

Uji Aktivitas Fraksi Diklorometana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai Terapi Komplementer Malaria secara *In Vivo*

(*The Activity Test of Dichloromethane Fraction of Bangle (Zingiber cassumunar Roxb.) Methanolic Extract as Complementary Therapy of Malaria In Vivo*)

Edda Rachmadenawanti, Bagus Hermansyah, Yuli Hermansyah
Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: eddarachmadenawanti18@yahoo.com

Abstract

World Malaria Report reported that Malaria threatens 40% of world population in six regions and ninety seven endemic countries. This study aimed to investigate the activity of dichloromethane fraction of Bangle as a complementary therapy of malaria in vivo. This was true experimental laboratories study using 28 mice of Balb/c, divided into seven groups. Five treatment groups were given five dose of dichloromethane fraction of Bangle methanolic extracts as imunostimulant before malaria infection and during malaria therapy by combining with malaria standard therapy. K(+) group was given malaria standard therapy. K(-) group was not given any therapy after infection. Inhibition percentage of malaria parasite in K(-) was 0 and K(+) was 24,74%. The treatment group of 0,09 mg/grBW had the highest inhibition percentage, as many as 88,19%. It declined by decreasing dose of fraction. The result of pearson correlation showed very strong correlation ($r=0,880$). The Ic_{50} value of dichloromethane fraction of Bangle methanolic extract as a complementary therapy was 0,008 mg/grBW. In conclusion, dichloromethane fraction of Bangle methanolic extract had immunostimulant effect and antimalarial activity in vivo.

Key words: bangle, complementary therapy, inhibition percentage, malaria

Abstrak

World Malaria Report melaporkan bahwa kasus malaria telah mengancam 40% populasi dunia dan terjadi di enam regio dengan 97 negara endemik malaria. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria. Jenis penelitian ini menggunakan *true experimental laboratories* dengan 28 ekor mencit galur Balb/c yang dibagi menjadi tujuh kelompok. Pada lima kelompok perlakuan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle dengan dosis yang berbeda sebagai imunostimulan sebelum terinfeksi malaria dan sebagai terapi bersama terapi standar malaria setelah terinfeksi malaria. Kelompok K(+) diberikan terapi standar malaria selama terinfeksi malaria dan kelompok K(-) tidak diberikan perlakuan. Persentase penghambatan terhadap parasit malaria pada Kelompok K(-) sebesar 0 dan Kelompok K(+) sebesar 24,74%. Persentase penghambatan paling tinggi sebesar 88,19% terdapat pada kelompok perlakuan dosis 0,09 mg/grBB dan menurun seiring menurunnya dosis perlakuan yang diberikan. Analisis data menggunakan korelasi *Pearson* menunjukkan korelasi sangat kuat dengan korelasi searah ($r=0,880$). Nilai Ic_{50} fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria adalah 0,008 mg/grBB. Dapat disimpulkan bahwa fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle memiliki aktivitas imunostimulan dan antimalaria secara *in vivo*.

Kata kunci: bangle, malaria, persentase hambatan, terapi komplementer

Pendahuluan

Malaria merupakan penyakit infeksi negara tropis di dunia. Kasus malaria mengancam 40 persen kehidupan populasi di dunia [1]. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa berdasarkan *World Malaria Report* yang diadakan setiap penghujung tahun bulan Desember di tahun 2014, penyebaran malaria terjadi di seluruh wilayah WHO yang berjumlah enam regio dengan 97 negara endemik malaria, negara – negara tersebut menjadikan kasus malaria sebagai *Highlight Progress*. Kasus malaria dilaporkan di dunia tahun 2013 mencapai 3,2 milyar orang beresiko untuk terinfeksi, 198 juta orang telah terinfeksi malaria, 584 ribu kematian dengan kasus malaria membunuh 453 ribu anak- anak di bawah usia lima tahun [2].

Malaria adalah penyakit infeksi akibat protozoa genus *Plasmodium*, dengan terdapat lima jenis spesies parasitnya, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae*, dan *Plasmodium knowlesi* [3]. Pada tahun 2008, penggunaan ACT sebagai monoterapi malaria yang direkomendasikan oleh WHO ternyata memiliki kelemahan, kasus ACT menimbulkan resistensi telah dilaporkan diperbatasan Thailand-Kamboja Asia Tenggara [4].

Bangle memiliki kandungan seperti *phenylbutanoid compound*, *curcumin*, flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, steroid dan terpenoid yang bermanfaat bagi kesehatan [5]. Pada penelitian ini kandungan senyawa tersebut dikembangkan sebagai terapi komplementer malaria secara *in vivo*. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria.

Metode Penelitian

Penelitian ini sudah mendapatkan perizinan *ethical clearance* dari Komisi Etik Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pemeliharaan dan perlakuan hewan coba dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Pemeriksaan derajat parasitemia dilaksanakan di Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Jember. Proses ekstraksi dan fraksinasi dari bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dilakukan di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Jember.

Kandungan yang terdapat pada bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) diambil dengan menggunakan proses ekstraksi dan fraksinasi. Ekstraksi merupakan proses pemisahan senyawa aktif suatu simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu, sedangkan fraksinasi adalah pemisahan senyawa aktif yang dapat larut dalam pelarut berdasarkan tingkat kepolaran masing-masing pelarutnya [6].

Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut metanol. Metanol merupakan pelarut universal yang memiliki gugus polar (-OH) dan gugus nonpolar (-CH₃) sehingga dapat menarik analit-analit yang bersifat polar dan nonpolar [6]. Pada proses fraksinasi dilakukan dengan metode fraksinasi bertingkat. Fraksinasi diawali dengan pelarut non polar *n*-heksana, sehingga diperoleh fraksi *n*-heksana dan fraksi air. Fraksi air berikutnya dilarutkan dengan pelarut semi polar diklorometana sehingga diperoleh fraksi diklorometana dan fraksi air. Fraksi diklorometana diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga diperoleh fraksi kental diklorometana ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.). Diklorometana merupakan senyawa yang tidak berwarna, larutan yang mudah menguap, larut dalam alkohol dan eter, memiliki titik didih 40,1 °C, titik lebur -97 °C dan bersifat semi polar, sehingga senyawa yang diambil bersifat semipolar [7].

Penelitian ini merupakan *true experimental laboratories* menggunakan *post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan sampel dengan jumlah 28 ekor mencit galur Balb/c jantan dengan berat 25-30 gram dan umur 2-3 bulan. Sampel dibagi menjadi tujuh kelompok, yaitu kelompok K(+), kelompok K(-), dan lima kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan diberikan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai imunostimulan selama 14 hari sebelum terinfeksi malaria dan sebagai terapi bersama terapi standar malaria selama 3 hari setelah terinfeksi malaria, berupa Dihidroartemisinin Piperquin dan Primakuin saat hari pertama. Pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) pada lima kelompok perlakuan dibedakan menjadi lima dosis, yaitu 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045 mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB. Pada kelompok K(+) diberikan terapi standar malaria saja selama 3 hari setelah terinfeksi dan kelompok K(-) tidak diberikan perlakuan selama terinfeksi malaria.

Proses induksi *Plasmodium berghei* pada hewan coba supaya terinfeksi malaria disebut inokulasi. Inokulasi dilakukan dengan mengambil darah yang terinfeksi dari mencit donor dengan derajat parasitemia mencapai 10%-15% secara intrakardial. Darah diinjeksikan pada hewan coba secara intraperitoneal. Pengenceran darah donor dilakukan sebelum darah diinjeksikan pada hewan coba supaya memiliki kesamaan konsentrasi *Plasmodium berghei* pada hewan coba.

Pengambilan data dilakukan selama empat hari, yaitu pada hari pertama (H₀) terinfeksi malaria atau empat hari setelah induksi *Plasmodium berghei*, hari kedua (H₁) atau 24 jam setelah pemberian terapi, hari ketiga (H₂) atau 48 jam setelah pemberian terapi, dan hari keempat (H₃) atau 72 jam setelah pemberian terapi. Pengamatan data dilakukan dengan melihat derajat parasitemia pada hapusan darah tipis. Hapusan darah tipis dilihat pada mikroskop dengan perbesaran objektif 100x. Derajat parasitemia merupakan jumlah eritrosit yang terinfeksi pada seribu eritrosit yang kemudian diolah menjadi persentase penghambatan. Data berupa derajat parasitemia diolah menjadi persentase penghambatan. Persentase penghambatan merupakan kemampuan fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

Analisis data dilakukan secara komputerisasi dengan SPSS. Distribusi data normal atau tidak dilihat menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk*. Korelasi antara variabel bebas dan variabel terikat dilihat menggunakan uji korelasi *Pearson*. Nilai Ic_{50} merupakan konsentrasi suatu obat dalam menghambat 50% dari suatu proses biologis tertentu dapat ditentukan dengan menggunakan analisis probit.

Hasil Penelitian

Pada hari pertama terinfeksi malaria kelompok kontrol memiliki rata-rata persen parasitemia dua kali lipat lebih tinggi daripada kelompok perlakuan seperti pada tabel 1. Rata-rata persentase parasitemia secara keseluruhan menunjukkan penurunan pada semua kelompok perlakuan dan kelompok kontrol positif dari hari pertama (H₀) sampai hari keempat (H₃) secara bervariasi, sedangkan pada kelompok kontrol negatif terdapat peningkatan rata-rata parasitemia seperti pada tabel 1.

Tabel 1. Rata-rata persen parasitemia masing-masing kelompok pada H₀ sampai H₃

Kelompok	Rata-rata % Parasitemia			
	H ₀	H ₁	H ₂	H ₃
Kontrol(+)	3,33	3,13	2,72	2,51
Kontrol(-)	3,56	5,61	8	13,03
0,005625 mg/grBB	1,53	1,28	0,97	0,85
0,01125 mg/grBB	1,42	0,95	0,70	0,63
0,0225 mg/grBB	1,28	0,94	0,50	0,38
0,045 mg/grBB	1,27	0,92	0,48	0,26
0,09 mg/grBB	1,15	0,66	0,30	0,13

Rata-rata persentase parasitemia pada kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan pada kelompok kontrol positif selama empat hari. Pada kelompok perlakuan rata-rata persen parasitemia terendah dimiliki oleh kelompok perlakuan dengan pemberian dosis 0,09 mg/grBB yang kemudian rata-rata parasitemia semakin meningkat dengan menurunnya dosis 0,045mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, dan 0,005635/grBB seperti pada Tabel 1.

Persentase penghambatan pada Tabel 2 dapat diketahui bahwa persentase penghambatan kelompok perlakuan terbesar dimiliki oleh kelompok perlakuan dengan pemberian fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,09 mg/grBB kemudian menurun pada kelompok perlakuan dosis 0,045 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, dan 0,005625 mg/grBB. Persentase penghambatan kelompok perlakuan juga lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol positif. Kelompok kontrol negatif tidak dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

Tabel 2. Persentase penghambatan masing-masing kelompok terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*

Kelompok	Persen Penghambatan (%)			
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Rata-rata
Kontrol(+)	24,26	25,74	24,22	24,74 ± 0,87
Kontrol(-)	0	0	0	0,00 ± 0,00
0,005625 mg/grBB	39,06	47,46	46,67	44,40 ± 4,64
0,01125 mg/grBB	50,85	51,92	62,71	55,16 ± 6,56
0,0225 mg/grBB	71,15	69,77	68,97	69,96 ± 1,10
0,045 mg/grBB	81,25	82,61	74,69	79,52 ± 4,23
0,09 mg/grBB	89,58	85	90	88,19 ± 2,77

Data persentase penghambatan dilakukan uji normalitas menggunakan uji normalitas *Shapiro-wilk* diperoleh hasil nilai signifikansi $>0,05$ yang menunjukkan data tersebut terdistribusi normal. Pada uji korelasi *Pearson* diketahui angka koefisien korelasi sebesar 0,880 atau sangat kuat dengan korelasi dua arah yang searah, semakin tinggi dosis yang diberikan akan semakin tinggi persentase penghambatan terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Nilai Ic_{50} fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria menggunakan analisis probit adalah 0,008 mg/grBB.

Pembahasan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) memiliki aktivitas sebagai imunostimulan dan antimalaria sebagai terapi komplementer malaria.

Aktivitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai imunostimulan ditunjukkan pada hari pertama terinfeksi, kelompok kontrol memiliki persentase parasitemia dua kali lipat lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok perlakuan. Aktivitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai antimalaria ditunjukkan dengan kombinasinya bersama terapi standar malaria memiliki persentase penghambatan lebih tinggi sehingga dapat menurunkan persentase parasitemia lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif, yang diberikan terapi standar malaria saja.

Kandungan senyawa bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) yang berperan sebagai imunostimulan adalah saponin, flavonoid, tanin, *phenylbutanoid compound*, dan *curcumin* [8,9,10,11]. Sporozoit yang masuk ke dalam darah akan dengan cepat merangsang respon imun non-spesifik yang terutama dilakukan oleh makrofag untuk memfagositosis parasit tersebut. *Phenylbutanoid compound* akan meningkatkan pertahanan sistem imun dengan membantu meningkatkan aktivitas dan kapasitas fagositosis dalam melawan parasit, atau dikenal sebagai efek fagositosis [9].

Salah satu senyawa yang terkandung pada bangle sebagai antimalaria adalah *curcumin* [12]. Isolasi *curcumin* paling baik menggunakan pelarut diklorometana

dibandingkan pelarut lain, dengan jumlah kadar 78,36% *curcumin* pada *Microwave Assisted Extraction* dan 74,56% pada *conventional extraction* [7].

Curcumin dapat meningkatkan efek antiinflamasi dengan cara menginduksi ROS (*Reactive Oxygen Species*) intraseluler pada *Plasmodium falciparum* dengan menghambat aktivitas enzim *Histone Acetyl Transferase* (HATS) sehingga dapat menyebabkan kerusakan oksidatif pada DNA parasit pada konsentrasi paling rendah 1 μ M [13]. Penelitian sebelumnya menggunakan ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan dosis 0,9 mg/grBB yang mengandung *curcumin* 33,2 mg mampu meningkatkan kadar NO [11]. Peningkatan ROS dan NO dapat menghambat aktivasi proses transkripsi gen yang bertanggung jawab pada inflamasi sel endotel yaitu, Egr-1, AP-1, dan NF-kB. Hambatan terhadap Egr-1, AP-1, dan NF-kB menyebabkan penekanan sitokin-sitokin pro inflamasi, seperti TNF- α , IL-1, IL-6, IL-3, LT, dan INF- γ dan menghambat ekspresi molekul adhesi di endotel, seperti *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1), *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* (VCAM-1), CD36, dan *trombospondin* yang berperan penting dalam proses perlekatan *cytho adherence* dan *rosetting* [14]. Aktivitas antimalaria bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) juga ditunjukkan dengan kandungan *Curcumin* secara efisien dapat berikatan dengan *sarco-encoplasmoic reticulum Ca²⁺-ATPase* (SERCA) malaria, sehingga dapat menahan kemampuan metabolik parasit dalam menghasilkan ATP memicu kematian parasit, yang juga menjadi target utama biologis obat antimalaria, yaitu artemisinin [15].

Simpulan dan Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) terbukti memiliki aktivitas imunostimulan dan antimalaria sebagai terapi komplementer malaria dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*. Terdapat korelasi sangat kuat antara pemberian kelima dosis fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) dengan pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Nilai Ic_{50} fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) sebagai terapi komplementer malaria adalah 0,008 mg/grBB.

Pada penelitian selanjutnya perlu dilakukan uji toksisitas fraksi diklorometana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) agar dapat diketahui dosis yang aman sebagai obat herbal terapi komplementer bersama obat antimalaria dan uji klinik mengenai farmakokinetik, farmakodinamik, dan efek samping dalam penggunaannya agar dapat dipakai dalam praktek kedokteran dan pelayanan kesehatan formal (fitofarmaka).

Daftar Pustaka

- [1] World Health Organization. Malaria Data and Statistics. [Internet]. 2015. [Cited 2015 March 24]. Available from: <http://www.who.int/malaria/data/en/>
- [2] World Health Organization. *World Malaria Report*. Switzerland: WHO Press. 2014.
- [3] Natadisastra D, Ridad A. Parasitologi Kedokteran Ditinjau dari Organ Tubuh yang Diserang. Jakarta: EGC. 2009.
- [4] Yusuf Y. Bukti Munculnya Malaria Resisten Artemisinin di Asia. *Jurnal Bionature*. 2013; 4(2):128-132.
- [5] Majaw S, Moirangthem J. Qualitative and Quantitative Analysis of *Clerodendron Colebrokianum* Walp Leaves and *Zingiber Cassumunar* Roxb. Rhizomes Ethnobotanical leaflets. 2009; 13:578-579.
- [6] Astarina NWG, Astuiti KW, Warditiani NK. Skrining Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Bangle (*Zingiber purpureum* Roxb.). *Jurnal Farmasi Udayana*. 2013; 10: 1-6.
- [7] Verma SC. Separation Process for Curcumin from *Curcuma longa* L. rhizomes and Its Quantification by hplc-pda. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science*. 2014; 3(7): 752-761.
- [8] Chanwitheesuk A, Teerawutgulrag A, Rakariyatham, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. *Food Chemistry*. 2005; 92: 491-497.
- [9] Chairul, Praptiwi, Sofnie. Phagocytosis Effectivity Test of Phenylbutenoid Compounds Isolated from Bangle (*Zingiber cassumunar* Roxb.) Rhizome. *Biodiversitas*. 2009; 10(1): 40-43.
- [10] Iswanti D, Silitonga RF, Martatilofa E, Darusman LK. *Zingiber cassumunar*, *Guazuma ulmifolia*, and *Murraya paniculata* Extracts as Antiobesity: In Vitro Inhibitory Effect on Pancreatic Lipase Activity. *J. Biosci*. 2011; 18(1): 6-10.
- [11] Armiyanti Y, Utami WS, Ameliana L. Pengembangan Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber Cassumunar* Roxb.) Terstandar Menjadi Granul Eferesen sebagai Terapi Ajuvan untuk Mencegah Komplikasi pada Malaria. *UNEJ Digital Repository*. [Internet]. 2014. [Cited 2015 June 18]. Available from: <http://repository.unej.ac.id/handle/123456789/57892>.
- [12] Ghosh A, Banerjee T, Bhandary S, Surolia A. Formulation of nanotized curcumin and demonstration of its antimalarial efficacy. *International Journal of Nanomedicine*. 2014; 9: 5373-5387.
- [13] Cui L, Miao J. Cytotoxic effect of curcumin on malaria parasite *Plasmodium falciparum*: inhibition of histone acetylation and generation of reactive oxygen species. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51: 488-494.
- [14] Mimche PN, Taramelli D, Vivas L. The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria. *Malaria journal*. 2011; 10: 1-9.
- [15] Haddad M, Sauvain M, Deharo E. Curcuma as Paraticidal agent. *Planta Med*. 2011; 77: 672-678.