

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

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

Sarah Andriani, Bagus Hermansyah, Sugiyanta
Fakultas Kedokteran, Universitas Jember
Jl. Kalimantan 37, Jember 68121
Email: bagus_hermansyah@unej.ac.id

Abstract

Malaria is one of endemic disease in Indonesia that caused many deaths. Immune system plays important rules in preventing malaria severity. Bangle has been proven as an immunostimulant and could reduce parasitaemia in malaria infection. This study aimed to determine the activity of n-hexane fraction of bangle methanolic extract as complementary therapy of malaria. This study used 28 mice, divided into one positive control group, one negative control group, and five treatment groups. Bangle stimulation before induction was given to five treatment groups with dose: 0,005625mg/grbw, 0,01125mg/grbw, 0,0225mg/grbw, 0,045mg/grbw, and 0,09mg/grbw for 14 days. Plasmodium berghei induction was given to all groups, and then treatment groups were given ACT and bangle fraction, and positive control group was given ACT without fraction for three days. Parasitaemia was observed everyday, then plasmodium growth inhibition per centation was counted. Bangle fraction stimulation gave lower parasitaemia at the begining and Pearson correlation test showed strong positive correlation between dose of bangle fraction and plasmodium growth inhibition per centation ($p < 0,01$). We can conclude that n-hexane fraction of bangle methanolic extract was active as complementary therapy of malaria ($IC_{50} = 0,013$ mg/grbb).

Keywords: malaria, bangle, n-hexane, complementary therapy

Abstrak

Malaria merupakan salah satu penyakit endemis di Indonesia yang banyak menyebabkan kematian dan sistem imun berperan penting dalam mencegah keparahannya. Ekstrak bangle telah terbukti sebagai imunostimulan dan dapat menurunkan derajat parasitemia pada malaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle sebagai terapi komplementer malaria. Sampel pada penelitian ini adalah 28 ekor mencit, dibagi menjadi satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan lima kelompok perlakuan. Stimulasi bangle sebelum induksi diberikan pada kelima kelompok perlakuan dengan dosis 0,005625mg/grbb, 0,01125mg/grbb, 0,0225mg/grbb, 0,045mg/grbb, dan 0,09mg/grbb selama 14 hari. Induksi *Plasmodium berghei* dilakukan pada seluruh kelompok, kemudian selama tiga hari kelompok perlakuan diterapi ACT bersama fraksi bangle, kelompok kontrol positif hanya diterapi ACT, sedangkan kelompok kontrol negatif tidak diterapi. Derajat parasitemia diamati setiap hari kemudian dihitung persentase penghambatan pertumbuhan *plasmodium* setiap kelompok. Stimulasi fraksi bangle menghasilkan rata-rata derajat parasitemia yang rendah di awal, dan uji korelasi *Pearson* menunjukkan hubungan positif yang kuat antara dosis fraksi dan persentase penghambatan ($p < 0,01$). Dapat disimpulkan bahwa fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria ($IC_{50} = 0,013$ mg/grbb).

Kata kunci: malaria, bangle, n-heksana, terapi komplementer

Pendahuluan

Malaria saat ini masih menjadi penyakit endemis di beberapa daerah di Indonesia. Menurut laporan kasus malaria tahun 2013 rata-rata angka kesakitan malaria di Indonesia masih mencapai 1,4 per 1000 penduduk [1]. Malaria banyak menyebabkan kematian akibat komplikasinya terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, balita dan ibu hamil [2]. Selain itu malaria berat juga sering terjadi pada penduduk pendatang baru pada daerah dengan endemisitas malaria yang tinggi karena belum terdapatnya imunitas terhadap malaria [3]. Hal ini disebabkan karena imunitas terhadap malaria didapatkan ketika terpapar dan terus meningkat apabila jumlah paparan malaria meningkat, serta memiliki peranan penting dalam menentukan keparahan malaria [4].

Artemisinin-Based Combination Therapy (ACT) masih menjadi terapi utama untuk malaria. Tetapi saat ini telah dilaporkan adanya resistensi *Plasmodium falciparum* baik terhadap monoterapi artemisinin maupun terhadap ACT. Banyak usaha telah dilakukan untuk mencari antimalaria baru yang lebih efektif, selain itu berbagai cara juga dilakukan untuk mencari terapi ajuvan yang bisa membantu mereduksi keparahan malaria ketika resistensi terhadap terapi utama terjadi [5]. Terapi ajuvan adalah terapi komplementer yang bekerja sinergi dengan terapi utama malaria. Peranan imunitas tubuh dalam menghadapi malaria cukup penting sehingga terapi ajuvan yang bekerja sebagai imunostimulan dapat dijadikan pilihan untuk membantu mengurangi keparahan malaria.

Kandungan bioaktif beberapa tanaman telah terbukti memiliki efek imunostimulan sehingga dapat dikembangkan sebagai terapi komplementer pada malaria. Salah satunya adalah rimpang bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) yang saat ini banyak dipakai sebagai obat tradisional. Ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dengan dosis 0,904 mg/gr BB selama 14 hari telah terbukti dapat meningkatkan kapasitas fagositosis makrofag dan sekresi TNF- α serta menunjukkan derajat parasitemia yang rendah pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* [6]. Penelitian tersebut menggunakan ekstrak kasar bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sehingga dalam penelitian ini dilakukan fraksinasi menggunakan pelarut n-heksana untuk mengambil senyawa non-polar dari ekstrak metanol tersebut.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas fraksi n-heksana ekstrak

metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebagai terapi komplementer malaria, mengetahui hubungan antara pemberian fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dengan presentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*, dan untuk mendapatkan nilai konsentrasi penghambatan setengah maksimal (IC_{50}) dari fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebagai terapi komplementer malaria.

Metode Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan rancangan *posttest-only control group design* menggunakan hewan coba berupa 28 mencit galur *Balb/c* jantan berusia 2-3 bulan dengan berat antara 25-30 gram. Hewan coba dibagi menjadi tujuh kelompok yaitu satu kelompok kontrol negatif, satu kelompok kontrol positif, dan lima kelompok perlakuan. Penelitian ini telah mendapat persetujuan *ethical clearance* dari Komisi Etik Penelitian Universitas Jember.

Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) yang digunakan dalam penelitian ini terlebih dahulu diidentifikasi di Jurusan Agronomi Fakultas Pertanian Universitas Jember. Rimpang bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) diekstrak menggunakan pelarut metanol dengan metode maserasi dan dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental. Ekstrak tersebut kemudian difraksinasi dengan pelarut non-polar n-heksana menggunakan corong pisah sehingga diperoleh fraksi n-heksana.

Stimulasi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebelum induksi malaria diberikan pada kelima kelompok perlakuan dengan dosis 0,005625 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,045 mg/grBB, dan 0,09 mg/grBB secara peroral selama 14 hari. Kemudian induksi malaria dilakukan pada semua kelompok hewan coba menggunakan *Plasmodium berghei*. Setelah positif malaria kelima kelompok perlakuan diberi terapi ACT bersama fraksi bangle sesuai dosis stimulasi, kelompok kontrol positif hanya diberi terapi ACT, sedangkan kelompok kontrol negatif tidak diberi terapi. Terapi ACT yang diberikan berupa kombinasi primakuin (hanya pada hari pertama) dan dihidroartemisinin-piperakuin selama tiga hari sesuai dengan standar regimen terapi pada malaria *falciparum* pada manusia.

Pemeriksaan hapusan darah untuk menghitung derajat parasitemia dilakukan pada seluruh hewan coba setiap hari hingga akhir terapi. Darah yang digunakan diambil dari ujung ekor mencit yang ditetaskan diatas *object glass* dan kemudian diratakan dengan bantuan *cover glass* serta diberi pewarnaan *giemsa*. Hapusan darah kemudian diamati menggunakan mikroskop perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi. Derajat parasitemia didapatkan dengan menghitung jumlah total eritrosit yang terinfeksi pada tiap seribu eritrosit yang tampak lalu diukur menggunakan rumus:

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

Hasil rata-rata penghitungan derajat parasitemia kemudian digunakan untuk menghitung persentase pertumbuhan dan persentase penghambatan pertumbuhan *Plasodium berghei*. Persentase pertumbuhan pada masing-masing kelompok didapatkan dari selisih antara rata-rata derajat parasitemia pada hari ketiga setelah terapi dengan rata-rata derajat parasitemia pada hari pertama hewan coba positif malaria sebelum diberikan terapi. Persentase penghambatan kemudian dihitung dengan membandingkan persentase pertumbuhan dengan persentase parasitemia hari pertama terinfeksi malaria pada kelompok tersebut.

Analisis statistik pada penelitian ini menggunakan uji normalitas Shapiro-Wilk, uji korelasi Pearson, dan uji analisis probit. Analisis probit digunakan untuk menemukan dosis fraksi n-heksana ekstrak bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) yang dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebanyak 50% (konsentrasi penghambatan setengah maksimal / IC₅₀).

Hasil Penelitian

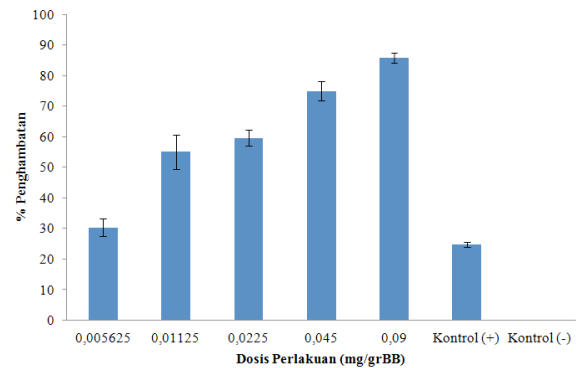
Berikut adalah data rata-rata hasil pemeriksaan derajat parasitemia pada seluruh hewan coba.

Tabel 1. Rata-Rata Derajat Parasitemia Hewan Coba pada H0 Sampai H3

Dosis (mg/grBB)	Rata-rata Derajat Parasitemia			
	H0	H1	H2	H3
0,09	1,40	1,10	0,70	0,20
0,045	1,60	1,20	0,90	0,40
0,0225	1,90	1,20	0,90	0,77
0,01125	2,01	1,50	1,20	0,90
0,005625	2,30	1,80	1,60	1,60
Kontrol (+)	3,33	3,13	2,72	2,51
Kontrol (-)	3,56	5,61	8,00	13,03

Rata-rata derajat parasitemia setiap kelompok hewan coba pada H0 (hari sebelum terapi dimulai) menunjukkan adanya variasi meskipun diusahakan inokulasi yang seragam. Rata-rata derajat parasitemia pada kelima kelompok perlakuan diberi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) lebih rendah dibandingkan dengan kelompok kontrol positif dan kontrol negatif. Setelah pemberian terapi rata-rata derajat parasitemia pada kelompok kontrol negatif mengalami peningkatan sedangkan rata-rata derajat parasitemia pada kelompok kontrol positif dan pada kelima kelompok perlakuan mengalami penurunan secara bervariasi.

Hasil penghitungan rata-rata persentase penghambatan masing masing kelompok hewan coba adalah sebagai berikut.



Gambar 1. Diagram Presentase Penghambatan Fraksi N-Heksana Ekstrak Metanol Bangle (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) Terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei*

Persentase penghambatan yang dihasilkan oleh fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* terbesar dimiliki oleh kelompok perlakuan dengan dosis fraksi 0,09 mg/grBB kemudian menurun pada kelompok perlakuan dengan dosis 0,045 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, dan 0,005625 mg/grBB.

Dari hasil uji statistik semua data terdistribusi normal ($p > 0,05$), dan terdapat korelasi bermakna antara dosis fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dengan persentase penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* ($p < 0,01$) dengan arah korelasi positif dan kekuatan korelasi yang sangat kuat ($r = 0,880$). Dari

analisis probit didapatkan nilai IC_{50} fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* adalah sebesar 0,013 mg/grBB.

Pembahasan

Sistem imun tubuh berperan penting dalam patogenesis malaria. Tubuh dengan sistem imun yang lemah lebih rentan mengalami malaria dengan derajat parasitemia yang lebih tinggi dengan kecenderungan terjadinya komplikasi yang lebih tinggi [3] sehingga dibutuhkan adanya suatu imunostimulan untuk membantu tubuh untuk mengoptimalkan fungsi sistem imun pada malaria.

Pengukuran derajat parasitemia pada hewan coba yang diinduksi *Plasmodium berghei* pada hari pertama terserang malaria dan belum diberi terapi (H0) menunjukkan bahwa rata-rata derajat parasitemia pada kelompok kontrol positif dan kontrol negatif yang tidak diberi stimulasi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) lebih tinggi dibandingkan dengan kelima kelompok perlakuan yang sebelumnya telah diberi stimulasi, meskipun telah diusahakan untuk dilakukan induksi *Plasmodium berghei* yang seragam. Diantara kelima kelompok perlakuan yang telah diberi stimulasi, pada H0 kelompok dengan dosis fraksi 0,09 mg/grBB memiliki rata-rata derajat parasitemia terendah kemudian meningkat pada kelompok perlakuan dengan dosis 0,045 mg/grBB, 0,0225 mg/grBB, 0,01125 mg/grBB, dan 0,005625 mg/grBB. Pemberian stimulasi bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebelum induksi malaria dapat menjadi salah satu faktor rendahnya rata-rata derajat parasitemia pada kelompok perlakuan, karena beberapa zat yang terkandung pada bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) seperti flavonoid, senyawa *phenylbutanoid* dan minyak atsiri dapat berperan sebagai imunostimulan yang dapat meningkatkan sistem imun non-spesifik dan meningkatkan kekebalan tubuh terhadap malaria [6]. Flavonoid bekerja terhadap limfokin (Interferon γ) yang dihasilkan oleh sel T sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan respon fagositosis serta dapat memacu proliferasi limfosit, meningkatkan jumlah sel T dan meningkatkan sekresi IL-12 [7]. Minyak atsiri dan senyawa derivat *phenylbutanoid* juga dapat meningkatkan aktifitas fagositosis makrofag pada malaria [8,9].

Pada awal serangan malaria, sporozoit yang masuk darah segera dihadapi oleh respon imun non-spesifik yang terutama dilakukan oleh makrofag dan monosit yang menghasilkan sitokin-sitokin seperti TNF, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10 yang secara langsung menghambat pertumbuhan parasit dan membunuh parasit [10]. Senyawa flavonoid dapat terserap kedalam n-heksana dalam konsentrasi yang tinggi [11], begitupula dengan senyawa derivat *phenylbutanoid* pada bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dan minyak atsiri [12,13]. Dengan memberikan stimulasi fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) senyawa-senyawa imunostimulan yang terkandung dalam fraksi dapat meningkatkan respon imun non-spesifik dalam melawan sporozoit yang masuk ke dalam darah pada awal serangan.

Pada hari setelah pemberian terapi (H1-3) terjadi penurunan rata-rata derajat parasitemia baik pada kelompok kontrol positif maupun pada kelima kelompok perlakuan dengan persentase yang bervariasi. Hal ini menunjukkan terapi yang diberikan dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada hewan coba dalam derajat yang bervariasi, dimana persentase pengambatan pertumbuhan tertinggi terdapat pada kelompok perlakuan dengan dosis tertinggi dan persentase terendah terdapat pada kelompok kontrol positif. Adanya perbedaan persentase penghambatan pertumbuhan parasit pada kelompok kontrol dan masing-masing kelompok perlakuan menunjukkan kemampuan penghambatan pertumbuhan parasit oleh terapi standar ACT bersama fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) pada kelompok perlakuan lebih baik daripada terapi standar ACT tanpa fraksi pada kelompok kontrol positif.

Alkaloid, flavonoid, dan minyak atsiri merupakan beberapa kandungan dalam bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) yang memiliki aktivitas antimalaria dan dapat tersari kedalam fraksi non-polar. Flavonoid bersifat antiplasmodium karena dapat menginhibisi pertumbuhan parasit intraeritrositik [14]. Senyawa golongan alkaloid telah diketahui dapat menghambat pertumbuhan parasit dengan menghalangi pertumbuhan parasit melalui transpor intraseluler kolin [15] begitu pula dengan senyawa golongan terpenoid sebagai penyusun minyak atsiri telah diketahui dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* dengan cara menghambat sintesis protein pada parasit malaria [16]. Dengan

adanya senyawa-senyawa imunostimulan dan antimalaria yang terkandung dalam bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) dapat mendukung kerja fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) sebagai terapi komplementer malaria bersama dengan terapi standar ACT dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium sp* dan mengurangi keparahan malaria.

Beberapa hal yang menjadi kelemahan pada penelitian ini adalah adanya variasi pada hasil penghitungan derajat parasitemia hewan coba di dalam kelompok yang sama yang dapat disebabkan oleh stress psikologis, status fisiologis dan status imunologi pada setiap hewan coba yang tidak dapat dikendalikan sepenuhnya meskipun telah diusahakan untuk dilakukan perlakuan yang sama dari segi pemeliharaannya. Variasi pada hasil penghitungan derajat parasitemia juga dapat dipengaruhi oleh ketelitian pengamat dalam melakukan penghitungan eritrosit terinfeksi pada preparat yang diantisipasi dengan melakukan replikasi pembacaan preparat sebanyak tiga kali dengan pengamat berbeda.

Simpulan dan Saran

Fraksi n-heksana ekstrak metanol bangle memiliki aktivitas sebagai terapi komplementer malaria dan pemberiannya bersama dengan terapi standar ACT dapat meningkatkan persentase pengambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* dengan nilai IC_{50} sebesar 0,013 mg/grbb.

Dari hasil penelitian yang diperoleh, perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kandungan bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) yang dapat tersari dalam fraksi n-heksana dan juga uji toksisitas dari fraksi tersebut sebagai dasar untuk penentuan dosis sebagai terapi komplementer malaria.

Daftar Pustaka

- [1] WHO. World Malaria Report 2014. Switzerland: WHO Press; 2014.
- [2] Kemenkes RI. Buletin Malaria : Epidemiologi Malaria di Indonesia. Jakarta: Bakti Husada; 2011.
- [3] Wiley J, Sons. Severe Malaria. WHO Trop Med Int Health Suppl. 2014; 19(1): 7-13.
- [4] Griffin JT, Hollingsworth TD, Reyburn H, Drakeley CJ, Riley EM, Ghani AC. Gradual Acquisition of Immunity to Severe Malaria with Increasing Exposure. Proc R Soc

- [Internet]. 2014; 282(20142657):[about 8pp]. Available from : <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/282/1801/20142657>.
- [5] Prato M, Giribaldi G. New Perspectives for Adjuvant Therapy in Severe Malaria. J Bacteriol Parasitol. 2012; 3(5).
- [6] Armiyanti Y, Utami WS, Ameliana L. Pengembangan Ekstrak Rimpang Bangle (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) Terstandar Menjadi Granul Efervesen sebagai Terapi Ajuvan untuk Mencegah Komplikasi pada Malaria. UNEJ Digital Repository [Internet]. 2014. Available from : <http://repository.unej.ac.id/handle/123456789/57892>.
- [7] Sukmayadi AE, Sumuwi SA, Intan M. Aktivitas Imunomodulator Ekstrak Etanol Daun Tempuyung (*Sonchus arvensis* Linn.) Terhadap Peningkatan IL-2 Pada Tikus Putih Jantan Galur Wistar. IJPST. 2014; 1(2): 42-51.
- [8] Chairul, Praptiwi, Chairul SM. Phagocytosis Effectivity Test of Phenylbutenoid Compounds Isolated from Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) Rhizome. Biodiversitas. 2009; 10(1): 40-43.
- [9] Awaad MHH, Abdel-Alim GA, Sayed KSS, Kawkab, Ahmed A, Nada AA, Metwalli ASZ, Alkhalaf AN. Immunostimulant Effects of Essential Oils of Peppermint and Eucalyptus in Chickens. Pak Vet J.2010; 30(2): 61-66.
- [10] Harijanto PN. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam edisi V. Jakarta: Interna Publishing; 2014.
- [11] Sultana M, Verma PK, Raina R. Quantitative Analysis of Total Phenolic, Flavonoids and Tannin Contents in Acetone and N-hexane Extracts of *Ageratum conyzoides*. IJCRGG. 2012; 4(3): 996-999.
- [12] Kaewchoothong A, Tewtrakul S, Panichayupakaranant P. Inhibitory Effect of Phenylbutanoid-rich *Zingiber cassumunar* Extracts on Nitric Oxide Production by Murine Macrophage-like RAW264.7 Cells *Phytother Res*. 2012.
- [13] Susanti L. "Identifikasi Komponen Minyak Atsiri dalam Ekstrak Heksana dari Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia Galanga*) secara Kromatografi Gas - Spektroskopi Massa (Gc-Ms)." Tidak Diterbitkan. Thesis. Yogyakarta: Universitas Negeri Yogyakarta; 2011.
- [14] Lehane AM, Saliba KJ. Common Dietary Flavonoids Inhibit the Growth of the

- Intraerythrocytic Malaria Parasite. BMC Research Notes. 2008; 1(26).
- [15] Hilou A, Nacoulma OG, Guiguemde TR. In vivo Antimalarial Activities of Extracts *Amaranthus Spinousus* L. and *Boerhaavia erecta* L. in Mice. J Ethnopharmacol. 2006; 103: 236-240.
- [16] Pouplin JN, Tran TH, Dolecek TA, Phan TA, Farrar J. Antimalarial and Cytotoxic Activities of Ethnopharmacologically Selected Medicinal Plants from South Vietnam. J Ethnopharmacol. 2007; 109.