

**Efektivitas Ekstrak Akar Pandan Wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.)
sebagai Antimalaria terhadap Jumlah Neutrofil dalam Darah Mencit (*Mus musculus*)
yang diinfeksi *Plasmodium berghei***

Pamela Rita Sari¹; Muhammad Ibnu Kahtan²; Ari Widiyantoro³

¹ Program Studi Kedokteran, FK UNTAN

² Program Studi Kimia, FMIPA UNTAN

³ Departemen Parasitologi Medik, Program Studi Kedokteran, FK UNTAN

Abstrak

Latar Belakang. Malaria masih menjadi masalah utama kesehatan penduduk dunia. Neutrofil berperan membantu membunuh parasit dengan cara memfagosit. Akar *Pandanus amaryllifolius* Roxb. memiliki senyawa yang dapat bekerja sebagai antimalaria. **Metode.** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental murni dengan metode *complete randomized design*. Sampel yang digunakan sebanyak 5 kelompok diinfeksi malaria dengan *Plasmodium berghei* dan satu kelompok lain sebagai kelompok normal. Tiga kelompok diberi ekstrak metanol pandan wangi masing-masing dengan konsentrasi 6,5%, 13%, dan 26%, kelompok kontrol positif diberi DHP, kelompok kontrol negatif diberi aquades, dan kelompok normal tidak diintervensi. **Hasil.** Kelompok konsentrasi 6,5%, 13%, dan 26% memiliki aktivitas antimalaria dan berpotensi sebagai imunomodulator terhadap neutrofil. Konsentrasi paling efektif adalah 26% dengan tingkat korelasi antara tingkat parasitemia dan jumlah neutrofil ($p = 0,037$). **Kesimpulan.** Ekstrak akar pandan wangi memiliki aktivitas antimalaria paling baik pada konsentrasi 26% yang ditandai adanya penurunan jumlah parasitemia dan peningkatan neutrofil.

Kata Kunci: Antimalaria, Akar Pandan, Neutrofil, *Plasmodium berghei*

Background. Malaria remains a major health problem in the world. Neutrophils is acting as phagocyte to kill the parasite. The root of *Pandanus amaryllifolius* Roxb. obtained compounds that can work as antimalarial agent. **Method.** This experimental study used 6 groups with 5 groups was infected by *Plasmodium berghei* while the other one as a normal group. Three groups were given extract with dose of each group was 6,5%, 13%, and 26%, positive control group was given DHP, negative control group was given aquades, and normal group was not intervened. **Results.** The concentration groups of 6.5%, 13%, and 26% had antimalarial activity and potentially as immunomodulators to neutrophils. The most effective concentration was 26% with correlation level between parasitemia level and neutrophil count ($p = 0,037$). **Conclusion.** The most effective concentration was 26% that could be evaluated with decreased level of parasitemia and increased of neutrophile count on malarial mice.

Keywords: Antimalaria, Pandanus root, Neutrophil, *Plasmodium berghei*

PENDAHULUAN

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang disebabkan oleh jenis parasit *Plasmodium*. Parasit ini ditularkan melalui vektor nyamuk *Anopheles* betina dan hidup berkembang biak dalam sel darah merah manusia.^{1,2} Hingga kini malaria masih menjadi masalah utama kesehatan penduduk dunia, karena dapat menyerang semua orang baik laki-laki maupun perempuan dan berpotensi menyebabkan kematian terutama pada kelompok resiko tinggi seperti bayi, anak balita, dan ibu hamil.^{3,4,5}

Di Asia Tenggara jumlah kasus malaria dikonfirmasi sebanyak 1,5 juta, 97% dari kasus tersebut Indonesia menempati peringkat ke-2 (21%).⁶ Wilayah Indonesia yang endemis dengan malaria sebagian besar berada di kawasan bagian timur. Kalimantan dan beberapa wilayah Sumatra masuk dalam kategori endemik sedang.^{3,7} Secara nasional angka kesakitan tahun 2013 adalah 1,38 per 1.000 penduduk berisiko. Sementara

berdasarkan indikator upaya penanggulangan malaria Indonesia (*API/annual parasite incidence*) pada tahun 2013 menargetkan sebanyak <1,25 per 1.000 penduduk berisiko. Sehingga dapat dikatakan target API tahun 2013 belum tercapai.²

Patogenesis malaria sangat kompleks, sehingga dukungan peranan sistem imun penting dalam pertahanan tubuh terhadap malaria, baik melibatkan sistem imun non-spesifik maupun spesifik. Sistem imun non-spesifik terdiri atas pertahanan fisik, biokimia, humoral dan seluler seperti monosit/makrofag, neutrofil, basofil, eosinofil dan sel NK (*Natural Killer*). Neutrofil sebagai imunitas seluler berperan membantu membunuh parasit dengan cara memfagosit. Selama memfagosit neutrofil akan mengeluarkan radikal bebas baik O^2 dependen seperti superoksida ataupun O^2 independen seperti *nitric oxide*.^{7,8,9,10,11}

Selama ini penanggulangan malaria dilakukan secara komprehensif dengan upaya promotif, preventif dan kuratif.

Artemisin dan derivatnya merupakan obat antimalaria yang dikenal sebagai lini pertama. Namun WHO melaporkan bahwa obat antimalaria tersebut sudah terdeteksi resisten pada beberapa negara dunia, khususnya di Greater Mekong Subregion misalnya di Cambodia, Myanmar, Thailand dan Vietnam.^{6,12}

Berhubungan dengan hal diatas, mendorong peneliti untuk mencari alternatif obat antimalaria baru agar dapat mengurangi perluasan resistensi obat antimalaria lini pertama. Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai antimalaria adalah pandan wangi. Penelitian Widiyantoro *et al.*, (2014) melaporkan hasil ekstrak akar pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yang mengandung alkaloid dan terpenoid terbukti mempunyai aktivitas antimalaria yang diuji secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum*.¹³ Namun belum banyak diketahui pengaruh dari bahan aktif akar pandan yang berpotensi sebagai antimalaria terhadap sistem imun.

METODE

Alat dan Bahan

Instrumen yang digunakan dalam penelitian yaitu toples kaca besar, blender, saringan, kandang mencit, timbangan digital, timbangan listrik (*Denver Instrument Company AA-160*), gunting ekor mencit, sonde, sarung tangan steril dan non-steril, spuit injeksi, gelas ukur, pipet ukur, pipet mikro, kaca objek, kaca penutup, minyak emersi, mikroskop cahaya, *stopwatch* dan kamera.

Bahan-bahan penelitian yang digunakan adalah ekstrak akar pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.), metanol, aquades, etanol 96%, *Giemsa Staining*, mencit jantan (*Mus musculus*), DHP (*Dihydroartemisinin- Piperaquin*), dan *Plasmodium berghei*.

Persiapan Hewan Uji

Sampel mencit dibagi menjadi 6 kelompok, yang mana masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor mencit, dengan kelompok pertama sebagai kelompok normal tanpa diberi perlakuan,

kelompok kedua sebagai kontrol positif yang diberi perlakuan menggunakan DHP, kelompok ketiga sebagai kontrol negatif yang diberi aquades dan kelompok selanjutnya ke-4, ke-5, dan ke-6 masing-masing diberi ekstrak akar pandan wangi dengan dosis yang bervariasi.

Sebelum diberi perlakuan, semua sampel mencit diaklimatisasikan selama kurang lebih satu minggu agar dapat beradaptasi dengan lingkungan percobaan. Pemberian makanan dan minuman dilakukan secara teratur.

Persiapan Simplisia

Sampel yang akan dibuat ekstrak dalam penelitian adalah akar pandan wangi (*Pandanus amaryllifolius* Roxb.) yang sudah diidentifikasi di Laboratorium Taksonomi Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada. Tanaman tersebut diperoleh dari daerah Gamping, Yogyakarta. Akar yang masih segar dibersihkan dengan air mengalir dan dikeringkan beberapa hari hingga kandungan kadar air mencapai < 10%, kemudian dipotong-potong kecil

sekitar 2-3 cm kemudian diblender hingga menjadi menjadi serbuk dan disaring atau diayak dengan tujuan mendapatkan serbuk yang lebih halus.

Pembuatan Ekstrak

Sampel serbuk simplisia akar pandan wangi yang sudah menjadi serbuk halus dimaserasi dengan metanol 80% pada suhu kamar selama 3x24 jam. Kemudian sampel disaring dan dipisahkan antara filtrat (ekstrak cair) dan residu. Residu dimaserasi kembali dengan metanol yang baru (sampai jernih, minimal 3 kali pengulangan). Seluruh filtrat yang terkumpul dipekatkan menggunakan evaporator dengan suhu 55°C - 60°C hingga didapatkan ekstrak kental metanol dan ditimbang untuk mengetahui rendemennya, kemudian dilakukan uji skrining fitokimia. Setelah menjadi ekstrak kental metanol, ekstrak tersebut dilakukan uji antimalaria terhadap jumlah neutrofil pada mencit *Mus musculus* yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*.

Pembiakan *Plasmodium berghei* Pada Mencit Pendoror

Pembiakan *Plasmodium berghei* dilakukan dengan cara menggunakan 3 ekor mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* dan didiamkan selama beberapa hari yang nantinya sebagai pendonor. Proses inokulasi dari mencit pendonor ke mencit uji dilakukan secara intraperitoneal. Kategori transferisasi dari mencit pendonor ke mencit uji jika sediaan prepat yang dihitung parasitemianya mencapai 2-3%. Perhitungan parasitemia dilakukan berdasarkan rumus :

$$\% \text{ Parasitemia : } \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Pengambilan dan Pemeriksaan Sampel Darah

Pengambilan darah dilakukan pada bagian perifer mencit (ekor). Setelah itu dilakukan pemeriksaan dengan cara membuat sediaan apusan darah tepi yang

menggunakan sampel darah sekitar 6 μL per sediaan dari masing-masing mencit. Sediaan apus yang dibuat dan dipulas dengan baik akan diwarnai dengan pewarnaan *Giemsa*, kemudian dilakukan pengamatan hitung jenis leukosit (neutrofil) dibawah mikroskop cahaya dengan pembesaran 40x-100x. Hitung jenis leukosit dilakukan hingga jumlah leukosit terpenuhi 100 sel kemudian diidentifikasi dan dihitung jumlah persentase masing-masing jenis leukosit berdasarkan rumus :

$$\text{Hitung Jenis Leukosit : } \frac{n}{100 \text{ sel}} \times 100\%,$$

dengan n adalah jumlah salah satu jenis leukosit (neutrofil/basofil/eusinofil/limfosit /monosit)

Analisis Data

Analisis data diproses menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Data yang diperoleh diuji dengan *Shapiro wilk* dan

Levene test untuk mengetahui distribusi dan homogenitas data. Apabila terdistribusi normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji *One Way Anova*. Jika tidak terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan uji alternatif yaitu uji *Kruskal-Wallis*. Jika hasil analisis signifikan, maka dilanjutkan uji *Mann-Whitney* untuk menemukan dari kelompok mana saja yang terjadi perbedaan bermakna (signifikan). Terakhir data dikorelasikan menggunakan uji *Spearman* apabila data tidak terdistribusi normal, atau uji *Pearson* dengan syarat data terdistribusi normal dan homogen.

HASIL

Hasil determinasi tumbuhan pada penelitian ini adalah akar dari tanaman *Pandanus amaryllifolius* Roxb. Simplicia sebanyak 450 gram yang melalui proses ekstraksi menghasilkan 13 gram ekstrak kental metanol. Hasil uji skrining fitokimia, ekstrak metanol akar pandan

mengandung alkaloid, flavonoid, saponin dan triterpenoid/steroid.

Perhitungan parasitemia dilakukan dengan melihat jumlah eritrosit yang terinfeksi per 1000 eritrosit dalam persen. Pengamatan dilakukan setiap hari setelah 2,5 jam pemberian terapi ekstrak akar pandan untuk kelompok uji, DHP untuk kelompok kontrol positif dan aquades untuk kelompok negatif selama 5 hari. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa akar pandan memiliki aktivitas sebagai anti-malaria, dibuktikan dengan semakin tingginya dosis yang digunakan, semakin rendah tingkat parasitemianya.

Perhitungan persentase neutrofil dilakukan dengan cara mengamati sediaan apusan darah tepi menggunakan rumus hitung jenis leukosit dibawah mikroskop. Hasil perhitungan menunjukkan semakin tinggi tingkat dosis ekstrak yang diberikan, maka semakin tinggi persentase jumlah neutrofil. Hal tersebut menunjukkan

bahwa ekstrak akar pandan berpotensi sebagai imunomodulator.

Berdasarkan hasil data yang diperoleh, disimpulkan bahwa ekstrak metanol akar pandan dengan konsentrasi 26% merupakan dosis yang paling efektif dibanding dengan konsentrasi 6,5% dan 13%. Hasil uji korelasi dosis efektif (26%) juga menunjukkan hubungan yang signifikan antara tingkat parasitemia dan jumlah neutrofil dengan nilai $p = 0,037$.

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil perhitungan parasitemia dan neutrofil, secara keseluruhan menunjukkan bahwa ekstrak akar pandan yang mengandung bahan aktif seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan steroid/triterpenoid, memiliki aktivitas anti-malaria pada tubuh mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Terbukti selama 5 hari perlakuan dengan dosis yang bervariasi, kadar parasitemia semakin menurun meskipun penurunannya tidak secepat pada kelompok kontrol positif. Hal

tersebut sejalan dengan penelitian Widiyantoro *et al.*, (2014) yang melaporkan bahwa ekstrak akar pandan dapat menurunkan tingkat parasitemia *Plasmodium falciparum* secara in-vitro. Namun diantara dosis konsentrasi 6,5%, 13% dan 26%, dosis yang paling efektif menurunkan tingkat parasitemia adalah konsentrasi 26%. Di duga kandungan alkaloid pada gugus lakton mampu menghambat pertumbuhan parasit dalam darah. Menurut Hargono (1996), sejak dulu alkaloid diketahui bersifat sitotoksik. Mekanisme kerja alkaloid sebagai antimalaria ialah melalui inhibisi detoksifikasi *haem* parasit dalam vakuola makanan.

Berdasarkan hasil terapi hari pertama dari keseluruhan varian dosis, menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap tingkat parasitemia dan jumlah neutrofil yang dibandingkan dengan kontrol positif dan negatif. Terapi hari kedua, ketiga varian dosis menunjukkan perbedaan yang signifikan pada tingkat parasitemia dan

tidak signifikan pada jumlah neutrofil terhadap kontrol positif. Namun terlihat sangat signifikan pada jumlah neutrofil terhadap kontrol negatif. Peningkatan tertinggi jumlah neutrofil terlihat mulai pada hari kedua hingga mencapai puncaknya pada hari ketiga. Hal tersebut berhubungan dengan waktu paruh kehidupan neutrofil yang sangat pendek. Selain itu peningkatan parasitemia dapat meningkatkan rangsangan terhadap sel-sel imun sebagai sistem pertahanan tubuh termasuk neutrofil yang berperan sebagai sel fagosit terhadap mikroba. Hal tersebut dibuktikan dengan uji korelasi *spearman* yang menunjukkan perbedaan yang signifikan terhadap tingkat parasitemia dan jumlah neutrofil pada dosis efektif, yang mana semakin tinggi tingkat parasitemia maka semakin tinggi pula jumlah neutrofil meskipun masih dalam rentang normal. Mekanisme kerja neutrofil dalam memfagosit yaitu dengan cara mengeluarkan radikal bebas baik O^2

dependen seperti superoksida ataupun O^2 independen seperti *nitric oxide*.

Korelasi yang signifikan juga membuktikan bahwa bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak akar pandan wangi seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan steroid/triterpenoid, tidak hanya memiliki aktivitas antimalaria namun dapat juga berpotensi sebagai imunomodulator. Terlihat bahwa terdapat perbedaan peningkatan jumlah neutrofil dari ketiga varian dosis terhadap kontrol negatif. Hal tersebut diduga kandungan bahan aktif ekstrak akar pandan seperti flavonoid, saponin dan steroid/triterpenoid berpotensi sebagai imunomodulator. Studi lainnya juga mengatakan bahwa kandungan flavonoid pada daun pepaya memiliki sifat imunomodulator yang dapat bekerja terhadap limfokin interferon gamma yang dihasilkan oleh sel T, sehingga akan merangsang sel-sel fagosit untuk melakukan proses fagositosis. Selain itu dapat juga meningkatkan proliferasi sel B dan peningkatan IL-2.¹⁴

KESIMPULAN

Ekstrak akar pandan wangi memiliki aktivitas antimalaria paling baik pada konsentrasi 26% yang ditandai adanya penurunan jumlah parasitemia dan peningkatan neutrofil.

DAFTAR PUSTAKA

1. WHO. Global Technical Strategy for Malaria 2016–2030. Geneva : World Health Organization, 2015
2. Kemenkes RI (Kementerian Kesehatan Republik Indonesia). Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2013. Jakarta: Kemenkes RI, 2014.
3. Kemenkes RI (Kementrian Kesehatan Republik Indonesia). Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan. Epidemiologi Malaria di Indonesia. Pusdatin Direktorat Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang. Jakarta : Kemenkes RI, 2011.
4. Genton B., D'Acremont V., Rare L., Baea K., Reeder J.C., Alpers M.P., & Müller I. Plasmodium vivax and Mixed Infections Are Associated with Severe Malaria in Children: A Prospective Cohort Study from Papua New Guinea, 2008. PLoS Medicine, 5(6), e127.
5. Rodriguez-Morales A.J., Sanchez E., Vargas M., Piccolo C., Colina Arria M., Franco-Paredes C. Pregnancy outcomes associated with Plasmodium vivax malaria in northeastern Venezuela. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006; p74:755–757
6. WHO. World Malaria Report 2014. Geneva : World Health Organization, 2014.
7. Harijanto P. Eliminasi Malaria pada Era Desentralisasi. Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan, Vol. 1, Triwulan 1. Jakarta : Kemenkes RI, 2011; Hal.:23
8. Baratawidjaja K.G. Immunologi Dasar. Edisi ke-11. Jakarta : Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2014
9. Harijanto P. Malaria. Buku Ajar Ilmu Penyakit Dalam Jilid I, Edisi VI. Jakarta : Interna Publishing, 2014; Hal.: (80) 595-612
10. Suparman E. Malaria pada kehamilan. 146th ed. Jakarta: Cermin Dunia Kedokteran; 2005;p.19-28.
11. White N.J & Breman J.G. Malaria and babesiosis: Disease caused by red blood cell parasites. In: Principles of Internal Medicine. 16th ed. McGraw-Hill Med Pub Div, 2005; p.1218-32.
12. WHO. Emergency Response to Artemisinin Resistance In The Greater Mekong Subregion. Geneva : World Health Organization, 2013.
13. Widiyantoro, Ari et al.. Skrining Fitokimia Dan Aktivitas Antimalaria Fraksi Polar Akar Pandan (Pandanus amaryllifolius Roxb.) 2014. Diakses pada tanggal 26 Oktober 2015 dppm.uui.ac.id/ dokumen/DPPM-UUI_pros62_Hal_823-830_Sikring_Fitokimia.pdf
14. Febrianty, Herminah et al. Modulasi Sel T CD4+ dan CD8+ pada Spleen Ayam Arab Putih (Gallus turcicus) dengan Ransum yang Mengandung Daun Pepaya (Carica pepaya L.). biotropika.ub.ac.id/index.php/biotropika/article/view/367