

STUDI IN VITRO: PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK *Holothuria athra* DENGAN PELARUT N-HEKSANA TERHADAP PERTUMBUHAN *Plasmodium falciparum*

Hanina Maria Al Qibthiya¹, Prawesty Diah Utami^{2*}, Erina Yatmasari³

¹Prodi Kedokteran - Universitas Hang Tuah, Surabaya, Jawa Timur, Indonesia

^{2,3}Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Hang Tuah Surabaya, Jawa Timur, Indonesia

*Korespondensi : prawesty.diah@hangtuah.ac.id, Telp/ HP: 08113442112

Naskah Masuk : 11 Februari, Revisi : 23 Mei, Layak Terbit 31 Mei

<https://doi.org/10.30649/sbj.v1i3.30>

Abstrak

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh *Plasmodium* yang ditularkan nyamuk *Anopheles* betina infeksi. Teripang keling (*Holothuria atra*) adalah biota laut yang mengandung berbagai komponen bioaktif yaitu alkaloid, flavonoid, saponin dan terpenoid sebagai antimalaria. Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teripang keling (*Holothuria atra*) terhadap pertumbuhan *P. falciparum* berdasarkan studi in vitro. Penelitian ini menggunakan sampel kultur *P. falciparum* strain 3D7 dan ekstrak *H. atra* yang diberikan pelarut n-heksana. Media kultur dibagi menjadi 3 kelompok kontrol yaitu kontrol negatif, kontrol positif dan dengan penambahan ekstrak *H. atra* pelarut n-heksana. Ketiga kelompok kontrol ini akan di inkubasi selama 48 jam pada suhu 37° C. Setelah itu dilakukan pemeriksaan kadar pemeriksaan kadar parasitemia dan *inhibitory rate* menggunakan mikroskop cahaya serta pengukuran IC₅₀ menggunakan analisis probit melalui program SPSS. Pada penelitian ini memperlihatkan adanya efek antimalaria dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum*. Semakin besar dosis yang diberikan maka efek hambatannya juga semakin besar. Nilai IC₅₀ ekstrak n-heksana *H. atra* adalah 1,23 µg/ml. Dari hasil analisis membuktikan bahwa ekstrak teripang keling (*Holothuria atra*) dengan pelarut N-heksana memiliki efek antimalaria yang dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dan mempunyai aktivitas yang tinggi sebagai antimalaria.

Kata kunci : *Holothuria atra*, n-heksana, Studi in vitro, *Plasmodium falciparum*

Abstract

Malaria is a disease caused by *Plasmodium* which is transmitted by an infective female *Anopheles* mosquito. Rivet sea cucumber (*Holothuria atra*) is a marine biota that contains various bioactive components, namely alkaloids, flavonoids, saponins and terpenoids as antimalarials. The study was conducted to determine the effect of giving extract of sea cucumber (*Holothuria athra*) on the growth of *P. falciparum* based on in vitro studies. This study used a culture sample of *P. falciparum* strain 3D7 and *H. atra* extract treated with n-hexane as solvent. The culture media were divided into 3 control groups, namely negative control, positive control and with the addition of n-hexane solvent *H. atra* extract. These three control groups will be incubated for 48 hours at 37°C. After that, the levels of parasitemia and inhibitory rate examinations were carried out using a light microscope and IC₅₀ measurements using probit analysis through the SPSS program. This study showed an antimalarial effect in inhibiting the growth of *P. falciparum*. The larger the dose given, the greater the inhibitory effect. The IC₅₀ value of *H. atra* n-hexane extract was 1.23 g/ml. The sea cucumber extract (*Holothuria atra*) with n-hexane as a solvent has an antimalarial effect that can inhibit the growth of *P. falciparum* and has high activity as an antimalarial.

Keyword: *Holothuria atra*, n-hexane, in vitro studies, *Plasmodium falciparum*

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit yang disebabkan oleh *Plasmodium* yang ditularkan nyamuk *Anopheles* betina infektif. Mempunyai 5 jenis *Plasmodium* yang menyebabkan malaria pada manusia yaitu *P.ovale*, *P.vivax*, *P.falciparum*, *P.knowlesi*, dan *P.malariae*, dua diantaranya *P. falciparum* dan *P. vivax* yang paling berbahaya ^(1,2). Menurut laporan WHO, 228.000.000 kasus pada 2018 ditemukan, sehingga perkiraan angka kematian karena malaria mencapai 405.000 ^(3,4). Angka malaria tertinggi di Indonesia banyak ditemukan di wilayah timur meliputi Papua Barat sebesar 4.5 persen, Papua sebesar 6.1 persen, dan Nusa Tenggara Timur sebesar 2.6 persen ^(5,6).

P. falciparum adalah salah satu *Plasmodium* yang paling berbahaya dari *Plasmodium* lainnya dan dapat menyebabkan manifestasi parah. Komplikasi yang dapat terjadi adalah malaria serebral, asidosis, anemia berat, gagal ginjal akut, dan hipoglikemia. Pada tahun 2018, *P. falciparum* 99,7% kasus malaria di wilayah Afrika, 50% kasus di wilayah Asia Tenggara, 71% kasus di Mediterania Timur dan 65% di Pasifik Barat. Menurut WHO penggunaan obat kombinasi turunan dari Artemisin yaitu Artemisinin-based Combination Therapy (ACT) dalam mengobati malaria yang disebabkan oleh *P. falciparum* ini menghilangkan parasit yang tersisa dalam tubuh dalam waktu yang cepat ⁽⁷⁾. Molekuler untuk resistensi artemisinin telah diidentifikasi, dan resistensi artemisinin didefinisikan sebagai pembersihan parasit yang tertunda setelah pengobatan dengan monoterapi artesunat atau dengan terapi

kombinasi berbasis artemisinin (ACT). Pembersihan yang tertunda dapat meningkatkan resiko resistensi terhadap obat, terutama pada pasien dengan kadar parasitemianya yang tinggi, dan/atau memfasilitasi pemilihan parasit yang resisten terhadap obat. Kegagalan pengobatan cenderung meningkat dengan resistensi terhadap obat ^(4,6).

Pemanfaatan biota laut dapat sebagai pengobatan alternatif yang dapat mengatasi resistensi obat malaria seperti Teripang keling (*Holothuria athra*). Pengembangan teripang sebagai antimalaria perlu terus dilakukan agar mendapatkan produk yang berkhasiat, tetapi mempunyai efek samping yang minimal ^(8,9). Secara in vitro ekstrak *Holothuria athra* dapat membunuh parasit *Plasmodium falciparum*. Berbagai komponen bioaktif yang terkandung pada teripang yang digunakan ialah alkaloid, flavonoid, saponin dan terpenoid. Antimalaria pada ekstrak teripang di dapat dari alkaloid dan terpenoid. Dari penelitian sebelumnya telah dilakukan pengujian efek inhibisi dari senyawa aktif *H. athra* yang menyebabkan hasil yang efektif dalam menghambat perkembangan *P. falciparum* yang di uji secara in silico ^(4,10).

Pemilihan pelarut n-heksana dikarenakan merupakan senyawa non polar yang sangat sesuai untuk melarutkan senyawa non polar seperti terpenoid. Pada studi sebelumnya menyatakan bahwa penggunaan pelarut n-heksana pada *Holothuria athra* memiliki efek antimalaria yang signifikan jika dibandingkan dengan ekstrak etanol maupun etil asetat. Ekstrak n-heksana menunjukkan angka parasitemia terkecil dan daya hambat *P. falciparum* yang tinggi ditunjukkan ekstrak n-heksana ^(4,8).

Berdasarkan kejadian diatas, maka peneliti tertarik untuk melakukan penelitian eksperimental studi *in vitro* untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak *Holothuria athra* dengan pelarut n-heksana terhadap pertumbuhan *P. falciparum*.

Berdasarkan fenomena yang dipaparkan pada paragraf sebelumnya, maka penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak teripang keling (*Holothuria athra*) terhadap pertumbuhan *P. falciparum* berdasarkan studi *in vitro* menggunakan metode studi eksperimental. Diharapkan penelitian ini bisa menjadi acuan untuk penelitian yang mengeksplorasi *H.athra*. Selain hal itu jika hasil penelitian ini terbukti manfaat *H.athra* untuk sebagai antimalaria pada malaria maka dapat dilakukan penelitian lebih lanjut.

METODE

Penelitian eksperimental ini, menggunakan desain penelitian “*post Test Only Control Group Design*”, karena pengukuran variabel diteliti di fase akhir penelitian. Ekstrak teripang keling *H. athra* menjadi bahan yang di uji dan pelarut yang digunakan dalam proses ekstrak adalah pelarut n-heksana.

Ada 3 kelompok yang digunakan dalam penelitian ini ialah kelompok K- (hanya mengandung *P.falciparum* tanpa diberikan perlakuan), kontrol positif (diberikan klorokuin), dan kelompok ekstrak n-heksana. Masing-masing berisi 10 media kultur *P. falciparum* dan mendapat dosis 0.01; 0.1; 1; 10; dan 100 µg/ml. Setiap kelompok dilakukan duplikasi 2 kali, selanjutnya di inkubasi dalam 48 jam dengan suhu 37°C pada proses pemberian

perlakuan dan kultur semua sampel.

Ekstrak teripang keling *H. athra* di koleksi dari perairan Sapeken Sumenep Pulau Madura, telah dibersihkan, dibuang isi perutnya, dipotong dalam ukuran kecil serta dilakukan freeze drying serta diekstraksi dengan pelarut n-heksana. Pemberian ekstrak dilakukan setelah *P. falciparum* tumbuh dalam media kultur. Pada penelitian ini konsentrasi yang digunakan adalah 5 jenis konsentrasi dari 0,01-100 µg/ml. Dosis ekstrak teripang yang signifikan menekan pertumbuhan parasit adalah diatas 40 µg/ml. Angka tersebut menjadi dasar pijakan untuk penemuan dosis dalam penelitian ini. Serta pemeriksaan analisa probit dilakukan untuk mengukur efek antimalaria ^(8,10).

Pada penelitian ini dilakukan dengan empat tahapan yaitu preparasi, ekstraksi, pembiakan *P. falciparum* dan pengujian aktivitas antimalaria *in vitro* dengan melakukan observasi terhadap kadar parasitemia dan *inhibitory rate*/persentase inhibisi.

Untuk penelitian media kultur *P. falciparum* di lakukan di *Tropical Disease Center* Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga. Teripang keling (*Holothuria athra*) di dapatkan dari Kep. Madura, desa sabuntan, kec. Sapeken, kab. Sumenep dan proses ekstraksi dilakukan di FKH Universitas Airlangga. Uji taksonomi untuk menentukan spesies teripang dilakukan di MIPA Biologi ITS.

Alat dan bahan penelitian

Alat proses ekstrak

Gelas ukur, Gelas Erlenmeyer, rotary evaporator, corong pisah, freeze dryer object glass dan cover glass, Shaker , timbangan digital, botol kaca, Inkubator, gelas piala, tabung *sentrifuge* ukuran 10 mililiter, 15

mililiter, dan 50 mililiter; Membrane *micropore*, ruang *Laminar Air Flow*, Pipet micro, Pipet pasteur, kompresor, magnetic stirrer, erlenmeyer, alat sentrifugasi, mikroskop, slide mikroskop, esikator, dan cairan dimeter 50 mm⁽¹⁰⁾.

Bahan pembuatan ekstrak

Pembuatan ekstrak teripang membutuhkan bahan dasar teripang keling (*H. athra*) dengan pelarut n-heksana.

Bahan uji aktivitas *in vitro* malaria

Bahan yang dibutuhkan adalah RPMI 1640, *aquadest*, natrium bikarbonat, HEPES buffer, gentamisin, plasma dan eritrosit manusia, pewarna giemsa, DMSO, minyak emersi dan metanol. Penelitian ini menggunakan *Plasmodium falciparum* strain 3D7 dari Lab. malaria Institut Tropical Disease Center Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur. Dilengkapi dengan Packed Red Blood Cell (RBC) serta plasma manusia yang bergolongan darah O rhesus (+) dari PMI Surabaya digunakan untuk membantu pembiakkan *Plasmodium falciparum*.

Preparasi dan Ekstraksi

Batang teripang seberat 1 kg dibersihkan, dipotong kecil-kecil, dan dikeringkan. Setelah kering, kemudian dihaluskan, menghasilkan 900 g bubuk teripang. Ekstraksi menggunakan metode maserasi. Serbuk *H. athra* dilarutkan dengan pelarut n-heksana selama 24 jam. Maserat yang diperoleh ditampung dan diuapkan menggunakan rotary evaporator dimasukkan ke dalam wadah kedap udara dan disimpan dalam lemari es sampai akan digunakan^(8,11).

Pembiakkan *P. Falciparum*

Pembuatan media tak lengkap (1 L)

Menyiapkan tabung *Beaker* yang berisi komponen air steril, hipoksantin 50 mg dan HEPES 5,94 gr. Kemudian dilakukan pengadukan magnetis selama 1 jam agar teraduk dan tercampur sampai larut dan homogen. Menambahkan 1 *sachet* serbuk RPMI 10,4 gr. Selanjutnya, dibilas dengan air steril *sachet* RPMI beberapa kali secara perlahan. Memasukkan air steril hingga volume 1 liter dan dicampur hingga homogen. Selanjutnya, menambahkan NaHCO₃ 2 gr lalu diaduk hingga larut. Setelah itu, memasukkan Gentamisin 25 mg dan diaduk sampai larut. Terakhir sterilisasi, disaring dengan membrane pori-pori 0,22 µm, kemudian diletakkan dalam botol steril dengan temperatur 4°C^(10,12).

Pembuatan media lengkap (50 mL)

Kedalam tabung falcon 50 ml yang sudah steril dimasukkan media tak lengkap 42,5 mL. Ditambahkan plasma sebanyak 7,5 mililiter, kemudian dilakukan pengocokan perlahan-lahan sampai campuran merata sampai didapatkan media dengan kadar plasma sebanyak 15% dan media kultur siap digunakan untuk pembiakkan *Plasmodium*^(10,12).

Preparasi Eritrosit dan Plasma Segar Manusia

Preparasi Eritrosit 50%

Kedalam tabung falcon bertutup yang telah disterilkan dimasukkan darah sebanyak 7,5 mL. Tabung falcon yang berisi darah di cuci dengan media lengkap 7,5 ml lalu disentrifugasi 1500 rpm dalam 5 menit. Ulangi proses ini 3 kali. Darah yang sudah di cuci di campur lagi dengan media lengkap dengan volume yang sama sampai kandungan eritrosit menjadi 50% (RBC 50%)^(10,12).

Preparasi Plasma Segar Manusia

Plasma diaktivasi dengan proses inkubasi suhu 56°C 30 menit. Memasukkan plasma 15 mL yang sudah diaktivasi pada tabung falcon bertutup. Mengendapkan fibrin pada plasma dengan sentrifugasi pada 1500 rpm 5 menit^(8,10).

Kultivasi *Plasmodium falciparum* Pencairan (Thawing)

Mencairkan *Plasmodium falciparum* dengan menghangatkan *P. falciparum* dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 15 menit. Masukkan suspensi parasit yang mencair ke dalam tabung falcon steril 15 mL dan tambakan 2 ml NaCl 3,5 % menggunakan mikropipet kemudian sentrifugasi 1500 rpm 5 menit. Lalu buang bagian supernatan. Cuci parasit dengan medium tak lengkap, kemudian disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Selanjutnya, buang bagian supernatan. Lakukan berulang sebanyak 2x. Tambahkan media lengkap 4 ml dan 1 ml RBC 50%, campur dengan pipet hingga homogen. Suspensi parasit diletakkan pada cawan petri. Cawan petri dimasukkan ke bejana eksikator yang berisi lilin yang menyala dan tertutup rapat. Setelah lilin mati, masukkan eksikator ke inkubator dan dilakukan inkubasi pada temperatur 37°C. Media biakan diganti dengan media baru setiap 24 jam^(10,12).

Penggantian Media

Mempipet sebanyak banyaknya larutan media lengkap pada cawan petri yang berisi biakan parasit. Kemudian masukkan media lengkap baru ke biakan dengan jumlah yang sama dengan yang diambil pada tahap pertama. Lalu, campur

sampai merata. Masukkan kembali biakkan ke candle jar, lalu inkubasi suhu 37°C^(10,12).

Pengamatan pertumbuhan *P. Falciparum*

Letakkan satu tetes suspensi sel parasit pada gelas objek, kemudian ratakan suspensi sel parasit tersebut dengan bantuan satu sisi *cover glass*. Setelah itu, biarkan sampai kering. Fiksasi hapusan darah tipis ke dalam metanol absolut, selanjutnya biarkan sampai metanol kering. Hapusan darah tipis diberi tetesan *aquadest* yang berisi pewarna giemsa 20% sampai menutup semua permukaan hapusan darah, lalu di diamkan dalam 20 menit. Lalu di cuci menggunakan air hingga kering. Periksa hapusan dan hitung parasitemianya menggunakan mikroskop perbesaran 10x100⁽¹⁰⁾.

Pengujian aktivitas malaria

Preparasi Suspensi Sel Parasit Uji

Seluruh suspensi pada cawan petri sebanyak 5 ml ditambahkan ke dalam tabung falcon steril dan di tutup selama 15 menit. Kemudian di sentrifugasi 1500 rpm dalam 5 menit. Supernatan 4,5 ml dibuang sampai didapatkan 5% eritrosit yang terinfeksi parasit, 50% hematokrit dengan jumlah total kurang lebih 500 µl. Membuat suspensi sel parasit (kandungan parasitemia menjadi 1% dan hematokritnya 10%), dengan menambahkan larutan RBC 50% sebanyak 200 µl dan larutan media lengkap 10 ml ke dalam tabung suspensi tersebut, kemudian campurkan perlahan dengan menggunakan pipet mikro sampai tercampur rata. Membuat hapusan darah tipis untuk D₀ sebelum masuk ke dalam *microwell*. Suspensi sel parasit 500 µl akan dimasukkan ke setiap sumur yang sudah berisi 500 µl larutan yang ujikan. Volume suspensi dapat

dibuat untuk 30 *well* ^(10,12).

Preparasi sampel

Penelitian ini menggunakan ekstrak n-heksana teripang keling (*Holothuria athra*) sebagai sampel. Sebanyak 10 mg ekstrak teripang keling ditambahkan DMSO sampai dengan volume seluruhnya 1000 μ l (larutan stok, konsentrasi 10.000 μ g/ml). Kemudian dari larutan stok dibuat serial pengenceran sampai didapatkan konsentrasi akhir sebesar 0,01 μ g/ml; 0,1 μ g/ml; 1 μ g/ml; 10 μ g/ml dan 100 μ g/ml.

Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Larutan kontrol negatif menggunakan DMSO. Kebutuhan volume DMSO untuk 1 *well* adalah 500 μ L. Jumlah *well* untuk kontrol negatif adalah 10 sehingga kebutuhan DMSO nya 5 ml.

Pembuatan Larutan Kontrol Positif

Kontrol positif menggunakan obat klorokuin karena *P.falciparum* yang digunakan yang sensitif terhadap klorokuin. 10 mg klorokuin ditambahkan DMSO sampai dengan seluruh volumenya 1 ml. Kemudian di encerkan serial dengan menggunakan DMSO sampai mencapai konsentrasi 0,01; 0,1; 1; 10 dan 100 μ g/ml.

Preparasi Lempeng Sumur Mikro

Microwell plate, 96 *well disposable* yang telah steril digunakan untuk uji aktivitas antimalaria. *Microwell plate* terdiri dari 8 kolom dan 12 baris. Yang digunakan

untuk penelitian hanya 3 kolom (A:kontrol negatif; B:kontrol positif; dan C: ekstrak). 5 baris pertama untuk masing-masing konsentrasi perlakuan dan 5 baris berikutnya untuk replikasinya, sehingga *well* (sumuran) yang dibutuhkan adalah 30.

Microwell kolom A berisi DMSO sebagai kontrol negatif, kolom B berisi larutan klorokuin dalam DMSO, dan kolom C berisi larutan ekstrak n-heksana dalam DMSO. Baris 1-5 menunjukkan konsentrasi klorokuin dan ekstrak n-heksana dengan konsentrasi 0,01; 0,1; 1; 10; dan 100 μ g/ml. baris 6-10 berisi replikasi dari masing-masing konsentrasi. Larutan uji dan suspensi parasit yang sudah diisi ke dalam *microwell*, kemudian dimasukkan dalam *candle jar* dan inkubasi 48 jam dengan suhu 37°C ^(10,12).

Pengamatan Hasil

Buang bagian atas suspensi dalam *microwell* setelah 48 jam, lalu sediaan hapusan darah tipis dibuat. Warna sediaan hapusan darah tipis menggunakan giemsa 20% jika sudah kering, kemudian hapusan darah tipis diperiksa dengan mikroskop perbesaran 100x menggunakan minyak emersi. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase parasitemia (eritrosit terinfeksi/5000 eritrosit x 100%) ^(8,10).

Pengolahan dan Analisa Data

Hapusan darah yang sudah dibuat, dihitung dengan cara menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi setiap 1000 eritrosit normal dibawah mikroskop. Data tersebut kemudian digunakan untuk menentukan persen pertumbuhan dan % penghambatan. Persen pertumbuhan diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \% \text{ parasitemia} - D0$$

Keterangan : D0: % pertumbuhan pada jam ke-0

Rumus untuk perhitungan % penghambatan adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = 100\% - ((X_u/X_k) \times 100\%)$$

Keterangan :

Xu: % pertumbuhan pada larutan uji

Xk: % pertumbuhan pada kontrol negatif

Berdasarkan data persen penghambatan dilakukan analisis statistik dengan probit program SPSS untuk mengetahui nilai IC₅₀ atau konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat pertumbuhan parasit sebanyak 50%.

HASIL

Presentase rata-rata Parasitemia

Kadar parasitemia adalah presentase total eritrosit yang terinfeksi *P.falciparum*. Pengukurannya menggunakan 5000 eritrosit dengan perwarnaan giemsa untuk membandingkan yang terinfeksi dan yang normal. Perhitungannya sebagai berikut:

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit yang terinfeksi} \times 100\%}{5000}$$

Tabel 1. rata-rata persentase parasitemia pada uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap *P. falciparum*

K1 : kelompok kontrol (-)

K2: kelompok kontrol (+)

G : kelompok perlakuan yang mendapat ekstrak *H. atra*

Group	0 Jam	Rata-rata % Parasitemia Setelah inkubasi 48 jam				
		Konsentrasi (µg/mL)				
		100	10	1	0.1	0.01
K1	1.03	6.73	6.73	6.73	6.73	6.73
K2	1.03	0	1.46	2.09	2.79	3.67
G	1.03	0.4	2.75	3.94	5.16	6.3

Dari tabel diatas didapatkan nilai presentase parasitemia dari ketiga kelompok perlakuan. Kelompok pertama presentase pada semua dosis homogen karena kontrol negatif tidak diberi perlakuan. Kelompok kedua menunjukkan kadar parasitemia tertinggi ada pada pemberian dosis klorokuin 0.01 µg/ml, sedangkan kadar terendah (0) pada dosis 100 µg/ml. kelompok ketiga kadar tertinggi sama dengan kelompok kedua, semakin besar pemberian dosis kadar parasitemia nya rendah. Tetapi, untuk kadar terendah kelompok ketiga yakni 0.4 µg/ml.

Presentase Pertumbuhan

Pengukuran pertumbuhan parasit dilakukan dengan membuat sediaan darah menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000x. Pertumbuhan parasit digunakan untuk menghitung kadar parasitemia dan *inhibitory rate* yang diberi ekstrak *H. atra*.

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \% \text{ parasitemia} - D0$$

Tabel 2. Rata-rata persentase pertumbuhan *P.falciparum* setelah pemberian ekstrak teripang keling (*Holothuria athra*)

Grup	Rata-rata Persen Pertumbuhan (%)				
	Konsentrasi (µg/mL)				
	100	10	1	0.1	0.01
K1	5.7	5.7	5.7	5.7	5.7
K2	0	0.43	1.06	1.76	2.64
G	0	1.72	2.91	4.13	5.27

Dari tabel diatas didapatkan data untuk pertumbuhan *P. falciparum* dari ketiga kelompok perlakuan. Kelompok pertama data yang diperoleh persentase pertumbuhannya sama karena tidak mendapat perlakuan (kontrol negatif). Pada kelompok kedua tampak bahwa persentase pertumbuhan tertinggi terdapat pada media kultur dengan dosis 0,01 µg/ml dan terendah pada dosis 10 µg/ml. Hasil yang sama juga tampak pada kelompok perlakuan yang mendapatkan ekstrak *H. atra* dimana pertumbuhan tertinggi pada dosis 0.01 µg/ml dan terendah pada dosis 10 µg/ml.

Inhibitory rate

Pengukuran inhibitory rate untuk mengetahui aktivitas ekstrak *H. atra* dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dalam menginfeksi eritrosit.

$$\% \text{ inhibisi} = 100\% - \frac{\text{Parasitemia uji} \times 100\%}{\text{Parasitemia kontrol}}$$

Tabel 3. Rata-rata persentase penghambatan *P. falciparum* setelah pemberian ekstrak teripang keling (*Holothuria athra*)

Grup	Rata-rata Persen Penghambatan (%)				
	Konsentrasi (µg/mL)				
	100	10	1	0.1	0.01
K1	0	0	0	0	0
K2	-	92.46	81.40	69.12	53.68
G	100	69.83	49.04	27.54	7.63

Dari tabel diatas didapatkan nilai rerata pada kelompok kontrol negatif yaitu 0, pada kelompok kedua rata-rata tertinggi pada dosis 10 µg/ml yaitu 92.46 µg/ml sedangkan yang terendah pada dosis 0.01µg/ml yaitu 53.68 µg/ml. Kelompok ketiga nilai rata-rata tertinggi pada dosis 10 µg/ml yakni 69.83 dan terendah pada dosis 0.01 µg/ml 7.63 µg/ml.

Inhibitory concentration 50 / IC₅₀

IC₅₀ adalah konsentrasi ekstrak yang memiliki kemampuan menghambat 50% pertumbuhan parasit. Analisis probit dengan program SPSS digunakan untuk mencari nilai IC₅₀.

Tabel 4. Nilai IC₅₀ *P. falciparum* setelah pemberian ekstrak teripang keling (*Holothuria athra*)

	Konsentrasi (µg/mL)					IC ₅₀
	100	10	1	0.1	0.01	
K2	0	67,63	48.60	22.72	6.58	0.4
G	100	69.83	49.04	27.54	7.63	1.23

Dari analisis probit SPSS IC₅₀ konsentrasi ekstrak *H. atra* untuk menghambat pertumbuhan *P.falciparum*

diberikan ekstrak *H. athra* pelarut n-heksana adalah 1.23 µg/ml. Sedangkan IC₅₀ klorokuin yang dieprlukan untuk menghambat pertumbuhan yaitu 0.4.

Aktivitas antimalaria dinyatakan tinggi bila nilai IC₅₀ < 5 µg/mL, tergolong menengah bila nilai IC₅₀ < 5 > µg/mL, tergolong sedang bila IC₅₀ < 15-50 µg/mL, dan tidak aktif bila IC₅₀ >50 µg/mL. Mengacu pada standard pengukuran aktivitas zat aktif tersebut, maka ekstrak n-heksana *H. athra* memiliki aktivitas antimalaria yang tinggi^(8,13).

PEMBAHASAN

Pada penelitian pengaruh pemberian ekstrak *Holothuria athra* dengan pelarut n-heksana terhadap pertumbuhan *P. falciparum* dilakukan menggunakan metode maserasi dengan membandingkan kadar parasitemia, inhibitory rate dan IC₅₀ terhadap kelompok ekstrak teripang keeling pada pelarut n-heksana dengan kontrol positif. Penelitian kali ini menggunakan 3 kelompok yaitu kelompok kontrol negatif (hanya mengandung *P.falciparum* tanpa diberikan perlakuan), kontrol positif (diberikan klorokuin), dan kelompok ekstrak n-heksana. Masing-masing berisi 10 media kultur *P. falciparum* dan mendapat dosis 0.01; 0.1; 1; 10; dan 100 µg/ml. Setiap kelompok dilakukan duplikasi 2 kali, kemudian di inkubasi dalam 48 jam dengan suhu 37°C pada proses pemberian perlakuan dan kultur semua sampel.

Pada penelitian ini dilakukan pengukuran terhadap empat indikator yang digunakan untuk menilai aktivitas antimalaria ekstrak n-heksana yakni kadar parasitemia, presentase pertumbuhan, *inhibitory rate* dan perhitungan IC₅₀

menggunakan analisis probit dengan program SPSS.

Pengukuran Kadar Parasitemia, Persentase Pertumbuhan, *Inhibitory Rate*

Dalam penelitian ini menggunakan sediaan hapusan darah tipis dengan pewarnaan giemsa yang diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan pembesaran 1000x. Dari hasil pengukuran kadar parasitemia di dapatkan kelompok pertama dengan persentase angka homogen pada semua dosis yang berarti pertumbuhan parasit terjadi. Fenomena ini terjadi karena kelompok pertama tidak diberi perlakuan, sehingga media yang murni mengandung *P.falciparum* mengalami pertumbuhan pada semua pengamatan. Untuk kelompok kedua dan ketiga terjadi penurunan kadar parasitemia dengan meningkatnya dosis klorokuin dan dosis ekstrak. Menurunnya kadar parasitemia pada kelompok 2 dan 3 karena mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* yang diperoleh dari aktifitas antimalaria ekstrak n-heksana dan sampel yang dipakai merupakan parasit sensitif klorokuin (strain 3D7 *P. falciparum*), mekanisme klorokuin ini dapat menekan pertumbuhan *P. falciparum*. Pada studi yang dilakukan Moelyadi *et al* (2020) Berbagai komponen bioaktif yang terkandung pada teripang yang digunakan ialah alkaloid, flavonoid, saponin dan terpenoid masing-masing mempunyai aktivitas antimalaria sebagai berikut : (a) Alkaloid sebagai antimalaria menghambat pembentukan dinding sel dengan mengganggu pembentukan peptidoglikan yang menyebabkan sel menjadi lisis^(14,15); (b) Flavonoid sebagai antimalaria menghambat transport nutrisi dengan pembentukan membran tertentu (New Permeation

Pathway/NPP)^(14,15); (c) Saponin mengandung bahan aktif yang berkarakteristik seperti sabun dan memiliki kemampuan menghemolisis darah^(16,17); (d) Terpenoid memiliki peran antimalaria / anti hemozoin pada penyakit malaria untuk menghambat mekanisme biokristalisasi heme dari hasil degradasi sel darah merah seperti 4-aminoquinolines dan menghambat pemecahan hemoglobin^(18,19). Klorokuin mampu mencapai konsentrasi yang tinggi dalam vakuola makanan dari parasit. Klorokuin menekan enzim heme-polimerase dari parasit yang berfungsi mengubah heme toksin menjadi hemozoin non-toksik yang dihasilkan dari penumpukan heme toksik di dalam tubuh parasit. Klorokuin juga menghambat proses biosintesis asam nukleat yang mampu menghambat pertumbuhan parasit^(20,21).

Hasil pengukuran persentase pertumbuhan didapatkan kelompok pertama dengan presentase angka homogen pada semua dosis yang berarti pertumbuhan parasit terjadi disebabkan kelompok pertama tidak diberi perlakuan. Kelompok kedua dan ketiga menunjukkan penurunan persentase pertumbuhan dengan meningkatnya dosis klorokuin dan dosis ekstrak karena kelompok kedua diberikan klorokuin dan kelompok ketiga diberikan ekstrak n-heksana yang memiliki aktifitas antimalaria.

Hasil pengukuran persentase hambatan didapatkan kelompok pertama dengan angka 0 yang berarti tidak terdapat hambatan dalam pertumbuhan parasit dikarenakan tidak diberi perlakuan. Sedangkan kelompok kedua dan ketiga terdapat peningkatan hambatan dari pertumbuhan *P. falciparum* dengan meningkatnya klorokuin dan dosis ekstrak karena kelompok kedua diberikan

klorokuin dan kelompok ketiga diberikan ekstrak n-heksana yang memiliki aktifitas antimalaria.

Berdasarkan hasil pengukuran tersebut, didapatkan kelompok pertama data homogen karena tidak diberi perlakuan (kontrol negatif). Kelompok kedua (kontrol positif) dan ketiga mampu menghambat pertumbuhan *P. falciparum* yang diperoleh dari aktifitas antimalaria ekstrak n-heksana dan sampel yang dipakai merupakan parasit sensitif klorokuin (strain 3D7 *P. falciparum*), mekanisme klorokuin ini dapat menekan pertumbuhan *P. falciparum*. Penelitian sebelumnya telah dilakukan pengujian efek inhibisi dari senyawa aktif *H. athra* yang menyebabkan hasil yang efektif dalam menghambat perkembangan *P. falciparum* yang di uji secara *in silico*^(4,10).

Inhibitory Concentration 50 / IC₅₀

Nilai IC₅₀ yang dapat menghambat pertumbuhan parasit 50% dilakukan analisis statistik menggunakan analisis probit dengan program SPSS. Dari hasil analisis probit penelitian ini menunjukkan IC₅₀ pada ekstrak heksana yaitu sebesar 1.23 µg/ml lebih tinggi dari kontrol positif yaitu klorokuin sebesar 0,4 µg/mL. Hal ini berarti kandungan ekstrak n-heksana *Holothuria athra* mempunyai potensi sangat aktif sebagai antimalaria^(8,13).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil uji aktivitas antimalaria pada penelitian ini menunjukkan pemberian ekstrak teripang keling (*Holothuria athra*) dengan pelarut n-heksana mempunyai efek antimalaria yang dapat menghambat perkembangan *P. falciparum* yang ditunjukkan dengan menurunnya persentase pertumbuhan parasit.

Dari hasil uji aktivitas antimalaria di dapatkan semakin besar dosis konsentrasi ekstrak semakin tinggi persentase hambatan pertumbuhan parasit. Nilai IC₅₀ ekstrak n-heksana teripang keling (*Holothuria athra*) sebesar 1.23 µg/ml yang berarti bahwa *H. athra* memiliki aktivitas antimalaria yang tinggi. Akan tetapi, nilai IC₅₀ ekstrak n-heksana *H. athra* lebih rendah dari klorokuin.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai *H. athra* dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum* dan uji toksisitas secara *in vivo*.

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti ingin menyampaikan rasa terimakasih yang mendalam pada dosen pembimbing saya, rekan-rekan saya dan seluruh staff dan karyawan FK Hang Tuah sehingga skripsi saya selesai sesuai dengan *timeline* kegiatan penelitian.

DAFTAR PUSAKA

1. Arsyah MR, Utami PD, Dikman I, Kedokteran F, Hang U, Surabaya T. Pengaruh Pemberian Ekstrak Temulawak (Curcuma Xanthorrhiza Roxb.) Terhadap Level Nekrosis Pada Jaringan Lien Mencit Putih (Mus Musculus L.) Jantan Galur Balb/c yang Diinokulasi Plasmodium berghei ANKA. Hang Tuah Med J. 2019;16(2):186–95.
2. Hamid A, Kadir S, Studi P, Masyarakat K, Epidemiologi PS, Timur UI, et al. Analisis Fkator Yang Berhubungan Dengan Kejadian Malaria di Wilayah Kerja Puskesmas Plus Calabai Kecamatan Pekat Kabupaten Dompu Tahun 2015. J Kesehat DAN SAINS. 2017;1(September):9–18.
3. Suroyo RB, Haharap J. Evaluasi Pelaksanaan Program Eliminasi Malaria di Kabupaten Aceh Singkil Tahun 2018. J Keperawatan Prior. 2020;3(1):1–12.
4. Moelyadi F, Utami PD, Dikman IM. Inhibitory Effect of Active Substances of Lollyfish (*Holothuria atra*) Against the Development of Plasmodium falciparum Based on In Silico Study. Indones J Mar Sci. 2020;25(December):135–42.
5. Veronica E, Kadek N, Dwi S. Potensi Daun Kastuba (Euphorbia Pulcherrima) Sebagai Antimalaria Plasmodium Falciparum. Hang tuah Med J. 2020;18(1):1–15.
6. Rossa Avrina, Yenni Risniati, Hadjar Siswantoro, Armedy Ronny Hasugian, Emiliana Tjitra D. Hubungan Keapaatan Parasit Dengan Manifestasi Klinis Pada Malaria Plasmodium Falciparum Dan Plasmodium Vivax. Media Litbang Kesehat. 2011;21(3):119–26.
7. World Health Organization. World malaria report 2020. 2020.
8. Basir A. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Teripang Keling (*Holothuria atra*) Terhadap Plasmodium falciparum Secara In Vitro. 2013;
9. Rahman Rumlus, Haryono Semangun, Ocky Karnaradjasa JCM. Keanekaragaman jenis teripang di Fafanlap dan Gamta , Kepulauan Misool , Kabupaten Raja Ampat , Papua Barat dan uji aktivitas kandungan senyawa kimianya. Bonorowo Wetl. 2015;5(1):1–10.
10. Kusumaningrum N ‘Aisyah. Uji Aktivitas Antimalaria Daun Helianthus annuus L. Dengan Ekstraksi Bertingkat Terhadap Plasmodium falciparum Secara In Vitro. 2016;
11. R. Kurnijasanti and M. Candrarisna. the effect of pisang ambon (*Musa paradisiaca* L.) stem extract on the regulation of IL-1B, IL-6 and TNF-a in rats’ enteritis. iraqi J Sci. 2019;33(2):407–13.
12. W Trager and JB Jensen. Human malaria. J Natl Med Assoc. 1976;68(6):530–3.
13. Utami PD, Yudho V. High Antiplasmodial Activity of Golden Gamat (*S . hermanni*) Extract Through In Vitro Study. Eur J Biol Biotechnol. 2021;2(5):19–23.
14. Uzor PF. Alkaloids from Plants with Antimalarial Activity: A Review of Recent Studies. Evidence-Based Complement Altern Med. 2020;2020:1–17.
15. Yusifa Arsy Variana, Endah Setyaningruma, Kusuma Handayania, Nismah Nukmala AA. Analisis Senyawa Bioaktif Ekstrak Metabolit Sekunder *Serratia marcescens* strain MBC1. 2021;04(02):64–71.
16. Orjih AU. Requirements for Maximal Enrichment of Viable Intraerythrocytic Plasmodium falciparum Rings by Saponin Hemolysis. 2008;
17. Gunawan DH. Penurunan Senyawa Saponin

- Pada Gel Lidah Buaya Dengan Perebusan Dan Pengukusan. J Teknol Pangan. 2018;9(1):41-4.
18. Indah Hartati, Safaah Nurfaizin, Suwardiyono LK. Ekstraksi gelombang mikro terpenoid daun surian (*Toona sureni merr*). J Inov Tek Kim. 2016;1(2):98-103.
 19. Astutik HW. Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Postif Terpenoid Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*) Pada Mencit Yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. 2012;
 20. Adieba Warda Hayya. Penggunaan Klorokuin Pada Infeksi Virus COVID-19. J Inov Penelit. 2021;1(8):1-6.
 21. Azlin E. Obat Anti Malaria. Sari PEDIATR. 2004;5(4):3-7.