

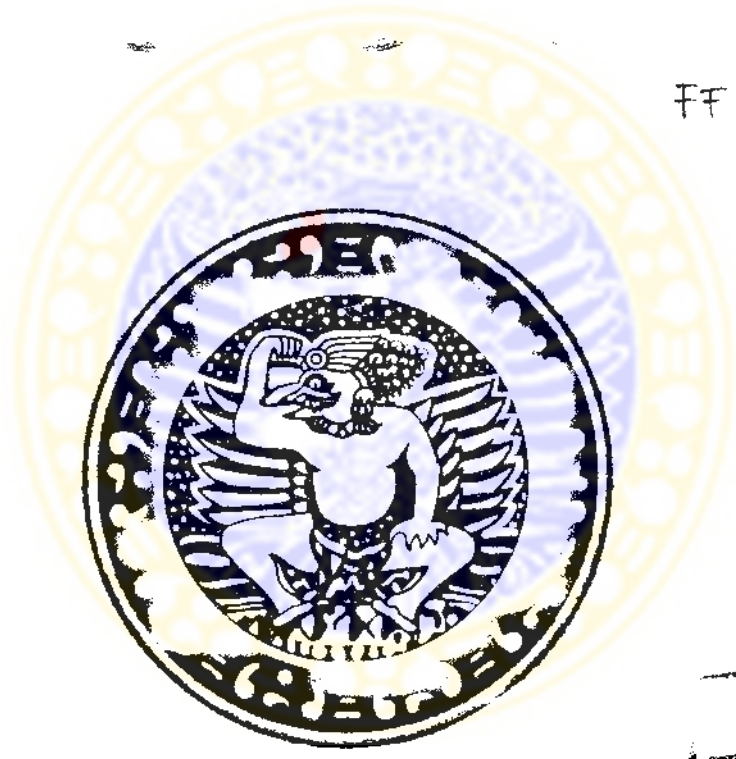
08/10 ✓
www ✓

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

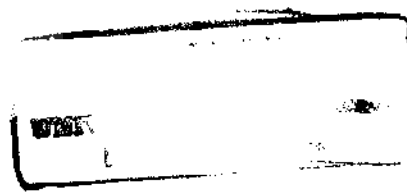
SKRIPSI

DINI RETNOWATI

MODEL TERAPI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 80% SAMBILOTO DAN KLOOROKUIN PADA MENCIT TERINFEKSI PARASIT MALARIA



FF 127/08
Rot
101



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2007**

Lembar Pengesahan

MODEL TERAPI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 80% SAMBILOTO DAN KLOROKUIN PADA MENCIT TERINFEKSI PARASIT MALARIA

SKRIPSI

Dibuat Untuk Memenuhi Syarat Mencapai Gelar Sarjana Farmasi Pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2007

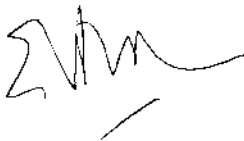
Oleh :

DINI RETNOWATI

NIM : 050312742

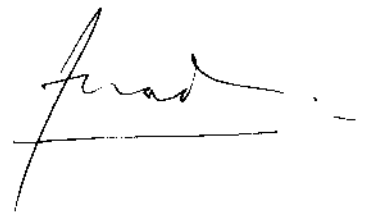
Disetujui Oleh :

Pembimbing Utama



Dr. Aty Widyawaruyanti, M.Si
NIP. 131 877 884

Pembimbing Serta



Dr. H. Achmad Fuad H., MS
NIP. 130 937 972

RINGKASAN

MODEL TERAPI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 80% SAMBILOTO DAN KLOROKUIN PADA MENCIT TERINFEKSI PARASIT MALARIA

Dini Retnowati

Malaria adalah salah satu penyakit yang masih menjadi masalah kesehatan di berbagai negara. Timbulnya resistensi dari obat standar seperti klorokuin mendorong adanya pencarian alternatif antimalaria. Salah satunya adalah obat yang berasal dari bahan alam (tanaman). Sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees.) adalah salah satu tanaman obat yang telah digunakan secara empiris oleh masyarakat untuk pengobatan malaria. Dari penelitian terdahulu telah diketahui bahwa ekstrak sambiloto dapat memberikan aktivitas antimalaria secara *in vitro* maupun *in vivo*.

Kombinasi obat-obat antimalaria juga menjadi salah satu alternatif, seperti yang telah disarankan oleh WHO pada tahun 2001. Tujuan dari terapi kombinasi ini adalah untuk meningkatkan efektivitas terapi, mengurangi toksisitas, dan juga untuk mengurangi tingkat resistensi dari obat standar. Dari beberapa penelitian terdahulu diketahui bahwa terapi kombinasi klorokuin dengan obat lain dapat memberikan aktivitas antimalaria yang lebih baik dibandingkan dengan monoterapi klorokuin saja. Dengan adanya terapi kombinasi klorokuin dengan obat lain diharapkan dapat menurunkan tingkat resistensi dari klorokuin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari terapi kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*.

Bahan uji yang digunakan dalam penelitian kali ini adalah ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto (*A. paniculata*, Nees.). Suspensi uji akan diberikan dengan rute per oral. Setelah dilakukan pengujian aktivitas antimalaria dengan dosis 100 mg/kgBB mencit pada ketiga ekstrak, diketahui bahwa ekstrak etanol 80% sambiloto memiliki aktivitas antimalaria yang paling besar. Ekstrak ini kemudian akan digunakan dalam berbagai model terapi kombinasi dengan klorokuin.

Model terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dan klorokuin terdiri dari 3 macam model, yaitu **model A** (kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB mulai hari ke-1 sampai hari ke-4), **model B** (kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB pada hari ke-1 saja), **model C** (kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB hari ke-1 sampai ke-4 dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB pada hari ke-4 saja). Ketiga kombinasi ini hasilnya juga akan dibandingkan dengan **model D** yaitu terapi ekstrak etanol 80% sambiloto saja selama 4 hari (D₀-D₃). Sebagai kontrol negatif digunakan DMSO 2% dalam larutan CMC Na 0,5%.

Hasil uji diamati dengan cara membuat preparat hapusan darah tipis dari ekor mencit dengan pewarnaan Giemsa pada gelas obyek dan dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit per-5000 eritrosit dengan mikroskop perbesaran

1000 kali. Kemudian dihitung persentase pertumbuhan parasit dan persentase penghambatan dari masing-masing model terapi kombinasi.

Dari hasil pengamatan hari ke-1 sampai hari ke-7 menunjukkan persen penghambatan parasit pada model A, model B, model C, dan model D masing – masing sebesar 85,61% ; 69,31% ; 73,64% ; dan 65,14%. Dari hasil persen penghambatan parasit ini diketahui bahwa model A memberikan aktivitas antimalaria yang paling besar dibandingkan dengan model terapi yang lain. Sedangkan dari analisis statistik *one way Anova* menunjukkan bahwa F hitung (5,266) lebih besar dibandingkan F tabel (4,1) dan harga signifikan lebih kecil dari α (0,05). Hal ini berarti terdapat model terapi kombinasi yang memberikan perbedaan yang bermakna terhadap daya pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

Keberhasilan terapi malaria tidak hanya dilihat dari persen penghambatan parasitemia saja, namun juga dilihat dari profil pertumbuhan parasit. Dari profil pertumbuhan parasit tersebut dapat disimpulkan bahwa model kombinasi yang dapat memberikan potensi keberhasilan terapi yang lebih besar adalah model A, karena pada model ini klorokuin dosis kecil dapat memberikan penghambatan parasit yang besar dengan adanya kombinasi dengan ekstrak sambiloto, dan juga menunjukkan penghambatan pertumbuhan parasit yang baik (terjadi penurunan parasitemia).



ABSTRACT**The Combination Therapy Model of Ethanolic Extract 80% Sambiloto and Chloroquine on Mice Infected Malaria**

Combination therapy is one method of overcoming the global challenge of drug-resistant malaria. Several models of combination therapy of ethanolic extract 80 % sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees.) and chloroquine were evaluated *in vivo* for potentiation against mice infected *Plasmodium berghei* by oral route. A four-day dosage (D₀-D₃) of combination ethanolic extract 80% sambiloto 100 mg/kg body weight and chloroquine 0,1567 mg/kg (A model) produce inhibition of parasite's growth for 85,61%. One-day dosage (D₀) of combination ethanolic extract 80% sambiloto 100 mg/kg body weight and chloroquine 0,1567 mg/kg (B model) inhibit parasite's growth for 69,31%. A four-day dosage of ethanolic extract 80 % sambiloto 100 mg/kg combined with chloroquine 10 mg/kg (C model) gives parasite growth's inhibition for 73,64%. On the other hand, the monotherapy of ethanolic extract 80% sambiloto 100 mg/kg (D model) only inhibit parasite for 65,14%. This result showed that A model gives the best combination therapy for antimalaria compared with the other models. Based on analysis with *one way Anova*, F value (5,266) greater than F table (4,1) and the significant level smaller than 0,05. This means the combination therapy's model gives significantly different for antimalarial. Based on the parasite's growth profile, combination therapy that give the most potential outcome is A model.

Key words : *Andrographis paniculata* extract, combination therapy, antimalarial, chloroquine

Take time to THINK. It is the source of power.

Take time to READ. It is the foundation of wisdom.

Take time to QUIET. It is the opportunity to seek God.

Take time to DREAM. It is the future made of.

Take time to PRAY. It is the greatest power on earth.

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas segala rahmat dan karuniaNya saya dapat menyelesaikan skripsi berjudul **“MODEL TERAPI KOMBINASI EKSTRAK ETANOL 80% SAMBILOTO DAN KLOROKUIN PADA MENCIT TERINFEKSI PARASIT MALARIA”** ini dengan sebaik-baiknya. Perkenankanlah saya mengucapkan terima kasih dan penghargaan sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Aty Widyawaruyanti, M.Si., selaku pembimbing utama yang telah membimbing serta memberikan arahan dan nasehat kepada saya sehingga skripsi ini dapat terlaksana dan terselesaikan dengan sebaik-baiknya.
2. Dr. H. Achmad Fuad Hafid, MS., selaku pembimbing serta yang telah memberikan bimbingan, arahan, dan nasehat kepada saya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan sebaik-baiknya.
3. Dra. Wiwied Ekasari, M.Si., dan dr. Indah S. Tantular, M.Kes., Ph.D., selaku dosen penguji atas saran dan masukan yang diberikan untuk penyempurnaan skripsi ini.
4. Rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan fasilitas selama saya mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
5. Dekan Fakultas Farmasi Unair yang telah memberikan fasilitas selama mengikuti kuliah dan melakukan penelitian ini.
6. Dra. Dewi Isadiartuti, M.Si., selaku dosen wali yang telah membimbing saya selama menempuh studi S1 di Fakultas Farmasi Unair.
7. Papa dan Mama tercinta atas doa serta segala kasih sayang, perhatian, kesabaran, dan nasehat yang diberikan, juga adikku atas kejahilan, kenakalan dan pinjaman laptopnya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
8. Arif Rahman Azizi atas segala bantuan, perhatian, semangat, dan dukungan moral yang sangat berarti terutama di saat-saat yang sulit.
9. Kepala dan staf karyawan Lab. Botani – Farmakognosi, Lab. Fitokimia dan Lab. Hewan atas bantuan dan kerjasama dalam penelitian ini.

10. Teman-teman seperjuangan lab bahan alam : Pika, Bude, Pipi, Yuyun, I'in, Esti, Gugus, Rima, Eta, Ima, Maisya, Ayies, Popol, atas kerjasama, bantuan, motivasi, dan semangat juang tinggi dalam penyelesaian skripsi ini.
11. Teman-teman sekelas reguler Genap : Dudut, Ace, Jemmy, Rudy, Paundra, Tita, Re (who left me) untuk tempat curhat, support, semangat, sehingga memotivasi saya untuk menyelesaikan skripsi ini dengan baik.
12. Sahabat-sahabatku "Segawonese" IPA-1 SMULA atas segala motivasi dan dukungan yang tak tergantikan : Khrisma Fitriasaki, Sitta Fiakhsani, Ina Rahmadiani, Heny Suryaningsih, Erika Dinamika (buat *all-statistic-things*), Ahmad Syafi'i, dan semuanya... mari jadikan bangsa ini lebih baik!
13. Semua teman-teman di Fakultas Farmasi Unair atas bantuan dan semangat dalam penyelesaian skripsi ini.
14. Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu persatu, yang telah membantu kelancaran penyelesaian skripsi ini.

Akhir kata, semoga skripsi ini dapat bermanfaat baik bagi ilmu pengetahuan maupun bagi para pembaca.

Surabaya, September 2007

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL.....	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
DAFTAR SINGKATAN.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan tentang <i>Andrographis paniculata</i> , Nees.....	6
2.1.1 Klasifikasi <i>Andrographis paniculata</i> , Nees.....	6
2.1.2 Nama Daerah.....	6
2.1.3 Morfologi Tanaman.....	7
2.1.4 Ekologi dan Penyebaran.....	7
2.1.5 Kandungan Kimia.....	7
2.1.6 Bioaktivitas Tanaman.....	8
2.2 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi.....	8
2.2.1 Definisi Ekstrak.....	8
2.2.2 Proses Ekstraksi.....	8
2.3 Tinjauan tentang KLT.....	9
2.4 Tinjauan tentang Malaria.....	10
2.5 Tinjauan tentang <i>Plasmodium berghei</i>	11

2.5.1	Klasifikasi <i>Plasmodium berghei</i>	12
2.5.2	Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	12
2.5.3	Siklus Hidup <i>Plasmodium berghei</i>	13
2.5.4	Pembiakan <i>in vivo Plasmodium berghei</i>	16
2.6	Klasifikasi Antimalaria.....	17
2.7	Tinjauan tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman dengan metode <i>in vivo</i>	18
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL.....		20
3.1	Kerangka Konseptual.....	20
3.2	Bagan Kerangka Konseptual.....	22
BAB IV METODE PENELITIAN.....		23
4.1	Bahan Penelitian.....	23
4.1.1	Bahan Tanaman.....	23
4.1.2	<i>Plasmodium berghei</i>	23
4.1.3	Hewan Coba (Mencit).....	23
4.1.4	Bahan Pembanding.....	23
4.1.5	Bahan lain yang digunakan untuk uji Antimalaria secara <i>in vivo</i>	23
4.1.6	Pelarut.....	23
4.1.7	KLT.....	24
4.2	Alat – alat.....	24
4.3	Metode Penelitian.....	24
4.3.1	Pembuatan Ekstrak.....	24
4.3.2	Penginfeksi Mencit Donor dengan <i>Plasmodium berghei</i>	25
4.3.3	Penginfeksi Mencit Coba dengan <i>Plasmodium berghei</i>	25
4.3.4	Skrining Aktivitas Antimalaria.....	25
a.	Penyiapan Bahan Uji.....	25
b.	Penyiapan Larutan Kontrol Positif.....	26
c.	Penyiapan Larutan Kontrol Negatif.....	26
d.	Skrining Aktivitas Antimalaria Ekstrak Sambiloto	

<i>in vivo</i>	26
4.3.5 Terapi Kombinasi Antimalaria.....	27
a. Penyiapan Bahan Uji.....	27
b. Penyiapan Larutan Kontrol Positif.....	27
c. Penyiapan Larutan Kontrol Negatif.....	28
d. Uji Aktivitas Antimalaria Berbagai Model Terapi Kombinasi <i>in vivo</i>	28
4.4 Evaluasi.....	29
4.4.1 Pembuatan sediaan pewarna Giemsa.....	29
4.4.2 Pembuatan Preparat Darah dan Perhitungan Parasitemia.....	29
a. Pembuatan Preparat Darah.....	29
b. Perhitungan Parasitemia.....	29
4.5 Perhitungan Jumlah Parasit.....	29
4.6 Skema Rancangan Penelitian Skrining Ekstrak Etanol 60%, 70%, dan 80% Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> , Nees.) pada Mencit Terinfeksi Parasit Malaria.....	31
4.7 Skema Rancangan Penelitian Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> , Nees.) dan Klorokuin pada Mencit Terinfeksi Parasit Malaria.....	32
4.8 Skema Penyiapan Parasit dan Uji Antimalaria.....	33
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	34
5.1 Pembuatan Ekstrak Etanol 60%, 70%, dan 80% Herba Sambiloto (<i>A. paniculata</i> , Nees.).....	34
5.2 Identifikasi Ekstrak Sambiloto.....	34
5.3 Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji.....	36
5.4 Pembuatan Larutan Kontrol.....	36
5.5 Skrining Aktivitas Antimalaria.....	36
5.6 Pembuatan Larutan Uji.....	39
5.7 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria.....	40
5.8 Analisis Data.....	45
BAB VI PEMBAHASAN.....	48

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	56
DAFTAR PUSTAKA.....	57
LAMPIRAN.....	61



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Herba Sambiloto.....	6
Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual.....	22
Gambar 4.1 Skema Rancangan Penelitian Skrining Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> , Nees.) 60%, 70%, dan 80% secara <i>in vivo</i>	31
Gambar 4.2 Skema Rancangan Penelitian Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i> , Nees.) dan Klorokuin secara <i>in vivo</i>	32
Gambar 4.3 Skema Penyiapan Parasit Uji Antimalaria Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto (<i>A. paniculata</i> , Nees.) dan Klorokuin secara <i>in vivo</i>	33
Gambar 5.1 Kromatogram Hasil KLT ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto (<i>A. paniculata</i> , Nees.) dengan penampak noda anisaldehid - H ₂ SO ₄ (a); sinar UV pada λ 365 nm (b), sinar UV pada λ 254 nm (c).....	35
Gambar 5.2 Grafik Persen Pertumbuhan Rata-rata Parasit dari Ekstrak Etanol 60%, 70%, dan 80% Sambiloto dan Kontrol.....	37
Gambar 5.3 Grafik Persen Pertumbuhan Rata-Rata Parasit dari Berbagai Model Terapi Kombinasi : (i) Model A; (ii) Model B; (iii) Model C; dan (iv) Model D.....	42

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 5.1 Pembuatan ekstrak sambiloto dengan berbagai kadar pelarut.....	34
Tabel 5.2 Persen Parasitemia Rata-Rata dari Skrining Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol 60%, 70%, dan 80% Sambiloto dosis 100 mg/kgBB mencit.....	37
Tabel 5.3 Persen Pertumbuhan dan Penghambatan dari Ekstrak Etanol Sambiloto 60%, 70%, dan 80% serta Kontrol.....	38
Tabel 5.4 Persen Parasitemia dari Berbagai Model Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol secara <i>in vivo</i>	40
Tabel 5.5 Persen Parasitemia Rata-Rata dari Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol secara <i>in vivo</i>	41
Tabel 5.6 Persen Pertumbuhan dan Prosen Penghambatan dari berbagai Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol pada Pengamatan hari ke-4 (D ₅).....	43
Tabel 5.7 Persen Pertumbuhan dan Prosen Penghambatan dari berbagai Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol pada Pengamatan hari ke-7 (D ₆).....	44
Tabel 5.8 Data HSD dari daya hambat pertumbuhan parasit malaria antar model kombinasi.....	46

DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	61
Lampiran 2 Perhitungan % Parasitemia.....	62
Lampiran 3 Perhitungan % Parasitemia Rata-Rata.....	63
Lampiran 4 Perhitungan % Penghambatan Parasit.....	64
Lampiran 5 Perhitungan % Penghambatan Parasit.....	65
Lampiran 6 Pembuatan Medium Alceiver.....	66
Lampiran 7 Hasil Statistik dengan <i>One Way Anova</i>	67
Lampiran 8 Perhitungan HSD.....	69
Lampiran 9 Daftar Distribusi F.....	70
Lampiran 10 Daftar Nilai q.....	71

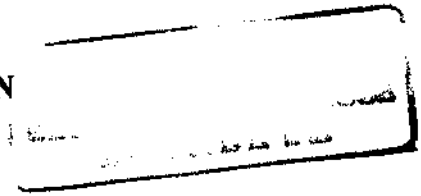
DAFTAR SINGKATAN

ANKA	: Anverse Kasapa
ED₅₀	: Effective Dose 50%
IC₅₀	: Inhibitory Concentration 50%
CMC Na	: Carboxy Methyl Cellulose Natrium
mg/kg BB	: miligram per kilogram berat badan
µg/mL	: mikrogram per mililiter
WHO	: World Health Organization



BAB I

PENDAHULUAN



I.1 Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu jenis penyakit yang sering menjadi wabah endemik yang menyerang suatu daerah di kawasan tropis dan subtropis, dan masih menjadi penyebab utama kematian di berbagai negara. Diperkirakan 700.000 – 2,7 juta jiwa meninggal tiap tahunnya, dimana sebanyak 75% dari mereka adalah anak-anak yang berasal dari Afrika. Malaria juga menjadi penyebab 10,7% kematian anak-anak yang berada di negara berkembang. (Centers for Disease Control and Prevention, 2006)

Di Indonesia sendiri malaria tergolong penyakit menular yang masih menjadi salah satu penyebab utama kematian penduduk. Sebagian penduduk di 20 provinsi di Indonesia terjangkit malaria. Lebih dari 40 juta penduduk Indonesia bermukim di daerah malaria, sekitar 11 juta diantaranya tinggal di Jawa dan Bali. (Mursito, 2002)

Di wilayah Jawa Timur, khususnya Malang Selatan, malaria kembali mengancam. Setidaknya ada 66 orang yang harus dirawat akibat malaria. Padahal Jawa termasuk pulau yang relatif aman dari serangan malaria bila dibanding pulau yang lainnya. (Wahjoedi, 2002)

Penanggulangan terhadap penyakit malaria telah dilakukan sejak lama, termasuk penemuan obat-obat baru yang dapat berkhasiat sebagai antimalaria. Obat malaria pertama yang ditemukan berasal dari kulit pohon kina (*Cinchona succirubra*) pada abad ke-17, yaitu kinina. Perkembangan teknologi obat-obatan yang semakin pesat menyebabkan penggunaan kinina digantikan oleh obat sintetik seperti Klorokuin.

Selama bertahun-tahun Klorokuin telah digunakan sebagai pengobatan antimalaria. Permasalahan selanjutnya yang terjadi disebabkan oleh timbulnya resistensi dari *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin. Ginting (2001) telah menemukan bahwa tingkat resistensi Klorokuin telah mencapai angka 47,5% dan terhadap Sulfadoxyn - Pyrimethamin sebesar 50% secara *in vivo*. Resistensi terhadap penggunaan obat antimalaria ini ternyata menyebar dengan cepat

di beberapa daerah tropis, seperti di Asia Tenggara yaitu di Thailand, Vietnam, Malaysia, dan Indonesia. Resistensi ini dapat disebabkan oleh kemampuan dari *Plasmodium* untuk menyesuaikan diri terhadap pemberian obat antimalaria (A.J. Knell, 1991). Penyesuaian diri ini dapat terjadi dengan mekanisme yaitu parasit (*Plasmodium*) tidak memiliki *site* untuk mengikat obat sehingga tidak dapat terkonsentrasi dalam sel darah merah, parasit memiliki jalur biokimia lain untuk mengadakan sintesis asam amino sehingga dapat menghindari pengaruh obat, dan adanya mutasi spontan di bawah tekanan obat. Resistensi ini menjadi salah satu kendala pemberantasan penyakit malaria dan membuat para ilmuwan berusaha untuk mencari obat malaria yang baru, baik itu yang berasal dari bahan alam maupun hasil sintesis. Terapi kombinasi obat-obat antimalaria juga telah disarankan oleh WHO pada tahun 2001 untuk menghambat atau menurunkan perkembangan resistensi tersebut.

Walaupun tingkat resistensi Klorokuin di Indonesia belum sebesar di negara lain seperti Thailand dan Vietnam, namunantisipasi terhadap masalah resistensi ini harus segera dilakukan. Salah satunya adalah dengan menggunakan terapi kombinasi antimalaria. Konsep dari terapi kombinasi ini berdasarkan sifat sinergis atau aditif dari masing – masing obat agar dapat meningkatkan efek terapi yang dihasilkan. Tujuan dari adanya kombinasi terapi antimalaria ini adalah 1) meningkatkan efektivitas antimalaria, 2) menurunkan toksisitas obat yang digunakan, dan 3) menurunkan tingkat resistensi obat (WHO, 2001). Berbagai penelitian tentang terapi kombinasi antimalaria telah dilakukan, antara lain Staedke (2001) menyatakan bahwa kombinasi Amodiakuin - Sulfadoksin/Pyrimethamin memiliki angka kegagalan terapi antimalaria secara klinis yang lebih kecil yaitu sebesar 3% dibandingkan dengan terapi Amodiakuin saja (7%) atau Sulfadoksin - Pyrimethamin saja (10%). Bray (2005) mengemukakan bahwa kombinasi Klorokuin dan Primakuin secara klinis dapat meningkatkan aktivitas antimalaria secara sinergis dibandingkan terapi dengan Klorokuin saja dengan menghambat *Plasmodium falciparum Chloroquin Resistance Transporter* (PfCRT) yang dapat menyebabkan resistensi Klorokuin.

Taylor (2001) telah melakukan penelitian di Irian Jaya, dan menyatakan bahwa kombinasi Klorokuin dan Doksisisiklin secara klinis dapat menghambat

pertumbuhan *P. falciparum* sebesar 90,9% dan pada *P. vivax* sebesar 70,6% dibandingkan dengan Klorokuin saja (20%) dan Doksisisiklin saja (64,7%). Kombinasi antara Klorokuin dan Cepharrantin - Minosiklin HCl juga memberikan aktivitas antimalaria yang lebih baik terhadap *P. berghei* NK-65 (Strain *Plasmodium* yang telah resisten terhadap Klorokuin) dibandingkan dengan terapi Klorokuin saja atau Cepharrantin - Minosiklin HCl saja, dilihat dari kemampuan hewan coba bertahan hidup. Dari pengamatan selama 30 hari didapatkan data bahwa kelompok uji dengan Klorokuin saja rata-rata mati pada hari ke-9 sampai ke-11, kelompok uji dengan Cepharrantin - Minosiklin HCl saja rata-rata mati pada hari ke-8 sampai ke-10, sedangkan kelompok uji kombinasi Klorokuin dan Cepharrantin - Minosiklin HCl semua hewan cobanya bertahan hidup hingga hari terakhir pengamatan. (Ishih, 2003)

Indonesia merupakan negara terbesar kedua setelah Brazil dalam hal kekayaan dan keanekaragaman hayati. Hal inilah yang menjadi suatu keuntungan dalam berbagai penelitian tanaman yang dapat digunakan untuk berbagai jenis pengobatan. Adanya pemahaman masyarakat yang sekarang berkembang yaitu "back to nature" membuat ilmuwan cenderung untuk meneliti jenis obat-obat baru yang berasal dari bahan alam. Hal ini didukung oleh semakin berkembangnya ilmu-ilmu fitoterapi seperti farmakognosi, fitokimia, dan fitofarmasi. (Tetty, 2003). Obat bahan alam juga lebih dipercaya oleh masyarakat memiliki efek samping yang lebih ringan, dan juga relatif lebih mudah didapat.

Dari hasil inventarisasi jenis tanaman Indonesia, tercatat lebih kurang 30.000 jenis tanaman yang tumbuh di Indonesia dan tidak kurang dari 1000 jenis tanaman yang telah dimanfaatkan oleh masyarakat dalam upaya penyembuhan dan pencegahan suatu penyakit, peningkatan daya tahan tubuh serta pengembalian kesegaran tubuh. (Mursito, 2002)

Telah banyak dilakukan penelitian terhadap tanaman - tanaman yang memiliki khasiat sebagai antimalaria. Di Indonesia, tanaman yang secara tradisional dapat digunakan sebagai antimalaria salah satunya adalah sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.). Kandungan utama dari tanaman sambiloto adalah senyawa andrografolida, yaitu sebesar $\pm 2,5\%$ dalam simplisia kering, sedangkan dalam ekstrak etanol sebesar $\pm 10,69\%$ (Ekasari, 1998; Adlan, 1997).

Penelitian terdahulu juga menunjukkan bahwa ekstrak sambiloto memiliki aktivitas antimalaria dengan cara menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum in vitro* (Suyanto, 1995; Widyawaruyanti, 1995; Rahman, 1999). Uji *in vivo* dari ekstrak sambiloto terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit juga menunjukkan aktivitas antimalaria (Rahman et al, 1999). Sedangkan pada penelitian yang dilakukan Widyawaruyanti (2001) menunjukkan bahwa senyawa andrografolida hasil isolasi sambiloto memiliki aktivitas sebagai skizontosida ($IC_{50} = 12,16 \mu\text{g/ml}$) dan gametosida ($IC_{50} = 3,61 \mu\text{g/ml}$) pada kultur *Plasmodium falciparum in vitro*, serta pada penelitian selanjutnya dilaporkan bahwa kemampuan isolat andrografolida menghambat 50% pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* (ED_{50}) secara *in vivo* sebesar 3,6 mg/kgBB (Dina, 2004).

Penelitian terdahulu yang dilakukan oleh Dwi Kusumawardhani (2005) meneliti aktivitas antimalaria ekstrak sambiloto terstandar pada *Plasmodium berghei in vivo*. Dilaporkan bahwa ekstrak sambiloto terstandar (kadar andrografolida $(10,82 \pm 0,37)\%$) memiliki aktivitas antimalaria dilihat dari harga ED_{50} -nya sebesar 12,22 mg ekstrak sambiloto terstandar/kgBB yang setara dengan 1,32 mg senyawa andrografolida.

Zein (2004) telah meneliti bahwa kombinasi Klorokuin dan ekstrak sambiloto secara klinis memberikan aktivitas antimalaria yang lebih baik dibandingkan dengan monoterapi Klorokuin saja, dilihat dari penurunan % parasitemia yang memiliki perbedaan bermakna dibandingkan kelompok lain pada pengamatan hari ke-2 sampai ke-14 ($p < 0,05$).

Ekstrak dari suatu simplisia memiliki karakteristik yang spesifik, baik dari karakteristik fisika maupun kimia. Hal ini dipengaruhi oleh perbedaan proses ekstraksi simplisia yang meliputi perbedaan metode ekstraksi dan juga pelarut yang digunakan. Dengan adanya perbedaan pelarut (termasuk adanya perbedaan polaritas) maka dapat memberikan perbedaan komposisi dari setiap ekstrak, termasuk kandungan kimianya. Hal inilah yang menjadi dasar penelitian dimana pada penelitian yang terdahulu ekstrak sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) yang digunakan diproses dengan menggunakan pelarut etanol 96%. Diharapkan dengan adanya pengaruh perbedaan kadar pelarut ekstrak yang digunakan akan dapat memberikan perbedaan komposisi dari ekstrak yang didapat

dan juga dapat memberikan perbedaan aktivitas antimalaria dari sambiloto. Untuk itu, pada penelitian kali ini akan dilakukan ekstraksi simplisia herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dengan kadar pelarut yang berbeda, yaitu etanol 60%, etanol 70%, dan etanol 80%. Adanya perbedaan kadar air yang digunakan sebagai pelarut adalah karena umumnya obat-obat antimalaria digunakan oleh masyarakat secara empiris dengan menggunakan air sebagai pelarutnya. Masing – masing ekstrak akan mendapatkan perlakuan yang sama, yaitu dengan metode maserasi. Kemudian masing – masing ekstrak diamati daya hambatnya terhadap pertumbuhan *P. berghei* dalam kultur *in vivo* pada mencit secara per oral. Dari ketiga ekstrak tersebut akan diamati daya hambatnya terhadap pertumbuhan parasit, dan ekstrak sambiloto yang memiliki daya hambat yang paling besar akan digunakan selanjutnya pada terapi kombinasi dengan Klorokuin. Berbagai model terapi kombinasi akan dilakukan pada kombinasi ekstrak sambiloto dan Klorokuin, dan dari model terapi tersebut akan didapatkan gambaran tentang aktivitas antimalaria yang dihasilkan.

1.2 Rumusan Masalah

Bagaimanakah aktivitas antimalaria yang ditunjukkan oleh terapi kombinasi Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees.) dan Klorokuin?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari kombinasi Ekstrak Etanol Sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees.) dan Klorokuin terhadap mencit terinfeksi parasit malaria.

1.4 Manfaat Penelitian

Dapat digunakan untuk landasan ilmiah sebagai alternatif terapi pengobatan antimalaria.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Andrographis paniculata*, Nees.



Gambar 2.1 Herba Sambiloto

2.1.1 Klasifikasi *Andrographis paniculata*, Nees. (Syamsuhidayat, 1991)

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Solanales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Andrographis</i>
Spesies	: <i>Andrographis paniculata</i> , Nees.

Andrographis paniculata, Nees. memiliki beberapa sinonim yaitu *Justica paniculata* Burm., *Justica laterebosa* Russ., *Justica stricta* Lamk. (Kusuma, W.,1996).

2.1.2 Nama Daerah (Anonim, 1983)

Sambiloto (Indonesia), ki oray, ki peurat, takilo (Sunda), bidara, sadilata, takila (Jawa), pepaitan (Sumatra).

2.1.3 Morfologi Tanaman (Syamsuhidayat, 1991)

- Habitus** : herba semusim, tinggi mencapai 90 cm.
- Batang** : bentuk segiempat ketika masih muda dan setelah tua bulat, berkayu, pangkal bulat dan percabangan monopodial hijau.
- Daun** : tunggal, bulat telur, bersilang berhadapan, pangkal dan ujung runcing, tepi rata, panjang \pm 5 cm, lebar \pm 1,5 cm, pertulangan menyirip, panjang tangkai \pm 30 mm, hijau.
- Bunga** : majemuk, bentuk tandan, di ketiak daun, dan di ujung batang, kelopak lanset, berbagi lima, pangkal berlekatan hijau, benang sari dua, bulat panjang, kepala sari bulat, ungu putih pendek, kepala putik ungu kecoklatan, mahkota lonjong, pangkal berlekatan, ungu pecah menjadi empat, bagian dalam putih bernoda ungu, bagian luar berambut, merah.
- Buah** : kotak, bulat panjang tengah beralur dan ujung runcing, masih muda hijau, setelah tua hitam.
- Biji** : kecil, bulat, masih muda putih kotor, setelah tua coklat.
- Akar** : tunggang, putih kecoklatan.

2.1.4 Ekologi dan Penyebaran

Tumbuh di India, semenanjung Malaysia, dan hampir di seluruh Indonesia. Tumbuh pada ketinggian 1 m sampai 700 m di atas permukaan laut.

2.1.5 Kandungan Kimia

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) mengandung :

Diterpenoid lakton : andrografolida, neoandrografolida, deoksiandrografolida, 14-epiandrografolida, 14-deoksi-12-metoksiandrografolida, 12-epi-14-deoksi-12-metoksiandrografolida, 14-deoksi-12-hidroksiandrografolida, 14-deoksi-11-hidroksiandrografolid, 14-deoksi-11,12-dehidroksiandrografolida, andrografisida, 6-asetoandrografolida, bisandrografolida A, B, C, dan D. Senyawa-senyawa ini umumnya terdapat di bagian daun.

Flavonoid : polimetoksisflavon, andrografen, paniculin, mono-O-metil wightin dan apigenin-7,4-dimetileter. Senyawa-senyawa ini umumnya terdapat pada bagian akar.

Tanin, saponin, alkana, keton, dan aldehid (Matsuda, 1994)

2.1.6 Bioaktivitas Tanaman

Tanaman sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.), dengan kandungan utama andrografolida telah digunakan sebagai obat tradisional di Asia sebagai antipiretik, antiinflamasi, dan hepatoprotektan (Budavari S, 2001), obat sakit perut, kencing manis, antimalaria dan terkena racun. Kandungan senyawa kalium memberikan khasiat menurunkan tekanan darah. (Mursito, 2002)

2.2 Tinjauan tentang Metode Ekstraksi

2.2.1 Definisi Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau simplisia hewani menggunakan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Depkes, 1995)

Ekstrak merupakan sari dari tanaman yang diperoleh dari proses ekstraksi atau penarikan bahan aktif dari suatu tanaman ataupun simplisia nabati dan hewani, menggunakan pelarut yang sesuai dengan memperhatikan sifat-sifat fisika kimia dari senyawa aktif yang akan diekstraksi. (Mursito, 2002).

2.2.2 Proses Ekstraksi

Proses ekstraksi melibatkan berbagai macam pelarut, mulai dari pelarut polar maupun non polar. Selain itu juga dapat dilakukan dengan berbagai macam cara atau metode.

Proses pembuatan ekstrak diawali dari proses pembuatan serbuk simplisia yang mempunyai derajat kehalusan tertentu. Semakin halus serbuk simplisia, sebenarnya proses ekstraksi yang terjadi semakin efektif, namun semakin halus

serbuk simplisia yang akan diekstraksi menyebabkan semakin sukit proses penyaringan yang diperlukan.

Sebagai bahan pelarut dipilih cairan yang dapat melarutkan bahan aktif yang dikehendaki dalam kondisi yang maksimal dan tidak melarutkan bahan lain yang tidak diperlukan, sehingga senyawa aktif yang diperlukan terpisah dengan sebagian besar kandungan simplisia yang tidak diperlukan.

Berbagai macam metode ekstraksi yang biasa dilakukan adalah :

- Maserasi

Maserasi merupakan proses ekstraksi simplisia dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut yang sesuai selama 24 jam pada suhu kamar. Selama dalam perendaman dilakukan pengadukan atau pengocokan dalam selang waktu tertentu. Selanjutnya cairan dituang atau disaring. Apabila perlu, cairan yang diperoleh diuapkan untuk memperoleh konsistensi yang diinginkan.

- Digesti

Digesti merupakan proses ekstraksi simplisia dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut yang sesuai selama 24 jam pada suhu 40° - 50°C. Setiap kali dilakukan pengadukan. Cairan dituang atau disaring dalam wadah tertentu. Apabila perlu, cairan yang diperoleh diuapkan untuk memperoleh konsistensi yang diinginkan.

- Perkolasi

Perkolasi adalah proses ekstraksi simplisia dengan cara merendam serbuk simplisia dengan pelarut yang sesuai kemudian dilanjutkan dengan mengalirkan hasil rendaman. Setiap kali cairan dialirkan keluar akan diganti dengan pelarut yang sejenis sehingga jumlah cairan yang merendam simplisia selalu berada dalam volume yang tetap. Aliran cairan dilakukan hingga seluruh senyawa aktif telah terekstraksi sempurna.

(Mursito, 2002)

2.3 Tinjauan tentang KLT

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah teknik pemisahan campuran zat yang didasarkan atas perbedaan migrasi dari masing-masing komponen pada fase diam di bawah fase gerak atau pelarut yang bergerak. Bisa dipakai suatu lapis tipis

absorben yang ditaburkan pada bahan inert (kaca, plastik, aluminium, logam atau metal) sebagai fase diam. Campuran yang dipisahkan berupa larutan yang ditotolkan bentuk bercak atau pita. Kemudian dikembangkan dalam bejana tertutup dengan larutan pengembang yang sesuai maka campuran senyawa kimia tersebut akan bergerak melintasi fase diam dengan kecepatan yang berbeda tergantung kelarutannya pada larutan pengembang dan kecenderungan senyawa tersebut melekat pada fase diam. (Gritter, 1991)

Mekanisme proses pemisahan pada KLT ada beberapa macam antara lain adsorpsi, partisi, pertukaran ion, filtrasi, dan elektroforesis. Yang umum dipakai adalah mekanisme adsorpsi dan partisi. Mekanisme adsorpsi adalah apabila suatu campuran zat diteteskan pada lempeng fase diam maka semua zat akan diadsorpsi karena kekuatan adsorpsi antara molekul masing-masing zat dengan fase diam berbeda-beda jika sistem itu dilewatkan cairan fase gerak maka zat yang diadsorpsi paling lemah oleh fase diam akan terlepas lebih dahulu sehingga akan membentuk noda yang paling atas, selanjutnya diikuti oleh noda-noda dari molekul zat yang teradsorpsi paling kuat oleh fase diam dan membentuk noda paling rendah (Stahl, 1985). Mekanisme partisi adalah campuran yang akan dipisahkan, didistribusikan diantara dua fase cair yang tidak saling campur. Hal ini berdasarkan perbedaan kelarutan relatif dari masing-masing komponen dan fase gerak.

Sebagai parameter untuk menentukan letak noda pada KLT adalah harga R_f yaitu hasil bagi jarak noda dari titik awal dengan jarak yang ditempuh pelarut dari titik awal.

$$R_f = \frac{\text{jarak noda dari titik awal}}{\text{jarak yang ditempuh fase gerak}}$$

Setiap zat memiliki harga R_f yang spesifik dengan fase gerak dan fase diam tertentu (Skoog, 1981)

2.4 Tinjauan Tentang Malaria

Malaria adalah penyakit infeksi akut dan kronis yang ditandai dengan demam berkala, pembesaran hati, dan anemia yang disebabkan parasit bersel tunggal yaitu protozoa yang termasuk dalam genus *Plasmodium* dan ditularkan

oleh nyamuk *Anopheles*. Malaria merupakan wabah endemik yang dapat terjangkit pada daerah tropis, daerah iklim panas dan basah. Daerah-daerah tersebut antar lain Amerika Tengah dan Selatan, Meksiko, Kepulauan Karibia, Afrika, Asia Selatan, Asia Timur, Asia Tenggara, dan Oseania.

Malaria termasuk penyakit infeksi dengan daerah penyebaran yang meliputi hampir seluruh bagian dunia. Malaria yang menjangkiti manusia disebabkan oleh salah satu atau beberapa dari 4 jenis parasit malaria (*Plasmodium*) dengan penyebaran yang berbeda yaitu :

1. *Plasmodium falciparum* yang merupakan penyebab malaria jenis *tertiana maligna*. Parasit ini merupakan yang paling ganas dan berbahaya sebab dapat mematikan dalam beberapa hari bila berkembang menjadi malaria otak dimana banyak eritrosit rusak yang menyumbat kapiler otak. Biasanya terdapat di daerah dengan iklim panas dan lembab.
2. *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* yang merupakan penyebab malaria jenis *tertiana benigna*, mempunyai ciri demam berkala 3 hari sekali dengan puncak setelah tiap 48 jam. Parasit malaria ini menjangkiti daerah tropis, sub tropis dan daerah yang memiliki 4 musim.
3. *Plasmodium malariae* yang merupakan penyebab malaria jenis *kuartana*, mempunyai ciri demam berkala 4 hari sekali dengan puncak setiap 72 jam. Parasit malaria ini menjangkiti daerah tropis saja.

2.5 Tinjauan Tentang *Plasmodium berghei*

2.5.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

Filum	: Protozoa
Sub Filum	: Sporozoa
Kelas	: Telosporea
Sub Kelas	: Coccidea
Famili	: Plasmodiidae
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Spesies	: <i>Plasmodium berghei</i>

2.5.2 Morfologi *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei sebagai parasit penyebab malaria pada rodensia mempunyai beberapa bentuk parasit dalam darah, yaitu bentuk ring / cincin, trophozoit, skizon, dan gametosit.

- Bentuk ring / cincin

Tampak seperti cincin dengan sitoplasma warna biru dengan nukleus / inti sel kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan Giemsa dari hapusan darah tepi.

- Bentuk trophozoit

Bentuk berupa amoeboid atau seperti pita, inti sel warna merah, sitoplasma warna biru, dan dengan pembelahan nukleus, stadium skizon terjadi.

- Bentuk skizon

Ukuran kira kira 27 μm pada hari ke empat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak titik titik kasar warna merah gelap yang tampak jelas (titik maurer), diakibatkan sitoplasma rusak karena populasi parasit mencapai $\frac{2}{3}$ eritrosit.

- Bentuk gametosit

Ada 2 macam bentuk yaitu makro gametosit dan mikro gametosit. Makro gametosit berbentuk oval dengan noda biru yang mengandung kumpulan nukleus dan granula. Mikro gametosit bentuknya seperti renal atau kacang dengan noda biru lemah atau kemerahan mengandung nukleus yang mengkilat serta granula yang lebih kecil dan tersebar.

Pada pemeriksaan hapusan / tetesan tebal darah tepi dijumpai parasit muda berbentuk cincin (*ring form*). Pada sediaan tetesan darah tebal, stadium trophozoit juga berbentuk cincin, gametosit berbentuk oval, dengan bentuk cincin dan bulatan merah di luar gametosit dalam jumlah banyak. Pada sediaan hapusan darah tipis, trophozoit muda berbentuk tanda seru atau koma dan cincin terbuka, gametosit berbentuk oval dan terdapat bintik Maurer pada eritrosit. Dengan pengecatan Giemsa, nukleus warna merah, plasma warna biru, eritrosit warna merah muda dan pigmen warna kuning tengguli sampai hitam tengguli. (LUMC, 2002)

2.5.3 Siklus hidup *Plasmodium berghei*

Siklus hidup *Plasmodium berghei* dan malaria lainnya melalui 2 fase yaitu fase aseksual (skizogoni) dan siklus seksual (sporogoni). Sebagai tempat terjadinya fase aseksual adalah melalui manusia yang sekaligus merupakan *hospes* (inang) sementara. Tempat terjadinya fase seksual atau tahap reproduksi yang diikuti oleh sporogoni adalah melalui nyamuk *Anopheles durenii* betina yang memegang peranan ganda yaitu vektor dan *hospes* definitif.

1. Siklus aseksual

a) Fase pra eritrosit atau eksoeritrosit

Infeksi dimulai oleh gigitan nyamuk yang terinfeksi yang akan memasukkan sporozoit haploid ke aliran darah inang. Setelah masuk ke aliran darah, sporozoit *Plasmodium berghei* akan terikut menuju hepar dan menyerang sel-sel hepatosit (sama seperti *Plasmodium* lainnya yang menyerang manusia). Invasi ini diperantarai oleh invaginasi membran plasma hepatosit membentuk rongga / vakuola yang ditempati sporozoit (berlangsung mulai hitungan menit hingga hitungan jam setelah inokulasi). Sporozoit mengalami mobilisasi dari sel yang satu ke sel lainnya sebelum menyerang hepatosit dengan mekanisme membentuk vakuola tersebut. Di dalam hepatosit, terjadi proses pertumbuhan sporozoit menjadi trophozoit sekaligus maturasi skizon selama 47 – 52 jam, dalam 1 skizon terdapat 1500 – 8000 merozoit berinti tunggal.

Dalam waktu 24 jam pasca infiltrasi sporozoit pada hepatosit dan dalam 26 jam setelahnya terjadi setidaknya 13 kali pembelahan inti untuk bisa menjadi merozoit. Terjadi pemecahan sel hepar, lalu merozoit – merozoit tersebut terlepas ke peredaran darah dan menyerang eritrosit. Pada *P. berghei* tidak ditemukan adanya bentuk hipnozoit (bentuk dormans) seperti pada *P. vivax* dan beberapa plasmodium lain, tetapi ada bukti yang menunjukkan keberadaan skizon hepar yang berkembang dengan lambat tetapi tidak dormans.

b) Fase eritrositik

- **Perkembangan aseksual**

Merupakan tahap perkembangan lebih lanjut dari fase seksual, ditandai oleh invasi merozoit pada eritrosit, *Plasmodium berghei* dapat menyerang pada retikulosit atau pada eritrosit dewasa. Di dalam eritrosit, terjadi peningkatan ukuran sel dan sitoplasma dari merozoit dan inilah yang dinamakan tahap trophozoit. Trophozoit menggunakan hemoglobin sebagai substansi bagi metabolismenya dan menghasilkan hemozoin. Karakter khas dari tahap ini adalah terdapat pigmen kecoklatan yang tersebar di sitoplasma.

Waktu yang diperlukan untuk pertumbuhan merozoit menjadi trophozoit dewasa adalah sekitar 16 jam. Begitu fase trophozoit selesai, terjadi replikasi DNA parasit yang kemudian mengalami pembelahan inti menghasilkan parasit berinti ganda (skizon), pada proses skizogoni selama 6 – 8 jam parasit mengalami pembelahan inti berkali-kali membentuk sel yang berinti 8 – 24. Setelah tahap skizogoni selesai lalu dilanjutkan pada pembentukan merozoit, yang memiliki banyak ciri khas yang berhubungan dengan fungsinya dalam menyerang eritrosit, misalnya organela-organela apikal seperti rhoptris dan mikronema. Seperti *P. falciparum*, *P. berghei* memiliki organela seperti plastida yang mengandung genom ekstra kromosom sirkuler 30,7 kb, DNA ini menunjukkan kemiripan 70-95% dengan milik *P. falciparum* yang 35 kb, demikian juga pengaturan gen-gen karakteristiknya. Sebagai tambahan, parasit rodensia memiliki 6 kb DNA mitokondria ekstrakromosomal, homolog dengan yang dimiliki *Plasmodium falciparum*. Durasi fase pembentukan merozoit ini berkisar 22 – 24 jam.

Skizon dalam retikulosit mengandung lebih banyak merozoit (16-18) daripada yang ada dalam eritrosit dewasa (8-12). Kemudian skizon yang sudah matang maupun yang muda akan menghilang dari sirkulasi perifer namun terdapat akumulasi pada pembuluh kapiler organ visceral seperti paru paru, limpa, hepar dan otak (tingkatan akumulasi dan letak akumulasi pada organ berbeda untuk strain *Plasmodium berghei* yang berbeda).

Setelah pemecahan skizon, merozoit akan menyerang eritrosit yang baru lagi dan menyebabkan terjadinya peningkatan parasitemia. Fase untuk perkembangan eritrositik *P. berghei* pada rodensia biasanya ditemukan secara simultan dalam darah saat perjalanan infeksi.

- **Perkembangan seksual**

Pada perkembangan aseksual, sejumlah kecil parasit berhenti membelah dan berdiferensiasi menjadi bentuk seksual (gametosit). Ada 2 jenis gametosit yaitu mikrogametosit (jantan) dan makrogametosit (betina). Pada *Plasmodium berghei* di tiap siklus aseksualnya 5 - 25% parasit mengalami diferensiasi seksual. Prosentasi yang relatif tetap ini berbeda dengan *P. falciparum* dimana laju periode pembelahan aseksualnya berubah seiring laju produksi gametositnya. Bentuk merozoit dari skizon hepar *P. berghei* mampu berdiferensiasi secara langsung menjadi gametosit setelah menginvasi eritrosit selama 26 – 30 jam.

Pada 16 - 18 jam perkembangan, gametosit sulit dibedakan dengan trophozoit pada mikroskop. Diperlukan waktu sekitar 18 – 22 jam untuk mengetahui bahwa sudah terjadi bentuk gametosit yang dapat diamati ciri-cirinya seperti inti sel tunggal yang besar, distribusi granul pigmen pada sitoplasma, dan ukuran sel. Setelah 24 jam dapat diketahui adanya mikro gametosit yang ditandai dengan inti lebih besar, granul dan badan osmiofilik lebih sedikit daripada makro gametosit.

2. Siklus seksual

a) Fertilisasi dan perkembangan zigot pada nyamuk

Saat terjadi penghisapan darah oleh nyamuk terhadap hospes terinfeksi, hanya gametosit dewasa yang dapat berkembang dalam perut nyamuk. Gametosit kemudian berubah menjadi gamet dimana makrogametosit berubah menjadi 1 makrogamet dan mikrogametosit berubah menjadi 8 mikrogamet yang berbentuk seperti seperti sperma. Tiga pengaruh lingkungan telah diketahui memicu proses ini, penurunan suhu darah sampai lebih dari 5°C dari suhu normal, peningkatan pH dari 7,3

menjadi 7,8 - 8,0 dan adanya Gametosit Activating Factor (GAF). Pada *P. berghei* sebagai GAF adalah asam xanthurinat. Walaupun pada proses pembentukan gametosit antara *P. berghei* dan *P. falciparum* berbeda, tetapi proses pembentukan gametnya mirip.

Setelah terbentuk gamet, sekitar 10 menit – 1 jam setelahnya terjadi penetrasi mikrogamet ke dalam makrogamet yang menghasilkan zigot diploid (disebut dengan proses fertilisasi), yang dilanjutkan dengan pembelahan meiosis. Setelah meiosis, terjadi pembelahan zigot berinti (ookinet) dengan DNA haploid 2 – 4 kali lebih banyak baru kemudian diikuti dengan pembelahan inti.

b) Ookista dan perkembangan sporozoit

Ookinete dewasa yang bergerak aktif dapat menembus epitel lambung dan tinggal diantara membran sel paling inferior dan basal lamina dinding lambung. Pada tahap ini, ookinete berubah menjadi ookista dan terjadi replikasi mitosis sampai terdapat 1000 an sporozoit. Terjadi perbesaran diameter dari ookista dalam waktu 10 – 12 hari. Jumlah ookista dan sporozoit berbeda untuk tiap spesies nyamuk Anopheles. Terjadi pemecahan ookista yang diikuti pelepasan sporozoit yang kemudian masuk ke dalam kelenjar saliva nyamuk. Terjadi migrasi sporozoit untuk keluar dari kelenjar saliva nyamuk, lalu sporozoit masuk ke ruang sekretori ekstrasel dan tinggal di sana hingga waktu infeksi ke dalam tubuh hospes tiba.

2.5.4 Pembiakan *in vivo Plasmodium berghei*

Rodensia yang sering digunakan dalam penelitian seperti mencit, tikus, hamster, kelinci umumnya sensitif terhadap infeksi *Plasmodium berghei* baik lewat gigitan nyamuk maupun injeksi peritoneal dari darah yang telah terinfeksi parasit. Pada strain rodensia yang berbeda mempunyai perbedaan tingkat kepekaan terhadap infeksi yang cukup besar sehingga mempengaruhi pada strain nyamuk yang digunakan untuk menginfeksi. Sporozoit dapat ditemukan dalam hepatosit dalam hitungan menit hingga jam setelah inokulasi, untuk laju pembelahan aseksual dalam darah untuk *Plasmodium berghei* berdasarkan

penelitian relatif stabil (10 kali pembelahan per 24 jam saat fase I siklus eritrositik).

Penginfeksian yang disengaja adalah dengan injeksi intravena atau intraperitonial untuk eritrosit dengan bentukan fase eritrosit (cincin, trophozoit, skizon). Sekitar 10% dari parasit yang diinfeksi adalah viabel dan memasuki sirkulasi sistemik.

2.6 Klasifikasi Antimalaria

Berdasarkan perkembangan dan siklus kehidupan parasit dimana obat bekerja atau cara kerjanya, antimalaria dikelompokkan sebagai berikut :

1. Skizontosida jaringan (skizontosida eritrositik), yang digunakan untuk pencegahan kausal.

Mekanisme kerjanya dengan destruksi jaringan primer plasmodia dan merozoit di hepar, yang dimulai dari tahap infeksi eritrositik, lalu mencegah invasi eritrositik dan lain lain penyebaran infeksi ke nyamuk *Anopheles*. Contoh : klorguanid, pirimetamin dan primakuin.

2. Skizontosida jaringan, yang digunakan pada upaya preventif kekambuhan. Mekanisme kerjanya berlangsung pada bentuk skizon di jaringan laten, jaringan sekunder, atau hipnozoit dari *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* di hepatosit. Contoh : primakuin dan pirimetamin.

3. Skizontosida darah (skizontosida eritrositik), yang digunakan untuk pengobatan klinik dan supresif.

Mekanisme kerja berlangsung pada merozoit pada fase eritrositik aseksual dari parasit malaria dan mengganggu skizogoni eritrositik. Berdasarkan masa kerjanya, kelompok ini dibagi menjadi dua, yaitu :

- a) Schizontosida yang bekerja secara cepat, contoh : amodiakuin, artemisin, klorokuin, kuinin, dan tetrasiklin.
- b) Schizontosida yang bekerja secara lambat, contoh : pirimetamin, klorguanid, sikloguanil pamoat, sulfonamida dan sulfon.

4. Gametositosida

Mekanisme kerjanya dengan destruksi bentuk eritrosit seksual (gametosit) dari parasit malaria sehingga mencegah penyebaran plasmodia ke dalam

tubuh nyamuk *Anopheles* atau transmisinya ke nyamuk dihambat. Contoh : klorokuin, primakuin, dan kuinin.

5. Sporozoitosida

Mekanisme kerjanya dengan membunuh sporozoit setelah masuk dalam darah setelah gigitan nyamuk. Waktu untuk obat bekerja sangat singkat karena sporozoit secara cepat masuk ke sel hepar sehingga banyak obat anti malaria kurang aktif terhadap bentuk sporozoit tersebut.

6. Sporontosida

Mekanisme kerjanya melalui pencegahan perkembangan oosist dan sporozoit dalam tubuh nyamuk malaria yang menginfeksi host. Contoh : klorguanid, pirimetamin dan primakuin. (Bambang Soekardjo dan Siswandono, 2000 ; Ganiswara, 1995)

2.7 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman dengan metode *In Vivo*

Pada umumnya dilakukan 2 tes untuk pengujian aktivitas anti malaria dengan *Plasmodium berghei* yang biasanya digunakan untuk dasar skrining ekstrak tanaman, yaitu dengan metode Peter dan metode Rane.

1. Tes Peter (The 4 – day suppressive test of blood schizontocidal action) (Phillipson, 1991)

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat 20 ± 2 gram ditempatkan dalam ruang yang bersuhu sekitar $22 \pm 2^\circ\text{C}$ sebanyak 5 kelompok dan diberi makanan dengan menu standar. Darah dari mencit donor dengan parasitemia yang sudah tinggi (sekitar 20 % eritrosit yang terinfeksi) dilarutkan dalam medium kultur (TC 199) sampai tiap 0,2 ml mengandung 10^7 eritrosit yang terinfeksi. Tiap mencit diberi 0,2 ml secara intravena pada hari ke 0. Ekstrak tanaman bisa dilarutkan atau dibuat suspensi dengan triturasi sonifikasi setelah penambahan 0,2% larutan Tween atau 0,5 % larutan CMC atau 0,5 % larutan DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan setiap hari dengan rentang dosis 1 – 100 mg/kg BB mencit, dimulai sejak hari dimulainya penginfeksi selama 4 hari berturut turut secara per oral atau subkutan. Pada hari ke-5, diambil sampel darah dari ekor dan

dilakukan pewarnaan dengan pewarna yang sesuai (misal Giemsa). Lalu diukur persentase jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dibandingkan total eritrosit yang diamati. Harga ED_{50} (dalam kasus ini menunjukkan adanya penekanan / penghambatan parasit sebanyak 50 % bila dibandingkan dengan kontrol) bisa dihitung dengan log dosis vs aktivitas probit. Standar deviasi dihitung menggunakan program komputer yang sesuai.

2. Tes Rane (Phillipson, 1991)

Dasar dari tes ini adalah membandingkan efek dari perlakuan standar pemberian *Plasmodium berghei* yang membunuh mencit dalam 6 hari dengan perpanjangan waktu bertahan hidup 12 hari, dengan perlakuan pemberian sebuah dosis tunggal senyawa yang diujicobakan. Kelompok standar diberikan 10^6 sel donor yang terinfeksi secara intraperitoneal pada hari ke 1 dan larutan ekstrak tanaman atau suspensi dalam oleum Arachidis yang telah dionifikasi diberikan melalui rute subkutan dengan interval dosis 640 , 320 ,160 dan 80 mg / kg BB mencit pada hari ke-4.

Penilaian aktivitas berdasarkan jumlah yang masih hidup, lebih dari 2x lipat dibandingkan kelompok kontrol. Minimum Effective Dose (MED) yang didapat dibandingkan Maximum Tolerated Dose (MTD) yang mengakibatkan tak lebih dari 1/5 jumlah mencit mati karena efek toksik. Dosis yang lebih rendah diperlukan untuk memperoleh harga MED. Walaupun tes ini terbilang masih kasar bila dibandingkan dengan Tes Peter, tetapi tes ini terbukti lebih baik dalam mengetahui profil obat baru karena menyertakan ukuran perbandingan antara efikasi dengan toksisitasnya.

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Kerangka Konseptual

Penyakit malaria merupakan penyakit endemik yang menjadi penyebab kematian di berbagai negara. Penyakit ini disebabkan oleh protozoa genus *Plasmodium* dan ditularkan melalui gigitan nyamuk ke manusia. Penyakit malaria sendiri dibagi dalam 4 jenis penyebab, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, dan *Plasmodium malariae*. Masing – masing memiliki karakteristiknya tersendiri dalam hal intensitas dan frekuensi serangan.

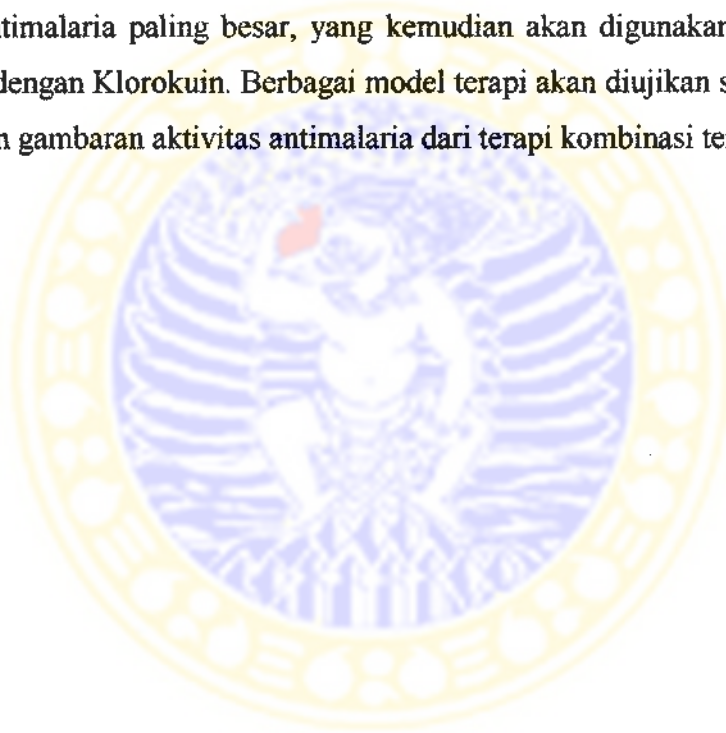
Seiring dengan perkembangan dunia medis, perkembangan obat - obat antimalaria juga telah berkembang pesat. Berbagai jenis obat antimalaria sintesis telah ditemukan. Namun timbul pula masalah baru yaitu ditemukannya resistensi terhadap obat antimalaria yang dapat mempersulit pengontrolan penyakit ini. Karena itulah dibutuhkan adanya penemuan obat – obat antimalaria baru, baik itu berasal dari sintesis, semi sintesis, maupun dari bahan alam.

Salah satu cara untuk mengatasi masalah resistensi adalah dengan terapi kombinasi obat antimalaria, yang telah disarankan oleh WHO pada tahun 2001. Kombinasi ini bertujuan untuk dapat meningkatkan efektivitas terapi antimalaria, menurunkan toksisitas, dan juga menurunkan tingkat resistensi obat malaria. Dengan adanya kombinasi terapi maka aktivitas antimalaria yang dihasilkan akan lebih baik dibandingkan dengan monoterapi.

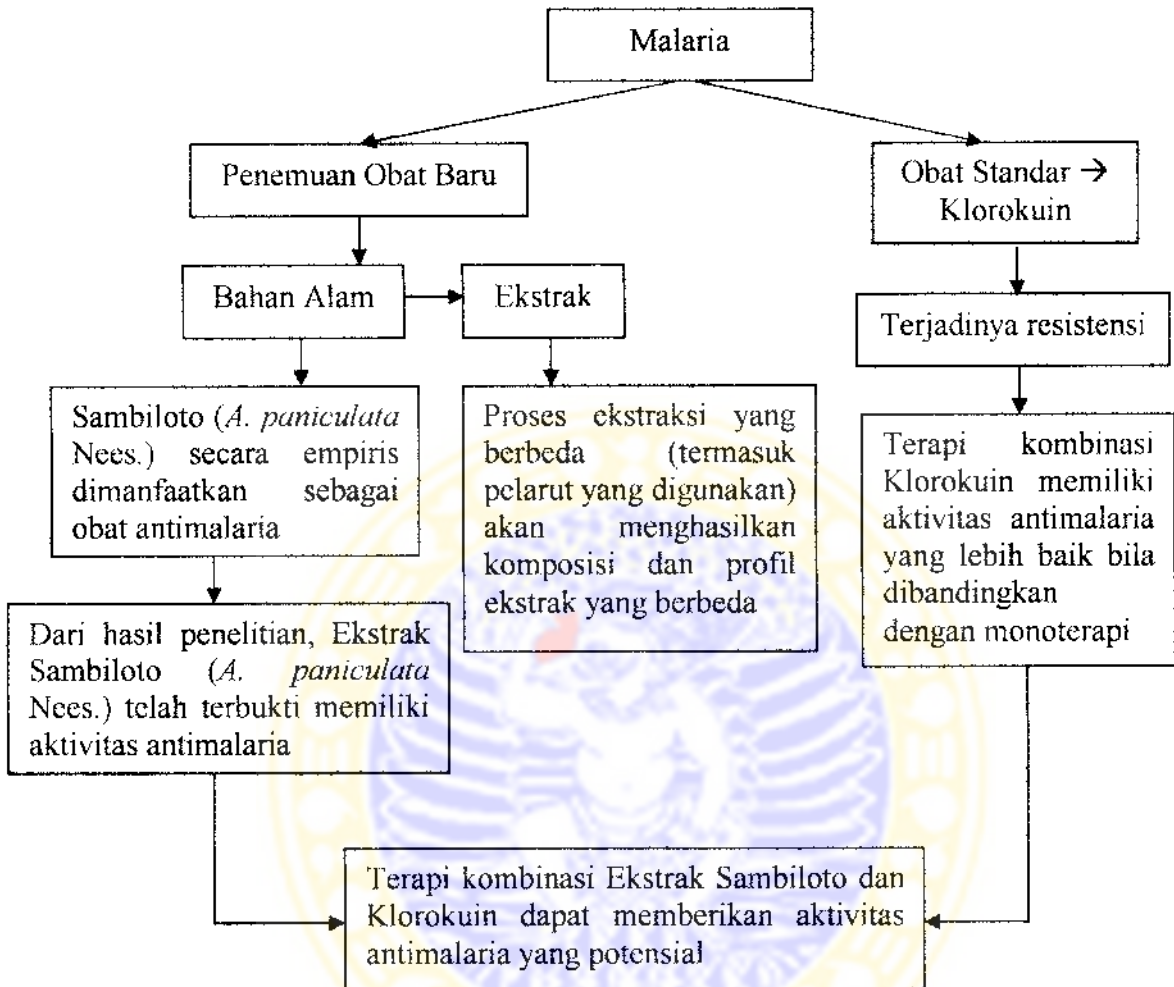
Klorokuin adalah salah satu obat standar yang tingkat resistensinya cukup tinggi di beberapa negara. Namun beberapa penelitian menyebutkan bahwa terapi kombinasi antimalaria antara klorokuin dengan obat lain memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan terapi klorokuin saja. Hal ini membuktikan bahwa efektivitas klorokuin dapat meningkat dengan adanya kombinasi dengan obat lain, baik itu bersifat sinergis atau aditif.

Salah satu tanaman di Indonesia yang memiliki khasiat sebagai antimalaria adalah sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.). Telah diketahui kandungan utama dari tanaman ini yaitu andrografolida, suatu senyawa diterpen lakton yang dipercaya memiliki khasiat sebagai antimalaria. Ekstrak etanol 96% sambiloto

(*Andrographis paniculata* Nees.) telah terbukti memiliki aktivitas antimalaria, dan juga aktivitasnya lebih tinggi dibandingkan dengan isolat andrografolida. Hal ini membuktikan bahwa di dalam ekstrak sambiloto terdapat komponen - komponen lain didalamnya yang dapat menunjang aktivitas antimalaria. Berdasarkan hal tersebut perlu diuji aktivitas antimalaria dari ekstrak sambiloto dengan kadar pelarut yang berbeda (etanol 60%, etanol 70% dan etanol 80%), untuk mengetahui adanya perbedaan aktivitas antimalaria yang dihasilkan. Dengan adanya perbedaan dalam proses ekstraksi, termasuk perbedaan kadar pelarut yang digunakan, maka zat / komponen yang terlarut dalam ekstrak tersebut akan berbeda pula komposisinya. Dari sini akan didapatkan ekstrak sambiloto dengan aktivitas antimalaria paling besar, yang kemudian akan digunakan dalam terapi kombinasi dengan Klorokuin. Berbagai model terapi akan diujikan sehingga dapat memberikan gambaran aktivitas antimalaria dari terapi kombinasi tersebut.



3.2 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1. Bahan Penelitian

4.1.1. Bahan Tanaman

Simplisia herba *Andrographis paniculata* Nees. (Sambiloto) yang didapat dari daerah Pacet, Jawa Timur pada bulan April 2006.

4.1.2. *Plasmodium berghei*

Biakan *Plasmodium berghei* yang digunakan dalam penelitian ini adalah galur ANKA yang diperoleh dari Laboratorium Biokimia Eijkman Jakarta, dikembangkan di Laboratorium Hewan Coba, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

4.1.3. Hewan Coba (Mencit)

Binatang percobaan (mencit) yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Balb C dengan interval berat badan 20 – 30 gram dan umur \pm 2 bulan, yang diperoleh dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya.

4.1.4 Bahan Pembanding

Bahan pembanding yang digunakan dalam penelitian adalah klorokuin difosfat (Sigma C-6628, 25 gram, Lot 7740650).

4.1.5. Bahan lain yang digunakan untuk uji Antimalaria secara *In Vivo*

Bahan lain yang digunakan untuk uji antimalaria secara *in vivo* antara lain media Alceiver, pewarna Giemsa, dapar fosfat (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4), dan minyak imersi.

4.1.6 Pelarut

Pelarut yang digunakan antara lain etanol (teknis-redestilasi), etanol p.a (Merck), PBS (Phosphat Buffered Saline), DMSO (Dimetil Sulfoksida-etanol) (Merck), Metanol (Merck), Kloroform (Merck), dan Aqua destilata.

4.1.7 KLT

Plate KLT yang digunakan adalah silica gel 60 F-254 (Merck)

4.2 Alat – alat

- Timbangan analitik
- Penyaring Buchner
- Pompa vakum
- Rotavapor
- Pipet mikro 1000,0 μ l
- Labu ukur 5,0 ml ; 10,0 ml ; 25,0 ml dan 100,0 ml
- Tabung kecil bertutup
- Bejana KLT
- Penggetar Ultrasonik (Branson Ultrasonic 3510E-MT)
- Water Bath
- Syringe dan Jarum suntik 1,0 ml
- Alat sonde
- Mikroskop dan *Object Glass*
- Counter
- Vial

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Pembuatan Ekstrak

Dibuat pelarut etanol dengan berbagai macam kadar, yaitu Etanol 60%, Etanol 70%, dan Etanol 80% masing-masing sebanyak 5 liter :

- Etanol 60% : 3 L etanol + 2 L aquadest
- Etanol 70% : 3,5 L etanol + 1,5 L aquadest
- Etanol 80% : 4 L etanol + 1 L aquadest

Kemudian simplisia kering digiling sehingga diperoleh serbuk halus, dan ditimbang sebanyak 250 gram sebanyak 3 kali. Masing-masing serbuk dimaserasi dengan menggunakan 1 liter pelarut etanol dengan berbagai kadar yaitu Etanol 60%, Etanol 70%, dan Etanol 80%. Residunya dimaserasi ulang dengan pelarut

masing-masing sampai pelarut habis (5 liter). Ekstrak yang diperoleh dipekatkan dengan menggunakan rotavapor sampai diperoleh ekstrak kental.

4.3.2 Penginfeksian Mencit Donor dengan *Plasmodium berghei*

1. Simpanan beku darah terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam medium alceivers (1 : 3) *dithawing*.
2. Injeksikan ke mencit donor secara intraperitoneal masing – masing sebanyak 200 μ l.
3. Hitung persen parasitemia dengan cara mengambil satu tetes darah dari ekor dan dibuat hapusan darah tipis dengan pewarna Giemsa.
4. Setelah persen parasitemia sudah mencapai $\geq 20\%$, dilakukan pembedahan untuk mengambil darah dari jantung.
5. Darah yang diambil dari mencit donor tersebut diencerkan dengan medium alceivers (1 : 3).

4.3.3 Penginfeksian Mencit Coba dengan *Plasmodium berghei*

Darah dari mencit donor dalam medium alceivers (1 : 3) diinfeksi secara intraperitoneal sebanyak 200 μ l ke semua mencit coba. Kemudian dibiarkan sampai terjadi pertumbuhan parasit (1-5%) pada semua mencit coba, biasanya dibutuhkan waktu ± 4 hari. Bila semua mencit coba sudah terbukti positif ada pertumbuhan parasitnya, maka mencit coba siap diberikan bahan uji.

4.3.4 Skrining Aktivitas Antimalaria

a. Penyiapan Bahan Uji

Sebagai bahan uji adalah ekstrak etanol 60%, etanol 70%, dan etanol 80% herba sambiloto dengan dosis 100 mg/kgBB. Dengan anggapan berat badan standar mencit adalah 25 g dan volume tiap pemberian adalah 250 μ l, maka perhitungan dosis didasarkan atas berat badan tersebut, dan bila mencit beratnya lebih atau kurang dari berat standar maka tinggal menambahkan atau mengurangi volume sesuai ekivalennya. Ditimbang ekstrak sambiloto sejumlah yang telah disebutkan di atas, kemudian ditambah DMSO 2% dan dilarutkan dengan CMC Na 0,5% sampai volume tertentu.

b. Penyiapan Larutan Kontrol Positif

Sebagai kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan dosis 10 mg/kg BB mencit.

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut : klorokuin difosfat 25 mg dilarutkan dalam CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 25,0 ml, dihasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 µg/ml. Untuk 0,25 ml mengandung klorokuin difosfat 0,25 mg/25 g BB mencit (10 mg/kg BB mencit).

c. Penyiapan Larutan Kontrol Negatif

Sebagai kontrol negatif digunakan larutan DMSO 2% dalam CMC Na 0,5%. Cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

Ditimbang 0,5 gram CMC Na, ditaburkan sedikit demi sedikit di atas 10 ml aquadest panas dalam mortir, didiamkan selama 10 – 15 menit, dicampur sampai homogen, ditambah aquadest sedikit demi sedikit sambil diaduk, setelah homogen dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah aquadest sampai tepat 100,0 ml, kemudian dikocok sampai homogen (larutan CMC Na 0,5%).

Sedangkan untuk DMSO 2%, dibuat dengan cara DMSO dipipet 200 µl lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml di ad kan dengan CMC Na 0,5% sampai tepat 10,0 ml.

d. Skrining Aktivitas Antimalaria Ekstrak Sambiloto *in vivo*

Skrining aktivitas antimalaria ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto *in vivo* dilakukan dengan menggunakan metode Peter (1977), *The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action* (Phillipson, 1991).

Mencit terinfeksi parasit dibagi menjadi 3 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 5 mencit, masing-masing kelompok diberi perlakuan :

- a) 1 kelompok kontrol positif
- b) 1 kelompok kontrol negatif
- c) 1 kelompok uji (Ekstrak etanol sambiloto 60%, 70%, dan 80% dosis 100 mg/kgBB yang dilarutkan pada DMSO 2% dalam CMC Na 0,5%)

Pemberian bahan uji pada mencit dilakukan apabila sudah ada pertumbuhan parasit (1-5%), diberikan selama 4 hari ($D_0 - D_3$) berturut – turut. D_0 yaitu hari

pertama pembuatan hapusan sebelum pemberian bahan uji dan treatment. Tiap hari diamati persen parasitemianya sampai hari ke-7 ($D_0 - D_6$) dengan cara mengambil sampel darah dari ekor dan dibuat hapusan tipis, hal ini bertujuan untuk mengamati perkembangan aksi obat.

4.3.5 Terapi Kombinasi Antimalaria

a. Penyiapan Bahan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol sambiloto yang memiliki aktivitas antimalaria paling besar, yang hasilnya didapat dari skrining aktivitas antimalaria masing-masing ekstrak. Dosis yang digunakan sesuai dengan dosis skrining aktivitas antimalaria ekstrak, yaitu 100 mg/kgBB. Kemudian akan dikombinasikan dengan klorokuin difosfat dengan 2 macam dosis yaitu 0,1567 mg/kgBB dan 10 mg/kgBB. Dengan anggapan berat badan standar mencit adalah 25 g dan volume tiap pemberian adalah 250 μ l, maka perhitungan dosis didasarkan atas berat badan tersebut, dan bila mencit beratnya lebih atau kurang dari berat standar maka tinggal menambahkan atau mengurangi volume sesuai ekivalennya.

b. Penyiapan Larutan Kontrol Positif

Sebagai kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan dosis 10 mg/kg BB mencit. Cara pembuatannya adalah klorokuin difosfat 25 mg dilarutkan dalam CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 25,0 mL, dihasilkan larutan dengan konsentrasi 1000 μ g/ml. Untuk 0,25 ml mengandung klorokuin difosfat 0,25 mg/25 g BB mencit (10 mg/kg BB mencit).

Kontrol positif kedua yang digunakan adalah klorokuin difosfat 0,1567 mg/kgBB. Cara pembuatannya adalah 1,567 mg klorokuin difosfat dilarutkan dalam CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL. Lalu diambil 1 mL dari larutan induk tersebut dan dimasukkan dalam labu ukur ad 10,0 mL (0,1567 mg/kgBB mencit).

c. Penyiapan Larutan Kontrol Negatif

Sebagai kontrol negatif digunakan larutan DMSO 2% dalam CMC Na 0,5%. Cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

Ditimbang 0,5 gram CMC Na, ditaburkan sedikit demi sedikit di atas 10 ml aquadest panas dalam mortir, didiamkan selama 10 – 15 menit, dicampur sampai homogen, ditambah aquadest sedikit demi sedikit sambil diaduk, setelah homogen dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah aquadest sampai tepat 100,0 ml, kemudian dikocok sampai homogen (larutan CMC Na 0,5%).

Sedangkan untuk DMSO 2%, dibuat dengan cara DMSO dipipet 200 μ l lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10,0 ml lalu di ad kan dengan CMC Na 0,5% sampai tepat 10,0 ml.

d. Uji Aktivitas Antimalaria Berbagai Model Terapi Kombinasi *in vivo*

Model terapi kombinasi antimalaria antara ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin terdiri dari :

- **Model A** : Terapi kombinasi ekstrak etanol sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB yang diberikan mulai hari ke-1 (D_0) sampai hari ke-4 (D_3). Sebagai kontrol positif digunakan larutan klorokuin 0,1567 mg/kgBB yang diberikan selama 4 hari ($D_0 - D_3$).
- **Model B** : Terapi kombinasi ekstrak etanol sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB yang diberikan hanya pada D_0 saja. Sebagai kontrol positif digunakan larutan klorokuin 0,1567 mg/kgBB yang hanya diberikan pada D_0 saja.
- **Model C** : Terapi kombinasi ekstrak etanol sambiloto 100 mg/kgBB selama 4 hari (D_0-D_3) dan klorokuin 10 mg/kgBB hanya pada hari ke-4 (D_3). Sebagai kontrol positif digunakan larutan klorokuin 10 mg/kgBB yang diberikan selama 4 hari ($D_0 - D_3$).

Dari ketiga model kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin tersebut, hasilnya juga akan dibandingkan dengan **Model D** yaitu terapi ekstrak etanol sambiloto saja seperti yang telah dilakukan pada skrining aktivitas antimalaria ekstrak.

4.4 Evaluasi

4.4.1 Pembuatan sediaan pewarna Giemsa

Sediaan pewarna Giemsa terdiri dari :

- a) Larutan Giemsa 100%
- b) Dapar fosfat

Untuk larutan Giemsa siap pakai, 1 bagian larutan Giemsa 100% tersebut ditambah 9 bagian dapar fosfat pH 7,2.

4.4.2 Pembuatan Preparat Darah dan Perhitungan Parasitemia

a. Pembuatan Preparat Darah

Pembuatan preparat darah dilakukan sebagai berikut :

Diteteskan ± 1 tetes suspensi sel parasit ke atas gelas obyek mikroskop, dengan bantuan satu sisi gelas obyek yang lain, suspensi sel parasit tersebut diratakan. Lalu dibiarkan sampai kering di udara terbuka. Lapisan tipis tersebut difiksasi dalam metanol absolut selama $\pm 3-5$ menit, kemudian dikeringkan di udara terbuka. Terakhir ditambahkan pewarna Giemsa. Sediaan hapusan darah tipis diperiksa dengan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali. Untuk parasit malaria inti berwarna merah dan plasma berwarna biru, sel darah berwarna merah muda, titik "*Schuffner*" berwarna merah tua.

b. Perhitungan Parasitemia

Parasitemia adalah perbandingan sel darah merah yang terinfeksi parasit malaria dengan sel darah merah yang belum terinfeksi dimana perhitungan jumlah parasit tiap 5000 eritrosit.

Perhitungan persen parasitemia :

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{jumlah eritrosit yang terinfeksi}}{5000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

4.5 Perhitungan Jumlah Parasit

Dari hapusan darah tipis diamati jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit malaria tiap 5000 eritrosit (% parasitemia). Kemudian dihitung persen pertumbuhan dan persen penghambatan dengan cara perhitungan sebagai berikut :

$$\% \text{ pertumbuhan} = \frac{P(d_1-d_0) + P(d_2-d_1) + P(d_3-d_2) + \dots + P(d_6-d_5)}{6}$$

$P(d_x-d_{x-1}) = \% \text{ parasitemia hari } x \text{ dikurangi } \% \text{ parasitemia hari sebelumnya}$

$$\% \text{ penghambatan} = 100\% - [X_e/X_k \times 100\%]$$

$X_e = \% \text{ pertumbuhan rata - rata parasit pada tiap dosis bahan uji}$

$X_k = \% \text{ pertumbuhan rata - rata parasit pada kontrol negatif}$

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis varians satu (*one way ANOVA*) pada batas kepercayaan $\alpha = 0,05$ untuk mengetahui adanya perbedaan hasil penghambatan pertumbuhan parasit yang bermakna dari masing – masing terapi kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin. Apabila dari hasil analisis menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna dari penghambatan parasit antar ekstrak (bila nilai F hitung lebih besar daripada F tabel), maka analisis dilanjutkan dengan menggunakan *Tukey's Honestly Significant Different* (HSD) untuk mengetahui model terapi kombinasi yang memberikan perbedaan penghambatan parasit yang paling bermakna. Dengan demikian, dapat diketahui model terapi kombinasi yang memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan parasit malaria yang paling besar.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol 60%, 70%, dan 80% Herba *Sambiloto* (*A. paniculata*, Nees.)

Herba *A. paniculata*, Nees yang diperoleh dari daerah Pacet, Jawa Timur diserbuk sampai halus kemudian diekstraksi dengan metode maserasi (perendaman) menggunakan pelarut etanol 60%, 70%, dan 80%. Rendaman herba disaring, diambil filtratnya, kemudian residunya direndam kembali dengan pelarut yang sama sampai jumlah pelarutnya habis. Filtrat dari masing - masing pelarut ditampung dan dipekatkan dengan *rotavapor*. Hasil pembuatan ekstrak serta KLT dapat dilihat pada tabel 5.1.

Tabel 5.1 Pembuatan ekstrak sambiloto dengan berbagai kadar pelarut

Pelarut	Volume total (L)	Berat serbuk herba (g)	Berat Ekstrak (g)
Etanol 60%	5	250,5	47,35
Etanol 70%	5	250,7	51,28
Etanol 80%	5	250,2	44,70

5.2. Identifikasi Ekstrak *Sambiloto*

Ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% *A. paniculata*, Nees. diuji secara kualitatif kandungan senyawanya dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

Profil KLT yang digunakan adalah sebagai berikut :

Fase diam : Kiesel Gel 60 GF E Merck

Fase gerak : Kloroform : Metanol = 9 : 1

Pelarut : Masing-masing pelarut ekstrak, yaitu etanol 60%, 70%, dan etanol 80%

Penampak noda : Anisaldehyd - H₂SO₄

5.3 Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji

Bahan uji yang digunakan untuk skrining aktivitas antimalaria adalah ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto. Volume suspensi uji yang diberikan tiap mencit dengan bobot 25 g adalah 250 μ L, dan perhitungan dosis didasarkan pada berat badan mencit tersebut. Bila mencit yang diuji memiliki berat badan yang lebih atau kurang dari berat badan standar, maka dilakukan konversi sesuai dengan ekivalennya. Penyiapan suspensi uji diawali dengan menimbang masing-masing ekstrak sambiloto sejumlah 100 mg yang kemudian ditambahkan DMSO 2% dan CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL.

5.4 Pembuatan Larutan Kontrol

Sebagai larutan kontrol negatif digunakan larutan CMC Na 0,5%. Kontrol negatif ini dibuat dengan menimbang 500 mg CMC Na, ditaburkan sedikit demi sedikit di atas 10 mL aquadest dalam mortir, dibiarkan selama 10 - 15 menit. Kemudian diaduk sampai homogen, ditambah aquadest sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Setelah homogen dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah aquadest sampai tepat 100,0 mL.

Sedangkan untuk larutan kontrol positif digunakan klorokuin difosfat 10 mg/kgBB, yang dibuat dengan cara menimbang klorokuin difosfat sebesar 10 mg kemudian dilarutkan dengan CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL.

5.5. Skrining Aktivitas Antimalaria

Ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto yang didapat masing - masing diuji aktivitas antimalaria secara *in vivo* untuk menentukan ekstrak yang akan digunakan dalam pengujian selanjutnya yaitu terapi kombinasi dengan klorokuin. Hasil pengamatan aktivitas antimalaria dapat diamati pada tabel 5.2., sedangkan perhitungan dapat dilihat pada lampiran 2.

Tabel 5.2 Persen Parasitemia Rata-Rata dari Skrining Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol 60%, 70%, dan 80% Sambiloto dosis 100 mg/kgBB mencit

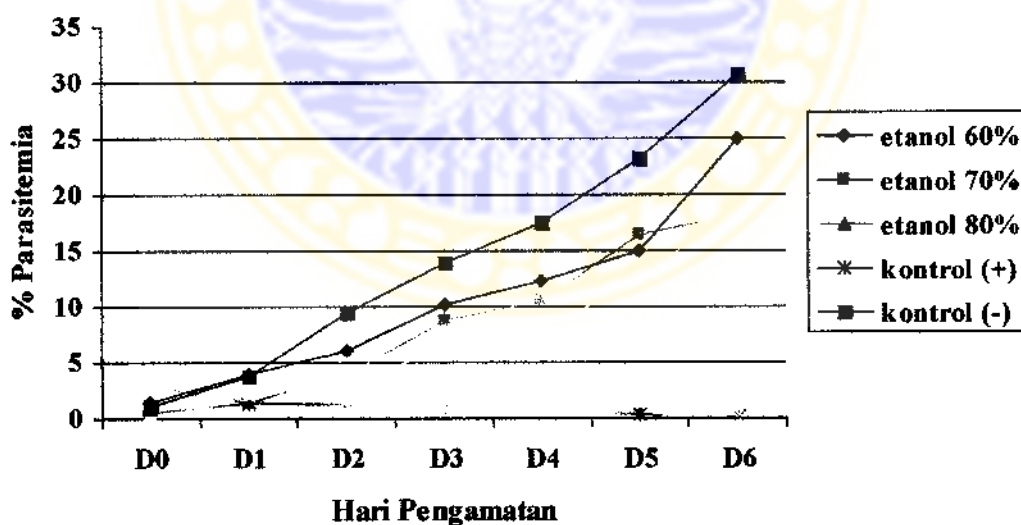
Ekstrak Etanol	% Parasitemia						
	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
60%	1,36	3,85	6,05	10,10	12,37	14,97	24,92
70%	0,51	1,35	3,87	8,72	10,57	16,42	18,20
80%	0,45	2,09	3,78	5,91	7,50	12,85	18,39
K(+)	2,80	1,40	1,20	0,90	0,76	0,40	0,13
K(-)	1,16	3,81	9,51	13,92	17,43	23,23	30,78

Keterangan :

D₀-D₆ : Hari ke-1 sampai hari ke-7 pengamatan

K(+): Kontrol Positif

K(-): Kontrol Negatif



Gambar 5.2 Grafik persen pertumbuhan rata-rata parasit dari ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% Sambiloto dan Kontrol.

Tabel 5.3 Persen Pertumbuhan dan Penghambatan dari Ekstrak Etanol Sambiloto 60%, 70%, dan 80% serta Kontrol

Ekstrak Etanol	% Pertumbuhan				% Penghambatan
	I	II	III	Rata-Rata	
60%	2,99	2,26	3,27	2,84	45,90
70%	1,59	3,22	2,74	2,52	52,00
80%	2,13	1,81	1,55	1,83	65,14
K(+)	0,00	0,00	0,00	0,00	100,00
K(-)	5,68	5,44	4,64	5,25	-

Berdasarkan hasil uji skrining aktivitas antimalaria dari masing-masing ekstrak sambiloto, didapatkan data yaitu ekstrak etanol 80% sambiloto memiliki aktivitas antimalaria yang paling baik dibandingkan dengan ekstrak etanol lain (60% dan 70%). Hal ini dapat dilihat dari nilai prosen penghambatannya yaitu sebesar 65,14% yang lebih besar dibandingkan ekstrak etanol 60% (45,90%) dan 70% (52,00%). Ekstrak etanol 80% sambiloto ini selanjutnya akan digunakan dalam pengujian aktivitas antimalaria, dimana dalam pengujian tersebut akan dilakukan berbagai model terapi kombinasi dengan klorokuin untuk melihat aktivitas antimalaria yang dihasilkan.

5.6. Pembuatan Larutan Uji

Bahan uji yang digunakan adalah ekstrak etanol 80% sambiloto dosis 100 mg/kgBB dan klorokuin difosfat dosis 0,1567 mg/kgBB (setara dengan ED₅₀) dan 10 mg/kgBB (dosis standar). Dengan asumsi bahwa berat badan standar mencit adalah 25 gram dan volume tiap pemberian adalah 250 µL, maka perhitungan dosis didasarkan pada berat badan mencit tersebut. Bila mencit yang diuji memiliki berat badan yang lebih atau kurang dari berat badan standar, maka dilakukan konversi sesuai dengan ekivalennya.

Cara pembuatan larutan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Suspensi uji ekstrak etanol 80% sambiloto dibuat dengan menimbang sejumlah 100 mg ekstrak, ditambahkan DMSO 2% dan disuspensikan dengan larutan CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL.
- Larutan uji dan kontrol positif klorokuin difosfat 0,1567 mg/kgBB dibuat dengan menimbang klorokuin difosfat sebesar 1,567 mg kemudian dilarutkan dengan CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL. Lalu diambil 1,0 mL dari larutan induk tersebut dan dimasukkan dilarutkan dengan CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL.
- Larutan uji dan kontrol positif klorokuin difosfat 10 mg/kgBB dibuat dengan menimbang klorokuin difosfat sebesar 10 mg kemudian dilarutkan dengan CMC Na 0,5% dalam labu ukur sampai tepat 10,0 mL.
- Kontrol negatif dibuat dengan menimbang 500 mg CMC Na, ditaburkan sedikit demi sedikit di atas 10 mL aquadest dalam mortir, dibiarkan selama 10 - 15 menit. Kemudian diaduk sampai homogen, ditambah aquadest sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Setelah homogen dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah aquadest sampai tepat 100,0 mL.

5.7. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria

Hasil uji aktivitas antimalaria dari berbagai model terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dan klorokuin dapat dilihat pada tabel berikut.

Tabel 5.4 Persen Parasitemia dari Berbagai Model Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol secara *in vivo*

Kelompok		Rep	% Parasitemia						
			D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
A	Uji	1	0,59	1,06	1,40	3,34	4,00	2,74	0,79
		2	0,79	1,49	2,77	3,56	5,10	2,87	0,89
		3	0,27	1,85	3,28	4,35	3,16	1,46	1,28
	K(+) A	1	0,37	1,12	2,56	5,17	8,00	12,27	13,26
		2	0,64	2,39	4,14	5,48	7,01	9,77	13,68
		3	0,37	1,63	3,26	6,33	8,03	11,44	17,12
B	Uji	1	0,38	0,92	1,67	2,10	4,69	5,99	7,33
		2	0,20	1,08	2,09	3,94	6,73	8,65	9,98
		3	0,42	0,98	2,13	3,14	5,95	6,08	8,77
	K(+) B	1	0,69	1,50	3,19	7,03	9,32	17,65	19,59
		2	0,59	2,54	4,36	6,98	9,38	14,79	20,21
		3	0,46	2,59	4,54	6,66	9,13	13,46	17,81
C	Uji	1	0,37	1,05	3,24	6,20	2,69	0,63	0,87
		2	0,26	2,22	5,85	9,65	3,07	0,65	1,83
		3	0,27	1,25	1,89	3,45	5,04	2,49	2,88
	(K+) C	1	2,80	1,40	1,20	0,90	0,80	0,40	0,10
		2	3,60	1,50	1,30	1,00	0,80	0,30	0,00
		3	2,00	1,30	1,10	0,80	0,70	0,50	0,30
K (-)	1	0,63	3,46	8,36	13,99	17,72	19,90	26,49	
	2	1,07	4,28	11,48	14,01	17,98	22,96	31,17	
	3	1,77	3,68	8,70	13,76	16,59	26,83	34,68	

Keterangan :

- D₀-D₆** : Hari ke-1 sampai hari ke-7 pengamatan
- A** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dosis 100 mg/kgBB dan klorokuin dosis 0,1567 mg/kgBB (D₀-D₃)
- B** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dosis 100 mg/kgBB dan klorokuin dosis 0,1567 mg/kgBB (D₀ saja)
- C** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dosis 100 mg/kgBB (D₀-D₃) dan klorokuin dosis 10 mg/kgBB (D₃ saja)
- K(+)** **A** : Kontrol positif klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀-D₃)
- K(+)** **B** : Kontrol positif klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀ saja)
- K(+)** **C** : Kontrol positif klorokuin 10 mg/kgBB (D₀-D₃)
- K(-)** : Kontrol negatif

Tabel 5.5 Persen Parasitemia Rata-Rata dari Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol secara *in vivo*

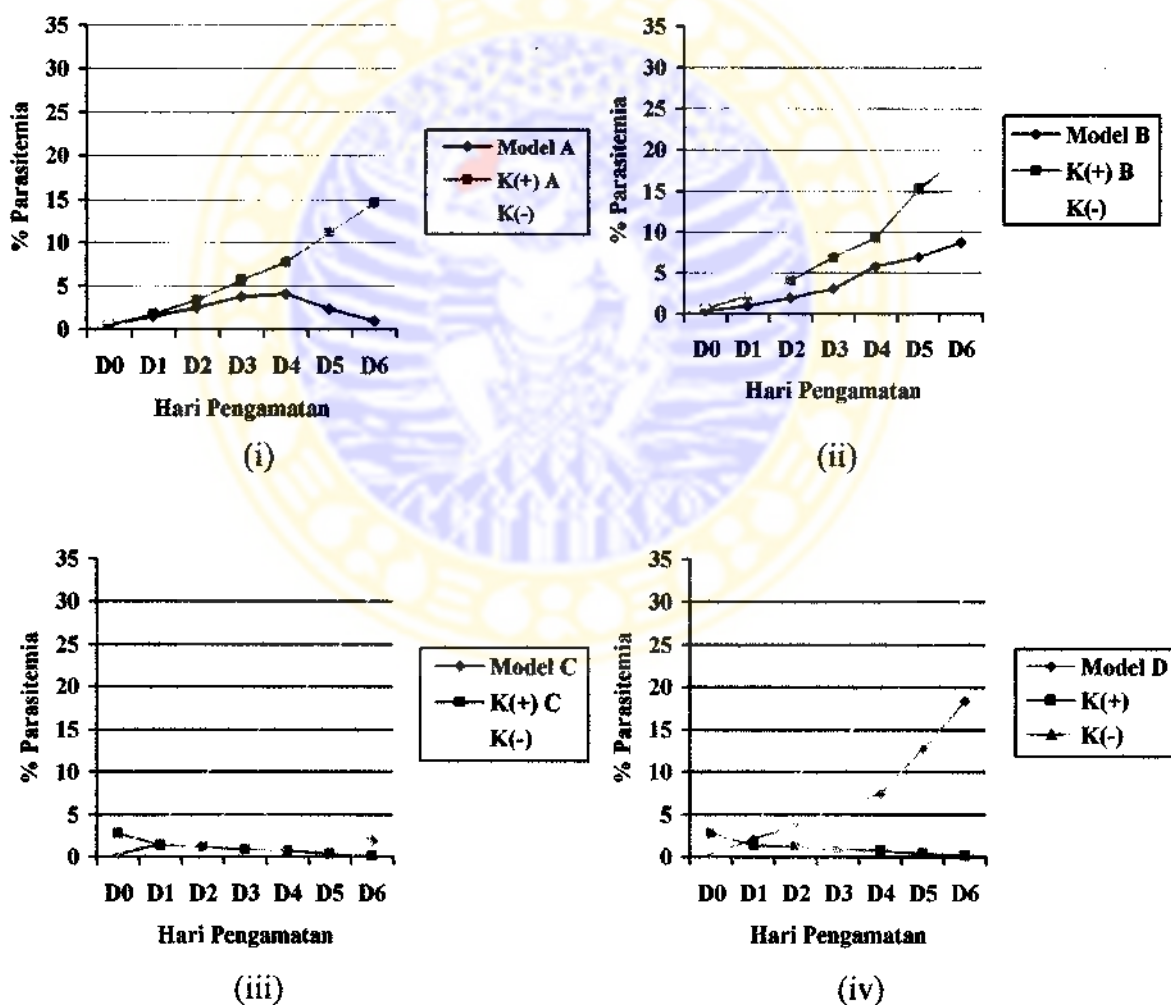
Kelompok		% Parasitemia						
		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
A	Uji	0,55	1,46	2,48	3,75	4,09	2,36	0,99
	K(+) A	0,46	1,71	3,32	5,66	7,68	11,16	14,69
B	Uji	0,33	0,99	1,96	3,06	5,79	6,91	8,69
	K(+) B	0,58	2,21	4,03	6,89	9,28	15,30	19,20
C	Uji	0,30	1,51	3,66	6,43	3,60	3,77	1,86
	K(+) C	2,80	1,40	1,20	0,90	0,76	0,40	0,13
K(-)		1,16	3,81	9,51	13,92	17,43	23,23	30,78

Keterangan :

- D₀-D₆** : Hari ke-1 sampai hari ke-7 pengamatan
- A** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀-D₃)
- B** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀ saja)

- C** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB (D₀-D₃) dan klorokuin 10 mg/kgBB (D₃ saja)
- K(+)** A,B,C : Kontrol positif kelompok uji A,B, dan C
- K(-)** : Kontrol negatif

Dari ketiga model terapi kombinasi tersebut (model A, B, dan C) hasilnya juga akan dibandingkan dengan model D, yaitu terapi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB saja yang diberikan selama 4 hari (D₀-D₃). Data persen parasitemia rata-rata dari model D dapat dilihat pada tabel 5.3. Profil pertumbuhan parasit dari keempat model terapi dapat dilihat pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Grafik Persen Pertumbuhan Rata-Rata Parasit dari Berbagai Model Terapi Kombinasi : (i) Model A; (ii) Model B; (iii) Model C; dan (iv) Model D.

Tabel 5.6. Persen Pertumbuhan dan Persen Penghambatan dari berbagai Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol pada Pengamatan hari ke-5 (D₄)

Kelompok		Rep.	Pertumbuhan		Penghambatan	
			%	Rata-rata	%	Rata-rata
A	Uji	1.	1,08	0,86	76,21	78,85
		2.	1,08		76,21	
		3.	0,72		84,14	
	K(+) A	1.	1,91	1,90	57,93	60,20
		2.	1,59		64,98	
		3.	1,92		57,71	
B	Uji	1.	1,08	1,36	76,21	69,97
		2.	1,63		64,10	
		3.	1,38		69,60	
	K(+) B	1.	2,16	2,18	52,42	52,05
		2.	2,20		51,54	
		3.	2,17		52,20	
C	Uji	1.	0,58	1,14	87,22	78,22
		2.	0,70		94,58	
		3.	2,14		52,86	
	K(+) C	1.	0,00	0,00	100	100
		2.	0,00		100	
		3.	0,00		100	
D		1.	2,13	1,83	59,43	65,14
		2.	1,55		70,48	
		3.	1,81		65,52	
K(-)		1.	5,68	4,54	-	-
		2.	4,22		-	
		3.	3,71		-	

Tabel 5.7. Persen Pertumbuhan dan Persen Penghambatan dari berbagai Model Terapi Kombinasi Ekstrak Etanol 80% Sambiloto + Klorokuin dan Kontrol pada Pengamatan hari ke-7 (D₆)

Kelompok		Rep.	Pertumbuhan		Penghambatan	
			%	Rata-rata	%	Rata-rata
A	Uji	1.	0,56	0,65	87,67	85,61
		2.	0,72		84,14	
		3.	0,68		85,02	
	K(+) A	1.	2,15	2,37	52,64	48,02
		2.	2,17		52,86	
		3.	2,79		38,55	
B	Uji	1.	1,16	1,39	74,45	69,31
		2.	1,63		64,10	
		3.	1,39		69,38	
	K(+) B	1.	3,15	3,10	30,62	31,64
		2.	3,27		27,97	
		3.	2,89		36,34	
C	Uji	1.	0,97	1,20	78,63	73,64
		2.	1,76		61,23	
		3.	0,86		81,06	
	K(+) C	1.	0,00	0,00	100	100
		2.	0,00		100	
		3.	0,00		100	
D		1.	2,13	1,83	59,43	65,14
		2.	1,55		70,48	
		3.	1,81		65,52	
K(-)		1.	5,68	4,54	-	-
		2.	4,22		-	
		3.	3,71		-	

Keterangan :

- D₀-D₆** : Hari ke-1 sampai hari ke-7 pengamatan
- A** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀-D₃)
- B** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀ saja)
- C** : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB (D₀-D₃) dan klorokuin 10 mg/kgBB (D₃ saja)
- D** : Ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB (D₀-D₃)
- K(+)** **A** : Kontrol positif klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀-D₃)
- K(+)** **B** : Kontrol positif klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D₀ saja)
- K(+)** **C** : Kontrol positif klorokuin 10 mg/kgBB (D₀-D₃)
- K(-)** : Kontrol negatif

5.8. Analisis Data

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antimalaria berbagai model terapi kombinasi antara ekstrak etanol 80% Sambiloto (*A. paniculata*, Nees.) dan Klorokuin, dapat dilihat bahwa model terapi kelompok A memiliki aktivitas yang lebih besar apabila dibandingkan dengan terapi kombinasi yang lain. Hal ini dapat diketahui dari nilai % hambatan yang paling besar yaitu 78,85% (pengamatan pada D₄) dan sebesar 85,61% (pengamatan pada D₆)

Sedangkan berdasarkan analisis statistik Anova satu arah (*One Way Anova*) terhadap persen penghambatan pada pengamatan D₄ dengan menggunakan program SPSS 13 menunjukkan bahwa F hitung (1,621) lebih kecil daripada F tabel (4,1) dan harga signifikan lebih besar dari α (0,05). Hal ini berarti tidak ada kelompok uji yang memberikan perbedaan yang bermakna terhadap daya hambat pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

Pada persen penghambatan parasit yang diamati pada D₆, menunjukkan bahwa F hitung (5,266) lebih besar dari F tabel (4,1) dan harga signifikan lebih besar dari α (0,05). Hal ini berarti terdapat minimal satu kelompok uji yang memberikan perbedaan bermakna terhadap daya hambat pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$).

Untuk mengetahui kelompok uji yang memberikan nilai perbedaan yang bermakna, dilakukan uji pasca Anova (*Post Hoc Test*) berupa uji Tukey's HSD. Dari uji Tukey's HSD yang dilakukan dengan menggunakan rumus HSD yang melibatkan nilai q pada $\alpha = 0,05$ dan derajat kebebasan 3 dan 8 menghasilkan data yang tampak pada tabel 5.8.

$$HSD = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{MSE}{n}} \quad \rightarrow \quad HSD = 4,53 \sqrt{\frac{44,444}{3}}$$

$q_{\alpha, k, N-k}$: 4,53
 α : 0,05
 k : 4
 $N-k$: 12-4
 MSE : 44,444
 N : 12
 n : 3

$HSD_{\text{tabel}} = 17,43$

Tabel 5.8. Data HSD dari daya hambat pertumbuhan parasit malaria antar model kombinasi

Rata-rata Daya Hambat Tiap Model	Model A (85,61)	Model B (69,31)	Model C (73,64)	Model D (65,14)
Model A (85,61)	-	16,30	11,97	20,47*
Model B (69,31)	16,30	-	4,33	4,17
Model C (73,64)	11,97	4,33	-	8,50
Model D (65,14)	20,47*	4,17	8,50	-

Tanda (*) menunjukkan adanya perbedaan yang bermakna ($HSD_{\text{hitung}} > HSD_{\text{tabel}}$) pada rentang kepercayaan pada $\alpha = 0,05$

Keterangan :

- Model A : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D_0 - D_3)
- Model B : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D_0 saja)
- Model C : Terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB (D_0 - D_3) dan klorokuin 10 mg/kgBB (D_3 saja)
- Model D : Ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB (D_0 - D_3)

Dari uji Tukey's HSD diketahui bahwa terdapat perbedaan antar model kombinasi dalam memberikan hambatan terhadap pertumbuhan parasit malaria. Dan dari data tersebut diketahui bahwa model A yaitu kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB (D_0 - D_3) memberikan nilai perbedaan yang paling besar.

BAB VI

PEMBAHASAN

Malaria adalah salah satu jenis penyakit yang masih menjadi masalah serius di dunia, termasuk di Indonesia. Dengan resiko penularan penyakit yang tinggi, malaria menjadi sulit diatasi terlebih dengan timbulnya masalah lain yaitu adanya resistensi dari obat standar. Salah satu cara untuk mengatasi masalah resistensi ini adalah dengan penggunaan terapi kombinasi antimalaria seperti yang telah disarankan oleh WHO tahun 2001.

Berbagai penelitian tentang terapi kombinasi telah dilakukan, dan terapi kombinasi ini terbukti memiliki aktivitas antimalaria yang lebih baik dibandingkan dengan monoterapi (White, 1998). Penelitian yang dilakukan oleh Taylor (2001) di Irian Jaya menyebutkan bahwa kombinasi klorokuin dengan Doksisisiklin terbukti secara klinis dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum* sebesar 90,9%; lebih baik dibandingkan dengan terapi klorokuin saja (20%) atau Doksisisiklin saja (64,7%). Hal ini membuktikan bahwa walaupun klorokuin telah mengalami resistensi di beberapa daerah, namun dengan adanya kombinasi dengan obat lain maka efektivitas klorokuin sebagai obat antimalaria dapat meningkat.

Adanya penemuan obat baru, baik yang berasal dari sintetis maupun dari bahan alam, juga menjadi salah satu cara dalam pengatasan penyakit malaria. *Andrographis paniculata*, Nees., atau yang biasa dikenal dengan nama daerah sambiloto, merupakan salah satu tanaman obat yang potensial sebagai antimalaria. Secara empiris, masyarakat telah menggunakan tanaman sambiloto ini dalam pengobatan penyakit malaria. Telah banyak dilakukan penelitian mengenai sambiloto, salah satunya yang telah dilakukan oleh Widyawaruyanti (1995) yang menunjukkan bahwa ekstrak petroleum eter dan kloroform sambiloto memiliki aktivitas antimalaria dengan menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* secara *in vitro*. Kusumawardhani (2005) juga membuktikan bahwa ekstrak etanol sambiloto memiliki aktivitas antimalaria dengan menghambat pertumbuhan *P. berghei* secara *in vivo*. Berdasarkan hal tersebut maka sambiloto (*A. paniculata*, Nees.) berpotensi untuk dikembangkan menjadi alternatif obat antimalaria. Oleh

karena itu pada penelitian kali ini akan dilakukan berbagai model terapi kombinasi antimalaria antara ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin, yang bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria yang dihasilkan dari kombinasi tersebut. Dengan demikian maka kita dapat mengetahui bagaimanakah model terapi kombinasi antimalaria yang dapat memberikan efektivitas paling baik.

Sebelum menentukan ekstrak etanol yang akan digunakan dalam terapi kombinasi, dilakukan skrining aktivitas antimalaria dari ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80%. Penelitian yang dilakukan oleh Dina (2004) menyatakan bahwa isolat andrografolida (kandungan kimia terbesar dari sambiloto) memiliki aktivitas antimalaria secara *in vivo* dengan nilai ED_{50} sebesar 3,6 mg/kgBB. Sedangkan dari penelitian selanjutnya diketahui bahwa ekstrak etanol 96% sambiloto terstandar memiliki aktivitas antimalaria *in vivo* dengan ED_{50} sebesar 12,22 mg/kgBB, yang setara dengan 1,32 mg andrografolida (Kusumawardhani, 2005). Dengan parameter senyawa andrografolida sebagai antimalaria terbukti bahwa ekstrak sambiloto memiliki aktivitas yang lebih baik dibandingkan dengan isolat andrografolida, karena isolat andrografolida yang terkandung di dalam ekstrak sambiloto kadarnya lebih kecil (1,32 mg) dibandingkan dengan dosis isolat andrografolida saja (3,6 mg) yang dibutuhkan untuk memberikan penghambatan parasit malaria sebesar 50%. Hal ini juga menunjukkan bahwa terdapat kandungan senyawa lain di dalam ekstrak yang dapat menunjang aktivitas antimalaria dari sambiloto selain andrografolida. Oleh karena itu pada penelitian kali ini digunakan ekstrak etanol sambiloto dengan berbagai kadar. Dasar dari pemilihan ketiga konsentrasi etanol ini adalah dengan adanya perbedaan pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi, maka akan terdapat perbedaan kandungan senyawa yang terkandung di dalam tiap ekstrak. Dengan demikian diharapkan dapat memberikan perbedaan aktivitas antimalaria. Sedangkan dasar dari perbedaan perbandingan etanol dan air adalah karena umumnya obat-obat antimalaria digunakan oleh masyarakat secara empiris dengan menggunakan air sebagai pelarutnya.

Metode ekstraksi yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak etanol sambiloto adalah maserasi. Bahan yang digunakan adalah serbuk simplisia sambiloto sejumlah 750 gram serta menggunakan etanol 60%, 70%, dan 80%

masing-masing sebanyak 5 liter. Tiap 250 gram serbuk dimaserasi dengan 5 liter etanol, kemudian dipekatkan dengan rotavapor sampai menjadi 1/3 volume semula. Dari proses maserasi ini didapatkan tiga ekstrak kental yaitu ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto sejumlah 47,35 gram; 51,28 gram; dan 44,70 gram. Ketiga ekstrak ini kemudian diuji aktivitas antimalaria terhadap pertumbuhan *P. berghei* secara *in vivo* dengan rute per oral.

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan yang berumur \pm 2 bulan. Dasar pertimbangan pemilihan hewan coba terdiri atas berbagai hal. Hewan coba yang digunakan untuk menguji aktivitas suatu zat sebelum digunakan oleh manusia harus memiliki anatomi, fisiologi, dan metabolisme yang mirip atau mendekati manusia, supaya segala efek yang mungkin dapat muncul akibat dari penggunaan obat tersebut dapat diketahui dengan jelas. Mencit merupakan mamalia terendah yang memiliki anatomi, fisiologi, metabolisme, karakteristik kesensitifan dan keresistensi pada senyawa obat yang mendekati manusia. Selain itu, usia hidup mencit relatif singkat sehingga pengamatan uji aktivitas dapat dilakukan dengan mudah sampai kematian dari mencit akibat zat uji. Aspek ekonomi seperti kemudahan pemeliharaan dan harga perolehan juga menjadi salah satu pertimbangan akhir dalam pemilihan mencit sebagai hewan coba. Adapun alasan penggunaan mencit jantan adalah untuk menghindarkan pengaruh hormonal yang dapat mempengaruhi hasil uji. Umur mencit yang digunakan adalah \pm 2 bulan karena pada umur tersebut fungsi organ tubuhnya sudah sempurna sehingga dapat berfungsi dengan normal dan dapat memberikan respon yang baik.

Jenis parasit yang digunakan adalah *Plasmodium berghei*, yaitu jenis parasit yang memiliki paling banyak kemiripan dengan parasit *P. falciparum* yang menginfeksi manusia. Selain itu, *P. berghei* spesifik menginfeksi rodensia dan tidak menginfeksi manusia, serta memiliki kemampuan menginfeksi yang lebih cepat dan lebih ganas bila dibandingkan dengan spesies lain yang menyerang hewan coba, sehingga pengaruh obat terhadap pertumbuhan *P. berghei* lebih mudah teramati.

Skrining aktivitas antimalaria dari ekstrak etanol sambiloto dilakukan dengan pemberian suspensi uji selama 4 hari *single dose*. Pengujian selama 4 hari

merupakan standar pengujian obat antimalaria berdasarkan Tes Peter (*The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*) (Phillipson, 1991) dan juga sesuai dengan ketentuan WHO yang menyebutkan bahwa obat antimalaria diinginkan memiliki efektifitas yang tinggi, pemberiannya relatif singkat dan aman untuk digunakan.

Ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto masing-masing diberikan secara per oral pada mencit mulai hari ke-1 (D_0) sampai hari ke-4 (D_3) dengan dosis 100 mg/kgBB. Penggunaan dosis ini berdasarkan dosis tertinggi yang digunakan pada Tes Peter, dimana untuk pengujian aktivitas antimalaria ekstrak digunakan dosis sebesar 1-100 mg/kgBB. Untuk kontrol negatif digunakan larutan CMC Na 0,5% dan kontrol positif digunakan klorokuin difosfat 10 mg/kgBB. Kontrol negatif bertujuan untuk meningkatkan validitas internal dan digunakan sebagai komponen penyebut dalam perhitungan prosen penghambatan parasit dari ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto. Sedangkan kontrol positif digunakan sebagai pembanding besarnya daya hambat ekstrak etanol 60%, 70%, dan 80% sambiloto terhadap pertumbuhan *P. berghei* pada mencit. Pengamatan parasit dilanjutkan hingga hari ke-7 (D_6) untuk melihat profil pertumbuhan parasit setelah pemberian suspensi uji dihentikan.

Dari hasil skrining ekstrak didapatkan hasil yaitu ekstrak etanol 80% sambiloto memiliki aktivitas antimalaria yang paling baik dibandingkan dengan ekstrak etanol 60% dan 70%. Hal ini berdasarkan nilai % penghambatan parasit ekstrak etanol 80% yang paling besar yaitu sebesar 65,14% (hasil dapat dilihat pada tabel 5.3). Berdasarkan hasil tersebut, ekstrak etanol 80% sambiloto akan digunakan selanjutnya dalam berbagai model terapi kombinasi dengan klorokuin. Ada dua dosis klorokuin yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu 0,1567 mg/kgBB (ED_{50} klorokuin) dan 10 mg/kgBB (dosis standar klorokuin). Penggunaan dosis klorokuin 0,1567 mg/kgBB ini dimaksudkan untuk mengetahui aktivitas antimalaria yang dihasilkan oleh klorokuin (dengan dosis yang hanya menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50%) apabila dikombinasi dengan ekstrak sambiloto. Diharapkan dengan adanya pengurangan dosis klorokuin yang digunakan maka dapat mengurangi tingkat resistensi dari klorokuin.

Terapi kombinasi yang akan diujikan dalam penelitian ini terdiri dari berbagai model, yaitu model A (kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB pada D₀-D₃); model B (kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB pada D₀ saja); dan model C (kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB pada D₀-D₃ dan klorokuin 10 mg/kgBB pada D₃ saja). Kemudian ketiga model tersebut hasilnya juga akan dibandingkan dengan model D (ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB saja pada D₀-D₃). Penggunaan dosis ekstrak etanol 80% sambiloto sebesar 100 mg/kgBB ini didasarkan pada pengujian aktivitas antimalaria sebelumnya, dan terbukti memiliki aktivitas antimalaria yang cukup baik walaupun belum memenuhi standar pengobatan yang baik yaitu penghambatan parasit lebih dari 80%. Namun dengan adanya terapi kombinasi dengan klorokuin diharapkan aktivitas antimalaria yang dihasilkan juga akan meningkat.

Dari hasil analisis persen penghambatan parasit berbagai model kombinasi dengan analisis Anova pada hari ke-4 (D₅), diperoleh hasil yaitu F hitung (1,621) lebih kecil daripada F tabel (4,1) dan harga signifikan lebih besar dari α (0,05). Hal ini berarti tidak ada model terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto (*A. paniculata*, Nees.) dan klorokuin yang memberikan perbedaan bermakna terhadap persen penghambatan parasit dengan tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$). Dari hasil pengamatan % penghambatan parasit, didapatkan data bahwa model A memberikan aktivitas antimalaria yang paling besar bila dibandingkan dengan model yang lain yaitu 78,85% (tabel 5.6). Namun hasil pada model A ini juga memiliki nilai yang hampir sama dengan % penghambatan yang diberikan oleh model C yaitu 78,22%. Hasil ini membuktikan bahwa penggunaan klorokuin dengan dosis 0,15667 mg/kgBB bersamaan dengan ekstrak sambiloto selama 4 hari dapat memberikan efek yang setara dengan pemberian kombinasi ekstrak sambiloto selama 4 hari dan klorokuin dosis 10 mg/kgBB yang hanya diberikan pada hari ke-4 (D₃) saja.

Sedangkan berdasarkan analisis Anova pada pengamatan hari ke-7 (D₆) diperoleh hasil yaitu F hitung (5,266) lebih besar dari F tabel (4,1) dan harga signifikan lebih besar dari α (0,05). Hal ini berarti terdapat minimal satu model

kombinasi yang memberikan perbedaan bermakna terhadap daya hambat pertumbuhan parasit malaria pada tingkat kepercayaan 0,95 ($\alpha = 0,05$). Kemudian analisis dilanjutkan dengan menggunakan uji pasca Anova (*Post Hoc Test*) yaitu Tukey's HSD untuk mengetahui kelompok uji yang memberikan perbedaan paling besar. Hasil uji HSD (tabel 5.8) menunjukkan bahwa antar model kombinasi memberikan perbedaan persen penghambatan parasit yang bermakna, dan diantara 4 model kombinasi tersebut dapat dilihat bahwa model A memberikan perbedaan penghambatan parasit yang paling besar. Dengan demikian model terapi kombinasi yang memiliki aktivitas antimalaria paling efektif adalah model A yaitu kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB selama 4 hari (D₀-D₃).

Keberhasilan terapi malaria tidak hanya dapat dilihat dari nilai persen penghambatan parasit saja, namun juga dapat dilihat dari profil pertumbuhan parasit selama pengamatan seperti pada gambar 5.3. Dilihat dari profil pertumbuhan parasit, pada model A terjadi peningkatan parasit pada D₀-D₃ sedikit demi sedikit namun mengalami penurunan terus sampai D₆ setelah pemberian obat dihentikan (Persen parasitemia = 0,99%). Sedangkan pada model C penurunan parasit yang cukup tajam terjadi setelah pemberian klorokuin dosis 10 mg/kgBB, dan terus turun sampai D₆ (Persen parasitemia = 1,86%). Walaupun di akhir pengamatan besar % parasitemia kedua model perbedaannya tidak terlalu jauh, namun hasil ini menunjukkan bahwa ekstrak sambiloto memiliki potensi penghambatan parasit yang baik. Penggunaan dosis klorokuin yang berbeda disini juga menjadi suatu poin penting. Pada model A, dosis klorokuin yang digunakan hampir 1/100 kali dosis yang digunakan pada model C (0,1567 mg/kgBB dari 10 mg/kgBB), namun dapat memberikan aktivitas yang setara. Pada model C ditunjukkan bahwa dengan penggunaan dosis klorokuin yang tinggi penghambatan parasit yang dihasilkan tidak dapat mencapai 100%. Hal ini menunjukkan bahwa dibutuhkan adanya suatu akumulasi kadar klorokuin dalam darah untuk memberikan efek terapi. Hal inilah yang dapat memicu terjadinya resistensi klorokuin yang juga ditunjang dengan $t_{1/2}$ klorokuin yang panjang yaitu 127 jam serta penggunaan obat dalam jangka waktu lama. Dengan penggunaan dosis klorokuin yang kecil namun dengan terapi kombinasi dapat memberikan

aktivitas yang setara, diharapkan dapat mengurangi resiko resistensi dari klorokuin.

Pada model B dapat dilihat bahwa dengan pemberian terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB pada D_0 saja dapat memberikan hambatan pertumbuhan parasit sebesar 69,31% (tabel 5.7). Dibandingkan dengan model A yang kombinasinya diberikan selama 4 hari, model B dapat memberikan gambaran tentang kemampuan terapi kombinasi untuk menghambat pertumbuhan parasit yang cukup tinggi. Sedangkan untuk % parasitemia model B yang terus meningkat namun cukup landai (gambar 5.3), hal ini membuktikan bahwa dengan pemberian terapi kombinasi 1 hari saja, sudah dapat memberikan aktivitas antimalaria yang cukup baik bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Peningkatan parasitemia ini juga mungkin disebabkan karena $t_{1/2}$ klorokuin yang panjang yaitu 127 jam dan adanya efek kombinasi dengan ekstrak etanol 80% sambiloto. Hal ini dapat dilihat dari kontrol positif model B [K(+) B] yaitu klorokuin 0,1567 mg/kgBB pada D_0 saja yang hanya memberikan hambatan sebesar 31,64%. Dari perbandingan dengan kontrol positif dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol 80% sambiloto dapat memberikan efek sinergis dan aditif pada kombinasi dengan klorokuin. Hal ini dapat dilihat dari aktivitas antimalaria yang dihasilkan pada terapi kombinasi. Pada kontrol positif model A [K(+) A] (klorokuin 0,1567 mg/kgBB selama 4 hari) dapat menghambat pertumbuhan parasit sebesar 48,02%, dan pada model D (ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB) dapat menghambat pertumbuhan parasit sebesar 65,14%. Dengan adanya kombinasi yaitu seperti yang digambarkan oleh model A, penghambatan parasitnya meningkat menjadi sebesar 85,61%.

Pemberian ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB selama 4 hari dapat memberikan hambatan pertumbuhan parasit sebesar 65,14% (model D). Namun setelah obat berhenti diberikan, terjadi peningkatan jumlah parasit pada D_3 dan D_6 (tabel 5.2). Hal ini mungkin terjadi karena $t_{1/2}$ ekstrak etanol 80% sambiloto yang pendek sehingga setelah pemberian obat dihentikan % parasitemia mengalami peningkatan yang cukup tajam. Apabila dibandingkan dengan model A, sejak awal profil pertumbuhan parasitnya tidak terlalu tinggi (gambar 5.3) dan dengan adanya kombinasi dengan klorokuin 0,1567 mg/kgBB dapat memberikan

penghambatan parasit sebesar 85,61%. Hal ini juga membuktikan bahwa terapi kombinasi dapat memberikan aktivitas antimalaria yang lebih baik dibandingkan dengan monoterapi.

Setelah pengamatan dihentikan pada hari ke-7 (D_6), terdapat perbedaan dari kemampuan mencit untuk bertahan hidup untuk tiap model. Untuk model A, mencit rata-rata mati pada D_9 - D_{11} , hal ini mungkin disebabkan parasit masih tersisa dalam darah (dilihat pada pengamatan pada D_6 , tabel 5.5) sehingga parasit yang masih hidup tersebut dapat melakukan pembelahan lagi dan meningkatkan parasitemia. Sedangkan untuk mencit model B rata-rata mati pada D_7 - D_8 , karena obat hanya diberikan 1 hari di awal perlakuan (D_0) sehingga kadar obat dalam darah sudah habis dan tidak dapat menghambat pertumbuhan parasit lagi.

Pada model C, mencit uji rata-rata mati pada D_{10} - D_{12} . Dengan adanya pemberian klorokuin 10 mg/kgBB pada D_3 , memang dapat menghambat pertumbuhan parasit pada pengamatan D_4 - D_6 namun tidak dapat memberikan menghambat pertumbuhan parasit sampai 100%, sehingga parasit dapat berkembang biak lagi. Model terakhir adalah model D, yaitu monoterapi ekstrak etanol 80% sambiloto. Mencit uji rata-rata mati pada D_8 - D_9 , hal ini mungkin dikarenakan $t_{1/2}$ dari ekstrak etanol 80% sambiloto yang lebih pendek sehingga tidak dapat mempertahankan kadar ekstrak dalam darah untuk mencegah pertumbuhan parasit.

Dari pengujian berbagai model terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dan klorokuin, dapat dilihat bahwa setiap model memiliki profil pertumbuhan parasit yang berbeda. Dilihat dari prosen penghambatan parasit yang dihasilkan, model A dan model C memberikan aktivitas antimalaria yang setara. Namun jika dilihat profil pertumbuhan parasit sampai hari akhir pengamatan (D_6), model A memberikan potensi keberhasilan terapi yang paling besar dibandingkan dengan model lain. Hal ini disebabkan oleh kemampuan terapi kombinasi ini untuk memberikan hambatan pertumbuhan parasit yang baik (penurunan parasitemia) dan juga memiliki resiko resistensi yang lebih kecil karena penggunaan dosis klorokuin di bawah standar yaitu sebesar 0,1567 mg/kgBB. Namun dari berbagai model kombinasi tersebut belum ada yang dapat memberikan penghambatan parasit hingga 100%. Karena itu perlu dilakukan

penelitian lebih lanjut terhadap kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin yang diberikan dengan model kombinasi yang berbeda. Selain itu, perlu juga dilakukan pengembangan terhadap model terapi kombinasi ekstrak sambiloto dengan obat standar lain, untuk dapat mengetahui aktivitas antimalaria yang dihasilkan sehingga dapat berpotensi menjadi alternatif terapi malaria.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan profil pertumbuhan parasit yang ditunjukkan berbagai model terapi kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto dan klorokuin terhadap mencit terinfeksi parasit malaria, dapat diambil kesimpulan bahwa model yang dapat memberikan potensi keberhasilan terapi paling besar adalah model A, yaitu kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kgBB dan klorokuin 0,1567 mg/kgBB.

7.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap kombinasi ekstrak etanol sambiloto dan klorokuin yang diberikan dengan model kombinasi yang berbeda.
2. Perlu dilakukan pengembangan terhadap model terapi kombinasi ekstrak sambiloto dengan obat standar yang lain untuk dapat mengetahui aktivitas antimalaria yang dihasilkan, sehingga dapat berpotensi menjadi alternatif terapi malaria.

DAFTAR PUSTAKA

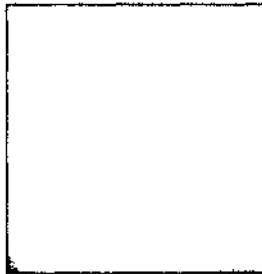
- Adlan, M., 1997, Standarisasi Ekstrak Etanol Herba Sambiloto dengan Parameter Kadar Andrografolida secara Densitometri, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Antimalarial Drug Combination Therapy, Report of WHO Technical Consultation. WHO, Geneva; 2001. p. 6-23
- Bray P.G., Deed E., Fox E., Kalkanidis M., Mungthin M., Deady L.W., Tilley L., 2005. Primaquine synergises the activity of chloroquine against chloroquine-resistant *P. falciparum*. **Biochem Pharmacol** 70, p. 1158-1166.
- Brown, H.W., 1979, **Dasar Parasitologi Klinis** (terjemahan Rukmono, B., dkk), Penerbit PT. Gramedia, Jakarta, Hal. 120-143.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2006. **Malaria Facts**. <http://www.cdc.gov/malaria/facts.htm>. Last Updated May 4th, 2004.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1995. **Farmakope Indonesia**. Jilid IV. Jakarta.
- Dina, S., 2004. Uji Antimalaria In Vivo Isolat Andrografolida dari *Andrographis paniculata* Nees. Terhadap *Plasmodium berghei* pada mencit, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari, W., 1998. **Penetapan Kadar Andrografolida Dalam Simplisia herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees.) dan Produk Obat Tradisionalnya untuk Data Standarisasi**, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Fidock D.A., Rosenthal P.J., Croft S.L., Brun R., Nwaka S., 2004. Antimalarial Drug Discovery : Efficacy Models for Compound Screening. **Nature Reviews** vol 3, p. 509-519
- Gandahusada S., 1998. **Parasitologi Kedokteran**. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal 178-202
- Ganiswara, 1995. **Farmakologi dan Terapi**, Ed. IV. Bagian Farmakologi FKUI, Jakarta.

- Ginting Y., Tarigan M.B., Zein U., Pandjaitan B., 2001. The Comparison of Resistance of Chloroquine and Pyrimethamine-Sulfadoxin in Uncomplicated Malaria falciparum in Siabu District, Mandailing Natal Regency Sumatera Utara Province, **Kongres Bersama PETRI**, Yogyakarta.
- Gritter R.J. et al., (diterjemahkan Kosasih P.), 1991, **Pengantar Kromatografi**, Ed. II, Penerbit ITB. Bandung.
- Heyne K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia**. Jilid III, Diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Departemen Kehutanan, Jakarta
- Ishih A., Suzuki T., Hasegawa T., Kachi S., Wang H.H., Terada M., 2004. In vivo Evaluation of Combination Effects of Chloroquine with Cepharantin® or Minocycline Hydrochloride Against Blood-Induced Chloroquine-Resistant *Plasmodium berghei* NK 65 Infections. **Tropical Medicine and Health Vol. 32 No. 1**, p. 15-19
- Knell, A.J., 1991. **Malaria**, A Publication Of The Tropical Programme Of The Wellcome Trust. Oxford University Press
- Kusumawardhani, D., 2005. Uji Antimalaria In Vivo Ekstrak Sambiloto Terstandar (Parameter Kadar Andrografolida) Pada Mencit, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Matsuda, T., et al., 1994. Cell Differentiation Inducing Diterpens from *Andrographis paniculata* Nees., **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 42(6) p. 1216-1225.
- Mursito, B. 2002. **Ramuan Tradisional Untuk Penyakit Malaria**. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Mulja, H.M., dan Suharman, 1995. **Analisis Instrumental**. Surabaya : Airlangga University Press, Hal : 223-232.
- Siswandono, Bambang Soekardjo. 1995. **Kimia Medisinal II**. Surabaya : Airlangga University Press, Hal : 84-85.
- Skoog A.D., 1981. **Principle of Instrumental Analysis**, Japan : Holt Sounder International.
- Staedke S.G., Kanya M.R., Dorsey G., Gassasina A., Ndeezi G., Chalebois E.D., 2001. Amodiaquine, Sulfadoxine/Pyrimethamine, and Combination

- Therapy for Treatment of Uncomplicated Malaria Falciparum in Kampala, Uganda : A Randomized Trial. **Lancet** vol **358**, p 368-374.
- Stahl E., 1985. **Analisis Obat Secara Kromatografi dan Mikroskopik**, Bandung, Penerbit ITB, Hal. 3-31.
- Suyanto, 1995. Uji Aktivitas Antimalaria secara In Vitro Isolat *Andrographis paniculata* Nees., **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Taylor W.R.J., dkk. 2001. Chloroquine/Doxycycline Combination versus Chloroquine Alone and Doxycycline Alone for the Treatment of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* Malaria in Northeastern Irian Jaya, Indonesia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **64** (5,6), p. 223-228
- Leiden University Medical Center (LUMC), 2006. **The *Plasmodium berghei* Research Model of Malaria**. <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model.html>. Last Updated : April 3rd 2006
- Philipson J. D., 1991. Assays for Antimalarial and Amoebicidal Activities. In : Day P. M, and Harborne J. B (Ed.), **Methods in plant Biochemistry**. Vol 6. Academic Press London, hal 135-152
- Rahman ANNN, Furuta T., Kojima S., 1999. Antimalarial Activity of Malaysian Medical Plants. **Journal of Ethnopharmacology** **64**, p. 249-254.
- White N.J., 1998. Delaying Antimalarial Drug Resistance with Combination Chemotherapy. **Parasitologia** vol **41**, p. 301-308
- Widyawaruyanti, A., dkk, 1995. **Uji Antimalaria Ekstrak Herba Sambiloto Terhadap *Plasmodium falciparum* secara In Vitro**, Laporan Penelitian DIP OPF Unair 1994-1995, Lembaga Penelitian Unair.
- Widyawaruyanti, A., dkk, 2001. **Uji Aktivitas Antimalaria dari Senyawa Diterpena Lakton Hasil Isolasi *Andrographis paniculata* Nees.**, Laporan Penelitian Project Grand-QUE Project Tahun 2000, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Zein, U. et al., 2004. **Antimalaria Effect of Chloroquin – Sambiloto (*Andrographis paniculata*, Nees) Combination prepared with Chloroquine Alone in Adult Patients of Uncomplicated Malaria**

Falciparum. Division of Tropical Diseases and Infections, Universitas Sumatera Utara.

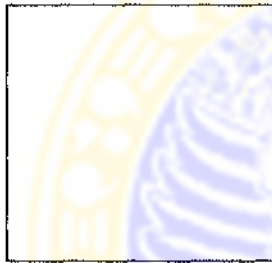
Lampiran 1
Morfologi *Plasmodium berghei*



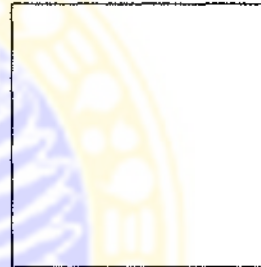
Ring Form



Skizon



Tropozoit



Multiple Infected Erythrocyte



Gametosit

Sumber : <http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model01.html>

Lampiran 2

Perhitungan % Parasitemia

Untuk menghitung prosen parasitemia digunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Parasitemia} = \frac{\sum \text{eritrosit yang terinfeksi}}{\sum \text{eritrosit total}} \times 100 \%$$

Contoh perhitungan prosen parasitemia :

1. Jumlah eritrosit yang terinfeksi dalam 5073 eritrosit adalah 612

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{612}{5073} \times 100\% = 12,06 \%$$

2. Jumlah eritrosit yang terinfeksi dalam 5029 eritrosit adalah 184

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{184}{5029} \times 100\% = 3,66 \%$$

Lampiran 3

Perhitungan % Parasitemia Rata-Rata

a. Contoh 1

Model A, hari ke-1, % parasitemia replikasi 1 = 0,59

replikasi 2 = 0,70

replikasi 3 = 0,27

$$\% \text{ parasitemia rata-rata} = \frac{0,59 + 0,70 + 0,27}{3} = 0,55$$

b. Contoh 2

Model A, hari ke-2, % parasitemia replikasi 1 = 1,06

replikasi 2 = 1,49

replikasi 3 = 1,85

$$\% \text{ parasitemia rata-rata} = \frac{1,06 + 1,49 + 1,85}{3} = 1,46$$

Lampiran 4

Perhitungan % Penghambatan Parasit

Untuk menghitung prosen pertumbuhan parasit digunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \frac{P(d_1 - d_0) + P(d_2 - d_1) + P(d_3 - d_2) + P(d_4 - d_3)}{\text{Jumlah hari} - 1}$$

Keterangan :

$P(D_x - D_{x-1})$ = % parasitemia hari ke-x dikurangi % parasitemia hari sebelumnya.

Apabila terjadi penurunan prosen parasitemia antara satu hari dan hari sesudahnya, maka pertumbuhan dianggap nol (0).

Contoh perhitungan :

Data % parasitemia model B hari ke-1 sampai ke-5 adalah :

Replikasi 1 : 0,38 ; 0,92 ; 1,67 ; 2,10 ; 4,69

Replikasi 2 : 0,20 ; 1,08 ; 2,09 ; 3,94 ; 6,73

Replikasi 3 : 0,42 ; 0,98 ; 2,13 ; 3,14 ; 5,95

$$\begin{aligned} \% \text{ pertumbuhan replikasi 1} &= \frac{(0,92-0,38) + (1,67-0,92) + (2,10-1,67) + (4,69-2,10)}{(5-1)} \\ &= \frac{0,54 + 0,75 + 0,43 + 2,59}{4} = 1,08 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ pertumbuhan replikasi 2} &= \frac{(1,08-0,20) + (2,09-1,08) + (3,94-2,09) + (6,73-3,94)}{(5-1)} \\ &= \frac{0,80 + 1,01 + 1,85 + 2,79}{4} = 1,63 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ pertumbuhan replikasi 3} &= \frac{(0,98-0,42) + (2,13-0,98) + (3,14-2,13) + (5,95-3,14)}{(5-1)} \\ &= \frac{0,56 + 1,15 + 1,01 + 2,81}{4} = 1,38 \end{aligned}$$

$$\% \text{ pertumbuhan parasitemia rata-rata} = \frac{1,08 + 1,63 + 1,38}{3} = 1,90$$

Lampiran 5

Perhitungan % Penghambatan Parasit

Untuk menghitung prosen penghambatan pertumbuhan *P. berghei* digunakan rumus sebagai berikut :

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \left\{ \frac{X_e}{X_k} \times 100 \% \right\}$$

Keterangan :

X_e : prosen pertumbuhan parasit rata-rata pada tiap dosis bahan uji

X_k : prosen pertumbuhan parasit rata-rata pada kontrol negatif

Contoh :

% pertumbuhan parasit rata-rata pada bahan uji = 1,14

% pertumbuhan parasit rata-rata pada kontrol negatif = 4,54

$$\% \text{ Penghambatan} = 100 \% - \left\{ \frac{1,14}{4,54} \times 100 \% \right\} = 78,22 \%$$

Lampiran 6

Pembuatan Medium Alceiver

Misalnya dibuat 100 ml larutan, maka komposisinya adalah

- | | |
|----------------------|-----------|
| 1. Gliserin | 9,5 ml |
| 2. Dextrose | 2,33 gram |
| 3. NaCl | 0,52 gram |
| 4. Tri Sodium Sitrat | 1,00 gram |
| 5. Aqua bidestilata | ad 100 ml |



Lampiran 7
Hasil Statistik dengan *One Way Anova*

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Min	Max
					Lower Bound	Upper Bound		
A	3	78.8533	4.57839	2.64333	67.4800	90.2267	76.21	84.14
B	3	69.9700	6.06347	3.50075	54.9075	85.0325	64.10	76.21
C	3	78.2200	22.26858	12.85677	22.9018	133.5382	52.86	94.58
D	3	59.6900	6.40135	3.69582	43.7882	75.5918	53.08	65.86
Total	12	71.6833	13.18376	3.80582	63.3068	80.0599	52.86	94.58

Test of Homogeneity of Variances

% penghambatan

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
5.417	3	8	.025

ANOVA

% penghambatan

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	722.737	3	240.912	1.621	.260
Within Groups	1189.188	8	148.649		
Total	1911.926	11			

Post Hoc Tests**Multiple Comparisons**

Dependent Variable: % hambatan

Tukey HSD

(I) model	(J) model	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A	B	16.30000	5.44327	.067	-1.1313	33.7313
	C	11.97000	5.44327	.203	-5.4613	29.4013
	D	20.46667(*)	5.44327	.023	3.0354	37.8979
B	A	-16.30000	5.44327	.067	-33.7313	1.1313
	C	-4.33000	5.44327	.855	-21.7613	13.1013
	D	4.16667	5.44327	.868	-13.2646	21.5979
C	A	-11.97000	5.44327	.203	-29.4013	5.4613
	B	4.33000	5.44327	.855	-13.1013	21.7613
	D	8.49667	5.44327	.449	-8.9346	25.9279
D	A	-20.46667(*)	5.44327	.023	-37.8979	-3.0354
	B	-4.16667	5.44327	.868	-21.5979	13.2646
	C	-8.49667	5.44327	.449	-25.9279	8.9346

* The mean difference is significant at the .05 level.

Homogeneous Subsets

% hambatan

Tukey HSD

model	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
D	3	65.1433	
B	3	69.3100	69.3100
C	3	73.6400	73.6400
A	3		85.6100
Sig.		.449	.067

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

Lampiran 8
Perhitungan HSD

$$HSD = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{MSE}{n}}$$

Keterangan :

- $q_{\alpha, k, N - k}$: harga q tabel pada (k, N – k)
- α : derajat kepercayaan
- k : banyaknya kelompok
- N – k : derajat bebas *within groups* (denominator)
- MSE : MSE pada uji anova CRD
- N : pengamatan dalam tiap kelompok
- n : jumlah replikasi tiap kelompok

$$HSD = 4,53 \sqrt{\frac{44,444}{3}}$$

- $q_{\alpha, k, N - k}$: 4,53
- α : 0,05
- k : 4
- N – k : 12-4
- MSE : 44,444
- N : 12
- n : 3

HSD = 17,43

Lampiran 9
Daftar Distribusi F

 $\alpha = 0.05$

df2	df1									
	1	2	3	4	5	6	8	12	24	4
1	161.4	199.5	215.7	224.6	230.2	234.0	238.9	243.9	249.0	254.3
2	18.5	19.0	19.2	19.3	19.3	19.3	19.4	19.4	19.5	19.5
3	10.1	9.6	9.3	9.1	9.0	8.9	8.8	8.7	8.6	8.5
4	7.7	6.9	6.6	6.4	6.3	6.2	6.0	5.9	5.8	5.6
5	6.6	5.8	5.4	5.2	5.1	5.0	4.8	4.7	4.5	4.4
6	6.0	5.1	4.8	4.5	4.4	4.3	4.2	4.0	3.8	3.7
7	5.6	4.7	4.4	4.1	4.0	3.9	3.7	3.6	3.4	3.2
8	5.3	4.5	4.1	3.8	3.7	3.6	3.4	3.3	3.1	2.9
9	5.1	4.3	3.9	3.6	3.5	3.4	3.2	3.1	2.9	2.7
10	5.0	4.1	3.7	3.5	3.3	3.2	3.1	2.9	2.7	2.5
11	4.8	4.0	3.6	3.4	3.2	3.1	3.0	2.8	2.6	2.4
12	4.8	3.9	3.5	3.3	3.1	3.0	2.9	2.7	2.5	2.3
13	4.7	3.8	3.4	3.2	3.0	2.9	2.8	2.6	2.4	2.2
14	4.6	3.7	3.3	3.1	3.0	2.9	2.7	2.5	2.4	2.1
15	4.5	3.7	3.3	3.1	2.9	2.8	2.6	2.5	2.3	2.1
16	4.5	3.6	3.3	3.0	2.9	2.7	2.6	2.4	2.2	2.0
17	4.5	3.6	3.2	3.0	2.8	2.7	2.6	2.4	2.2	2.0
18	4.4	3.6	3.2	2.9	2.8	2.7	2.5	2.3	2.2	1.9
19	4.4	3.5	3.1	2.9	2.7	2.6	2.5	2.3	2.1	1.9
20	4.4	3.5	3.1	2.9	2.7	2.6	2.5	2.3	2.1	1.8
21	4.3	3.5	3.1	2.8	2.7	2.6	2.4	2.3	2.1	1.8
22	4.3	3.4	3.1	2.8	2.7	2.6	2.4	2.2	2.0	1.8
23	4.3	3.4	3.0	2.8	2.6	2.5	2.4	2.2	2.0	1.8
24	4.3	3.4	3.0	2.8	2.6	2.5	2.4	2.2	2.0	1.7
25	4.2	3.4	3.0	2.8	2.6	2.5	2.3	2.2	2.0	1.7
26	4.2	3.4	3.0	2.7	2.6	2.5	2.3	2.2	2.0	1.7
27	4.2	3.4	3.0	2.7	2.6	2.5	2.3	2.1	1.9	1.7
28	4.2	3.3	3.0	2.7	2.6	2.4	2.3	2.1	1.9	1.7
29	4.2	3.3	2.9	2.7	2.5	2.4	2.3	2.1	1.9	1.6
30	4.2	3.3	2.9	2.7	2.5	2.4	2.3	2.1	1.9	1.6
40	4.1	3.2	2.8	2.6	2.5	2.3	2.2	2.0	1.8	1.5
60	4.0	3.2	2.8	2.5	2.4	2.3	2.1	1.9	1.7	1.4
120	3.9	3.1	2.7	2.5	2.3	2.2	2.0	1.8	1.6	1.3
4	3.8	3.0	2.6	2.4	2.2	2.1	1.9	1.8	1.5	1.0

Lampiran 10

Daftar Nilai q

TABLE D.12 (cont.) Critical Values of the q Distribution
 $\alpha = 0.05$

v	$p = 2$	3	4	5	6	7	8	9	10
1	17.97	26.98	32.82	37.08	40.41	43.12	45.40	47.36	49.07
2	6.085	8.331	9.798	10.88	11.74	12.44	13.03	13.54	13.99
3	4.301	5.910	6.825	7.502	8.037	8.478	8.853	9.177	9.462
4	3.927	5.040	5.757	6.287	6.707	7.053	7.347	7.602	7.826
5	3.635	4.602	5.218	5.673	6.033	6.330	6.582	6.802	6.995
6	3.461	4.339	4.896	5.305	5.628	5.895	6.122	6.319	6.493
7	3.344	4.165	4.681	5.060	5.359	5.606	5.815	5.998	6.158
8	3.261	4.041	4.529	4.886	5.167	5.399	5.597	5.767	5.918
9	3.199	3.949	4.415	4.756	5.024	5.244	5.432	5.595	5.739
10	3.151	3.877	4.327	4.654	4.912	5.124	5.305	5.461	5.599
11	3.113	3.820	4.256	4.574	4.823	5.028	5.202	5.353	5.487
12	3.082	3.773	4.199	4.508	4.751	4.950	5.119	5.265	5.395
13	3.055	3.735	4.151	4.453	4.690	4.885	5.049	5.192	5.318
14	3.033	3.702	4.111	4.407	4.639	4.829	4.990	5.131	5.254
15	3.014	3.674	4.076	4.367	4.595	4.782	4.940	5.077	5.198
16	2.998	3.649	4.046	4.333	4.557	4.741	4.897	5.031	5.150
17	2.984	3.628	4.020	4.303	4.524	4.705	4.858	4.991	5.108
18	2.971	3.609	3.997	4.277	4.495	4.673	4.824	4.956	5.071
19	2.960	3.593	3.977	4.253	4.469	4.645	4.794	4.924	5.038
20	2.950	3.578	3.958	4.232	4.445	4.620	4.768	4.896	5.008
24	2.919	3.532	3.901	4.166	4.373	4.541	4.684	4.807	4.915
30	2.888	3.486	3.845	4.102	4.302	4.464	4.602	4.720	4.824
40	2.858	3.442	3.791	4.039	4.232	4.389	4.521	4.635	4.735
60	2.829	3.399	3.737	3.977	4.163	4.314	4.441	4.550	4.646
120	2.800	3.356	3.685	3.917	4.096	4.241	4.363	4.468	4.560
∞	2.772	3.314	3.633	3.858	4.030	4.170	4.286	4.387	4.474

v	$p = 11$	12	13	14	15	16	17	18	19
1	50.59	51.96	53.20	54.33	55.36	56.32	57.22	58.04	58.83
2	14.39	14.75	15.08	15.38	15.65	15.91	16.14	16.37	16.57
3	9.717	9.946	10.15	10.35	10.53	10.69	10.84	10.98	11.11
4	8.027	8.208	8.373	8.525	8.664	8.794	8.914	9.028	9.134
5	7.168	7.324	7.466	7.596	7.717	7.828	7.932	8.030	8.122
6	6.649	6.789	6.917	7.034	7.143	7.244	7.338	7.426	7.508
7	6.302	6.431	6.550	6.658	6.759	6.852	6.939	7.020	7.097
8	6.054	6.175	6.287	6.389	6.483	6.571	6.653	6.729	6.802
9	5.867	5.983	6.089	6.186	6.276	6.359	6.437	6.510	6.579
10	5.722	5.833	5.935	6.028	6.114	6.194	6.269	6.339	6.405
11	5.605	5.713	5.811	5.901	5.984	6.062	6.134	6.202	6.263
12	5.511	5.615	5.710	5.798	5.878	5.953	6.023	6.089	6.151
13	5.431	5.533	5.625	5.711	5.789	5.862	5.931	5.995	6.055
14	5.364	5.463	5.554	5.637	5.714	5.786	5.852	5.915	5.974
15	5.306	5.404	5.493	5.574	5.649	5.720	5.785	5.846	5.904
16	5.256	5.352	5.439	5.520	5.593	5.662	5.727	5.786	5.843
17	5.212	5.307	5.392	5.471	5.544	5.612	5.675	5.734	5.790
18	5.174	5.267	5.352	5.429	5.501	5.568	5.630	5.688	5.743
19	5.140	5.231	5.315	5.391	5.462	5.528	5.589	5.647	5.701
20	5.108	5.199	5.282	5.357	5.427	5.493	5.553	5.610	5.663
24	5.012	5.099	5.179	5.251	5.319	5.381	5.439	5.494	5.545
30	4.917	5.001	5.077	5.147	5.211	5.271	5.327	5.379	5.429
40	4.824	4.904	4.977	5.044	5.106	5.163	5.216	5.266	5.313
60	4.732	4.808	4.878	4.942	5.001	5.056	5.107	5.154	5.199
120	4.641	4.714	4.781	4.842	4.898	4.950	4.998	5.044	5.086
∞	4.552	4.622	4.685	4.743	4.796	4.845	4.891	4.934	4.974