

## Pengaruh Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) terhadap Kadar TNF- $\alpha$ pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* (*The Effect of Bangle Extract (Zingiber cassumunar Roxb.) on TNF- $\alpha$ in mice infected with Plasmodium berghei*)

Pungky Setya Arini, Wiwien Sugih Utami, Erma Sulistyaningsih  
Fakultas Kedokteran Universitas Jember  
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121  
e-mail: ps.arini03@gmail.com

### Abstract

Malaria is an infectious disease caused by *Plasmodium spp.* Death in malaria is resulting from the parasite's resistance to malaria drugs and immune system problem. This study was conducted to determine the immunostimulant activity of bangle extract (*Zingiber cassumunar Roxb.*) in mice infected with *Plasmodium berghei*. Mice were divided into 5 groups; negative control group [K(-)], positive control group [K(+)] and 3 treatment groups (P1, P2, P3). All groups except K(-) were infected with *P. berghei*, P1 was treated with Bangle ethanolic extract 0,904 mg/gBW, P2 was given with Bangle ethanolic extract 0,904 mg/gBW and artemisinin 0,0364 mg/gBW, P3 was treated with artemisinin 0,0364 mg/gBW. After 4 days treatment, blood TNF- $\alpha$  from intracardial was measured. The result showed that TNF- $\alpha$  of P1, P2, P3, K(+) and K(-) were  $77,46 \pm 33,96$  pg/ml,  $55,08 \pm 15,19$  pg/ml,  $85,56 \pm 22,43$  pg/ml,  $102,81 \pm 61,76$  pg/ml,  $41,29 \pm 2,28$  pg/ml, respectively. The Mann-Whitney test showed  $p$  value  $\geq 0,05$ . In conclusion, *Zingiber cassumunar Roxb.* extract had no effect on TNF- $\alpha$  of *P. berghei*-infected mice.

**Keywords:** immunostimulant, *Zingiber cassumunar Roxb.*, TNF- $\alpha$

### Abstrak

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh *Plasmodium spp.* Kematian pada malaria disebabkan oleh parasit yang resisten terhadap obat antimalaria dan permasalahan sistem imun. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas imunostimulan ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Mencit dibagi dalam 5 kelompok; kontrol negatif [K(-)], kontrol positif [K(+)], dan kelompok perlakuan (P1, P2, P3). Semua kelompok kecuali K(-) diinfeksi *Plasmodium berghei*, P1 diberi ekstrak *Zingiber cassumunar Roxb.* 0,904 mg/gBB, P2 diberi ekstrak *Zingiber cassumunar Roxb.* 0,904 mg/gBB dan artemisinin 0,0364 mg/gBB, P3 diberi artemisinin 0,0364 mg/gBB. Setelah 4 hari perlakuan, mencit dinarkose menggunakan kloroform dan diambil darah secara *intracardial*. Rerata kadar TNF- $\alpha$  serum kelompok P1, P2, P3, K(+), dan K(-) adalah  $77,46 \pm 33,96$  pg/ml,  $55,08 \pm 15,19$  pg/ml,  $85,56 \pm 22,43$  pg/ml,  $102,81 \pm 61,76$  pg/ml, dan  $41,29 \pm 2,28$  pg/ml. Hasil analisis statistik menggunakan uji Mann-Whitney menunjukkan nilai  $p \geq 0,05$ . Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *Zingiber cassumunar Roxb.* tidak mempengaruhi kadar tumour necrosis factor-alpha pada mencit yang diinfeksi *P. berghei*.

**Kata kunci:** imunostimulan, *Zingiber cassumunar Roxb.*, TNF- $\alpha$

## Pendahuluan

Malaria ditemukan hampir di seluruh bagian dunia dan merupakan penyakit yang sampai saat ini masih menjadi masalah utama kesehatan penduduk dunia. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa berdasarkan *World malaria report* tahun 2011, pada tahun 2010 kasus malaria di dunia mencapai 216 juta dan diperkirakan 655 ribu orang meninggal [1]. Di Indonesia penyakit malaria masih ditemukan pada semua provinsi dengan stratifikasi malaria tinggi (berdasarkan *Annual Parasite Incidence/API*) di wilayah Indonesia bagian Timur [2].

Pada malaria berat terjadi overproduksi sitokin pro-inflamasi seperti *Tumour Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), *Interleukin-1* (IL-1), *Interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ) dan radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI), *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), *Nitric Oxide* (NO) oleh sel-sel fagosit dan sel endotel yang teraktivasi. Pengeluaran mediator di atas sebenarnya bertujuan untuk membunuh parasit, namun karena sifat radikal bebas yang tidak spesifik dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitarnya [3]. Hasil penelitian menunjukkan tingginya konsentrasi TNF- $\alpha$  di serum berkaitan dengan progresivitas malaria otak [4]. Kadar TNF- $\alpha$  yang tinggi mengakibatkan sel-sel endotel pembuluh darah mengekskresikan reseptor yang dapat berikatan dengan ligan-ligan pada eritrosit terinfeksi sehingga terjadi sitoaderen (perlekatan eritrosit terinfeksi pada sel endotel) dan sekuestrasi. *Tumour Necrosis Factor-alpha* juga menyebabkan eritrosit terinfeksi berikatan dengan eritrosit lain yang disebut dengan roseting. Sitoaderen dan roseting merupakan dasar patogenesis utama terjadinya komplikasi fatal pada malaria sehingga TNF- $\alpha$  mempunyai peranan penting dalam patomekanisme malaria berat [5].

Pemberantasan penyakit malaria semakin sulit karena adanya resistensi parasit terhadap obat antimalaria dan gangguan sistem imun. Oleh sebab itu, pemanfaatan senyawa-senyawa kimia dari tumbuh-tumbuhan dapat digunakan sebagai alternatif meningkatkan aktivitas sistem imun. Salah satu senyawa kimia pada tumbuhan yang telah terbukti sebagai imunomodulator dan dapat meningkatkan ekspresi CD36 pada monosit atau makrofag yang memediasi terjadinya fagositosis secara non-opsonisasi adalah kurkumin [6].

Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*), mengandung berbagai komponen kimia

penyusun minyak atsirinya (monoterpen dan seskuiterpen) yang umumnya tersari kedalam fraksi heksana, selain itu juga mengandung senyawa lain seperti flavonoid, kurkumin, diterpenoid, fenolik pada fraksi etilasetat, polisakarida ( $\alpha$ - dan  $\beta$ - glukukan) pada fraksi metanol/air. Beberapa komponen bioaktif yang berasal dari alam mempunyai efek pleiotropik (mempunyai beragam efek fisiologis) [7].

Secara empirik bangle sudah sering dipergunakan orang sebagai minuman yang dapat untuk meningkatkan kekebalan tubuh, tapi belum pernah dibuktikan efektivitasnya pada kasus-kasus infeksi kronik seperti malaria. Oleh karena itu, ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) mempunyai potensi untuk dikembangkan sebagai terapi ajuvan baru yang diharapkan dapat mencegah terjadinya komplikasi malaria yang berakibat fatal. Dalam hal ini penggunaan ekstrak lebih ekonomis dan lebih praktis dibandingkan dengan fraksinya ataupun isolatnya sehingga dapat menekan biaya produksi apabila ekstrak ini memiliki aktivitas dan akan dipergunakan oleh masyarakat. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi *Zingiber cassumunar Roxb.* sebagai imunostimulan untuk pencegahan komplikasi malaria dengan parameter kadar TNF- $\alpha$  pada serum mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

## Metode Penelitian

Jenis Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental laboratories* dengan rancangan *posttest only control group design*. Penelitian ini telah mendapatkan ijin dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember.

Populasi penelitian ini adalah mencit Balb/C karena strain ini dapat menimbulkan respon imunitas pada infeksi *Plasmodium berghei* dengan kriteria inklusi berat badan 20-30 gram dan berumur 2-3 bulan. Parasit *Plasmodium berghei* strain ANKA diperoleh dari laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

Bahan yang digunakan adalah rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*). Bahan didapat dari Sentra Tanaman Obat, Andongrejo, Merubetiri, Jember yang telah diidentifikasi di Herbarium Jemberiense, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember. Rimpang bangle setelah dicuci bersih, kemudian dipotong-potong kecil, selanjutnya diangin-anginkan. Potongan kecil rimpang bangle

dikeringkan dalam alat oven bersuhu tidak lebih dari 50°C, selama 4 hari 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 bangle dilakukan dengan cara perkolasi. Serbuk bangle sebanyak 600 g dibasahi dengan 300 ml etanol, lalu dimasukkan ke dalam bejana tertutup dan dibiarkan selama 3 jam. Filtrat sedikit demi sedikit dituangkan ke dalam perkolator sambil ditekan perlahan-lahan. Larutan etanol secukupnya ditambahkan ke dalam perkolator sampai cairan menetes dan di atas serbuk masih terdapat larutan etanol. Perkolator ditutup dan dibiarkan selama 24 jam. Cairan filtrat dibiarkan menetes dengan kecepatan 1ml per menit. Larutan etanol secukupnya ditambahkan berulang-ulang ke dalam perkolator agar selalu terdapat larutan etanol di atas permukaan simplisia. Filtrat pertama lebih kurang 200 ml ditampung dan dipisahkan. Lalu perkolasi dilanjutkan sampai didapat titik akhir perkolasi dengan petunjuk warna perkolat yang jernih. Filtrat diperas dan cairan perasan dicampur ke dalam perkolat. Pada penyarian lanjutan ini didapat filtrat lebih kurang 4.500 ml. Filtrat pertama dan kedua dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan selama 2 hari di tempat sejuk dan terlindung dari cahaya. Filtrat kemudian dipisahkan dengan alat *rotavapor* pada suhu 48°C dengan kecepatan 200 rpm sehingga cairan penyari habis terdestilasi.

Dalam 1 gram Bangle terdapat 33,2 mg Kurkumin, Kebutuhan Kurkumin pada mencit = 30 mg/gBB/hari Dosis Ekstrak Bangle = 0,904 mg/gBBmencit/hari. Dosis artemisinin untuk manusia adalah 3,2 mg/kgBB. Nilai konversi mencit adalah 0,0026 (manusia dengan berat badan 70kg  $\approx$  20g mencit). Dosis Artemisinin =  $(3,2 \times 0,0026 \times 70) : 20 = 0,0364$  mg/gBB mencit

Sampel diadaptasikan selama 7 hari di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada Yogyakarta dan diberi pakan standar. Sejumlah 15 ekor mencit Balb/C dibagi dalam 5 kelompok masing-masing terdiri atas 3 ekor mencit. Mencit distimulasi dengan dengan ekstrak bangle dosis 0,904 mg/gBBmencit/hari. Stimulasi ini dilakukan selama 14 hari dengan tujuan meningkatkan respon imun mencit terhadap infeksi termasuk malaria. Induksi *Plasmodium berghei* pada hewan coba. Stok darah terinfeksi *P. berghei*

dari simpanan beku dicairkan pada suhu kamar.

Darah tersebut disuntikkan pada mencit Balb/C donor 100-200  $\mu$ l secara intraperitoneal. Bila tingkat parasitemia mencit Balb/C 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 Balb/C coba. Mencit Balb/C yang telah di infeksi kemudian terapi.

Sampel diadaptasikan selama 1 minggu di laboratorium dan diberi pakan standar. Sejumlah 15 ekor mencit Balb/C dibagi dalam 5 kelompok masing-masing terdiri atas 3 ekor mencit. Setelah diinfeksi *Plasmodium berghei*, tiap hari diperiksa derajat parasitemianya. Terapi ekstrak Bangle ataupun artemisinin diberikan setelah mencit diinfeksi *Plasmodium berghei*. Lama pemberian terapi selama 4 hari. Selama 4 hari perlakuan, derajat parasitemia tetap diperiksa.

Terapi ekstrak bangle dengan dosis 0,904 mg/gBBmencit/hari ataupun dengan artemisinin dosis 0,0364 mg/gBB/hari menggunakan sonde lambung. Lama pemberian terapi selama 4 hari. Selama 4 hari perlakuan, derajat parasitemia tetap diperiksa.

Kadar TNF- $\alpha$  diukur menggunakan serum mencit Balb/C yang diambil dari darah *intracardial* setelah mencit dinarkose. Darah dibiarkan selama 30 menit pada suhu 4°C agar serum terpisah dari eritrosit yang menggumpal (serum dapat disimpan dalam *freezer*, jika tidak langsung dilakukan pengujian). Setelah itu, darah disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm pada suhu ruang selama 5 menit untuk menghilangkan gumpalan darah. Serum darah yang didapat kemudian diambil menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam ependorf dan disimpan dalam *freezer* dengan suhu -20°C apabila belum akan digunakan. Pengujian kadar TNF- $\alpha$  menggunakan metode ELISA secara duplo. Data dianalisis menggunakan uji *Mann-Whitney*.

## Hasil Penelitian

Hasil penghitungan kadar TNF- $\alpha$  dari serum mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1 Produksi TNF- $\alpha$  serum pada tiap mencit

Kelompok	Produksi TNF- $\alpha$ serum dengan satuan pg/ml			Rerata $\pm$ Std Deviasi
	I	II	III	
Bangle	47,10	114,15	71,14	77,46 $\pm$ 33,96
Bangle + Artemisinin	38,57	58,25	68,44	55,08 $\pm$ 15,19
Artemisinin	57,93	46,20	95,16	85,56 $\pm$ 22,43
Tanpa terapi	174,07	69,68	64,68	102,81 $\pm$ 61,76
Tanpa perlakuan	42,36	42,83	38,67	41,29 $\pm$ 2,28

Dari tabel 1 dapat kita lihat bahwa ada perbedaan kadar *Tumour Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ) serum mencit dari masing-masing kelompok perlakuan dimana TNF- $\alpha$  tertinggi pada kelompok tanpa terapi. Sedang pada kelompok perlakuan TNF- $\alpha$  tertinggi pada kelompok yang diterapi dengan artemisinin.

Analisis data uji normalitas (Kolmogorov Smirnov) pada TNF- $\alpha$  serum kelompok bangle, bangle-artemisinin, artemisinin, tanpa terapi, dan tanpa perlakuan didapatkan data nilai  $p < \alpha$ , dimana  $\alpha = 0,05$  maka dapat dikatakan bahwa data tersebut tidak terdistribusi normal sehingga tidak perlu dilakukan uji homogenitas. Analisis yang selanjutnya adalah menggunakan Kruskal wallis dan didapatkan nilai  $p > 0,05$  yang menunjukkan ada perbedaan tiap kelompok, maka dilanjutkan dengan uji Mann Whitney. Namun, hasil analisis statistik menggunakan uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antarkelompok dengan  $p \geq 0,05$ .

## Pembahasan

Pengukuran TNF- $\alpha$  dari serum mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* menunjukkan bahwa kadar TNF- $\alpha$  tertinggi ditemukan pada kelompok tanpa terapi. Sedangkan pada kelompok perlakuan, kelompok terapi dengan artemisinin menunjukkan kadar TNF- $\alpha$  yang tertinggi. Analisis statistik menggunakan uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang bermakna antarkelompok  $p \geq 0,05$ .

Kadar TNF- $\alpha$  serum mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* [K(+)] lebih tinggi daripada kelompok tanpa perlakuan [K(-)], namun secara analisis statistik tidak menunjukkan perbedaan yang bermakna. *Tumour Necrosis Factor-alpha* merupakan sitokin utama pada proses inflamasi akut terhadap bakteri Gram negatif dan mikroba

lainnya [8]. Ketidakesesuaian kondisi tersebut diduga karena adanya faktor-faktor di luar perlakuan yang dapat mempengaruhi kadar TNF- $\alpha$ .

Kelompok perlakuan (bangle, bangle-artemisinin, artemisinin) tidak memiliki perbedaan yang bermakna secara analisis statistik baik terhadap kelompok tanpa terapi maupun kelompok tanpa perlakuan. Kurkumin, yang terkandung dalam ekstrak bangle, dapat menghambat aktivasi *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) yang diikuti penurunan sitokin pro-inflamasi sehingga terjadi penurunan kadar TNF- $\alpha$  serum mencit tipe serebral malaria [6] selain itu, ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) mempunyai efek sebagai imunostimulan dengan cara meningkatkan fagositosis makrofag [9]. Peningkatan aktivitas fagositosis makrofag dapat meningkatkan kadar sitokin pro-inflamasi, yaitu *Tumour Necrosis Factor-alpha* (TNF- $\alpha$ ), *Interleukin-1* (IL-1), *Interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ) dan radikal bebas seperti *Reactive Oxygen Intermediate* (ROI), *Reactive Oxygen Spesies* (ROS), *Nitric Oxide* (NO) [3].

Berdasarkan teori tersebut, hasil analisis data yang tidak bermakna dapat diduga karena bahwa efek imunostimulan ekstrak bangle tidak melalui jalur TNF- $\alpha$  melainkan jalur lainnya seperti peningkatan fagositosis makrofag, ROI, ROS, dan NO.

## Simpulan dan Saran

Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) tidak dapat mempengaruhi kadar TNF- $\alpha$  mencit Balb/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Diharapkan pada penelitian selanjutnya menggunakan berbagai variasi dosis ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*), menggunakan jumlah sampel yang lebih besar, dan uji kadar TNF- $\alpha$  serum dapat dilakukan dengan rancangan *pre* dan *post test*.

## Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. Treatment of Severe *P. falciparum*. Guidelines for The Treatment of Malaria. 2006: 207-224.
- [2] Kementerian Kesehatan RI. Pedoman Tata Laksana Malaria. Jakarta: 2013
- [3] Lou J, Lucas, Grau GE, 2001. Pathogenesis of Cerebral Malaria : Recent Experimental Data and Possible

- Applications for Human. Clin Microbiol Rev, 2001; 14(4): 810-820.
- [4] Neill AL, Hunt NH. Effects of endotoxin and dexamethasone on cerebral malaria in mice. Parasitology, 1995; 111: 443-454.
- [5] Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo, OK. The pathogenic basis of malaria. Nature. 2002; 415: 673-679.
- [6] Mimche, Patrice N, Taramelli, Donatella, Vivas, Livia. 2011. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. 2011.
- <http://www.malariajournal.com/content/10/S1/S10>
- [7] Inalci M. Use of cancer chemopreventive phytochemicals as Antineoplastic agents. Lancet Oncol. 2005; 6: 899–904.
- [8] Baratawidjaja K. *Imunologi Dasar*. Ed. 7. Jakarta: Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia. 2006.
- [9] Chairul. Praptiwi, Chairul, Sofnie M. 2009. Phagocytosis Effectivity Test Of Phenylbutenoid Compounds Isolated From Bangle (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) Rhizome. Biodiversitas. 2009; 10: 40-43.