

Peranan Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) terhadap Produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*

(The Role of Bangle Extract (*Zingiber Cassumunar Roxb.*) on Nitric Oxide and Malondialdehyde of *Plasmodium beghei*-infected Mice)

Devita Prima Nurmasari, Wiwien Sugih Utami, Erma Sulistyarningsih
Fakultas Kedokteran Universitas Jember
Jln. Kalimantan 37, Jember 68121
e-mail: dr.devdev@yahoo.co.id

Abstract

It has been reported that Bangle rhizome contains curcumin. The aimed of study was to asses the role of Zingibe cassumunar Roxb. on Nitric Oxide and Malondialdehyde of mice infected by Plasmodium berghei. This was a quasy experimental study with post test only control group design. The sample was 30 mice Balb/C, divided into 5 groups, 6 mice in each group. Mice were given Bangle extract for 14 days as an immunostimulant. The negative control was treated with aquadest, the positive control group was induced by Plasmodium berghei. The treatment group 1 (P1) was stimulated with Bangle; P2 was stimulated with Bangle and treated with Artemisinin; P3 was treated with Artemisinin. The treatment was started when Plasmodium found in blood of mice, for 4 days. The results showed that there was significant difference in NO serum production between both P1 and P2 with positive control, but no significant difference between groups in MDA serum production. It was concluded that Bangle as an immunostimulant were able to increase NO serum production but have no role in MDA production.

Kata kunci: Bangle, imunostimulant, Nitric Oxide, Malondialdehyde, *Plasmodium berghei*

Abstrak

Isolasi rimpang Bangle menunjukkan bahwa terdapat kandungan bioaktif yaitu kurkumin dalam rimpang Bangle. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran ekstrak Bangle terhadap produksi Nitric Oxide dan Malondialdehyde pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Jenis dari penelitian ini adalah quasy *experimental*, dengan *post test only control group design*. Sebanyak 30 ekor mencit dibagi ke dalam 5 kelompok, masing-masing terdiri dari 6 mencit. Pemberian ekstak Bangle diberikan selama 14 hari dengan tujuan sebagai imunostimulan. Kontrol negatif diberikan aquadest, kontrol positif diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. Kelompok perlakuan1(P1) distimulasi Bangle. Kelompok perlakuan2(P2) distimulasi Bangle diterapi Artemisinin sedangkan kelompok perlakuan3(P3) diterapi Artemisinin. Terapi diberikan selama 4 hari apabila Plasmodium telah ditemukan dalam darah. Data hasil penelitian ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara produksi NO serum P1 dan P2 dengan kontrol positif. Sedangkan produksi MDA serum tidak menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna antarkelompok, sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak Bangle mampu meningkatkan produksi NO serum namun tidak berperan terhadap produksi MDA serum.

Kata kunci: Bangle, imunostimulan, Nitric Oxide, Malondialdehyde, *Plasmodium berghei*

Pendahuluan

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh infeksi protozoa genus *Plasmodium*. *World Health Organization* (WHO) menyatakan bahwa berdasarkan *World malaria report* tahun 2012, kasus malaria di dunia pada tahun 2010 mencapai 219 juta dan diperkirakan 660 ribu orang meninggal. Sebanyak 90% kematian akibat malaria terjadi di benua Afrika [1].

Respon awal sistem imun untuk eliminasi parasit malaria membutuhkan interaksi antara respon imun alamiah yang diwakili oleh makrofag, neutrofil, dan sel fagosit lainnya. Sitokin yang dihasilkan oleh sel T yaitu interferon- γ (IFN- γ) akan merangsang dan mengaktifkan makrofag. Makrofag yang teraktivasi akan menghancurkan parasit malaria dengan cara memproduksi radikal oksigen dan radikal nitrogen. Radikal oksigen akan memproduksi *Reactive Oxygen Species* (ROS) seperti anion superoksida (O_2^-), radikal hidroksil (OH^-), hidrogen peroksida (H_2O_2), sedangkan radikal nitrogen akan memproduksi *Nitric Oxide* melalui induksi enzim *inducible Nitric Oxide Synthase* (iNOS) [2].

ROS termasuk radikal bebas dengan mudah dapat menyerang *Poly Unsaturated Fatty Acid* (PUFA) dari membran lipid yang menyebabkan peroksidasi lipid dan disorganisasi struktur sel dan fungsi sel. Diantara senyawa karbonil reaktif yang paling banyak dihasilkan dari proses peroksidasi lipid adalah *Malondialdehyde* (MDA) [3, 4]. Pengeluaran mediator di atas sebenarnya bertujuan untuk membunuh parasit, namun karena sifat radikal bebas yang tidak spesifik dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan sekitarnya [5].

Berbagai cara dilakukan untuk mencegah terjadinya komplikasi malaria, salah satunya dengan menggunakan imunostimulan yaitu kurkumin. Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) merupakan rempah-rempah dari famili yang sama dengan kunyit dan memiliki kandungan bioaktif yaitu kurkumin. Kurkumin yang merupakan komponen berwarna oranye-kuning dapat memodulasi aktivasi sel T, sel B, makrofag, neutrofil, *Natural Killer cells* (sel NK), dan sel dendrit [6]. Fraksi etil asetat Bangle mampu meningkatkan fagositosis makrofag hampir mendekati kontrol positif yaitu *Phyllanthus niruri* yang memang telah terbukti memiliki kemampuan imunostimulan [7].

Berdasarkan hal tersebut, dilakukan penelitian tentang potensi *Zingiber cassumunar Roxb.* sebagai imunostimulan dengan parameter produksi *Nitric Oxide* (NO) dan *Malondialdehyde* pada mencit Balb/C yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

Metode Penelitian

Rimpang Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) didapat dari Desa Andongrejo Kecamatan Tempurejo, Jember telah diidentifikasi di Herbarium Jemberense, Jurusan Biologi, Fakultas MIPA Universitas Jember.

Plasmodium berghei diperoleh dari Lab. Parasitologi FK UGM. Studi ini telah mendaaaapat persetujuan etik dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Unibersitas Jember.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit galur Balb/C berumur 2-3 bulan, berat badan 25-30 g. Sebelum digunakan sebagai hewan percobaan, semua mencit dipelihara terlebih dahulu selama 7 hari untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan dan berat badan serta menyeragamkan makanannya.

Mencit dibagi menjadi 5 kelompok, dan tiap kelompok terdiri atas 5 mencit, kelompok K(-) dengan pemberian aquadest; kelompok K(+) diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dan tanpa diterapi; (P1) mencit distimulasi Bangle, diinfeksi *Plasmodium berghei* dan distimulasi Bangle; (P2) mencit distimulasi Bangle, diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi Bangle-Artemisinin; (P3) mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi Artemisinin.

Pembuatan sediaan ekstrak rimpang Bangle dilakukan dengan cara perkolasi. Serbuk rimpang Bangle sebanyak 600 g dibasahi dengan 300 ml etanol, lalu dimasukkan ke dalam bejana tertutup dan didiamkan selama 3 jam. Filtrat sedikit demi sedikit dituangkan ke dalam perkolator sambil ditekan perlahan-lahan. Penambahan larutan etanol secukupnya 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 1 ml per menit. Larutan etanol secukupnya ditambahkan berulang-ulang ke dalam perkolator agar selalu terdapat larutan etanol di atas permukaan simplisia. Perkolasi dilanjutkan sampai didapat titik akhir perkolasi dengan petunjuk warna perkolat yang jernih.

Pemekatan hasil filtrasi menggunakan alat rotavapor pada suhu 48°C dengan kecepatan 200 rpm sehingga cairan habis terdestilasi. Penguapan air yang masih tersisa di dalam ekstrak dilanjutkan dengan *waterbath* pada ekstrak, sehingga hasil akhir ekstrak yang didapat adalah ekstrak kental.

Penentuan dosis ekstrak Bangle dan Artemisinin.

a. Dosis Bangle

Dosis kurkumin yang diperlukan mencit sebagai dosis imunostimulan adalah 30mg/hari. Sedangkan dalam 1g Bangle terdapat 33,2 mg kurkumin. Rumus perhitungannya adalah

$$\text{Dosis Bangle} = \frac{\text{Dosis kurkumin untuk mencit}}{\text{Kurkumin dalam Bangle}}$$

$$\text{Dosis Bangle} = \frac{30}{33,2}$$

Dosis Bangle = 0,9037 untuk 1 grBB mencit. Maka dosis Bangle pada penelitian ini adalah 22,6mg/25grBB mencit.

b. Dosis Artemisinin

Dosis Artemisinin yang diperlukan manusia sebagai obat antimalaria adalah 3,2mg/kgBB dihidroartemisinin dan 16mg/kg BB piperakuin. Rumus perhitungannya untuk 25grBB mencit adalah

$$\text{Dosis artemisinin} = \frac{\text{Dihidroartemisinin} \times \text{nilai konversi} \times \text{BB manusia} \times (25/20)}$$

$$\text{Dosis artemisinin} = 3,2 \times 0,0026 \times 70 \times 1,25$$

$$\text{Dosis artemisinin} = 0,728\text{mg}/25\text{grBB mencit.}$$

Mencit distimulasi dengan ekstrak Bangle dosis 22,6 mg/25gBB/hari. Stimulasi ini dilakukan selama 14 hari dengan tujuan meningkatkan respon imun mencit terhadap infeksi termasuk malaria.

Induksi *Plasmodium berghei* pada Hewan Coba dilakukan dengan cara sejumlah 0,2 ml (2×10^7) diinjeksikan secara intraperitoneal ke kelompok mencit coba.

Pemberian Ekstrak Bangle. Terapi ekstrak Bangle dengan dosis 22,6 mg/25gBB/hari ataupun dengan artemisinin dosis 0,728 mg/25gBB/hari diberikan apabila telah ditemukan adanya plasmodium di dalam darah mencit. Lama pemberian terapi selama 4 hari sesuai dengan metode Peter yang dimodifikasi. Selama 4 hari perlakuan, derajat parasitemia tetap diperiksa.

Produksi NO serum diukur dengan reagen Griess dengan modifikasi menurut Green *et al.* (1982) dan Ding *et al.* (1988). Serum mencit sebanyak 200µl diencerkan dengan PBS 200µl kemudian ditambahkan dengan ZnSO₄ sebanyak 20µl kemudian disentrifus dengan kecepatan 10.000 rpm

selama 5 menit. Penambahan ZnSO₄ ini bertujuan untuk deproteinase. Supernatan yang telah terbentuk diambil sebanyak 100µl dan kemudian dimasukkan ke dalam sumuran pada microplate 96 wells. Standar NO juga dimasukkan sebanyak 100µl pada sumuran yang masih kosong. Reagen Griess (reagen chromogenic) ditambahkan sebanyak 100µl dan dimasukkan ke dalam tiap sumuran. Selama 5 menit kemudian, diobservasi adanya perubahan warna dan stabilisasi. Pengukuran absorbansi pada 550 nm menggunakan *automated microplate reader*.

Produksi MDA serum diukur dengan metode *Thiobarbituric Acid Reactive Substance*. Serum darah mencit dimasukkan ke dalam tabung yang mengandung Na sitrat kemudian disentrifus pada kecepatan 3000 rpm selama 15 menit. Sebanyak 0,5 ml supernatan dimasukkan untuk tiap masing-masing tabung, tabung sebagai tes dan kontrol kemudian ditambahkan 100 µl TCA 100% selanjutnya divortex. Tahap berikutnya yaitu, sebanyak 250 µl HCL 0,1N ditambahkan juga pada masing-masing tabung kemudian divortex kembali. Tabung tes dan kontrol disentrifus kembali pada 3000 rpm selama 10 menit dan diambil supernatannya serta disaring dengan *glass wool*. Tabung tes, ditambahkan 100 µl *sodium thio barbituric acid*, sedangkan tabung kontrol tidak ditambahkan *sodium thio barbituric acid*. Semua tabung tersebut divortex dan dipanaskan dengan *waterbath* 100°C selama 25 menit. Angkat hasilnya dan biarkan dalam suhu ruang. Tahap terakhir yaitu hasil yang didapat dibaca pada spektrofotometer 531,6 nm.

Data hasil penelitian dianalisis menggunakan *Independen T-Test*. Perbedaan dianggap bermakna apabila nilai $p < 0,05$ dengan 95% interval kepercayaan. Analisis statistik dibantu dengan program SPSS 16 for windows.

Hasil Penelitian

Makrofag yang teraktivasi akan memproduksi beberapa senyawa sebagai mekanisme untuk menghancurkan parasit. Salah satu senyawa tersebut adalah NO. Produksi NO serum adalah konsentrasi NO dengan satuan µM dengan cara mereaksikan reagen Griess dengan serum mencit dari masing-masing kelompok percobaan. Kelompok Bangle-Artemisinin memiliki produksi NO serum

paling tinggi. Berikut merupakan tabel produksi NO serum (Tabel 1).

Tabel 1. Rata-rata produksi NO serum

Kelompok	Mean±SD
P1	2,033±0,206
P2	3,105±0,969
P3	1,919±0,366
K(+)	1,195±0,462
K(-)	0,700±0,143

Hasil analisis dengan uji t-test independen menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna pada kelompok Bangle dibandingkan dengan K(+) dengan nilai $p=0,045$ dan kelompok Bangle-Artemisinin dengan K(+) dengan nilai $p=0,037$. Kelompok artemisinin tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan K(+) serta K(+) tidak memiliki perbedaan yang bermakna juga dengan K (-).

Malondialdehyde (MDA) merupakan suatu radikal bebas hasil metabolit reaktif peroksidasi lipid yang umumnya digunakan sebagai biomarker biologis peroksidasi lipid untuk menilai stress oksidatif. Pengukuran MDA dengan TBA didasarkan pada reaksi antara MDA dan TBA dalam suasana asam. Kompleks MDA-TBA yang terbentuk memiliki warna merah jambu dan absorbansinya dapat diukur dengan menggunakan panjang gelombang maksimum sebesar 531,6 nm. Berikut merupakan tabel produksi MDA serum (Tabel 2)

Tabel 2. Rata-rata produksi MDA serum

Kelompok	Mean±SD
P1	3,453±0,598
P2	4,040±0,299
P3	3,923±0,274
K(+)	3,183±0,429
K(-)	3,223±0,355

Pada hasil analisis dengan uji t-test independen didapatkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok dengan nilai $p>0,05$.

Pembahasan

Produksi NO serum pada kelompok Bangle dan Bangle-Artemisinin memiliki perbedaan yang bermakna dibandingkan dengan K(+). Hasil penelitian ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak Bangle sebagai imunostimulan dapat meningkatkan respon imun melalui peningkatan NO. Kurkumin pada Bangle mampu berperan sebagai imunostimulan yang mampu meningkatkan *Reactive Oxygen Species (ROS)* yang selanjutnya akan mengaktifkan sinyal yang melibatkan *Peroxisome Proliferator Activated Reseptor Gamma (PPAR-γ)* dan *Nrf2*. Aktivasi kedua sinyal tersebut pada monosit dan makrofag mengakibatkan peningkatan ekspresi CD36 sehingga dapat meningkatkan fagositosis makrofag [8]. Fagositosis makrofag merupakan lini pertahanan pertama terhadap berbagai macam infeksi [9]. Makrofag yang teraktivasi menerima sinyal dari IFN-γ untuk menghasilkan *inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS)*. Enzim tersebut mengkatalis konversi dari L-arginin menjadi L-citrulline yang menghasilkan gas *Nitric Oxide* [10]. Peningkatan produksi *Nitric Oxide* berkaitan dengan peningkatan aktifitas makrofag sebagai sel fagosit. NO serum bukan hanya dihasilkan dalam mekanisme respon imun, namun juga dapat dihasilkan pada kondisi fisiologis oleh *endothelial (eNOS)* dan *neural (nNOS)*. eNOS dan nNOS memproduksi NO dalam jumlah yang kecil dan durasi yang pendek (detik-menit), sedangkan iNOS akan memproduksi NO dalam jumlah yang besar dan durasi yang panjang (hari). Oleh karena itu, produksi NO serum selama proses infeksi dihasilkan oleh ledakan produksi iNOS yang berperan dalam mekanisme respon imun untuk melawan parasit malaria [11].

Nitric Oxide serum pada kelompok Artemisinin tidak memiliki perbedaan yang bermakna ($p=0,100$) dibandingkan dengan K(+). Tidak adanya perbedaan yang bermakna antara produksi NO serum kelompok artemisinin dengan tanpa terapi menunjukkan bahwa mekanisme kerja artemisinin untuk melawan parasit malaria tidak berhubungan dengan produksi NO. Artemisinin bekerja sebagai antimalaria dan secara spesifik bekerja dalam tahap stadium eritrositik. Struktur jembatan peroksida pada molekul artemisinin diputus oleh ion Fe^{2+} (ion besi II) menjadi radikal bebas yang sangat reaktif dan berperan dalam menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam parasit yang mengakibatkan parasit tersebut mati. Penelitian yang dilakukan oleh

Nemati et al. (2013) juga menunjukkan hasil yang sama bahwa artemisinin tidak memiliki kemampuan untuk meningkatkan NO pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Leishmania major* [12].

K(+) memiliki produksi NO serum yang paling rendah dan tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan K(-) ($p=0,151$). Analisis data tersebut menunjukkan bahwa infeksi *Plasmodium berghei* masih belum mampu merangsang sistem imun untuk menghasilkan NO. Penelitian yang dilakukan oleh Chairul (2009) menunjukkan bahwa kelompok yang tidak diberi Bangle sebagai imunostimulan memiliki kapasitas dan aktivitas fagositosis makrofag yang paling rendah. Rendahnya kemampuan fagositosis makrofag ini akan berkaitan dengan rendahnya produksi NO yang dihasilkan [7].

Nitric Oxide merupakan mediator yang paling penting diantara kelompok mediator awal yang diproduksi oleh sistem respon imun alamiah [9]. Produksi NO dan O_2^- akan menghasilkan *peroxynitrite anion* ($ONOO^-$) yang berbahaya terhadap berbagai macam patogen termasuk parasit [13]. Analisis data pada penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian Bangle sebagai imunostimulan dapat meningkatkan produksi NO dibandingkan dengan kelompok tanpa terapi pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Analisis data MDA serum menunjukkan bahwa kelompok Bangle, Bangle-Artemisinin tidak memiliki perbedaan yang bermakna dengan K(+) maupun K(-). Hasil ini disebabkan karena peningkatan ROS oleh kurkumin masih dapat ditolerir dengan antioksidan sehingga tidak terjadi stress oksidatif yang memicu terjadinya peroksidasi lipid dengan produk akhir yaitu MDA. Mekanisme keseimbangan respon imun oleh antiosidan untuk menteralkan ROS mampu mencegah terjadinya stress oksidatif.

Simpulan dan Saran

Ekstrak Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) berperan terhadap peningkatan *Nitric Oxide* dibandingkan dengan kelompok tanpa terapi, namun tidak berperan terhadap produksi *Malondialdehyde* pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Penulis menyarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan variasi dosis

ekstrak Bangle, sampel lebih besar, dan uji toksisitas ekstrak rimpang Bangle.

Daftar Pustaka

- [1] WHO; 2012 [cited 2013 Sept 15]. Available from: http://www.who.int/malaria/publication/s/world_malaria_report/en/
- [2] Vazquez TA dan Fang FC. Oxygen-Dependent Anti Salmonella Activity Of Macrophages. Trends Microbiol. 2001; 9: 29-33.
- [3] Rath RN, Panigrahi N, Das BK, Das PK. Lipid Peroxidation In Acute Falciparum Malaria. Ind J Med Res. 1991; 93: 303-305.
- [4] Halliwell, Barry, Gutteridge, JMC. Free Radical in Biology and Medicine 3rd edition. London: Oxford University Press; 1998.
- [5] Lou J, Lucas R, Grau GE. Pathogenesis of Cerebral Malaria : Recent Experimental Data and Possible Applications for Human. Clinical Microbiology Reviews. 2001; 14: 810-820.
- [6] Jagetia GC dan Aggarwal BB. Spicing Up of the Immune System by Curcumin. Journal of Clinical Immunology. 2007; 27: 71.
- [7] Chairul. Phagocytosis Effectivity Test of Phenylbutenoid Compounds Isolated from Bangle (*Zingiber cassumunar Roxb.*) Rhizome Bio diversitas. 2009; 10:1.
- [8] Mimche PN, Taramell 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:S10.
- [9] Carneiro SM, Coutinho A. Immunity to microbes: lessons from primary immunodeficiencies. Infect Immun. 2007; 75:1545-1555.
- [10] Abu-soud HM dan Stuehr DJ. Nitric Oxide Synthases Reveal A Role For Calmodulin In Controlling Electron Transfer. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90:10769-10772.
- [11] Rabelink T, Luscher T. Endothelial Nitric Oxide Synthase: Host Defense Enzyme Of The Endothelium. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26:267-271.
- [12] Nemati S, Nahrevanian H, Haniloo A, Farahmand A. Investigation on Nitric Oxide and C- Reactive Protein Involvement in Anti-Leishmanial Effects of Artemisinin and Glucantim on Cutaneous Leishmaniasis. Advanced Studies in Biology. 2013; 5: 27-36.

- [13] Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corasaniti MT, Nistico G, Finazzi AA. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*. 1997; 388: 432-433.