < 11, atau koma lebih dari 30 menit setelah serangan kejang yang tidak disebabkan oleh penyakit lain.
2. Anemia berat ditandai dengan Hb < 5 gr% atau hematokrit < 15% pada hitung parasit > 10.000/ $\mu$ L, bila anemianya hipokromik/ mikrositik dengan mengesampingkan adanya anemia defisiensi besi, talasemia atau hemoglobinopati lainnya.



Gambar 2.4 Alur penemuan penderita malaria di Indonesia (sumber: Permenkes RI nomer 5 tahun 2013)

3. Gagal ginjal akut dengan produksi urin  $< 400$  ml/24 jam pada orang dewasa atau  $< 12$  ml/kgBB pada anak setelah dilakukan rehidrasi dan kreatinin  $> 3$  mg%.
4. Edema paru / ARDS (*Adult Respiratory Distress Syndrome*).
5. Hipoglikemi (gula darah  $< 40$  mg%).
6. Syok yaitu tekanan sistolik  $< 70$  mmHg disertai keringat dingin atau perbedaan temperatur kulit-mukosa  $> 10^{\circ}\text{C}$ .
7. Perdarahan spontan dari hidung, gusi, traktus digestivus atau disertai kelainan laboratorik adanya gangguan koagulasi intravaskuler.
8. Kejang berulang lebih dari 2x24 jam setelah pendinginan pada hipertermia.
9. Asidemia (pH  $< 7,25$ ) atau asidosis (plasma bikarbonat  $< 15$  mmol/L).

10. Ikterus yaitu kadar bilirubin darah  $>3$  mg%, sering dijumpai pada dewasa, sedangkan jika ditemukan pada anak prognosisnya buruk.
11. Hiperparasitemia. Kondisi hiperparasitemia meningkatkan terjadinya risiko multiple organ failure
12. Makroskopik hemoglobinuri (*blackwater fever*) oleh karena infeksi pada malaria akut (bukan karena obat anti malaria) (Permenkes RI no.5 tahun 2013).

#### 2.1.9 Pengobatan

Pengendalian malaria selalu mengalami perkembangan, salah satunya dalam hal pengobatan. Kasus resistensi parasit malaria terhadap klorokuin ditemukan pertama kali di Kalimantan Timur pada tahun 1973 untuk *P. falcifarum*, dan tahun 1991 untuk *P. vivax* di Nias. Sejak tahun 1990, kasus resistensi tersebut dilaporkan makin meluas di seluruh provinsi di Indonesia. Selain itu, dilaporkan juga adanya resistensi terhadap Sulfadoksin-Pirimethamin (SP) di beberapa tempat di Indonesia. Keadaan ini dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas penyakit malaria. Oleh sebab itu, untuk menanggulangi masalah resistensi tersebut (*multiple drugs resistance*) dan adanya obat anti malaria baru yang lebih paten, maka pemerintah telah merekomendasikan obat pilihan pengganti klorokuin dan SP, yaitu kombinasi derivat Artemisinin dengan obat anti malaria lainnya yang biasa disebut dengan *Artemisinin based Combination Therapy* (ACT) (Permenkes RI no.5 tahun 2013).

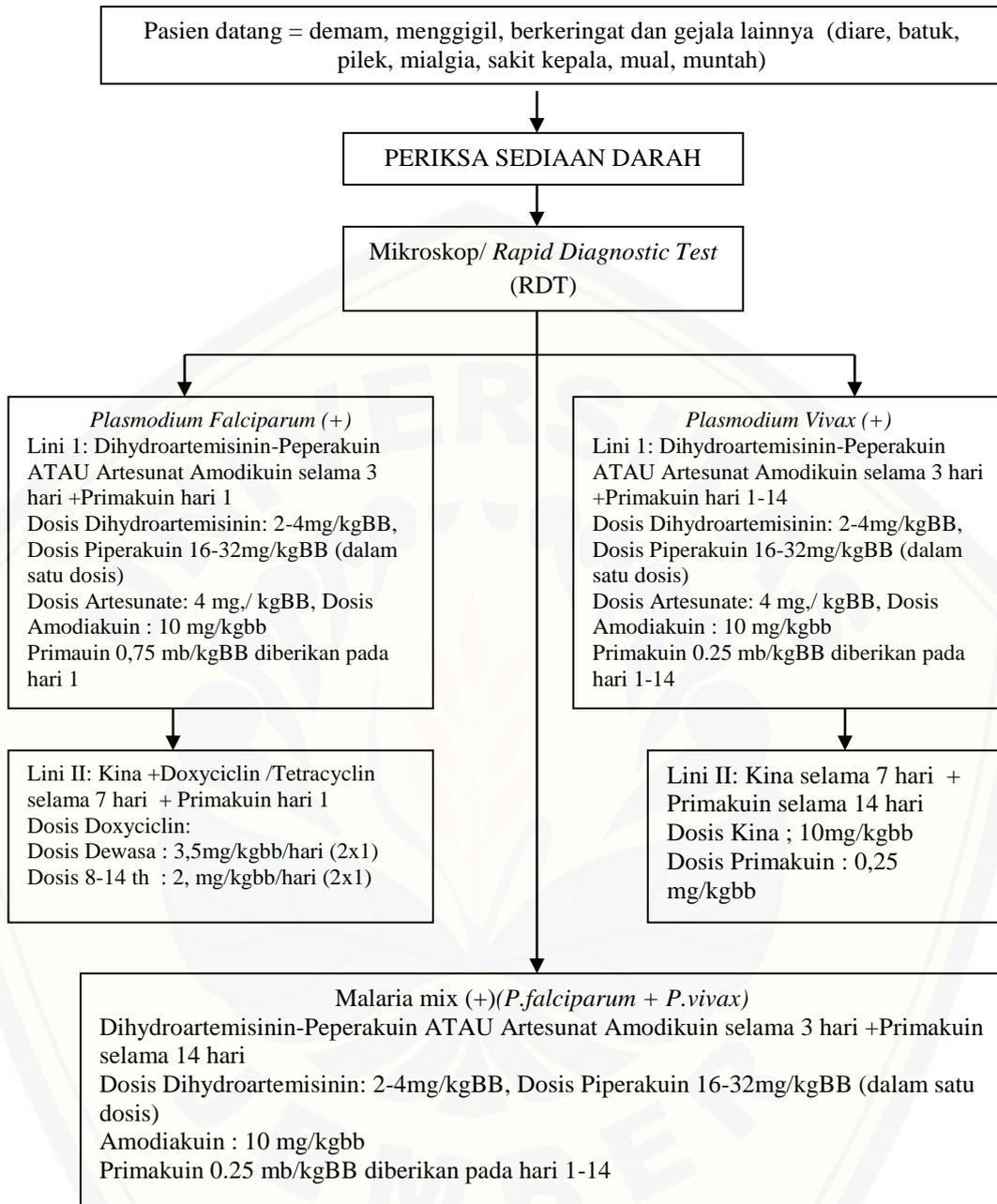
Saat ini yang digunakan program nasional adalah derivat Artemisinin dengan golongan aminokuinolin, yaitu:

1. Kombinasi tetap (*Fixed Dose Combination* = FDC) yang terdiri atas Dihydroartemisinin dan Piperakuin (DHP). 1 (satu) tablet FDC mengandung 40 mg Dihydroartemisinin dan 320 mg Piperakuin. Obat ini diberikan peroral selama tiga hari dengan range dosis tunggal harian sebagai berikut: Dihydroartemisinin dosis 2-4 mg/kgBB; Piperakuin dosis 16-32mg/kgBB.
2. Artesunat – Amodiakuin yang ada pada program pengendalian malaria dengan 3 blister, setiap blister terdiri dari 4 tablet artesunat 50 mg dan 4 tablet amodiakuin 150 mg.

Di Indonesia pengobatan malaria secara spesifik dibagi menjadi dua, yaitu pengobatan malaria tanpa komplikasi dan pengobatan malaria dengan komplikasi. Pengobatan pada kasus malaria dilakukan berdasarkan jenis *Plasmodium* sp. yang menyerang manusia. Pada saat pasien datang dengan keluhan trias malaria disertai gejala prodromal dilakukan 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 (Permenkes RI no.5 tahun 2013). Pengobatan malaria tanpa komplikasi telah dirangkum dalam Gambar 2.5.



## a. Pengobatan Malaria tanpa Komplikasi

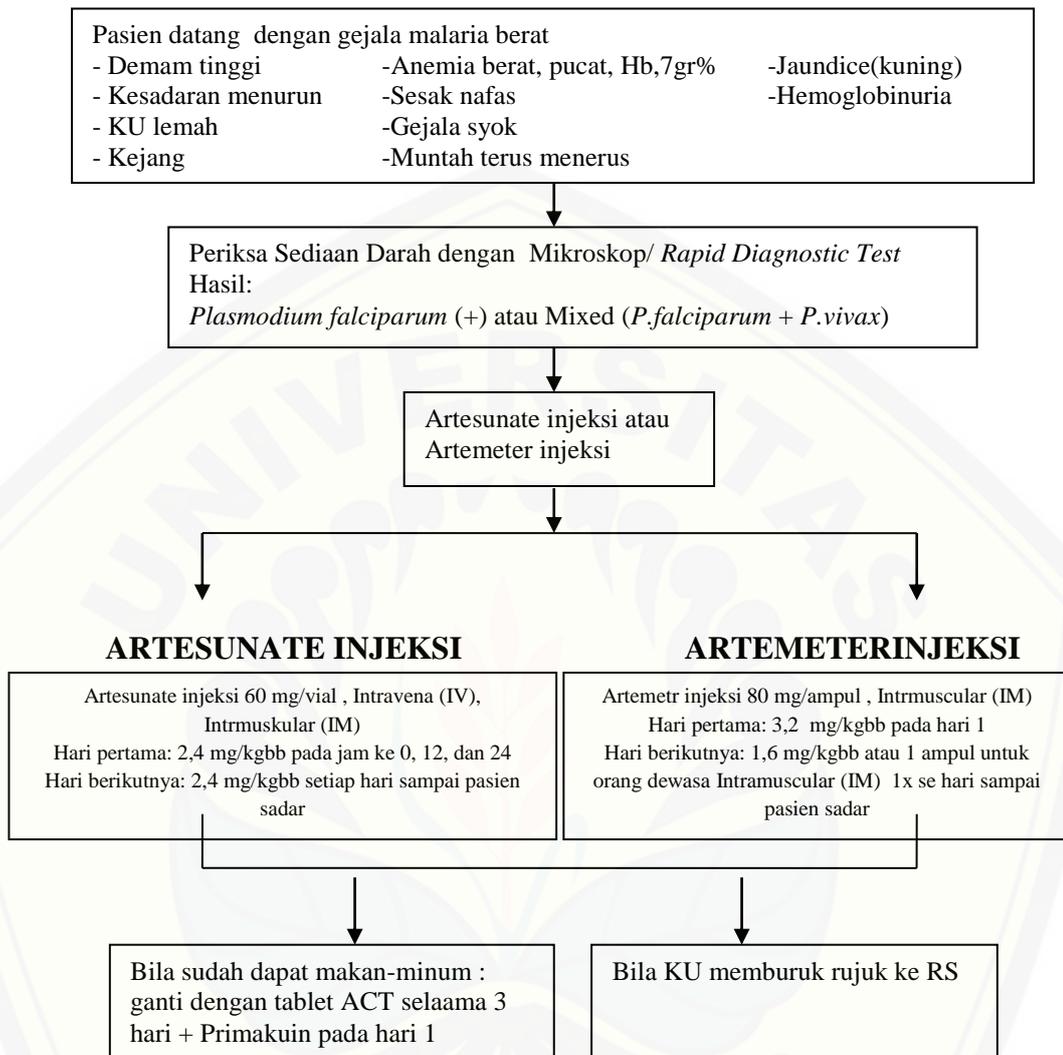


Gambar 2.5 Alur penatalaksanaan pengobatan malaria tanpa komplikasi oleh *P.falciparum* dan *P.vivax* (sumber: Permenkes RI no.5 tahun 2013)

## 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 Artesunate intravena seperti tercantum dalam Gambar 2.6 (Depkes RI, 2012).



Gambar 2.6 Alur penatalaksanaan pengobatan malaria berat (sumber : Depkes RI, 2012)

## 2.2 Malaria Serebral

### 2.2.1 Definisi

Malaria serebral adalah komplikasi neurologis yang paling berbahaya dari infeksi malaria *P. falciparum*. Malaria serebral terjadi akibat adanya kelainan otak yang menyebabkan gejala penurunan kesadaran sampai koma, GCS (*Glasgow Coma Scale*) < 11, atau koma lebih dari 30 menit setelah serangan kejang yang tidak disebabkan oleh penyakit lain. Data riskesdas 2013 mendapatkan 86,4% penyebab malaria adalah *P. falciparum* dan *P. vivax* sebanyak 6,9%. *Period*

*prevalence* menyatakan bahwa prevalens paling tinggi adalah pada kelompok umur >15 tahun (10,8%), nomor dua paling tinggi pada kelompok umur 1-4 tahun (10,7%), dan paling rendah tetap pada umur <1 tahun (8,2%). Dari data diatas tampak kecenderungan kelompok yang berisiko tinggi terkena malaria bergeser dari usia >15 tahun ke usia 1-4 tahun. Gejala sisa neurokognitif sering diamati pada anak-anak yang sembuh dari malaria serebral telah dikaitkan dengan modulasi hidup sel neuron dan plastisitas sinaps (Linares *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Patogenesis

Patofisiologi malaria serebral yang terkait dengan infeksiusitas parasit masih belum diketahui secara pasti. Meskipun dasar kelainan adalah adanya sumbatan mikrosirkulasi serebral yang disebabkan parasit, namun mekanisme pastinya masih merupakan hipotesis (Kakkilaya, 2008).

Gangguan kesadaran pada malaria serebral dapat disebabkan adanya berbagai mekanisme, yaitu sekuestrasi dan *rosetting*, peningkatan asam laktat, dan peningkatan sitokin dalam darah yang menyebabkan gangguan metabolisme di otak. Patogenesis malaria dengan komplikasi meliputi sitoadherensi pada mikrovaskular terhadap eritrosit terinfeksi parasit, adherens antara eritrosit normal dengan eritrosit yang mengandung parasit (*rosetting*), dan pengeluaran sitokin sebagai respons terhadap substansi toksik yang dikeluarkan oleh *P. falciparum* yang menyebabkan kerusakan jaringan (Weller, 2004 dan Kakkilaya, 2008). Namun, pada keadaan tertentu pengeluaran sitokin sebagai respons terhadap substansi toksik dari *P. falciparum* terjadi secara berlebihan sehingga menyebabkan kerusakan jaringan yang sangat berat dan fatal.

Penelitian yang dilakukan oleh Linares *et al.* (2013) menemukan bahwa semakin meningkatnya gejala malaria serebral, maka BDNF mRNA semakin berkurang di beberapa bagian otak, yang paling awal adalah di thalamus-hipotalamus, otak kecil, batang otak, dan korteks. Data ini menunjukkan bahwa perubahan dalam ketersediaan BDNF bisa terlibat dalam patogenesis malaria serebral. Sekuestrasi eritrosit terinfeksi parasit dalam sistem mikrosirkulasi saraf pusat adalah fitur yang menonjol dari malaria serebral yang mengakibatkan obstruksi mekanik dan iskemia (Latifu *et al.*, 2001). Data menunjukkan bahwa

NF- $\kappa$ B diaktifkan dalam neuron dan astrosit selama iskemia serebral dan bahwa aktivasi NF- $\kappa$ B dalam neuron berkontribusi pada kerusakan iskemik (Zhang *et al.*, 2005).

### 2.2.3 Manifestasi Klinis

Penyebab malaria serebral adalah akibat sumbatan pembuluh darah kapiler di otak karena menurunnya aliran darah efektif dan adanya hemolisis sel darah (Munthe, 2001). Hal ini menyebabkan beberapa manifestasi neurologis (1 atau beberapa manifestasi) berikut ini dapat ditemukan:

1. Ensefalopati difus simetris
2. Kejang umum atau fokal
3. Tonus otot dapat meningkat atau menurun
4. Refleks tendon bervariasi
5. Terdapat plantar fleksi atau plantar ekstensi
6. Rahang mengatup rapat dan gigi kretakan (seperti mengasah)
7. Mulut mencebil (*pouting*) atau timbul refleks mencebil bila sisi mulut dipukul
8. Motorik abnormal seperti deserebrasi rigiditas dan dekortikasi rigiditas
9. Tanda-tanda neurologis fokal kadang-kadang ada
10. Manifestasi okular : pandangan divergen (*dysconjugate gaze*) dan konvergensi spasme sering terjadi. Perdarahan sub konjungtiva dan retina serta papil edema kadang terlihat
11. Kekakuan leher ringan kadang ada tetapi tanda Frank (*Frank sign*) meningitis, Kernigs (+) dan fotofobia jarang ada. Untuk itu adanya meningitis harus disingkirkan dengan pemeriksaan punksi lumbal (LP) 1
12. Cairan serebrospinal (LCS) jernih, dengan < 10 leukosit/ml, protein sering naik ringan.

Selain itu, terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi manifestasi neurologi pada malaria, antara lain:

- a. Demam derajat tinggi akan mengganggu kesadaran, kejang demam (pada anak), dan psikosis. Manifestasi tersebut akan menurun bila derajat panas diturunkan. Apabila kesadaran tidak mengalami gangguan setelah serangan kejang atau demam maka prognosis penderita umumnya baik

- b. Obat-obat antimalaria, seperti klorokuin, kuinin, meflokuin, dan halofantrin juga dapat menyebabkan gangguan perilaku, kejang, halusinasi, dan psikosis. Bila tidak terdapat demam tinggi atau parasitemia yang menyertai manifestasi neurologis maka kemungkinan penyebabnya adalah obat antimalaria.
- c. Hipoglikemia, pada infeksi malaria berat, dapat terjadi hipoglikemia. Kejadian hipoglikemia lebih sering terjadi pada ibu hamil. Perlu adanya pertimbangan pemberian infus dextrose 25-50% untuk mengatasi hal ini.
- d. Hiponatremia hampir selalu terjadi pada kasus yang dialami orang tua dan seringkali akibat muntah berlebihan.
- e. Anemia berat dan hipoksemia dapat menyebabkan disfungsi serebral pada pasien dengan malaria (Kakkilaya, 2008).

#### 2.2.4 Diagnosis

Diagnosis malaria serebral hampir sama dengan malaria umum. Hal yang membedakan adalah manifestasi klinis malaria serebral. Gejala klinis untuk malaria serebral diantaranya berbagai tingkatan penurunan kesadaran berupa delirium, mengantuk, stupor, dan ketidaksadaran dengan respon motorik terhadap rangsang sakit yang dapat dinilai. Onset koma dapat bertahap setelah stadium inisial konfusi atau mendadak setelah serangan pertama. Tetapi, ketidaksadaran post iktal jarang menetap setelah lebih dari 30-60 menit. Bila penyebab ketidaksadaran masih ragu-ragu, maka penyebab ensefalopati lain yang lazim ditempat itu, seperti meningoensefalitis viral atau bakterial harus disingkirkan (Permenkes RI no.5 tahun 2013).

Meskipun manifestasi klinis malaria serebral sangat beragam, namun hanya terdapat 3 gejala terpenting, baik pada anak dan dewasa, yaitu:

1. Gangguan kesadaran dengan demam non-spesifik
2. Kejang umum dan sekuel neurologik
3. Koma menetap selama 24 – 72 jam, mula-mula dapat dibangunkan, kemudian tak dapat dibangunkan.

Kriteria diagnosis lainnya, yaitu menurut Lubis (2005), yaitu harus memenuhi lima kriteria berikut:

1. Penderita berasal dari daerah endemis atau berada di daerah malaria.

2. Demam atau riwayat demam yang tinggi.
3. Ditemukan parasit malaria falciparum dalam sediaan darah tipis atau tebal.
4. Adanya manifestasi serebral berupa kesadaran menurun dengan atau tanpa gejala-gejala neurologis yang lain, sedangkan kemungkinan penyebab yang lain telah disingkirkan.
5. Kelainan cairan serebrospinal yang berupa Nonne positif, Pandy positif lemah, hipoglikemia ringan.

Di daerah endemis malaria, semua kasus demam dengan perubahan sensorium harus diobati sebagai malaria serebral, sementara menyingkirkan meningoensefalitis yang biasa terjadi di tempat itu.

#### 2.2.5 Pengobatan

Penatalaksanaan malaria serebral sama seperti pada malaria berat umumnya (Permenkes RI no.5 tahun 2013). Beberapa hal penting yang perlu diperhatikan adalah:

- a. perawatan pasien dengan gangguan kesadaran.
- b. deteksi dini dan pengobatan komplikasi berat lainnya.
- c. penderita harus dirawat di ruang perawatan intensif (ICU).
- d. untuk di daerah endemis, terapi diberikan sesegera mungkin, kadang-kadang sebelum konfirmasi parasitologi.
- e. penderita harus ditimbang untuk menghitung dosis obat antimalaria.
- f. pemberian cairan infus untuk pemeliharaan cairan dan kebutuhan kalori, jika perlu dipasang kateter CVP, khususnya untuk penderita lanjut usia. Semua intake harus direkam secara hati-hati.
- g. waspadalah akan terjadinya infeksi bakteri, terutama pada pasien dengan pemasangan intravena, intubasi endotrakeal atau kateter saluran kemih dan terhadap kemungkinan terjadinya aspirasi pneumonia.

Perawatan pasien tidak sadar meliputi:

- a. Hal-hal yang perlu dimonitor :
  1. Tensi, nadi, suhu, dan pernafasan setiap 30 menit
  2. Pemeriksaan derajat kesadaran setiap 8 jam modifikasi Glasgow coma scale (GCS)

3. Hitung parasit tiap 24 jam
  4. Ht dan atau Hb setiap hari, bilirubin, dan kreatinin pada hari ke I dan III
  5. Gula darah tiap 8 jam
  6. Pemeriksaan lain sesuai indikasi (misal ureum, kreatinin, dan kalium darah pada komplikasi gagal ginjal)
- b. Pasang IVFD. Untuk mencegah terjadinya tromboflebitis dan infeksi yang sering terjadi melalui *iv-line* maka *iv-line* sebaiknya diganti setiap 2-3 hari.
  - c. Pasang kateter uretra dengan drainase/ kantong tertutup. Pemasangan kateter dengan memperhatikan kaidah a/antiseptis.
  - d. Pasang *gastric tube* (maag slang) dan sedot isi lambung untuk mencegah aspirasi pneumonia.
  - e. Mata dilindungi dengan pelindung mata untuk menghindari ulkus kornea yang dapat terjadi karena tidak adanya refleks mengedip pada pasien tidak sadar.
  - f. Menjaga kebersihan mulut untuk mencegah infeksi kelenjar parotis karena kebersihan rongga mulut yang rendah pada pasien yang tidak sadar.
  - g. Ubah atau balik posisi lateral secara teratur untuk mencegah luka dekubitus dan pneumonia hipostatik (Permenkes RI no.5 tahun 2013).

#### 2.2.6 RMCBS (*Rapid Murine Coma and Behavior Scale*)

RMCBS (*Rapid Murine Coma and Behavior Scale*) adalah skor yang menggunakan 10 parameter dan digunakan untuk mendiagnosis mencit dalam penelitian eksperimental malaria. Penelitian malaria memerlukan model untuk simulasi malaria serebral seperti pada manusia serta cepatnya penurunan kesehatan subjek penelitian malaria serebral menyebabkan skor RMCBS ini dikembangkan. Sepuluh parameter RMCBS ini mampu diamati hanya dalam 3 menit sehingga memungkinkan penelitian eksperimental malaria dengan jumlah subjek yang besar ketika dilakukan trial suatu terapi. Setiap parameter memiliki skor minimal 0 dan maksimal 2. Sepuluh parameter RMCBS beserta penilaiannya tercantum dalam Tabel 2.1. Model malaria serebral dinilai berdasarkan skor RMCBS (*Rapid Murine Coma and Behavior Scale*) yang dinyatakan positif jika bernilai 5-12 dalam kurun waktu 5-9 hari paska infeksi serta hapusan darah tipis dinyatakan positif malaria (Carroll *et al.*, 2010). Tingkat kesakitan yang diamati

menggunakan RMCBS secara objektif dikuatkan oleh validasi antar operator dan dikorelasikan secara signifikan dengan pemeriksaan patologi otak. Sehingga RMCBS mampu digunakan secara objektif untuk menilai positif atau tidaknya mencit model malaria serebral (Carroll *et al.*, 2010).

Tabel 2.1 Skor RMCBS (Sumber: Carroll *et al.*, 2010)

Label	Score	Description
Coordination		
Gait	(0-2)	(none – ataxic – normal)
Balance	(0-2)	(no body extension – extends front feet on wall – entire body lift)
Exploratory Behavior		
Motor Performance	(0-2)	(none – 2-3 corners explored in 90 seconds – explores 4 corners in 15 seconds)
Strength and Tone		
Body Position	(0-2)	(on side – hunched – full extension)
Limb Strength	(0-2)	(hypotonic, no grasp – weak pull-back[front paw grasp only] – strong pull-back[active pull away, jerk away])
Reflexes and Self-Preservation		
Touch Escape	(0-2)	(none – unilateral – instant and bilateral; in 3 attempts)
Pinna Reflex	(0-2)	(none – unilateral – instant and bilateral; in 3 attempts)
Toe Pinch	(0-2)	(none – unilateral – instant and bilateral; in 3 attempts)
Aggression	(0-2)	(none – bite attempt with tail cut – bite attempt prior to tail cut, in 5 seconds)
Hygiene-Related Behavior		
Grooming	(0-2)	(ruffled, with swathes of hair out of place – dusty/piloerection – normal/clean with sheen)

The RMCBS consists of 10 parameters, and each parameter is scored 0 to 2, with a 0 score correlating with the lowest function and a 2 score, the highest. An animal can achieve an accumulative score of 0 to 20.  
doi:10.1371/journal.pone.0013124.t001

### 2.3 *Plasmodium berghei*

*Plasmodium berghei* merupakan salah satu dari empat spesies *Plasmodium* yang menginfeksi rodent yang berasal dari Afrika Barat. Spesies lain yang dapat menginfeksi rodent adalah : *P. vinckei*, *P. chabandi*, dan *P. voelii*. *Plasmodium berghei* mempunyai siklus hidup maupun morfologi seperti parasit malaria pada manusia. *Plasmodium berghei* ANKA pada tikus sebagai model infeksi malaria berat adalah parasit pilihan karena kemampuannya untuk sekuestrasi dalam mikrosirkulasi yang merupakan karakteristik dari malaria serebral (Berendt *et al.*, 1994). Hal ini disebabkan teknologi pembiakan secara *in vitro* dan pemurnian pada tahapan siklus hidup, dan pengetahuan genom telah diketahui. *Plasmodium berghei* mempunyai ukuran genom yang paling mirip dengan genom *P. falciparum* dibandingkan dengan jenis *Plasmodium* yang lain (Gardner *et al.*, 2002). Oleh karena itu *P. berghei* ini oleh para peneliti digunakan sebagai model penelitian untuk mencari dan mengembangkan obat anti malaria (Gingras dan Jensen, 1993).

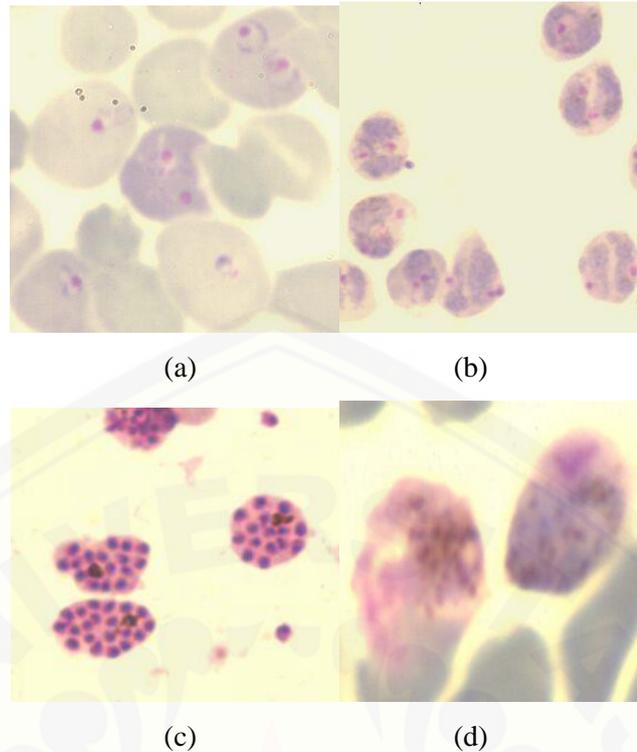
### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

*Plasmodium berghei* diklasifikasikan sebagai berikut :

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

Dalam darah rodensia bentuk *P.berghei* yang bisa diketemukan ada 4 (empat) yaitu: bentuk cincin, trophozoit, skizon, dan gametosit seperti yang terlihat pada Gambar 2.7.

1. Bentuk cincin: tampak sebagai cincin dengan sitoplasma biru dengan nukleus kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan *Giemsa* dari hapusan darah tepi.
2. Bentuk trophozoit: berbentuk amuboid atau seperti pipa.
3. Bentuk skizon: ukuran kira-kira 27  $\mu\text{m}$  pada hari keempat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak sebagai titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas.
4. Bentuk gametosit. Ada dua bentuk gametosit yaitu makrogametosit dan mikrogametosit. Makrogametosit berbentuk pisang, bernoda biru mengandung kumpulan nukleus dan granula, sedangkan bentuk mikrogametosit seperti ginjal atau kacang, bernoda biru muda atau kemerahan mengandung nukleus yang mengkilat dengan granula yang lebih kecil dan tersebar.



(a) bentuk cincin; (b) bentuk trofozoit; (c) bentuk skizon; (d) bentuk gametosit  
Gambar 2.7 Bentuk *P.berghei* dalam hapusan darah (sumber: www.lumc.nl)

Pada pemeriksaan darah tepi, baik hapusan darah tebal maupun 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).

### 2.3.2 *Plasmodium berghei* sebagai Model untuk Riset Malaria

Sejak tahun 1978, studi tentang parasit malaria sangat meningkat terutama studi pada parasit *P. 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 dan manusia dan merupakan salah satu dari empat spesies yang menginfeksi rodent murine Afrika.

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 oleh karena:

- a. Secara biologis parasit pada manusia dan rodensia mempunyai kesamaan.
- b. Susunan genom dan genetik 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*, produksi dalam jumlah besar serta pemurnian tahapan-tahapan siklus hidup.
- 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 host baik secara *in vivo* dan *in vitro*. Pengenalan yang baik terhadap *clones* dan *mutant lines* secara genetik.
- j. Struktur genetik rodensia sebagai inang yang telah diketahui dengan baik dan jenis transgenik yang telah tersedia dan bermanfaat untuk studi imunologi (Suryawati dan Suprapti, 2007).

## 2.4 Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

### 2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Monocotyledonae
Bangsa	: Zingiberales
Suku	: Zingiberaceae

Genus : *Zingiber*

Jenis : *Zingiber cassumunar* Roxb.

Nama umum : Bangle

Bangle merupakan herba semusim, tumbuh tegak, tinggi 1-1,5 meter, membentuk rumpun yang agak padat, berbatang semu, terdiri dari pelepah daun yang dipinggir ujungnya berambut sikat. Daun tunggal, letak berseling. Helaian daun lonjong, tipis, ujung runcing, pangkal tumpul, tepi rata, berambut halus, jarang, pertulangan menyirip, panjang 25-35 cm, lebar 20-40 mm, dan berwarna hijau. Bagian yang mengandung bunga berbentuk tandan, bentuk bundar telur atau seperti gelendong, panjang 6-10 cm, lebar 4-5 cm. Daun kelopak tersusun seperti sisik tebal. Kelopak seperti tabung, ujungnya bergerigi 3, panjang kurang lebih 1.5 cm, warna merah menyala, akar serabut berwarna putih kotor (Syukur *et al.*, 2001). Morfologi tanaman Bangle seperti yang ditampilkan pada Gambar 2.7.



Gambar 2.8 Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) (sumber: floradanfauna.com)

#### 2.4.2 Kandungan Bahan Aktif

Kandungan senyawa kimia di dalam rimpang Bangle antara lain: alkaloid, flavonoid, minyak atsiri, saponin, pati, tanin, steroid/ trflavonoid, lemak, dan gula serta sineol dan pinen (Wijayakusuma *et al.*, 1997). Analisis proksimat Bangle menunjukkan kandungan air 72,38%, abu 5,60%, protein kasar 0,23%, serat kasar 8,52%, karbohidrat 11,73%, dan lemak 1,54%. Analisis fitokimia mengandung

alkaloid, saponin, fenol hidrokuinon, flavonoid, dan triterpenoid yang rendah serta tidak mengandung steroid. Derivat phenylbutenoid yang diisolasi 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 namun yang tertinggi adalah derivat nomer 1 (Chairul dan Chairul, 2009).

Fraksi antioksidan yang paling aktif dari ekstrak rimpang Bangle diketahui mengandung tiga antioksidan potensial, cassumunarin A, B, dan C, yang dibuktikan dengan metode *spectroscopic* merupakan tipe baru kompleks curcumin. Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) melalui metode *sulfur free radical reactivity* memiliki aktivitas antioksidan tertinggi diantara ordo Zingiberales (Chirangini *et al.*, 2004).

#### 2.4.3 Manfaat

Rimpang *Zingiber cassumunar* Roxb. (Bangle) 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 (Dalimartha, 2009).

Bangle menunjukkan aktivitas sebagai imunostimulan seperti penelitian yang dilakukan oleh Chairul dan Chairul (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 curcumin yang tinggi dalam Bangle menyebabkan tanaman ini mempunyai efek antioksidan dan prooksidan yang keduanya memberikan efek proteksi terhadap malaria. Curcumin pada konsentrasi yang tinggi dapat

menyebabkan peningkatan *Reactive Oxygen Species* (ROS) terutama dalam bentuk radikal hidroksil. Penghambatan aktivasi NF- $\kappa$ B karena peningkatan ROS juga dapat mengaktivasi *peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR $\gamma$ ), sehingga menyebabkan *downregulation* sitokin-sitokin proinflamasi dan ekspresi molekul-molekul adesi di endotel yang berperan penting dalam patomekanisme komplikasi pada malaria, yaitu pada proses sitoadherensi dan *rosetting* (Mimche *et al.*, 2011). Dengan demikian curcumin 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. Oleh karena itu Bangle mempunyai potensi yang besar untuk dijadikan terapi komplementer pada malaria untuk mencegah terjadinya komplikasi dan pada akhirnya angka mortalitas karena malaria dapat diturunkan. Pemberian fraksi Bangle sebagai terapi komplementer malaria, yaitu dengan obat antimalaria Artemisinin menunjukkan efek sinergi dengan adanya penurunan derajat parasitemia, peningkatan kapasitas fagositosis makrofag, dan peningkatan kadar malondialdehid (MDA) dan nitrit oksida (NO) serum yang menunjukkan peningkatan radikal bebas yang penting untuk eliminasi parasit (Fatmawati *et al.*, 2014).

### **2.5 Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF)**

*Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF) merupakan salah satu anggota dari faktor neutropin yang terdapat di otak yang berperan penting untuk kelangsungan hidup neuron (Skaper, 2012). Penurunan ekspresi BDNF mRNA di otak berkorelasi dengan peningkatan keparahan malaria serebral pada tikus yang terinfeksi *P. berghei* (Linares *et al.*, 2013). Penurunan tingkat BDNF telah dikaitkan dengan perubahan dalam pemeliharaan dan regenerasi neuron, kelainan struktural dalam otak, dan pengurangan plastisitas neuron yang mengakibatkan gangguan kemampuan untuk menghadapi situasi krisis (Comim *et al.*, 2012). Tingkat BDNF rendah berhubungan dengan penurunan pelindung saraf dan administrasi BDNF telah terbukti menjadi pelindung cedera otak dan model infeksi akut (Shi *et al.*, 2009; Barichello dan Belamirno, 2010). Terapi tambahan

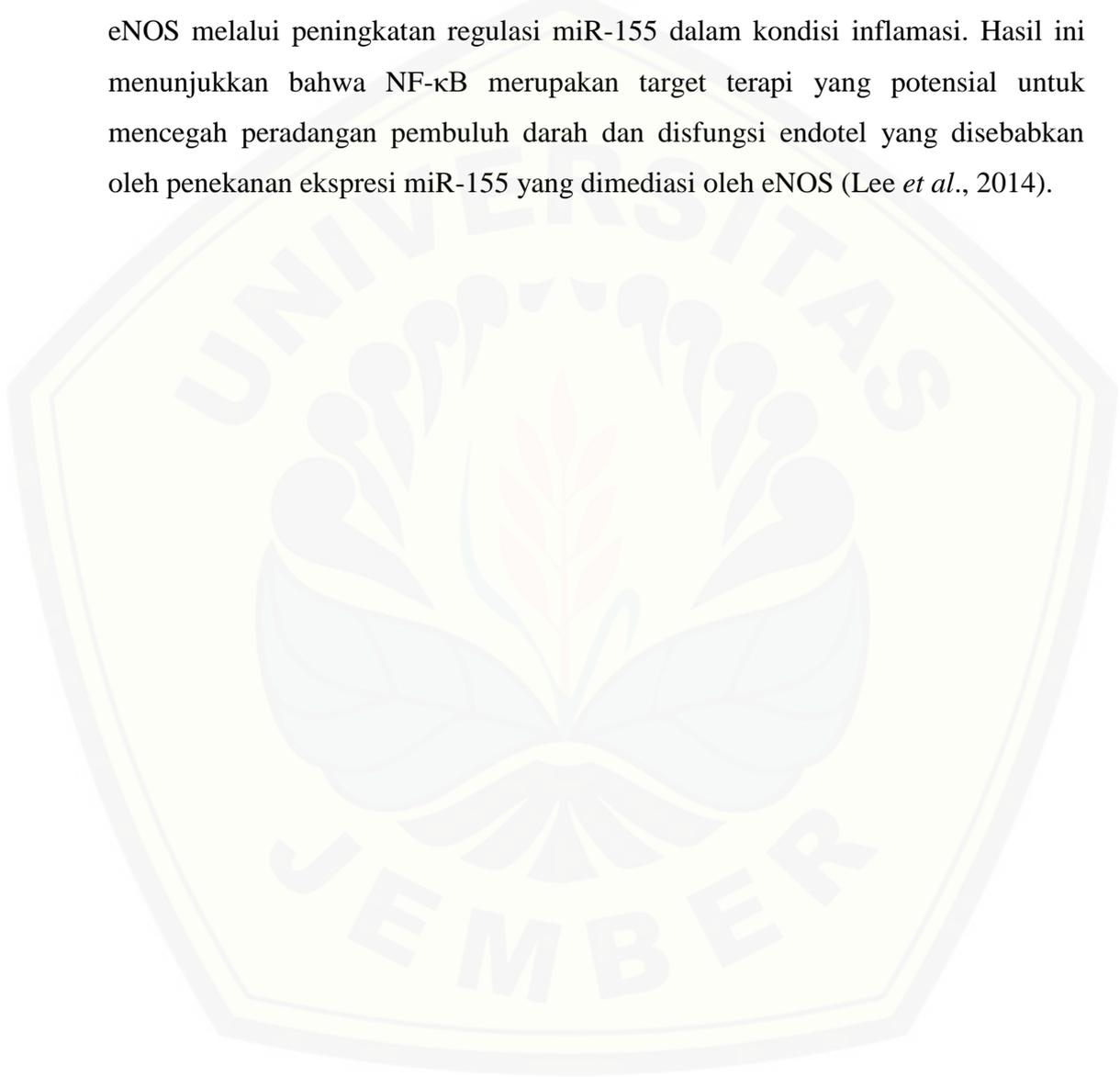
rosiglitazone dikaitkan dengan kedua peningkatan kadar BDNF dan NGF pada otak tikus yang terinfeksi malaria (Serghides *et al.*, 2014).

*Brain Derived Neurotrophic Factor* adalah anggota dari keluarga NGF yang melimpah di otak mamalia. *Brain Derived Neurotrophic Factor* bertindak melalui sistem parakrin dan autokrin untuk mengontrol berbagai proses otak, termasuk pertumbuhan, perkembangan, diferensiasi dan pemeliharaan sistem saraf, plastisitas neuron, aktivitas sinaptik, dan aktivitas yang dimediasi neurotransmitter (Chao, 2003). Meskipun namanya demikian, BDNF merupakan faktor neurotropik yang juga ditemukan di sel saraf tepi, bukan hanya di otak. Untuk lebih spesifik, BDNF adalah protein yang memiliki aktivitas di neuron dari sistem saraf pusat dan sistem saraf tepi. Namun telah diketahui bahwa protein BDNF tersebar luas dengan tingkat yang lebih tinggi di korteks serebral, otak depan basal, striatum, hippocampus, hipotalamus, batang otak, dan otak kecil - daerah vital untuk belajar, memori, dan berpikir yang lebih tinggi (Murer *et al.*, 2001; Cotman *et al.*, 2007).

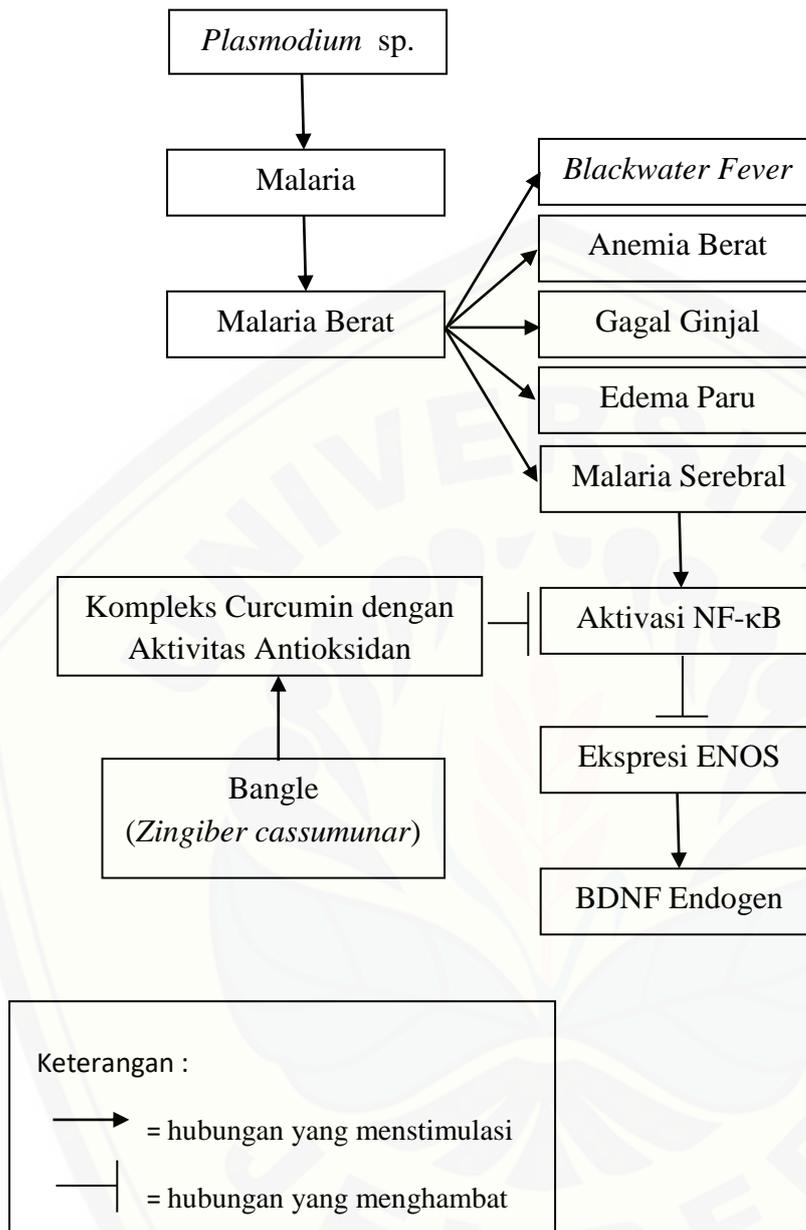
Produksi endogen BDNF diatur melalui beberapa mekanisme, salah satunya adalah melalui ekspresi endotel nitrat oksida sintase (eNOS). Cui *et al.* (2013) menunjukkan bahwa tikus tanpa eNOS menunjukkan pengurangan ekspresi neurotopin BDNF. Endotel nitrat oksida sintase dengan mengatur ekspresi BDNF juga menjadi mediator penting dari neurogenesis di otak. Pengurangan BDNF di tikus tanpa eNOS mungkin bertanggung jawab untuk defisit dalam pemulihan fungsional dan pengurangan plastisitas otak (Hunt *et al.*, 2010). Data menunjukkan bahwa eNOS memainkan peran penting dalam mengatur endogen BDNF dan TrkB yang terlibat dalam pertumbuhan akson dan fungsi sinaptik, dan dengan demikian dalam pemulihan fungsional setelah stroke.

*Brain Derived Neurotrophic Factor* (BDNF), *Nerve Growth Factor* (NGF), dan *neurotrophin-3* (NT-3) selektif mengikat anggota yang berbeda dari keluarga Trk reseptor tirosin kinase, tetapi ketiganya mengikat dengan afinitas mirip dengan reseptor neurotrophin P75. Reseptor P75 neurotrophin (p75NTR) telah dikaitkan dengan aktivasi kompleks transkripsi NF- $\kappa$ B di oligodendrocytes, sel Schwann. Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B adalah tombol pengatur peradangan dan kelangsungan hidup sel. NF- $\kappa$ B diaktifkan oleh iskemia serebral dalam neuron

dan glia. Data menunjukkan bahwa NF- $\kappa$ B diaktifkan dalam neuron dan astrosit selama iskemia serebral dan bahwa aktivasi NF- $\kappa$ B dalam neuron berkontribusi pada kerusakan iskemik (Zhang *et al.*, 2005). Faktor transkripsi NF- $\kappa$ B memiliki peran penting dalam peradangan pada sel-sel endotel. Endotel nitrat oksida sintase (eNOS)-derived nitrat oksida (NO) mencegah peradangan pembuluh darah. Data penelitian membuktikan bahwa NF- $\kappa$ B merupakan regulator negatif ekspresi eNOS melalui peningkatan regulasi miR-155 dalam kondisi inflamasi. Hasil ini menunjukkan bahwa NF- $\kappa$ B merupakan target terapi yang potensial untuk mencegah peradangan pembuluh darah dan disfungsi endotel yang disebabkan oleh penekanan ekspresi miR-155 yang dimediasi oleh eNOS (Lee *et al.*, 2014).



## 2.6 Kerangka Teori

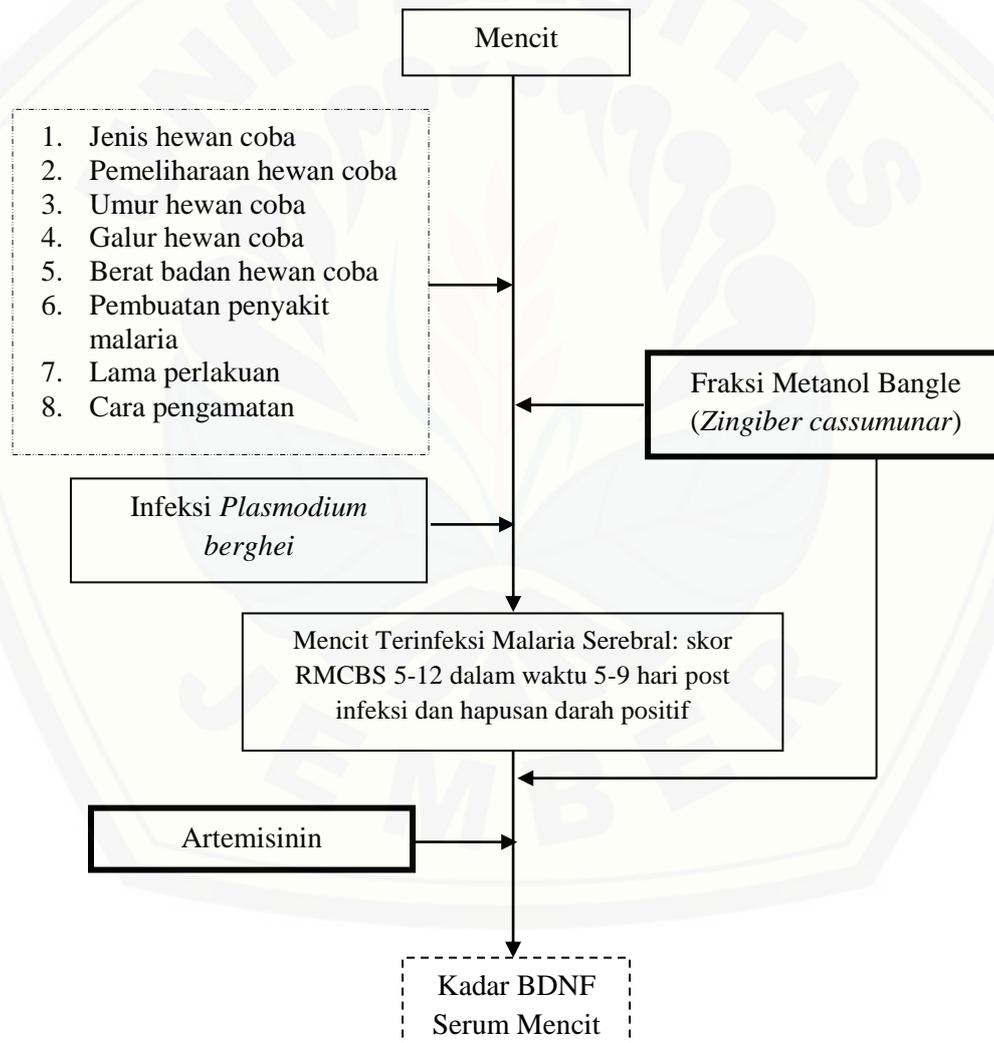


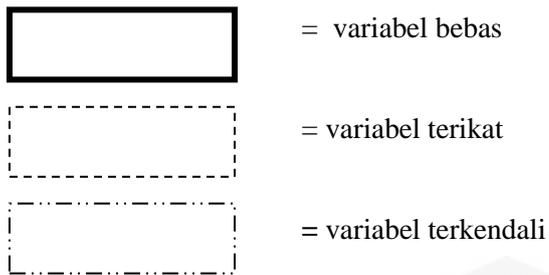
Gambar 2.9 Kerangka Teori

Malaria disebabkan oleh parasit *Plasmodium*. Malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum* memiliki patogenesis khusus yaitu melakukan sekuestrasi sehingga mampu menyebabkan malaria berat (malaria dengan komplikasi). Malaria serebral adalah salah satu komplikasi yang paling sering terjadi. Proses sekuestrasi eritrosit dalam sistem mikrosirkulasi saraf pusat mengakibatkan obstruksi iskemia pada malaria serebral yang mengaktifkan NF-κB diaktifkan

dalam neuron. NF- $\kappa$ B merupakan regulator negatif ekspresi eNOS sedangkan kompleks curcumin pada Bangle mampu menghambat aktivitas NF- $\kappa$ B. Selanjutnya diketahui bahwa eNOS merupakan salah satu regulator ekspresi BDNF endogen. BDNF merupakan salah satu neutropin yang berperan penting untuk kelangsungan hidup neuron yang menghambat perburukan infeksi malaria serebral. Pemberian Bangle mampu menghambat aktivasi NF- $\kappa$ B sehingga diharapkan eNOS tidak akan terhambat regulasinya dalam memproduksi BDNF endogen. Hal ini diilustrasikan dalam kerangka teori Gambar 2.9.

## 2.7 Kerangka Konsep Penelitian





Gambar 2.10 Kerangka Konsep Penelitian

## 2.8 Hipotesis Penelitian

Berdasarkan tinjauan pustaka diatas, peneliti memiliki hipotesis yaitu pemberian fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas untuk meningkatkan kadar serum BDNF mencit sebagai terapi komplementer malaria serebral.

## BAB 3 METODE PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Penelitian ini menggunakan *true experimental design* secara *in vivo* dengan rancangan *post test control group design* yang menggunakan binatang percobaan sebagai subyek penelitian.

### 3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Molekuler Fakultas Kedokteran Universitas Jember, Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember, dan Laboratorium Biologi Farmasi Universitas Jember dalam kurun waktu penelitian satu bulan setelah proposal diterima.

### 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 *P. berghei*.

#### 3.3.2 Sampel

Sampel penelitian menggunakan kriteria inklusi dan eksklusi agar didapatkan sampel yang homogen. Kriteria inklusi adalah sebagai berikut:

- a. Mencit strain Balb/C jantan berwarna bulu putih, sehat, bergerak aktif, tingkah laku normal.
- b. berumur 2-3 bulan dengan berat badan 20-30 gram.
- c. Skor RMCBS bernilai 5-12 dalam kurun waktu 5-9 hari paska infeksi serta hapusan darah tipis dinyatakan positif malaria setelah infeksi malaria.

Kriteria eksklusi: mencit yang kondisinya menurun atau mati sebelum penelitian berlangsung. Mencit dinyatakan kondisinya menurun apabila rambut kusam atau rontok, aktivitas kurang atau tidak aktif, dan ditemukan eksudat yang keluar dari mata, mulut, anus, dan genital.

### 3.3.3 Jumlah Sampel

Jumlah perlakuan pada penelitian ini ialah sebanyak 5 perlakuan berdasarkan waktu induksi dan waktu pemberian terapi.

Tabel 3.1 Kelompok Perlakuan

Nama Perlakuan	Bentuk Perlakuan
Kelompok Normal (A)	Tanpa infeksi dan tanpa pemberian fraksi metanol Bangle
Kelompok Negatif 1 (B)	Infeksi <i>P.berghei</i> dan tanpa pemberian fraksi metanol Bangle
Kelompok Negatif 2 (C)	Infeksi <i>P.berghei</i> + Artemisinin dosis 0,0364/gBB/hari
Kelompok Perlakuan (D)	Infeksi <i>P.berghei</i> + Artemisinin dosis 0,0364/gBB/hari + fraksi metanol Bangle dosis 0,017mg/gBB/hari
Kelompok Perlakuan (E)	Infeksi <i>P.berghei</i> + fraksi metanol Bangle dosis 0,017mg/gBB/hari

Pada penelitian ini dilakukan pengulangan pada tiap kelompok untuk mencegah adanya bias. Penghitungan besarnya pengulangan menggunakan rumus Federer (1977) sebagai berikut.

$(n-1)(p-1) \geq 15$  ( $p$  = jumlah perlakuan,  $n$ = jumlah ulangan), dengan  $p=4$  sehingga :

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$n-1 \geq 15/4$$

$$n-1 \geq 3.75$$

$$n \geq 4.75$$

Jadi minimal 5 pengulangan. Peneliti memilih jumlah lima dalam tiap perlakuan sehingga jumlah total yang digunakan adalah 25 ekor.

## 3.4 Variabel Penelitian

### 3.4.1 Variabel Bebas

1. Pemberian fraksi metanol Bangle dengan dosis 0,017mg/gBB mencit.
2. Pemberian Artemisinin dengan dosis 0,0364 mg/gBB/hari.

### 3.4.2 Variabel Terikat

1. Kadar BDNF serum.

### 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

### 3.5.1 Kadar BDNF

BDNF merupakan faktor neurotropin di otak yang dapat diukur melalui serum darah. Kadar BDNF diukur menggunakan *mouse BDNF sandwich enzyme immunoassay* kit tipe Cat E0013Mo dengan menggunakan ELISA kit *reader* pada hari terakhir perlakuan (setelah 24 jam) dinyatakan dalam satuan ng/ml. Darah mencit diambil intrakardial dan disentrifus untuk mendapatkan serum yang disimpan dalam suhu 4°C sebelum digunakan.

### 3.5.2 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 *P. falciparum*, Arterakin atau DHP (Dihydroartemisinin dan Piperakuin).

### 3.5.3 Fraksi metanol ekstrak metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)

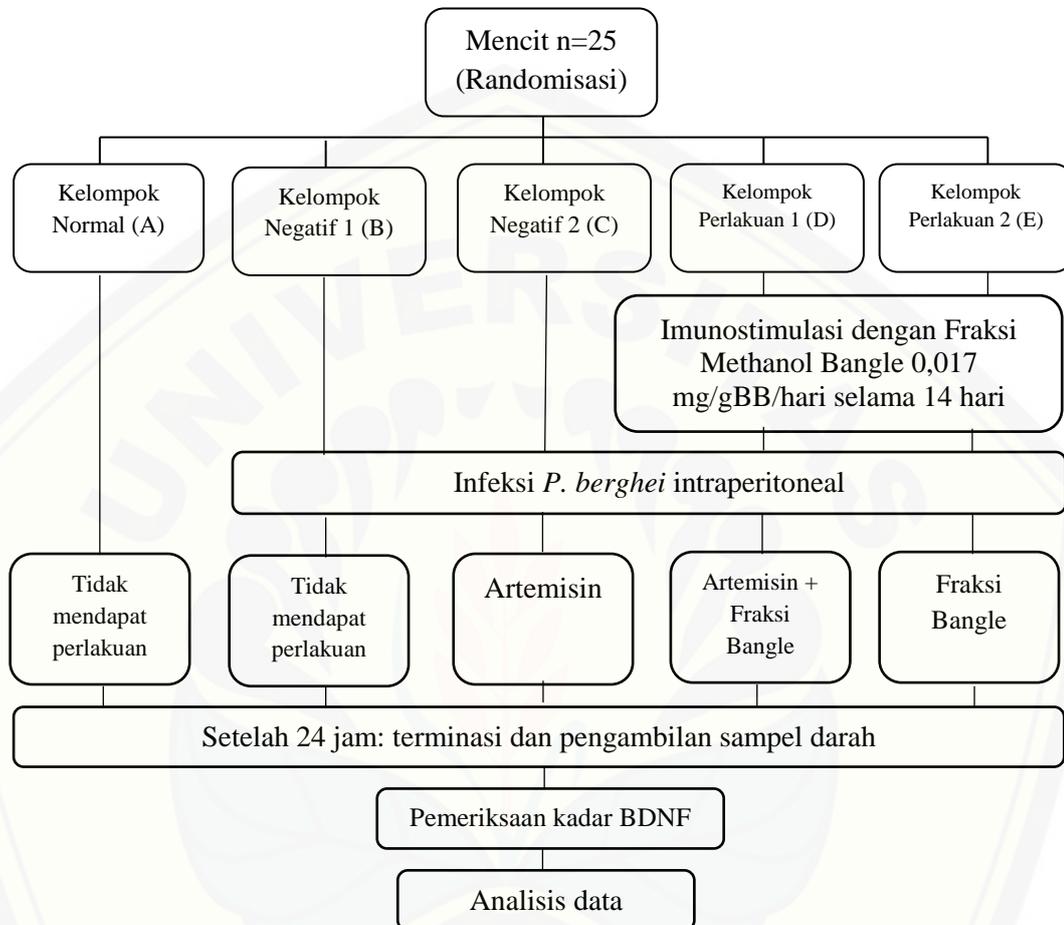
adalah rimpang Bangle yang diekstrak dengan menggunakan pelarut metanol menggunakan metode maserasi kemudian dipisahkan lagi menurut kepolaran suatu senyawa dengan fraksinasi menggunakan metode corong pisah dengan pelarut metanol pula sehingga didapatkan senyawa polar murni yang terkandung Bangle. Setiap kilogram Bangle kering akan didapatkan kurang lebih 10% ekstrak Bangle, dan setiap gram ekstrak Bangle akan didapatkan juga 10% fraksi Bangle.

### 3.5.4 Model malaria serebral

Mencit dinilai berdasarkan skor RMCBS (*Rapid Murine Coma and Behavior Scale*) yang dinyatakan positif jika bernilai 5-12 dalam kurun waktu 5-9 hari paska infeksi serta hapusan darah tipis dinyatakan positif malaria (Carroll *et al.*, 2010). Pemeriksaan dilakukan oleh dua orang dalam

satu waktu secara mandiri untuk mengurangi kesubjektifan. Hasil penilaian diambil rata-rata skor total.

### 3.6 Rancangan Penelitian



Gambar 3.1 Rancangan Penelitian

### 3.7 Alat dan Bahan

#### 3.7.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari penghalus rimpang Bangle, corong kaca *Buchner*, evaporator, rotavapor, dan beker kaca untuk proses ekstraksi rimpang Bangle. Fraksi metanol membutuhkan alat corong pisah ukuran 5 L dan 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 CO<sub>2</sub> 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), *P. berghei strain ANKA* yang diperoleh dari Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, fraksi metanol 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, *Phosphat Buffer Saline (PBS)*, *larutan Roswell Park memorial Institute (RPMI)*, pelarut fraksi DMSO, antikoagulan *EDTA*, *Giemsa*, kloroform, aquades steril, dan *object glass*.

## 3.8 Teknik Perolehan Data

### 3.8.1 Ekstraksi dan Fraksinasi 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 di Herbarium Jemberiense, Jurusan Biologi, MIPA Universitas Jember. Rimpang Bangle 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 dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 1 kg simplisia kering rimpang Bangle, dimaserasi dengan metanol 96% sebanyak 1 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 pasta kering.

Fraksinasi dilakukan dengan pelarut yang berbeda tingkat kepolarannya di dalam corong pisah. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar *n*-heksana sebanyak 5 x 150 ml, sehingga 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 sebanyak 7 x 150 ml 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 sebanyak 8 x 150 ml, sehingga diperoleh dua fraksi, yaitu fraksi metanol dan fraksi air. Fraksi metanol diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan fraksi kental metanol.

### 3.8.2 Perlakuan pada Hewan Coba

Stok darah terinfeksi *P. berghei* dari simpanan beku dicairkan pada suhu kamar. Darah tersebut disuntikkan pada mencit donor 100-200 µl secara intraperitoneal. Bila tingkat parasitemia mencit donor telah mencapai 20-30% maka dilakukan pengambilan darah secara intrakardial. Darah tersebut kemudian diencerkan dengan larutan fisiologis hingga diperoleh tingkat parasitemia  $10^8$  eritrosit terinfeksi parasit per ml. Sejumlah 0,2 ml larutan ini ( $2 \times 10^7$ ) diinjeksikan secara intraperitoneal ke kelompok mencit coba. Mencit yang telah di infeksi diamati setiap hari hingga ditemukan parasit malaria dalam darahnya.

Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standard *ad lib*. Sejumlah 25 ekor mencit Balb/C jantan dibagi dalam 5 kelompok masing-masing terdiri atas 5 ekor mencit (bagan rancangan penelitian diatas). Setelah diadaptasi selama 1 minggu, mencit kelompok perlakuan (D dan E) di stimulasi dengan masing-masing fraksi metanol Bangle selama 14 hari. Kemudian semua kelompok mencit coba kecuali kelompok perlakuan A diinfeksi *P. berghei* strain ANKA dengan volume 0,2 ml larutan donor ( $2 \times 10^7$ ).

a. Induksi Malaria *Plasmodium berghei* pada Mencit

Setelah 14 hari, semua kelompok dilakukan induksi malaria dengan cara injeksi intraperitoneal, induksi *P. berghei* pada hewan coba disebut inokulasi. Parasit malaria yang diinjeksikan adalah jenis *P. berghei* yang didapatkan dari mencit donor yang telah terinfeksi dari Laboratorium Parasitologi FK UB. 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 0,75 cc dengan menggunakan *sprit* 1 cc kemudian dimasukkan kedalam tabung EDTA. Darah yang sudah tercampur dengan EDTA kemudian diambil sebanyak 10 µl menggunakan mikro pipet dan dimasukkan ke dalam *eppendorf* berisi PBS 990 µl untuk melakukan pengenceran 100 kali. Campuran tersebut kemudian diambil 10 µl menggunakan mikro pipet untuk dimasukkan kedalam *eppendorf* kedua berisi PBS 990 µl 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.

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

- $\alpha$  : jumlah eritrosit  
 $\beta$  : pengenceran yang digunakan ( $10^4$ )  
 $\gamma$  : derajat parasitemia mencit donor  
K1 : konstanta ( $10^4$ )  
K2 : konstanta ( $5 \times 10^6$ )

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 larutan PBS 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. Larutan PBS 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.

#### b. Penilaian Malaria Serebral

Tikus dinilai menggunakan skor RMCBS (*Rapid Murine Coma and Behavioural Scale*) setiap 24 jam. Upaya dilakukan untuk menilai mencit pada waktu yang sama setiap hari. Darah sampel setiap hari diambil dari ujung ekor proses untuk mengukur derajat parasitemia melalui hapusan darah tipis dengan pewarnaan *Giemsa*. Tikus dengan skor RMCBS 5-12 dalam waktu 5-9 hari post infeksi memenuhi syarat model malaria serebral dan siap untuk dilakukan perlakuan selanjutnya (Carroll *et al.*, 2010). Terapi Artemisinin dan fraksi metanol dimulai setelah mencit memenuhi syarat tersebut. Regimen dosis Artemisinin yang diberikan secara peroral 0,0364 mg/gBB mencit/hari selama 24 jam (Fitri *et al.*, 2009). Jadi, dosis Artemisinin yang diberikan adalah 0,0364 mg per mencit selama 24 jam perlakuan.

#### c. Pemberian Terapi Komplementer

Fatmawati *et al.* (2014) melakukan penelitian uji efektivitas tiga macam fraksi Bangle dengan tiga macam dosis menunjukkan bahwa jenis dan dosis fraksi Bangle terbaik adalah fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dosis 0,017 mg/gBB mencit. Terapi Artemisinin juga diberikan sebagai terapi komplementer bersama fraksi metanol ekstrak metanol Bangle pada kelompok perlakuan setelah memenuhi definisi operasional model mencit malaria serebral.

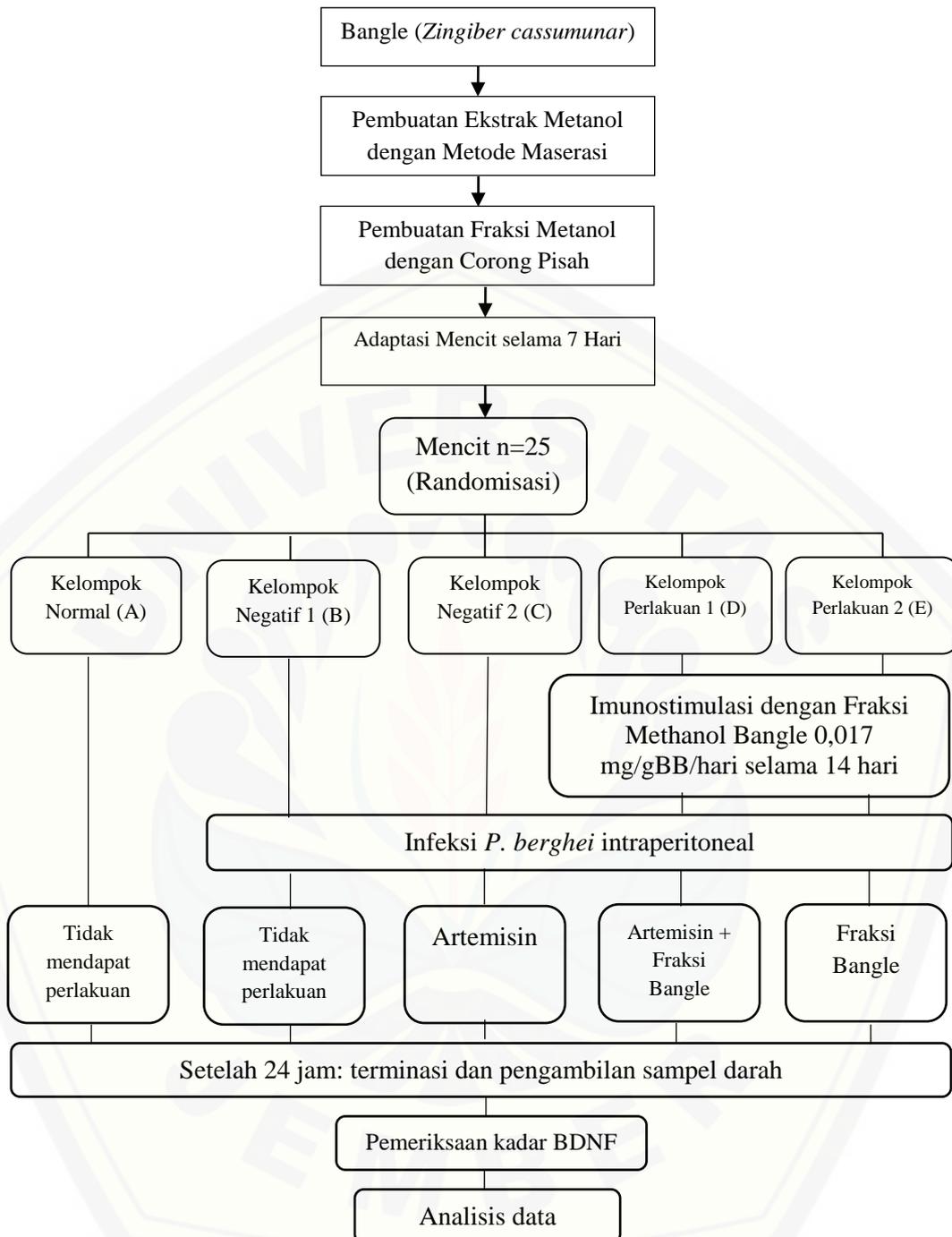
### 3.8.3 Pengukuran Kadar BDNF Serum dengan ELISA

Untuk sampel serum, darah dikumpulkan dalam wadah aditif bebas dan dibiarkan mengental untuk setidaknya 1 jam. Setelah sentrifugasi pada 3000 rpm selama 20 menit, serum dikumpulkan dan disimpan pada 4°C sampai analisis lebih lanjut. Untuk pengukuran BDNF konten dalam serum, sebuah *mouse* BDNF *Sandwich* ELISA kit sesuai dengan petunjuk yang diberikan oleh produsen. Secara singkat, 120 µl standar BDNF (12.8 ng/ml rekombinan BDNF manusia) yang diencerkan lima kali pada *mouse* BDNF 96 *well plates*. Masing-masing sampel sebanyak 40 µl, 10 µl antibodi dan 50 µl streptavidin-HRP ditambahkan ke dalam *well*. *Well* ditutup, dikocok, dan diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C. Kemudian, *well* dicuci dengan *washing solution* yang telah diencerkan. Proses *washing* diulang sebanyak lima kali. Anti BDNF antibodi akan berikatan dengan antibodi BDNF serta streptavidin-HRP membentuk kompleks imun. Akhirnya, setiap *well* ditambahkan 50 µl solution A dan 50 µl solution B untuk selanjutnya diinkubasi dalam gelap selama 10 menit hingga terjadi perubahan warna. Reaksi itu dihentikan dengan *stop solution* sebanyak 50 µl sehingga terjadi warna kuning dan absorbansi langsung diukur pada ELISA kit *reader* menggunakan panjang gelombang 450 nm. Kadar BDNF sampel dan standar dihitung dengan menggunakan kurva standar dan kadar dinyatakan setara dengan rekombinan protein BDNF manusia dalam standart.

### 3.9 Analisis Data

Data yang akan dianalisis berupa kadar BDNF serum. Perubahan kadar BDNF dinilai secara kuantitatif lalu analisis data yang dilakukan adalah uji normalitas dan uji varian. Jika sebaran data normal dan data varian sama ( $p > 0,05$ ), analisis data yang digunakan adalah *One Way Anova*. Namun, jika tidak sama ( $p < 0,05$ ) digunakan uji *Kruskal Wallis*. Selanjutnya digunakan uji *Post Hoc LSD* sebagai lanjutan *One Way Anova* dan *Mann Whitney* sebagai uji lanjutan *Kruskal Wallis* untuk menentukan perbedaan yang bermakna dalam tiap kelompok. Perbedaan tiap kelompok dinilai bermakna atau signifikan apabila nilai  $p < 0,05$ . Analisis statistik menggunakan program statistik SPSS versi 21.

### 3.10 Alur Penelitian



Gambar 3.2 Alur Penelitian

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Fraksi metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dapat mempengaruhi peningkatan kadar serum BDNF mencit sebagai terapi komplementer malaria serebral meskipun perbedaannya tidak signifikan secara statistik.

### 5.2 Saran

1. Perlu dilakukan pemeriksaan BDNF menggunakan metode lain yang lebih sensitif, seperti imunohistokimia untuk mendapatkan hasil yang lebih baik;
2. Perlu dilakukan pemeriksaan biomarker neurogenesis yang lain untuk menunjang hasil penelitian;
3. Perlu dilakukan skrining fitokimia serta isolasi senyawa aktif pada fraksi metanol ekstrak metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) untuk mengetahui secara rinci senyawa yang terkandung didalam fraksi yang dapat digunakan dalam terapi komplementer malaria serebral.

## DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, U. F. 2005. *Manajemen Penyakit Berbasis Wilayah*. Jakarta: Buku Kompas.
- Akhyar, Y. 2008. *Malaria*. Riau: Fakultas Kedokteran Universitas Riau. RSUD Arifin Achmad Pekanbaru.
- Annual Parasite Incidence (API)*. 2013. *Malaria Profile Indonesia*. <http://www.searo.who.int/entity/malaria/data/ino3.pdf>. [Diakses pada 25 Mei 2016].
- Arsunan, A. 2012. *Malaria di Indonesia Tinjauan Aspek Epidemiologi*. Makassar: Masegana Press.
- Barichello, T. dan E. Belarmino. Jr.. 2010. Correlation between behavioral deficits and decreased brain-derived neurotrophic factor in neonatal meningitis. *J Neuroimmunol*. 223: 73–76.
- Buffet, P. A., I. Safeukui, dan G. Dplaine. 2011. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in human. *Journal of the American Society of Hematology*. 117 (2): 381-392.
- Bekinschtein, P., M. Cammarota, C. Katche, L. Slipczuk, dan J. I. Rossato. 2008. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 105: 2711–2716.
- Berendt, A. R., G. D. H. Turner, dan C. I. Newbold. 1994. Cerebral malaria: the sequestration hypothesis. *Parasitol Today*. 10(10): 412–414.
- Carroll, R. W., M. S. Wainwright, K. Y. Kim, T. Kidambi, N. D. Gómez, T. Taylor, dan K. Haldar. 2010. A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS ONE*. 5(10): e13124.

- Chairul, P. dan S. M. Chairul. 2009. Phagocytosis effectivity test of phenylbutenoid compounds isolated from bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) rhizome. *Biodiversitas*. 10(1): 1-11.
- CDC. 2004. *Malaria, Anopheles Masquitoes*. National Center For Infectious Diseases, Division Of Parasitic Diseses.
- Chao, M. V. 2003. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Neurosci*. 4: 299–309.
- Chirangini, P., G. J. Sharma, dan S. K. Sinha. 2004. Sulfur free radical reactivity with curcumin as reference for evaluating antioxidant properties of medicinal zingiberales. *Journal of Environmental Pathology*. 23: 3.
- Cui, X., M. Chopp, A. Zacharek, R. Ning, X. Ding, C. Roberts, dan J. Chen. 2013. Endothelial nitric oxide synthase regulates white matter changes via the BDNF/trkb pathway after stroke in mice. PLOS.org DOI: 10.1371/journal.pone.0080358.
- Colegate, S. M dan R. J. Molyneux. 2007. *Bioactive Natural Products: Detection, Isolation, and Structural Determination*. Second Edition. CRC Press.
- Comim, C. M., P. A. Reis, V. S. Frutuoso, G. R. Fries, D. B. Fraga, F. Kapczinski, A. I. Zugno, T. Barichello, J. Quevedo, dan H. C. Castro-Faria-Neto. 2012. Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity [correction for acitivity] in the hippocampus of survivor mice. *Neurosci Lett*. 523(2): 104-7.
- Cotman, C. W., N. C. Berchtold, and L. A. Christie. 2007. Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Neurosciences*. 30(9): 464-472.
- Dalimartha, S. 2009. *Atlas Tumbuhan Indonesia*. Jilid 6. Jakarta: Pustaka Bunda.

- Damar, T. 2008. Mata Kuliah Pengendalian Vektor Nomenklatur, Klasifikasi dan Toxonomi Nyamuk. Semarang: Pasca Sarjana Undip.
- Depkes RI. 2003. *Epidemiologi Malaria*. Jakarta: Direktorat Jenderal PPM-PL, Departemen Kesehatan RI.
- Depkes RI. 2008. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*. Jakarta: Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan.
- Depkes RI. 2012. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*. Jakarta: Departemen Kesehatan Direktorat Jenderal P2PL.
- De Souza, J. B. dan E. M. Riley. 2002. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. *Microbes Infect.* 4:291-300.
- Djauzi, S. 2003. Perkembangan Imu-nomodulator. *Simposium Peranan Echinacea sebagai Imunomodulator dalam Infeksi Virus dan Bakteri*. 23 Juni 2003.
- Dong, S., Q. Zeng, E. S. Mitchell, J. Xiu, Y. Duan, C. Li, J. K. Tiwari, Y. Hu, X. Cao, dan Z. Zhao. 2012. Curcumin enhances neurogenesis and cognition in aged rats: implications for transcriptional interactions related to growth and synaptic plasticity. *PLoS ONE*. 7(2): e31211.
- Fatmawati, H., W. S. Utami, dan B. Hermansyah. 2014. Pengembangan Obat Herbal Terstandar Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terhadap Ekspresi ICAM-1 dan Kadar IL-10 sebagai Terapi Komplementer untuk Mencegah Komplikasi pada Malaria. Tidak Diterbitkan. Makalah. Jember: Lembaga Penelitian Universitas Jember.
- Fitri, L. E., H. Rosyidah, N. P. Sari, dan A. T. Endarti. 2009. Effect of n-acetyl cysteine administration to the degree of parasitemia and plasma interleukin-12 level of mice infected with *Plasmodium berghei* and treated with artemisinin. *Med J Indonesia*. 18(1): 23-30.

- Franco-Robles, E., A. Campos-Cervantes, B. O. Murillo-Ortiz, J. Segovia, S. López-Briones, P. Vergara, V. Pérez-Vázquez, M. S. Solís-Ortiz, dan J. Ramírez-Emiliano. 2014. Effects of curcumin on brain-derived neurotrophic factor levels and oxidative damage in obesity and diabetes. *Appl Physiol Nutr Metab.* 39(2):211-8.
- Gardner, M. J., N. Hall, E. Fung, M. Berriman, R. W. Hyman, J. M. Carlton, A. Pain, K. E. Nelson, S. Bowman, I. T. Paulsen, K. James, J. A. Eisen, K. Rutherford, S. L. Salzberg, A. Craig, S. Kyes, M. Chan, V. Nene, S. J. Shallom, B. Suh, J. Peterson, S. Angiuoli, M. Pertea, J. Allen, J. Selengut, D. Haft, M. W. Mather, dan A. B. Vaidya. 2002. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Nature.* 419(6906): 498.
- Garnham, P. C. C. 1965. The structure of early sporogonic stages of *Plasmodium berghei*. *Ann Soc belge Med trop.* 45(3): 259-266.
- Gingras, B. A. and J. B. Jensen. 1993. Antimalarial activity of azithromycin and erythromycin against *Plasmodium berghei* in mice. *J. Trp. Med. Hyg.* 49: 101-105.
- Hadidjaja, P. 1994. *Penuntun Praktikum Parasitologi Kedokteran*. Jakarta : FKUI.
- Hanani, E., J. A. Kawira, dan C. Dilanka. 2000. Pola Kromatogram Lapis Tipis dan Gas Cair Rimpang dan Akar *Zingiber cassumunar*. *Makalah pada Kongres Nasional Obat Tradisional Indonesia*. Surabaya, 20-22 September 2000.
- Harijanto, N. dan C. A. Gunawan. 2009. *Malaria dari Molekuler ke Klinis*. Jakarta: Buku Kedokteran EGC.
- Hunt, N. H., G. E. Grau, C. Engwerda, S. R. Barnum, dan H. Heyde. 2010. Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol.* 26: 272–274.
- Hollman, P. C. H, M. G. L. Hertog, dan M. B. Katan. 1996. Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry.* 57 (1): 43-46.

- Jiao, Y., J. Wen, dan Yux. 2004. Influence of flavanoid of astragalus membranaceus' stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice. Heilongjiang University. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. [Diakses pada 24 Agustus 2016].
- Kakkilaya, B. S. Central nervous system involvement in *P. falciparum* malaria. [www.malariasite.com](http://www.malariasite.com). [Diakses pada 15 September 2016].
- Kemenkes RI. 2011. *Buletin Malaria: Epidemiologi Malaria di Indonesia*. Triwulan I, p 1-17. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Kemenkes RI. 2013. *Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas 2013)*. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
- Langhorne, J., F. M. Ndungu, A. M. Sponas, dan K. Marsh. 2008. Immunity to malaria : more question than answer. *Natur Immunology*. 9 (7): 725-732.
- Latifu, A. S., C. Rae, A. Maitland, R. Stocker, dan N. H. Hunt. 2001. Is ischemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria?. *The American Journal of Pathology*. 159: 1105–1112.
- Lee, K. S., J. Kim, dan S. N. Kwak. 2014. Functional role of NF- $\kappa$ B in expression of human endothelial nitric oxide synthase. *Biochem Biophys Res Commun*. 452(1):209-10.
- Leiden University Medical Center (LUMC). 2015. Life cycle of *P. berghei*. <https://www.lumc.nl/org/parasitologie/research/malaria/berghei-model/life-cycle-berghei/?setlanguage=English&setcountry=en>. [Diakses pada 17 September 2016].
- Linares, M., P. Marin-Garcia, dan Perez-Benavente. 2013. Brain-Derived Neurotrophic Factor and the course of experimental cerebral malaria. *Brain Res*. 1490: 210–224.
- Lubis, H. N. 2005. Malaria Serebral Ringan. *Dexa Media*. 18(2):45-9.

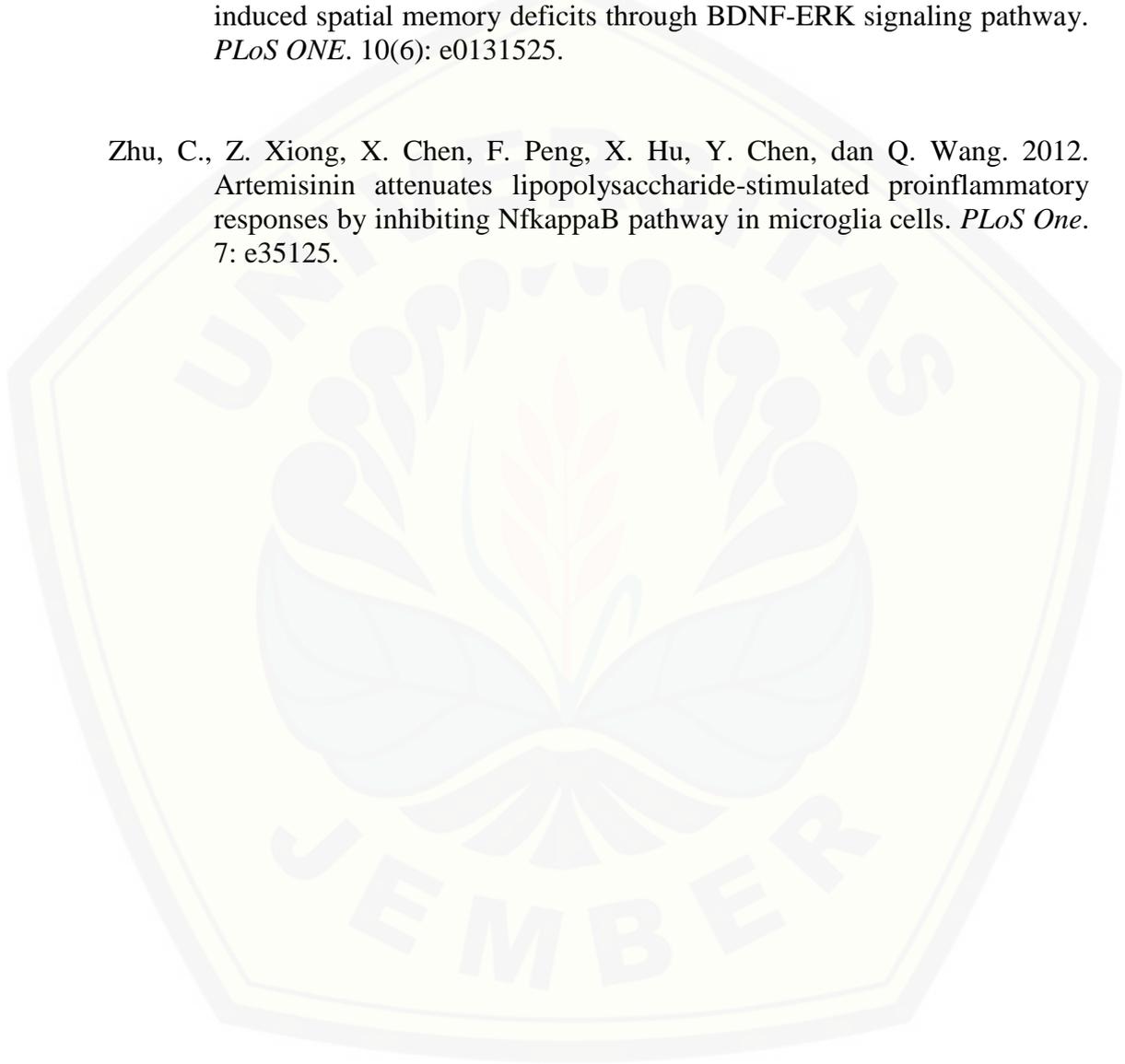
- Mimche, P. N., D. Taramelli, dan L. Vivas. 2011. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. *Malaria Journal*. 10(Suppl 1): S10.
- Munthe, C. E. 2001. Malaria serebral: Laporan Kasus. *Cermin Dunia Kedokteran*. 131: 5-6.
- Murer, M. G., Q. Yan, dan R. Raisman-Vozari. 2001. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog. Neurobiol.* 63, 71–124.
- Putera, H. D. 2002. Malaria serebral (Komplikasi): Suatu penyakit imunologis. Kalimantan Selatan: Laboratorium Parasitologi FK Universitas Lambung Mangkurat.
- Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 5 Tahun 2013. *Pedoman Tata Laksana Malaria*. [http://pppl.depkes.go.id/\\_asset/\\_regulasi/65\\_PMK%20No.%205%20ttg%20Pedoman%20Tata%20Laksana%20Malaria.pdf](http://pppl.depkes.go.id/_asset/_regulasi/65_PMK%20No.%205%20ttg%20Pedoman%20Tata%20Laksana%20Malaria.pdf) . [Diakses tanggal 13 September 2016].
- Raharjo, A., W. Ekasari, dan A. F. Hafid. 2014. Uji aktivitas antimalaria ekstrak air daun johar (*Cassipourea lamk*) terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo*. *Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. 1:1.
- Serghides, L., C. R. McDonald, Z. Lu, M. Friedel, C. Cui, K. T. Ho, H. T. J. Mount, J. G. Sled, dan K. C. Kain. 2014. PPAR $\gamma$  agonists improve survival and neurocognitive outcomes in experimental cerebral malaria and induce neuroprotective pathways in human malaria. *PLOS.org* DOI: 10.1371/journal.ppat.1003980.
- Sukara, E. 2000. Sumber Daya Alam Hayati dan Pencarian Bahan Baku Obat (Bioprospekting). *Prosiding Simposium Nasional II Tumbuhan Obat dan Aromatik*. Puslitbang Biologi-LIPI Bogor: 31-37.

- Susanna. 2005. Dinamika Penularan Malaria di Ekosistem Persawahan, Perbukitan dan Pantai (Studi di Kabupaten Jepara, Purwokerto dan Kota Batam), *Disertasi*. Depok: IKM. PS-FKM-UI.
- Shi, Q., P. Zhang, dan J. Zhang. 2009. Adenovirus-mediated brain-derived neurotrophic factor expression regulated by hypoxia response element protects brain from injury of transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci Lett*. 465: 220–225.
- Skaper, S. D. 2012. The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Methods Mol Biol*. 846: 1–12.
- Suryawati, S. Dan H. Suprpti. 2007. Efek anti malaria ekstrak brotowali (*Tinospora crispa*) pada mencit yang di infeksi *Plasmodium berghei*. *Jurnal Wijaya Kusuma*. 1(1): 13-22.
- Syukur, Cheppy, dan Hernani. 2001. *Budidaya Tanaman Obat Komersial*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- WHO. 2011. Malaria. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. [Diakses pada 30 Desember 2011].
- WHO. 2015. Malaria. <http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report-2015/report/en/>. [Diakses pada 28 Mei 2016].
- Wijayakusuma, H. M. H, S. Dalimarta, dan A. S. Wirian. 1997. *Tanaman Berkhasiat Obat di Indonesia*. Jakarta: Pustaka Kartini.
- Weller, P. F. 2004. *Protozoan Infection: Malaria Infection Disease: The Clinician's Guide to Diagnosis, Treatment, and Prevention*. New York: Dale DC.
- Yawan, S. F. 2006. Analisis Faktor Risiko Kejadian Malaria di Wilayah Kerja Puskesmas Bosmik Kecamatan Biak Timur Kabupaten Biak-Numfor Papua. *Tesis*. Semarang: Universitas Diponegoro.

Zhang, W., I. Potrovita, dan V. Tarabin. 2005. Neuronal activation of NF- $\kappa$ B contributes to cell death in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 25(1): 30-40.

Zhang, L., Y. Fang, Y. Xu, Y. Lian, N. Xie, T. Wu, H. Zhang, L. Sun, R. Zhang, dan Z. Wang. 2015. Curcumin improves amyloid  $\beta$ -peptide (1-42) induced spatial memory deficits through BDNF-ERK signaling pathway. *PLoS ONE.* 10(6): e0131525.

Zhu, C., Z. Xiong, X. Chen, F. Peng, X. Hu, Y. Chen, dan Q. Wang. 2012. Artemisinin attenuates lipopolysaccharide-stimulated proinflammatory responses by inhibiting NfkappaB pathway in microglia cells. *PLoS One.* 7: e35125.



## LAMPIRAN

## LAMPIRAN 3.1 Persetujuan Etik Penelitian



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI DAN PENDIDIKAN TINGGI

UNIVERSITAS JEMBER

KOMISI ETIK PENELITIAN

Jl. Kalimantan 37 Kampus Bumi Tegal Boto Telp/Fax (0331) 337877 Jember 68121 – Email :  
fk\_unej@telkom.net**KETERANGAN PERSETUJUAN ETIK**  
*ETHICAL APPROVA*

Nomor : 974 /H25.1.11/KE/2016

Komisi Etik, Fakultas Kedokteran Universitas Jember dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

*The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Jember University, With regards of the protection of human rights and welfare in medical research, has carefully reviewed the proposal entitled :*

**PENGARUH PEMBERIAN FRAKSI METANOL BANGLE (*Zingiber cassumunar Roxb.*) TERHADAP KADAR SERUM BDNF MENCIT SEBAGAI TERAPI KOMPLEMENTER MALARIA SEREBRAL**

Nama Peneliti Utama : Cicik Tri Juliani (NIM. 132010101039)  
*Name of the principal investigator*

Nama Institusi : Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
*Name of institution*

Dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.  
*And approved the above mentioned proposal.*

Jember, 12 Oktober 2016  
  
Kiri Riyanti, Sp.PK

### LAMPIRAN 4.1 Hasil Identifikasi Tanaman Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.)



KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Jl. Kalimantan 37 Jember Jawa Timur  
Telp 0331-330225

#### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 2.6.08/UN25.1.9/TU/2016

Berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Herbarium Jemberiense, Laboratorium Botani dan Kultur Jaringan, Jurusan Biologi, FMIPA, Universitas Jember oleh :

Nama/NIM : Asis Fitriana/132010101005  
Pudyo Kriswardani/132010101028  
Cicik Tri Juliani/ 132010101039  
Jur./Fak./PT : F. Kedokteran / Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut adalah :

*Zingiber montanum* (J.König) Link ex A.Dietr. {Syn. *Amomum cassumunar* (Roxb.) Donn; *Amomum montanum* J.König; *Amomum xanthorrhiza* Roxb. ex Steud.; *Cassumunar roxburghii* Colla; *Jaegera montana* (J.König) Giseke; *Zingiber anthorrhiza* Horan.; *Zingiber cassumunar* Roxb.; *Zingiber cliffordiae* Andrews; *Zingiber luridum* Salisb.; *Zingiber purpureum* Roscoe; *Zingiber xanthorrhizon* Steud. ; Family – Zingiberaceae; Vernacular name –; Bangle (Ind.)}

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 4 Oktober 2016

Ketua Laboratorium

Mengetahui,  
Dibantu Dekan I,  


Drs. Achmad Sjaifullah, M.Sc, Ph.D.  
NIP 195910091986021001



Dra. Dwi Setyati, M.Si  
NIP. 19640417199103200

**LAMPIRAN 4.2 Hasil Analisis Kadar Serum BDNF Mencit**Tabel hasil uji normalitas *Saphiro Wilk*

NamaKelompok	Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
KadarBDNF Kelompok A	.273	5	.200 <sup>*</sup>	.925	5	.565
Kelompok B	.217	5	.200 <sup>*</sup>	.903	5	.427
Kelompok C	.258	5	.200 <sup>*</sup>	.910	5	.469
Kelompok D	.207	5	.200 <sup>*</sup>	.942	5	.683
Kelompok E	.206	5	.200 <sup>*</sup>	.931	5	.606

Tabel hasil uji varian *Levene Test*

KadarBDNF

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.222	4	20	.103

Tabel hasil analisis *One Way Anova*

KadarBDNF

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.805E7	4	9513135.360	1.440	.257
Within Groups	1.321E8	20	6605162.240		
Total	1.702E8	24			

**LAMPIRAN 4.3 Hasil Perhitungan Derajat Parasitemia**

## 4.3.1 Kelompok B

Replikasi ke-	Hari ke- (Setelah Positif Malaria Serebral)		
	1	2	3
B1	3,2	6,9	14,3
B2	4	7,6	16,4
B3	3	10,9	11,4
B4	7,6	12,2	19,2
B5	5,9	10,6	5,6
mean±SD	4,20±1,966	8,37±2,28	11,98±5,20

## 4.3.2 Kelompok C

Replikasi ke-	Hari ke- (Setelah Positif Malaria Serebral)		
	1	2	3
C1	12,69	12,7	5,2
C2	10,69	9,4	3,1
C3	3,9	3,96	4
C4	5,7	7,4	9,6
C5	3,6	7,1	0,2
mean±SD	7,32±4,13	8,11±3,22	4,42±3,43

## 4.3.3 Kelompok D

Replikasi ke-	Hari ke- (Setelah Positif Malaria Serebral)		
	1	2	3
D1	10,4	8,6	2,3
D2	10,1	7,3	2
D3	4,1	3,2	1,6
D4	1,77	3,52	3,2
D5	0,8	3,2	8,1
mean±SD	5,43±4,56	5,16±2,59	3,44±2,67

## 4.3.4 Kelompok E

Replikasi ke-	Hari ke- (Setelah Positif Malaria Serebral)		
	1	2	2

E1	3,8	8,45	9,4
E2	0,4	1,5	3,7
E3	3,8	13,4	22,6
E4	4,3	4,7	20,3
E5	8	10,8	13,9
mean±SD	4,06±2,70	7,77±4,75	13,98±7,76

#### 4.3.5 Tabel rata-rata derajat parasitemia mencit

Kelompok	Rata-rata Derajat Parasitemia (%) Hari ke-		
	1	2	3
Kelompok Negatif 1 (B)	4,20	8,37	11,98
Kelompok Negatif 2 (C)	7,32	8,11	4,42
Kel. Perlakuan 1 (D)	5,43	5,16	3,44
Kel. Perlakuan 2 (E)	4,06	7,77	13,98

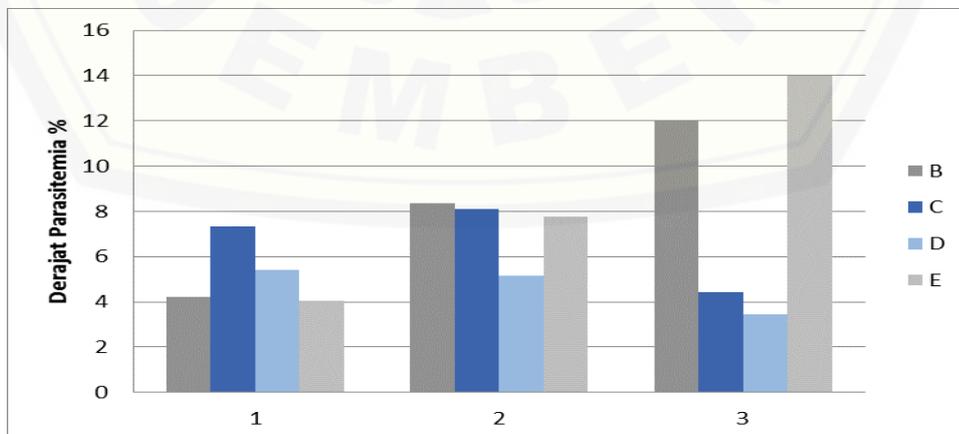
Kelompok Negatif 1 (B) : Infeksi *P.berghei* dan tanpa pemberian fraksi metanol Bangle

Kelompok Negatif 2 (C) : Infeksi *P.berghei* + Artemisinin dosis 0,0364/gBB/hari

Kelompok Perlakuan (D) : Infeksi *P.berghei* + Artemisinin dosis 0,0364/gBB/hari + fraksi metanol Bangle dosis 0,017mg/gBB/hari

Kelompok Perlakuan (E) : Infeksi *P.berghei* + fraksi metanol Bangle dosis 0,017mg/gBB/hari

#### 4.3.6 Grafik rata-rata derajat parasitemia mencit



## 4.3.7 Tabel rata-rata pertumbuhan parasit

Kelompok	Rerata Pertumbuhan Parasit (mencit ke-)					Rata-rata±st. deviasi
	1	2	3	4	5	
Kelompok Negatif 1 (B)	1.73	5.55	6.20	4.20	5.80	3.89±1.82
Kelompok Negatif 2 (C)	-3.75	-3.80	0.05	1.95	-1.70	-1.45±2.48
Kel. Perlakuan 1 (D)	-4.05	-4.05	-1.25	0.72	3.65	-0.997±3.29
Kel. Perlakuan 2 (E)	2.80	1.65	9.40	8.00	2.95	4.96±3.49

Rumus rata-rata pertumbuhan parasit =  $\frac{P(d3-d2) + P(d2-d1)}{\text{Jumlah hari} - 1}$

$P(d_x - d_{x-1})$  : derajat parasitemia hari x dikurangi derajat parasitemia hari sebelumnya

(Raharjo *et al.*, 2014)

**LAMPIRAN 4.4 Hasil Analisis Data Rata-rata Pertumbuhan Parasit**

Tabel hasil uji normalitas *Saphiro Wilk*

		Kolmogorov-Smirnov <sup>a</sup>			Shapiro-Wilk		
Nama Kelompok		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Rerata_Pertumbuhan	Kelompok B	.281	5	.200 <sup>*</sup>	.850	5	.196
	Kelompok C	.223	5	.200 <sup>*</sup>	.910	5	.466
	Kelompok D	.223	5	.200 <sup>*</sup>	.909	5	.460
	Kelompok E	.318	5	.110	.844	5	.177

a. Lilliefors Significance Correction

\*. This is a lower bound of the true significance.

Tabel hasil uji varian *Levene Test*

Rerata_Pertumbuhan			
Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.637	3	16	.220

Tabel hasil analisis *One Way Anova*

Rerata_Pertumbuhan					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	183.791	3	61.264	7.553	.002
Within Groups	129.787	16	8.112		
Total	313.577	19			

Tabel hasil analisis *Post Hoc LSD*

		Rerata_Pertumbuhan LSD				
(I) Nama_Kelompok	(J) Nama_Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kelompok B	Kelompok C	6.14600 <sup>*</sup>	1.80129	.004	2.3274	9.9646
	Kelompok D	5.69300 <sup>*</sup>	1.80129	.006	1.8744	9.5116
	Kelompok E	-.26400	1.80129	.885	-4.0826	3.5546
Kelompok C	Kelompok B	-6.14600 <sup>*</sup>	1.80129	.004	-9.9646	-2.3274
	Kelompok D	-.45300	1.80129	.805	-4.2716	3.3656
	Kelompok E	-6.41000 <sup>*</sup>	1.80129	.003	-10.2286	-2.5914
Kelompok D	Kelompok B	-5.69300 <sup>*</sup>	1.80129	.006	-9.5116	-1.8744
	Kelompok C	.45300	1.80129	.805	-3.3656	4.2716
	Kelompok E	-5.95700 <sup>*</sup>	1.80129	.004	-9.7756	-2.1384
Kelompok E	Kelompok B	.26400	1.80129	.885	-3.5546	4.0826
	Kelompok C	6.41000 <sup>*</sup>	1.80129	.003	2.5914	10.2286
	Kelompok D	5.95700 <sup>*</sup>	1.80129	.004	2.1384	9.7756

\*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

**LAMPIRAN 4.5 Hasil Perhitungan Skor RMCBS**

Skor RMCBS Hari ke- <i>days post infection</i>						
Mencit	V	VI	VII	VIII	IX	X
B1	17	15	11	9	8	
B2	15	19	17	11	10	7
B3	19	7	5	4		
B4	17	12	7	5		
B5	18	9	9	5		
C1	19	19	15	12	11	11
C2	20	18	16	12	14	10
C3	17	12	12	9		
C4	12	12	9			
C5	16	12	10	7		
D1	16	16	15	12	14	8
D2	17	9	10	9		
D3	17	16	7	6	4	
D4	14	11	13	10		
D5	6	5	5			
E1	19	19	6	5	4	
E2	17	16	12	14	10	
E3	17	11	9	7		
E4	19	8	5	4		
E5	18	15	10	9	6	

 = hari dimulainya pemberian perlakuan pada masing masing kelompok

**LAMPIRAN 4.6 Dokumentasi Kegiatan Penelitian**

## 4.6.1 Proses ekstraksi dan fraksinasi



Pembuatan simplisia Bangle

Penimbangan simplisia Bangle



Pengadukan simplisia+metanol 96%

Perendaman selama 24 jam



Penyaringan maserat dengan corong Buchner



Penguapan dengan Rotary Evaporator



Hasil kental ekstrak metanol



Penimbangan berat ekstrak yang diperoleh



Pengukuran pelarut fraksi



Pencampuran pelarut fraksi dan ekstrak metanol Bangle



Fraksinasi metode corong pisah



Proses pengendapan fraksinasi

4.6.2 Proses inokulasi *P. berghei*



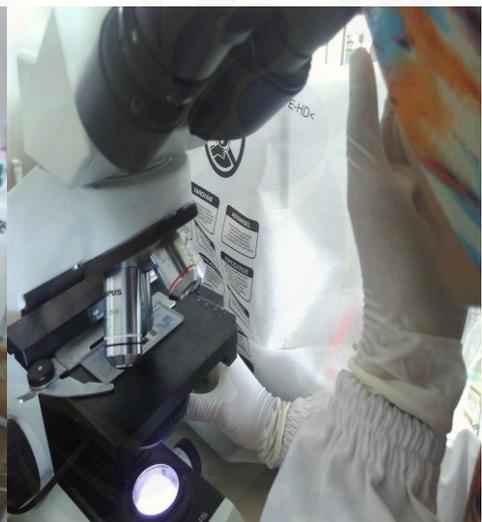
Pembedahan mencit donor



Pengambilan darah mencit donor intrakardial



Penyimpanan darah untuk diencerkan



Pemeriksaan jumlah eritrosit dengan hematositometer

4.6.3 Proses pembuatan hapusan darah tipis



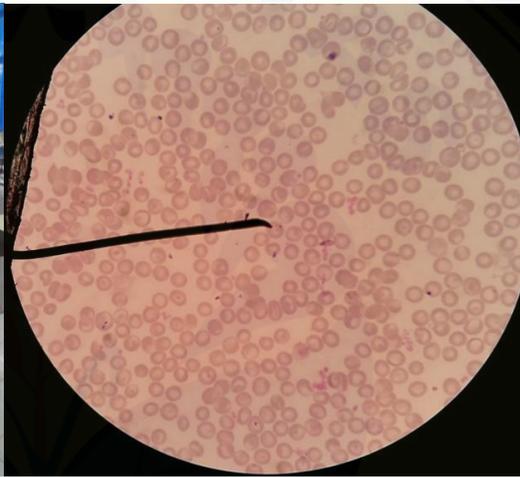
Pengambilan darah vena ekor



Pemwarnaan hapusan dengan *Giemsa*



Pemeriksaan derajat parasitemia



Gambaran hapusan darah tipis (1000x)

4.6.4 Proses pengukuran kadar serum BDNF mencit



Pengambilan darah mencit intrakardial



Pembuatan serum darah (sentrifus)



Pemisahan serum dan sel darah

Pemeriksaan serum BDNF



Pereaksian dengan BDNF Elisa kit

Running Elisa BDNF serum