

ANTIMALARIA

ADLN-Perpustakaan Universitas Airlangga

SKRIPSI

DWI AGUNG NUGROHO

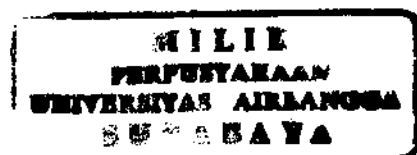
**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA
INFUSA DAUN JOHAR (*Cassia siamea*)
PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei***



FF 127/07

Nug
u

**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM FARMASI
SURABAYA
2006**



Lembar Pengesahan

**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA
INFUSA DAUN JOHAR (*Cassia siamea*)
PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

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

2006

Oleh :

DWI AGUNG NUGROHO

NIM. 050112447

Disetujui oleh :

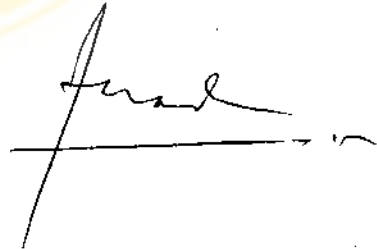
Pembimbing Utama



Dra. Wiwied Ekasari, Apt., MSi.

NIP. 132 087 863

Pembimbing Serta



Drs. H. Achmad Fuad Hafid, Apt., MS.

NIP. 130 937 972



"Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal, (yaitu) orang-orang yang mengingat **الله** sambil berdiri atau duduk atau dalam keadaan berbaring dan mereka memikirkan tentang penciptaan langit dan bumi (seraya berkata): "Ya Tuhan kami, tiadalah Engkau menciptakan ini dengan sia-sia, Maha Suci Engkau, maka peliharalah kami dari siksa neraka."
(QS. Aali 'Imraan (3) : 190-191)

Dedicated to :
beloved my father
Sukardi Mulyono (Alm.)

Location : Pasir Putih Beach, Tanjung Perak

KATA PENGANTAR

Puji syukur Alhamdulillah penulis panjatkan kepada Allah SWT atas segala rahmat dan hidayahNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA INFUSA DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei*”** sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar Sarjana Farmasi pada Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.

Dengan terselesaikannya skripsi ini, saya sampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, terutama Lab. Bahan Alam yang telah memberikan segalanya hingga akhir penulisan skripsi ini.
2. Dra. Wiwied Ekasari, Apt., Msi selaku pembimbing utama dan pimpinan Proyek Johar yang telah memberikan fasilitas penelitian, bimbingan, arahan dan motivasi dalam menyelesaikan skripsi ini.
3. Drs. H. Achmad Fuad Hafid, Apt., MS. sebagai pembimbing serta.
4. Dra. Aty Widyawaruyanti, Msi. dan Drs. Sukardiman, MS selaku penguji yang telah banyak memberikan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
5. Dr. Mulja Hadi Santosa dan Drs. Herra Studiawan, MS. Sebagai dosen penguji pengganti.
6. Kepala Bagian Ilmu Bahan Alam beserta seluruh karyawan (Pak Pardi, mas Iwan, Mas Mahfud, Pak Kadi dan Pak Djarwo) yang telah membantu penyelesaian skripsi ini.
7. Kedua Orang tuaku, Bapak Sukardi Mulyono(alm.) dan Ibu Sugiyem yang selalu memberikan semangat, kasih sayang, dukungan dan doa demi terselesaikannya skripsi ini.
8. Kakakku, mas Eko dan mbak Alip, adhekkku, Okta thank atas supportnya! serta keponakanku, Dicky, yang masih imut, mengingatkan tuk segera.... so segera menyelesaikan skripsi ini.
9. *My team* : Widi, Vali, Nurul dan Ardhis yang selalu bersama mengerjakan skripsi ini.

10. For ex. Tawazone people(Sutami, Ociem, Hardiyo, Subroto, Galuh & Erwan), asy syifa' people (Hermanto, Hengky, Topan, etc), tempat nebengku (Eko & Subroto) dan temen-temen seperjuangan, Semangat! *Isykariman uu mutsyahidan!!*
11. Special thanx !! Yoyok, Sigit, Agung, Ferry (*All my close friend in Solo*) Ari Kushend(*ever have been my inspiration*), Taza(*good bye&good luck for you*), Erwin(*My love*), Rini, Novi, Nita (*all friends in the kost*) Tyas, Emma, Imam, Tika, Thomi & Helmi, Nisa & Dudi, Ayun & Nawi, Pak Eko(Yahya) sekalian, Ade, Yusnita, Huda, Hanung yang selalu menyerukan agar saya bersabar dan semangat untuk menyelesaikan skripsi ini.
12. Teman-teman angkatan 2001 atas kebersamannya.
13. Semua pihak yang turut membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Akhirnya saya berharap semoga skripsi yang jauh dari kesempurnaan ini dapat bermanfaat bagi perkembangan ilmu pengetahuan, khususnya ilmu kefarmasian.

Surabaya, November 2006

Penyusun

RINGKASAN

UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA INFUSA DAUN JOHAR (*Cassia siamea*) PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei*

DWI AGUNG NUGROHO

Tanaman *Cassia siamea* merupakan tanaman yang digunakan oleh sebagian masyarakat sebagai obat anti malaria. Telah dilakukan penelitian, bahwa senyawa yang terkandung dalam daunnya yaitu alkaloid yang bisa menghambat pertumbuhan parasit malaria.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui khasiat dari infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dimana di masyarakat sudah banyak digunakan secara tradisional.

Penelitian ini dimulai dengan menimbang sebanyak 10 gram serbuk simplisia Daun Johar (*Cassia siamea*) kemudian diekstraksi dengan cara infusa hingga diperoleh volume yang dikehendaki (100 ml) dan masukkan dalam wadah. Dilanjutkan proses *freeze drying* dengan hasil berupa serbuk kering diambil, kemudian ditimbang dan masukkan wadah lalu disimpan di dalam eksikator.

Sebagai bahan uji, kemudian serbuk kering infusa dilarutkan dalam CMC Na 0,5 % dan dibagi dalam 6 dosis yaitu 400 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 25 mg/kgBB, 12,5 mg/kgBB. Sedangkan untuk kontrol positif digunakan klorokuin difosfat 10 mg/kgBB dan kontrol negatifnya larutan air ditambah CMC Na 0,5 %.

Mencit sebagai hewan coba diinfeksi dengan parasit lalu diberikan secara per oral selama 4 hari. Sampel darah dari ekor dikumpulkan sejak awal perlakuan hingga 6 hari berikutnya tanpa pemberian ekstrak, hal ini bertujuan untuk mengetahui efek obat terhadap tubuh. Sampel darah dibuat hapusan darah tipis lalu dilakukan pengecatan Giemsa. Setelah itu prosentase parasitemia dihitung untuk memperoleh prosentase penghambatan. Berdasarkan hasil penelitian, dilakukan perhitungan statistik dengan analisis probit sehingga diperoleh ED₅₀ sebesar 92,38 mg/kgBB.

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan pemberian dengan *multiple dose* dan berapa lama pemberiannya untuk meningkatkan aktivitas Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*).

ABSTRACT

TEST ACTIVITY ANTIMALARIA INFUSA of JOHAR LEAF (*Cassia Siamea*) in MICE of INFECTION of *Plasmodium berghei*

DWI AGUNG NUGROHO

The infusions of *Cassia siamea* Lamk. leaf was evaluated for anti malarial activity *in vivo*, in 4-day suppressive assays against *Plasmodium berghei* in mice. An *in vivo* model to study the antimalarial effect of plant extract is described. Selected mice (20-30 g body weight) were divided into 8 groups, each consist of 3 mice. Each animal was injected with *Plasmodium berghei* infected RBCs. The screening was done by Peter's test, mice were treated orally with diluted extract in dose levels of 400 mg/kg body weight, 200 mg/kg body weight, 100 mg/kg body weight, 50 mg/kg body weight, 25 mg/kg body weight and 12,5 mg/kg body weight for 6 groups. Two group served as control. The negative control was treated with 0,5 % CMC Na solution. The control positive was treated with a dose of 10 mg/kg body weight Chloroquine diphosphat solution. The concentration of water extract required for 50% suppression (ED₅₀) of *Plasmodium berghei* in mice was 92,38 mg/kg body weight.

Key word : *Cassia siamea* Lamk., infusions, *Plasmodium berghei*, Antimalarial activity, Peter's test.

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
HALAMAN PERSEMBAHAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
RINGKASAN.....	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesa Penelitian.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Tinjauan tentang Tanaman <i>Cassia siamea</i>	6
2.1.1 Klasifikasi Tanaman	6
2.1.2 Penyebaran <i>Cassia siamea</i>	6
2.1.3 Morfologi <i>Cassia siamea</i>	6
2.1.4 Kandungan <i>Cassia siamea</i>	7
2.1.5 Khasiat <i>Cassia siamea</i>	7
2.2 Penelitian tentang <i>Cassia siamea</i> sebagai antimalaria	8
2.3 Tinjauan Tentang Infusa.....	9
2.3.1 Cara Pembuatan.....	10

2.4 Tinjauan Tentang <i>Freeze dry</i>	10
2.5 Tinjauan Tentang KLT.....	11
2.6 Tinjauan Tentang Mencit	12
2.7 Tinjauan Tentang Malaria.....	12
2.8 Tinjauan tentang <i>Plasmodium berghei</i>	13
2.8.1 Klasifikasi <i>Plasmodium berghei</i>	13
2.8.2 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	13
2.8.3 Siklus Hidup	14
2.8.4 Pembiakan <i>in vivo Plasmodium berghei</i>	19
2.8.5 Klasifikasi Antimalaria	20
2.9 Tinjauan Tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman	
Secara <i>In vivo</i>	21
2.9.1 Tes Peter (The 4-day suppressive test of blood	
schizontocidal action)	21
2.9.2 Tes Rane	22
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	23
3.1 Landasan Teoritik	23
3.2 Bagan Kerangka Konseptual	25
BAB IV METODE PENELITIAN	26
4.1 Bahan Penelitian.....	26
4.1.1 Bahan Tanaman	26
4.1.2 <i>Plasmodium berghei</i>	26
4.1.3 Hewan coba	26
4.1.4 Bahan Pembanding	26
4.1.5 Bahan Lain untuk Uji Antimalaria secara <i>In vivo</i>	26
4.1.6 Pelarut	26
4.2 Alat-alat.....	27
4.3 Metode Penelitian.....	27
4.3.1 Pembuatan Infusa daun johar.....	27

4.3.2 Identifikasi Senyawa Alkaloid pada Infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) dengan Metode KLT.....	28
4.3.3 Kultivasi <i>Plasmodium berghei</i>	28
4.3.4 Penyiapan Bahan Uji	30
4.3.5 Analisis Parasit.....	31
4.4 Skema Pembuatan Infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>).....	33
4.5 Skema Penyiapan Parasit dan Uji Aktivitas Antimalaria.....	34
4.6 Skema Rancangan Penelitian Aktivitas Antimalaria infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) secara <i>in vivo</i>	35
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA.....	36
5.1 Pembuatan infusa Simplisia Daun <i>Cassia siamea</i>	36
5.2 Profil KLT Senyawa Alkaloid dari Infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>).....	36
5.3 Pembuatan Suspensi Uji.....	37
5.4 Pembuatan Larutan Kontrol.....	37
5.5 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria.....	38
5.6 Analisis Data.....	45
BAB VI PEMBAHASAN.....	46
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN.....	52
7.1 Kesimpulan.....	52
7.2 Saran.....	52
DAFTAR PUSTAKA.....	53

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Alat Infundasi (Pembuatan Infus).....	10
Gambar 2.2 Skema siklus hidup <i>Plasmodium berghei</i>	18
Gambar 3.1 Bagan konseptual penelitian dan uji aktivitas antimalaria Infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei in vivo</i> pada mencit.....	25
Gambar 4.1 Skema proses pembuatan infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>).....	33
Gambar 4.2 Skema penyiapan parasit dan uji aktivitas antimalaria.....	34
Gambar 4.3 Skema rancangan penelitian aktivitas antimalaria infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) terhadap pertumbuhan <i>Plasmodium berghei in vivo</i> pada mencit.....	35
Gambar 5.1 Hasil KLT dari infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) terhadap senyawa alkaloid.....	36
Gambar 5.2 Grafik hubungan antara persen parasitemia pengujian infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) selama 7 hari pengamatan.....	39
Gambar 5.3 Kurva Hubungan Probit Persen Penghambatan Terhadap Log Dosis infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) dan kontrol secara <i>in vivo</i>	41
Gambar 5.4 Grafik hubungan antara persen parasitemia terhadap pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif selama 7 hari pengamatan...	43
Gambar 5.5 Kurva Hubungan Probit Persen Penghambatan Terhadap Log Dosis Klorokuin Difosfat.....	45

DAFTAR TABEL

Tabel V.1 Persen Parasitemia dari Pengujian infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) dan kontrol secara <i>in vivo</i>	38
Tabel V.2 Persen Parasitemia Rata-rata dari pengujian infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>).....	39
Tabel V.3 Persen Parasitemia Rata-rata dari infusa Daun Johar (<i>Cassia siamea</i>) dan kontrol secara <i>in vivo</i>	40
Tabel V.4 Persen pertumbuhan <i>Plasmodium berghei</i> pada klorokuin difosfat sebagai kontrol positif.....	42
Tabel V.5 Persen pertumbuhan <i>Plasmodium berghei</i> dan persen penghambatan dari klorokuin difosfat sebagai kontrol positif dari $H_0 - H_4$	43

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 : Gambar <i>Cassia siamea</i>	56
Lampiran 2 : Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	57
Lampiran 3 : Sertifikat Determinasi.....	58
Lampiran 4 : Perhitungan Dosis <i>Cassia siamea</i>	59
Lampiran 5 : Pembuatan Medium Alceiver.....	61
Lampiran 6 : Persen Parasitemia.....	62
Lampiran 7 : Persen Pertumbuhan.....	63
Lampiran 8 : Persen Penghambatan.....	64
Lampiran 9 : Analisis Probit Infusa Daun <i>Cassia siamea</i>	65
Lampiran 10 : Analisis probit aktivitas antimalaria Klorokuin difosfat.....	67

DAFTAR SINGKATAN

ANKA	: Anverse Kasapa atau Anverse Katanga
CMC Na	: <i>Carboxy Metil Cellulosa Natrium</i>
Depkes RI	: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
DMSO	: <i>Dimethyl Sulphoxide</i>
DNA	: <i>Deoxyribo Nucleic Acid</i>
ED ₅₀	: <i>Effective Dose 50</i>
KOPEM	: Komando Pemberantasan Malaria
LUMC	: <i>Leiden University of Medical Center</i>
MED	: <i>Minimum Effective Dose</i>
WHO	: <i>World Health Organization</i>



BAB I

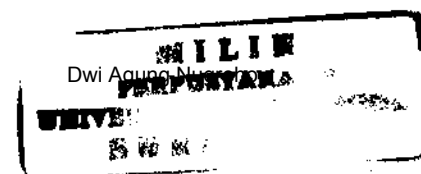
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Negara-negara tropis dan subtropis, termasuk Indonesia, masih disibukkan dalam mengatasi penyakit malaria. Penyakit ini merupakan penyakit yang sudah lama dikenal, namun masih belum ada penanggulangan yang efektif sampai sekarang. Dari hasil statistik, penyakit ini telah membunuh satu orang anak Afrika setiap 30 detik. Artinya, 2.880 orang anak Afrika meninggal setiap hari karena malaria. Di Indonesia sendiri malaria masih tetap menjadi penyebab utama kematian dan diperkirakan 50 orang menderita malaria per 1.000 orang penduduk. Kalau Indonesia berpenduduk 200 juta jiwa, 10 juta jiwa diantaranya menderita malaria. Ini adalah angka yang cukup besar. Karena itu, penyakit malaria ini juga penyakit yang harus mendapat perhatian serius sebagai salah satu usaha untuk mencapai "Indonesia Sehat 2010" (Utama, 2003).

Penyakit malaria sampai akhir abad ke-19 dipercaya disebabkan oleh miasma (udara buruk) dari rawa, tetapi kemudian Alphonse Laveran dan Ronald Ross menemukan bahwa penyakit ini merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit bersel satu yaitu protozoa yang termasuk dalam genus *Plasmodium* (Cowan, *et. all.*, 1993). *Plasmodium* ini mempunyai 4 (empat) spesies yang bersifat parasitik bagi manusia, yaitu *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*. Dari keempat spesies tersebut *Plasmodium falciparum* merupakan spesies yang paling umum menyerang manusia di daerah tropis dan subtropis dan merupakan penyebab malaria yang paling berbahaya, yaitu malaria maligna yang dapat menimbulkan kematian (Gandahusada, 1990).

Penyakit malaria merupakan salah satu penyakit menular utama di Indonesia, yang mana sudah sejak lama dilakukan usaha untuk mengatasinya, seperti dengan dilaksanakannya program KOPEM (Komando Pemberantasan Malaria) yang dimulai tahun 1959 sampai tahun 1968 menggunakan DDT di Jawa, Bali, Lampung dan Nusa Tenggara Barat terlihat adanya penurunan jumlah kasus penderita malaria. Tetapi, salah satu koran harian Indonesia pada tanggal 4



Maret 2002 memberitakan bahwa selama tahun 2001 di Kabupaten Kulon Progo, D.I. Jogjakarta penyakit malaria menyerang 23.460 orang dengan jumlah korban meninggal dunia sebanyak 7 orang. Sedangkan di Situbondo, penyakit ini menyerang lima kecamatan dengan jumlah pasien yang meninggal sebanyak 6 orang. Faktor-faktor yang menentukan bertahannya penyakit malaria di suatu daerah ditentukan oleh adanya nyamuk yang menjadi vektor malaria, adanya manusia yang rentan terhadap infeksi malaria dan keadaan lingkungan yang mendukung berkembang biaknya vektor (Kusmartisnawati, dkk., 2001; Yotopranoto, 1999).

Obat malaria yang tertua adalah kinina dari kulit pohon kina (*Chincona sp.*) yang dikenal sejak abad ke-17. Kemajuan bidang kimia sintetik menyebabkan kinina diganti oleh obat malaria sintetik seperti klorokuin. Namun setelah ditemukan adanya resistensi terhadap klorokuin pada salah satu strain *Plasmodium falciparum* di Thailand tahun 1959 dan di Columbia pada tahun 1960, kemudian ditemukannya kasus serupa di beberapa negara di Asia, Afrika dan Amerika Tengah menyebabkan peningkatan biaya pengobatan sehingga biaya tersebut semakin sulit dijangkau dan akibatnya jumlah kasus yang tidak terobati semakin meningkat, meningkatnya jumlah kasus yang tidak terobati dengan tuntas dan meningkatkan penyebaran kasus resistensi malaria (WHO, 1994). Hal ini membuat para ilmuwan berpaling kembali pada tumbuhan untuk mencari obat malaria yang baru (Masroerah dan Broto Sutaryo, 1994).

Indonesia yang terletak di kawasan tropis merupakan daerah yang kaya akan bermacam-macam tumbuhan, termasuk tanaman yang berkhasiat sebagai obat. Telah dikenal lebih dari 30.000 jenis tumbuhan yang tumbuh di Indonesia dan banyak diantaranya memiliki manfaat bagi kehidupan. Karena itu Indonesia diharapkan dapat menjadi sumber bahan obat alam yang potensial (Masroerah dan Broto Sutaryo, 1994).

Meskipun penelitian tumbuhan obat di Indonesia masih terus berlanjut, namun sampai sekarang masih banyak tumbuhan yang belum diketahui khasiat maupun senyawa aktifnya, khususnya tumbuhan obat yang berkhasiat sebagai antimalaria. Penggalan tumbuhan obat sebagai antimalaria masih terus

ditingkatkan mengingat dewasa ini telah ditemukan adanya *Plasmodium falciparum* yang resisten terhadap klorokuin (Oemijati, 1991).

Di Indonesia, beberapa tanaman telah diuji aktivitas antimalarianya, dari famili Caesalpiniaceae yang telah diteliti khasiat antimalarianya menurut buku Inventaris Tanaman Obat Indonesia yang diterbitkan oleh Badan Litbang Kesehatan (1991) antara lain: daun ketepeng cina (*Cassia alata* Linn), daun trengguli (*Cassia fistula* Linn), daun menting (*Cassia occidenralis* Linn), daun ketepeng (*Cassia tora* Linn), dan Daun Johar (*Cassia siamea* Linn) (Boesri, 1994).

Cassia siamea (Johar) yang berasal dari suku Caesalpiniaceae merupakan salah satu tanaman yang banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria. Tanaman ini memiliki kandungan senyawa antrakuinon pada seluruh bagian tanaman (Harboune, 1971). Sedangkan pada daunnya didapatkan senyawa alkaloid, dengan inti isokuinolina dan triterpenoid (El Sayyed, 1984; Ross, 1986). Pada penelitian terdahulu telah dilakukan oleh Ekasari (2001) dengan mengekstraksi Daun Johar dengan menggunakan pelarut etanol yang menghasilkan ekstrak etanol lalu ekstraksi dilanjutkan dengan pelarut kloroform yang menghasilkan ekstrak kloroform yang akhirnya dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom vakum sampai didapatkan fraksi 16 ekstrak kloroform yang mempunyai harga IC_{50} untuk ekstrak etanol sebesar 7,06 $\mu\text{g/ml}$ dan ekstrak kloroform sebesar 2,41 $\mu\text{g/ml}$ dan untuk fraksi 16 ekstrak kloroform didapatkan harga IC_{50} sebesar 1,70 $\mu\text{g/ml}$, kandungan yang diduga aktif adalah senyawa isokuinolin golongan alkaloid. Dari penelitian secara *in vitro* menunjukkan hasil yang memuaskan sehingga dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap Daun Johar (*Cassia siamea*) secara *in vivo*.

Gbeassor (1989) telah menguji efek antimalaria ekstrak air 8 tanaman dari Afrika, diantaranya adalah *Cassia siamea* dan dinyatakan bahwa tanaman ini dapat menghambat 100 %. Pada pemakaian secara tradisional. Wilkens di Surakarta pada harian Indische Dagbladen Juni 1917 sebagaimana tertuang dalam Tumbuhan Berguna Indonesia karya K. Heyne, menganjurkan penggunaan teh johar untuk malaria. Segenggam daun muda direbus dengan 6 cangkir air hingga tinggal 3 cangkir. Hasil rebusan diminum 3 kali sehari. Bila si penderita agak

sehat, pengobatan dikurangi menjadi 2 cangkir. Lalu bila kesehatannya sudah normal, selama beberapa hari cukup minum 1 cangkir/hari. Pada penelitian yang dilakukan secara *in vivo*, diharapkan hasil yang didapat bisa lebih menggambarkan kondisi parasit yang sesungguhnya dalam tubuh inang dibandingkan dengan uji aktivitasnya secara *in vitro*. Selain itu Gbeassor telah melakukan percobaan secara *in vitro* terhadap ekstrak air Daun Johar (*Cassia siamea*), namun sampai saat ini belum dilakukan uji secara *in vivo*. Berdasarkan hal tersebut di atas maka perlu dilakukan penelitian secara *in vivo* untuk ekstrak air dari Daun Johar (*Cassia siamea*) guna menunjang pemakaian Daun Johar sebagai anti malaria.

Untuk pengujian *in vivo* antara lain menggunakan *Plasmodium berghei*. *Plasmodium bergei* adalah salah satu dari spesies *Plasmodium sp.* yang menyerang mamalia selain manusia. Parasit ini menyerang rodensia di Afrika Barat. Parasit ini dapat digunakan sebagai model uji aktivitas antimalaria karena memiliki kemiripan dengan spesies parasit malaria yang menjangkiti manusia ditinjau dari segi struktur, fisiologis dan siklus hidup (Carer dan Diggs, 1977). *Plasmodium berghei* menjadi sebuah model ideal, karena bila dibandingkan dengan 3 spesies *Plasmodium* rodensia lain memiliki kelebihan antara lain : teknologi kultivasi *in vitro* dalam skala besar, data tentang pengaturan gen dan struktur gen, metode untuk memodifikasi parasit secara genetis, klon-klon yang khas dan galur-galur mutan yang telah dimodifikasi secara genetis (LUMC, 2002).

Plasmodium berghei merupakan model yang sempurna untuk uji secara *In vivo* karena merupakan subyek yang praktis untuk penelitian dan percobaan mengenal parasit mamalia disamping itu juga mempunyai kemiripan dengan parasit yang menginfeksi manusia.

Pada penelitian ini digunakan pelarut air dalam sediaan infusa. Infusa merupakan salah satu cara ekstraksi dengan pelarut air yang tertera dalam literatur. Dipakai pelarut air karena air merupakan pelarut semesta (dapat melarutkan senyawa polar, sebagian senyawa semipolar dan sedikit sekali senyawa non polar). Selain itu molekul air bersifat polar, stabil di suhu tinggi serta air adalah pelarut yang efisien, aman dan ekonomis (Anonim, 2004). Kadar

sari yang larut dalam air tidak kurang dari 21,5 %, lebih besar daripada kadar sari yang larut dalam etanol yaitu tidak kurang dari 12 %. (Materia Medika, 1977).

Sediaan disimpan dalam bentuk ekstrak kering dengan metode *freeze dry* dimana diharapkan sediaan dapat tahan lama, praktis dan cepat saji dalam penggunaannya. Sedangkan berhubungan dengan uji aktivitas antimalaria, dalam bentuk serbuk mempermudah dalam penentuan dosis yang diberikan pada mencit.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya hambat infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* dengan menentukan harga ED₅₀.

1.4 Hipotesis Penelitian

Infusa Daun Johar (*cassia siamea*) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*.

1.5 Manfaat Penelitian

Diperolehnya landasan ilmiah bagi penggunaan Daun Johar (*Cassia siamea*) sebagai antimalaria dalam upaya penggalian potensi bahan alam Indonesia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang Tanaman *Cassia siamea*

2.1.1 Klasifikasi Tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Anak divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Leguminosae
Suku	: Caesalpiniaceae
Marga	: <i>Cassia</i>
Jenis	: <i>Cassia siamea</i> Lamk(Becker C. A. and Backhuizen, 1963)
Nama daerah	: Johar, Juwar (Heyne, 1987)

2.1.2 Penyebaran *Cassia siamea*

Tanaman ini merupakan salah satu jenis pohon yang banyak dibudidayakan di Pulau Jawa. Tanaman ini banyak terdapat di sepanjang jalan sebagai pohon peneduh. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian kurang lebih 1000 m di atas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik. *Cassia siamea* merupakan tanaman asli India dan Sumatera sekitar khatulistiwa. Di daerah Batak sering ditemukan *Cassia siamea* dalam hutan sekunder yang berumur puluhan tahun dan tumbuh dengan baik. (Heyne, 1987)

2.1.3 Morfologi *Cassia siamea*

Merupakan tanaman pohon (keras) menahun, berbatang tegak dan banyak bercabang. Tanaman ini dapat mencapai tinggi hingga 20 m, batangnya berbentuk bulat dan berkayu keras dan daunnya berbentuk menyirip genap, anak daun berbentuk oval sampai memanjang sering kali melekuk ke dalam, pada bagian bawah rambut halus dan tepi daun rata. Ukuran anak daun panjangnya 3 – 7,5 cm dan lebar 12,5 cm.

Bunga berbentuk malai, kelopak bunga terbagi lima, daun mahkota berwarna kuning cerah panjangnya 2 cm, tangkai sari terpanjang 1 cm.

Bakal buah dengan tangkai putik sama panjangnya dengan benang sari yang terpanjang. Polongan dengan katup yang tebal dan sambungan buah yang dapat dipertebal, diantara sambungan berkelok-kelok panjangnya 15 – 30 cm, lebarnya 1,5 cm berkatup dua dan berisi biji antara 20 - 30 butir dan panjangnya 1,5 kali panjang. (Mardisiswo dan Rajakmangunsudiarso, 1985)

2.1.4 Kandungan *Cassia siamea*

Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman *Cassia siamea* antara lain: (Depkes RI, 1989; Ross, SA, 1986)

Daun	: triterpenoid, alkaloid inti isokuinolin yaitu siaminin, senyawa golongan antrakuinon (dioxapenalen, krisofanolantron).
Bunga	: senyawa alkaloid inti kromon, yaitu cassia denindihidroisokumarin asam kuinarat, sterol.
Kayu/batang	: tannin, antrakinin, lignin, pentosa hidrosianat.

2.1.5 Khasiat *Cassia siamea*

Cassia siamea mempunyai berbagai macam khasiat dan dapat digolongkan menurut bagian tanaman yang digunakan antara lain :

- Daun *Cassia siamea* digunakan secara tradisional oleh masyarakat Jawa sebagai antimalaria. Disamping itu juga dapat digunakan menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit (Heyne, 1987).
- Akarnya dapat digunakan sebagai obat cacing (Heyne, 1987). R. Broto Sudibyso di Yogyakarta, misalnya, meresepkan Daun Johar bersama kulit pohon pule dan kunyit untuk mengatasi penyakit kaki gajah dimana Daun Johar yang direbus mengeluarkan alkaloid berasa sangat pahit sehingga mematikan cacing penyebabnya.
- Bunga dan buahnya dipakai sebagai tonikum (Heyne, 1987). Selain itu digunakan untuk penenang dan peluruh, juga antihipertensi. Lalu ekstrak daun muda dan bunga dapat menurunkan ketegangan sistem syaraf pusat.

- d. kayu dan daun muda mengandung anthraquinon glisida yang bersifat tranquilizer (penenang), antipiretik (pereda demam), laksatif (pencahar), dan diuretik (peluruh air seni) (*Medicinal Plants in Thailand*).

2.2 Penelitian tentang *Cassia siamea* sebagai antimalaria

Gbeassor (1989) telah menguji efek antimalaria ekstrak air 8 tanaman dari Afrika. Ekstrak air panas dari delapan tanaman yang dikumpulkan di Togo, Afrika Barat yang diujikan untuk efek antimalaria dengan *Plasmodium falciparum* menggunakan uji secara *in vitro*. diantaranya adalah ekstrak *Cassia siamea*, *Jatropha gossypifolia* dan *Pavetta crassipes* dapat menghambat 100%.

Dari daun tanaman ini El-Sayyed (1984) berhasil, mengisolasi senyawa alkaloid isokuinolina yaitu senyawa siamina dengan kandungan total alkaloidnya 0,17 %. Di Indonesia, hasil penelitian yang dilakukan oleh Wahjoedi (2003) terhadap *Plasmodium berghei in vivo*, ternyata ekstrak etanol 70 % Daun Johar dapat memperpanjang kehidupan mencit percobaan sampai hari ke-16. Kontrol positif menggunakan Fansidar bertahan sampai hari ke-28, sedang kontrol negatif menggunakan aquades bertahan sampai hari ke-5.

Ekasari (2001) melanjutkan penelitian dengan mengekstraksi Daun Johar (*Cassia siamea*) menggunakan pelarut etanol menghasilkan ekstrak etanol mempunyai harga IC_{50} sebesar 7,06 $\mu\text{g/ml}$, Lalu ekstraksi dilanjutkan dengan menggunakan pelarut kloroform yang menghasilkan ekstrak kloroform mempunyai harga IC_{50} sebesar 2,41 $\mu\text{g/ml}$, kemudian dilakukan kromatografi kolom vakum dengan menggunakan pelarut n-heksan, etanol, kloroform dengan berbagai perbandingan sampai didapatkan fraksi 16 kloroform mempunyai harga IC_{50} sebesar 1,70 $\mu\text{g/ml}$. Sebagai standart digunakan klorokuin difosfat dan didapat harga IC_{50} sebesar 1,03 $\mu\text{g/ml}$.

Dari penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Dzulkarnain, B. *et. all*, (1992/1993) diketahui, sampai dosis 100 mg serbuk daun/100 g tikus dalam bentuk infus oral tidak mengurangi jumlah eritrosit (sel darah merah) tertular parasit (plasmodium).

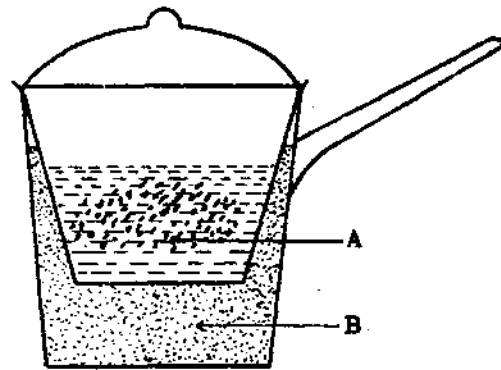
2.3 Tinjauan Tentang Infusa

Infus adalah sediaan cair yang dibuat dengan menyari simplisia dengan air pada suhu 90° C selama 15 menit.

Infudasi adalah proses penyarian yang umumnya digunakan untuk menyari zat kandungan aktif yang larut dalam air dari bahan-bahan nabati. Penyarian dengan cara ini menghasilkan sari yang tidak stabil dan mudah tercemar oleh kuman dan kapang. Oleh sebab itu sari yang diperoleh dengan cara ini tidak boleh disimpan lebih dari 24 jam.

Cara ini sangat sederhana dan sering digunakan oleh perusahaan obat tradisional. Dengan beberapa modifikasi, cara ini sering digunakan untuk membuat ekstrak. Infus dibuat dengan cara :

1. Membasahi bahan bakunya, biasanya dengan air 2 kali bobot bahan, untuk bunga 4 kali bobot bahan dan untuk karagen 10 kali bobot bahan.
2. Bahan baku ditambah dengan air dan dipanaskan selama 15 menit pada suhu 90°-98° C. Umumnya untuk 100 bagian sari diperlukan 10 bagian bahan. Pada simplisia tertentu tidak diambil 10 bagian, hal ini disebabkan karena:
 - a. Kandungan simplisia kelarutannya terbatas, misalnya kulit kina digunakan 6 bagian.
 - b. Disesuaikan dengan cara penggunaannya dalam pengobatan, misalnya daun kumis kucing, sekali minum infus 100 cc, karena itu diambil ½ bagian.
 - c. Berlendir, misalnya karagen digunakan 1 ½ bagian.
 - d. Daya kerjanya keras, misalnya digitalis digunakan ½ bagian.
3. Untuk memindahkan penyarian kadang-kadang perlu ditambah bahan kimia misalnya:
 - a. Asam sitrat untuk infus kina.
 - b. Kalium atau Natrium karbonat untuk infus kelembak.
4. Penyaringan dilakukan pada saat cairan masih panas, kecuali bahan yang mengandung bahan yang mudah menguap.



Gambar 2.1 Alat Infundasi (Pembuatan Infus)

A. Panci berisi bahan dan air

B. Tangas air

2.3.1 Cara Pembuatan

Simplisia yang telah dihaluskan sesuai dengan derajat kehalusan yang ditetapkan dicampur dengan air secukupnya dalam sebuah panci. Kemudian dipanaskan di dalam tangas air selama 15 menit, hitung mulai suhu di dalam panci mencapai 90° C, sambil sekali-kali diaduk. Infus diserukai sewaktu masih panas melalui kain flanel. Untuk mencukupi kekurangan air, ditambahkan air mendidih melalui ampasnya. Infus simplisia yang mengandung minyak atsiri harus diserukai setelah dingin. Infus asam jawa dan simplisia yang berlendir tidak boleh diperas. Infus kulit kina biasanya ditambah dengan asam sitrat sepersepuluh dari bobot simplisia. Infus simplisia yang mengandung glikosida antrakinon ditambahkan natrium karbonat sebanyak sepersepuluh dari bobot simplisia. Asam jawa sebelum dipakai dibuang bijinya dan sebelum direbus dibuat massa seperti bubur. Buah adas dan buah adas manis harus dipecah terlebih dahulu. (Anonim, 1986)

2.4 Tinjauan Tentang *Freeze dry*

Freeze dry adalah suatu proses di mana fase air berubah menjadi uap air secara langsung dari fase es, tanpa melewati fase cair. Proses ini disebut sublimasi, dan memerlukan tekanan yang kecil untuk terjadi. Semua metode pengeringan lain menggunakan penguapan, air diubah menjadi uap air dari fase cair dengan udara yang dipanaskan.

Freeze dry sesuai untuk memelihara material biologi sensitif. Ada tiga alasan untuk ini. Pertama, membekukan dengan lambat atau menghentikan reaksi

kimia. Kedua, proses terjadi di ruang hampa, dan tidak adanya oksigen mencegah reaksi oksidasi. Dan ketiga, proses dapat dilakukan pada temperatur sangat rendah, lebih rendah dari metode pengeringan yang lain.

Gangguan bakteri atau enzymatic tidak bisa terjadi pada temperatur rendah, dan perubahan bentuk bahan kimia umum diminimalisir. (Pebley, 2003).

2.5 Tinjauan tentang KLT (Kromatografi Lapis Tipis)

Untuk mengetahui keberadaan senyawa yang aktif sebagai anti malaria dalam sediaan infusa maka dilakukan skrining fitokimia dengan menggunakan KLT. Tujuan KLT adalah diarahkan pada deteksi zat berkhasiat dari zat yang ada dalam sediaan dengan jalan penyerapan zat pada dasarnya, semua cara kromatografi menggunakan 2 fase yaitu fase tetap (*stationary*) dan yang lain fase bergerak (*mobile*) pemisahan pemisahan pada gerakan relative dari 2 fase ini. Fase gerak dan fase tetap yang digunakan dalam KLT adalah fase gerak berupa zat cair dengan fase tetap adalah zat padat yang berfungsi sebagai penyerap. (Sostroamidjojo 2002)

Pemilihan pelarut pengembang atau pelarut pengembang campuran ini berdasarkan macam dan polaritas zat kimia yang dipisahkan (Mulya dan Suharman, 1995).

Pada penentuan Kromatografi KLT dengan memperhitungkan nilai faktor retardasi (Rf) dari persamaan :

$$R_f = \frac{\text{Jarak migrasi komponen}}{\text{Jarak migrasi fase pelarut}}$$

Untuk maksud analisis kualitatif, harga Rf noda kromatogram cuplikan sampel dibandingkan dengan harga Rf noda kromatogram standar. (Stahl, 1985)

2.6 Tinjauan Tentang Mencit

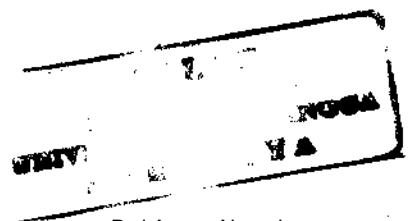
Mencit dengan nama lain *Mus Musculus* merupakan binatang percobaan yang banyak digunakan dalam penelitian biomedik modern. Hal ini karena mencit memiliki ukuran yang sesuai, waktu persiapan pendek, mudah pemeliharaannya. Mencit peka terhadap penyakit-penyakit yang dialami manusia karena memiliki kemiripan struktur anatomi dengan manusia (Morse, 1981).

Lama hidup mencit adalah 2 tahun, bahkan ada yang mencapai 3 tahun. Mencit dewasa berumur 35 hari. Berat mencit dewasa jantan 20 – 40 gram, sedangkan berat mencit dewasa betina 18 – 35 gram (Dex dan Harbourne, 1991).

2.7 Tinjauan Tentang Malaria

Malaria disebut juga paludisme, demam rawa, demam tropik, demam pantai dan demam roma. Malaria memiliki penyebaran yang luas dan sering terjadi pada daerah tropis, daerah beriklim panas dan basah. Malaria pada manusia disebabkan oleh salah satu atau beberapa dari 4 jenis parasit malaria (*Plasmodium*), dengan penyebaran yang tidak sama (Depary, 1989), yaitu :

1. *Plasmodium falciparum* penyebab malaria maligna. Parasit malaria ini hanya ditemukan di daerah beriklim panas dan lembab.
2. *Plasmodium malariae* penyebab malaria kuartana. Parasit malaria ini terdapat di daerah tropis.
3. *Plasmodium vivax* penyebab malaria tertiana benigna. Parasit malaria ini merupakan yang paling luas penyebarannya baik di daerah tropis, sub tropis dan daerah dengan empat musim.
4. *Plasmodium ovale* penyebab malaria tertiana ovale. Parasit ini merupakan spesies yang paling jarang ditemukan.



2.8 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei*

2.8.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

Filum	: Protozoa
Sub filum	: Sporozoa
Kelas	: Telosporea
Sub kelas	: Coccidea
Famili	: Plasmodiidae
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Spesies	: <i>Plasmodium berghei</i> (Kudo, 1996)

2.8.2 Morfologi *Plasmodium berghei* (LUMC, 2001)

Plasmodium berghei sebagai parasit penyebab malaria pada hewan pengerat memiliki beberapa bentuk parasit dalam darah, yaitu :

1. Bentuk cincin

Tampak sebagai cincin dengan sitoplasma biru dengan nucleus kromatin merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan Giemsa dari pulasan darah perifer.

2. Bentuk trofozoit

Bentuknya amuboid atau seperti pita, nucleus trofozoit membelah dan dengan pembelahan nukleus, stadium skizon terjadi.

3. Bentuk skizon

Ukuran kira-kira 27 μm pada hari ke empat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas (titik maurer), kemungkinan diakibatkan sitoplasma yang rusak karena parasit dan tersebar pada dua pertiga bagian eritrosit.

4. Bentuk Gametosit

Macam Gametosit ada dua yaitu makrogametosit dan mikrogametosit. Makrogametosit berbentuk pisang, bernoda biru mengandung kumpulan nukleus dan granula, sedangkan mikrogametosit berbentuk seperti ginjal atau kacang, bernoda biru lemah atau kemerahan mengandung nukleus yang mengkilat dan granula yang lebih kecil dan tersebar. Pada pemeriksaan darah tepi, baik hapusan atau tetesan tebal terutama dijumpai parasit muda bentuk cincin (*ring form*). Pada sediaan darah tebal, stadium trophozoit juga berbentuk

cincin, gametosit berbentuk pisang, banyak sekali bentuk cincin dan balon merah di sisi luar gametosit. Pada sediaan darah tipis trophozoit muda berbentuk tanda seru atau koma dan cincin terbuka, gametosit berbentuk pisang dan terdapat bintik Maurer pada sel darah merah. Dengan pengecatan pewarna Giemsa, tampak inti berwarna merah, plasma berwarna biru, sel darah berwarna merah muda dan pigmen berwarna kuning sampai hitam.

2.8.3 Siklus Hidup

Siklus hidup malaria terdiri dari 2 fase yaitu siklus aseksual (skizogoni) dan siklus seksual (sporogoni). Sebagai tempat pembelahan aseksual adalah manusia (hospes antara), sedangkan tempat terjadinya siklus seksual atau reproduksi yang disertai dengan sporogoni adalah nyamuk *Anopheles direns* betina (vektor dan hospes definitif).

2.8.3.1 Siklus aseksual

Infeksi malaria terjadi dengan masuknya sporozoit melalui gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang terinfeksi parasit.

2.8.3.1.1 Fase pre-eritrosit atau eksoeritrosit

Setelah memasuki aliran darah, sporozoit dari *P. berghei* akan mengalami hal yang sama dengan yang dialami oleh *Plasmodium* yang menyerang manusia, sporozoit akan menuju hepar dan menyerang hepatosit. Sporozoit yang melekat pada hepatosit bisa ditemukan mulai beberapa menit sampai beberapa jam setelah inokulasi. Proses invasi ini diperantarai oleh invaginasi membran plasma hepatosit membentuk vakuola yang akan ditempati sporozoit. Sporozoit bisa berpindah-pindah antar sel sebelum menyerang hepatosit lewat pembentukan vakuola ini. Di dalam hepatosit, sporozoit berkembang menjadi trophozoit dan kemudian sampai skizon hepar dewasa dalam waktu 47 - 52 jam, tiap skizon mengandung 1500 - 8000 merozoit yang berinti tunggal. Pembelahan inti untuk menjadi merozoit dimulai 24 jam setelah sporozoit memasuki sel hepar dan dalam 26 jam setelahnya terjadi setidaknya 13 kali pembelahan. Pola dasar dari pembentukan merozoit ini sama dengan yang terjadi pada skizon eritrosit dan pembelahan sporogoni pada nyamuk. Setelah sel hepar pecah, merozoit-merozoit tersebut akan terlepas ke sirkulasi sistemik dan menyerang eritrosit.

2.8.3.1.2 Fase eritrosit, terdiri dari :

i. Perkembangan aseksual

Setelah lepas dari sel hepar, merozoit akan menginvasi eritrosit, *P. berghei* cenderung menyerang retikulosit tetapi juga bisa menyerang eritrosit dewasa. Di dalam eritrosit merozoit berkembang menjadi trophozoit yang ditandai dengan peningkatan ukuran sel dan sitoplasma. Trophozoit menggunakan hemoglobin untuk metabolismenya dan menghasilkan hemozoin, pigmen kecoklatan tersebar di sitoplasma yang merupakan penanda khas fase ini. Perkembangan merozoit menjadi trophozoit dewasa memerlukan waktu sekitar 16 jam. Begitu fase trophozoit selesai, parasit akan menggandakan DNA-nya kemudian mengalami pembelahan inti menghasilkan parasit berinti 2 yang disebut skizon, pada proses skizogoni yang memakan waktu 6 - 8 jam parasit mengalami pembelahan inti berkali-kali membentuk sel yang berinti 8 - 24. Setelah proses skizogoni selesai parasit akan membentuk merozoit (Janse, 1986). Durasi fase pembentukan merozoit ini berkisar 22 - 24 jam, skizon dewasa dalam eritrosit dewasa biasanya mengandung merozoit yang lebih sedikit (8 - 12) dibandingkan dengan skizon dalam retikulosit (16 - 18). Kemudian skizon yang telah dewasa maupun yang belum akan menghilang dari sirkulasi perifer dan tersekuestrasi di pembuluh kapiler organ dalam, misalnya paru-paru, limpa, hepar, dan otak (tingkatan dan letak terkumpulnya pada organ berbeda untuk strain *P. berghei* yang berbeda). Pada malaria rodensia, protein-protein pada permukaannya dan permukaan eritrosit yang terinfeksi, serta peran protein-protein tersebut dalam sekuestrasi di organ-organ dalam masih belum banyak diketahui, berbeda dengan *P. falciparum* (Janssen, 2001). Setelah skizon pecah, merozoit akan menyerang eritrosit yang baru lagi dan menyebabkan peningkatan parasitemia. Fase untuk perkembangan eritrositik *P. berghei* pada rodensia biasanya asinkron sehingga bentuk-bentuk cincin, trophozoit, dan skizon biasanya ditemukan secara simultan dalam darah saat perjalanan infeksi (Mons, 1986).

2. Perkembangan seksual

Dalam siklus aseksual, sejumlah kecil parasit berhenti membelah secara aseksual dan berdeferensiasi menjadi bentuk seksualnya yang disebut gametosit. Gametosit dibagi dua, mikrogametosit (jantan) dan makrogametosit (betina). Pada *P. berghei* di tiap siklus aseksualnya 5 - 25 % parasit mengalami diferensiasi seksual. Persentase yang relatif tetap ini berbeda dengan *P. falciparum* dimana laju periode pembelahan aseksualnya berubah seiring laju produksi gametositnya. Merozoit dari skizon hepar *P. berghei* mampu berdeferensiasi secara langsung menjadi gametosit setelah menginvasi eritrosit, dan waktu yang dibutuhkan sekitar 26 - 30 jam (Mons, 1986; Suhrbier, 1987).

Pada 16 - 18 jam pertama perkembangan, gametosit sulit dibedakan dengan trophozoit pada mikroskop. Setelah 18 - 22 jam penanda khas berkembang, seperti inti sel tunggal yang besar, distribusi granul pigmen pada sitoplasma, dan ukuran sel. Pada tingkat ini bentuk-bentuk osmiophilik bisa ditemukan, tetapi makrogametosit dan mikrogametosit belum bisa dibedakan. Baru setelah 24 jam keduanya bisa dibedakan lewat inti mikrogametosit yang lebih besar, granul pigmen dan badan osmiophilik yang lebih sedikit dibanding makrogametosit. Waktu yang dibutuhkan (26 - 30 jam) lebih pendek bila dibanding perkembangan gametosit pada *P. falciparum* yang memakan waktu 8 - 11 hari, secara morfologi gametosit *P. berghei* berbentuk oval sedangkan gametosit *P. falciparum* berbentuk seperti pisang. Morfologi, waktu perkembangan, dan produksi gametosit dari *P. berghei* lebih mirip dengan Plasmodium manusia yang lain daripada *P. falciparum*. Inisiasi deferensiasi seksual pada *P. berghei* dimulai 12 - 16 jam setelah invasi, berbeda juga dengan *P. falciparum* yang inisiasinya telah dimulai sebelum pematangan skizon, sehingga merozoitnya sudah terprogram untuk berubah menjadi gametosit sebelum menginvasi sel darah merah baru (Mons, 1986; Bruce, 1990; Dyer and Day, 2000; Smith, 2000). Mekanisme molekular yang memicu dan mengatur perubahan dari pembelahan aseksual ke diferensiasi seksual belum diketahui, tetapi hasil penelitian menunjukkan bahwa keadaan lingkungan mempengaruhi mekanisme ini, misalnya kadar erythropoietin mempengaruhi rasio mikrogametosit dan makrogametosit pada *P. vinckei*.

2.8.3.2 Siklus seksual

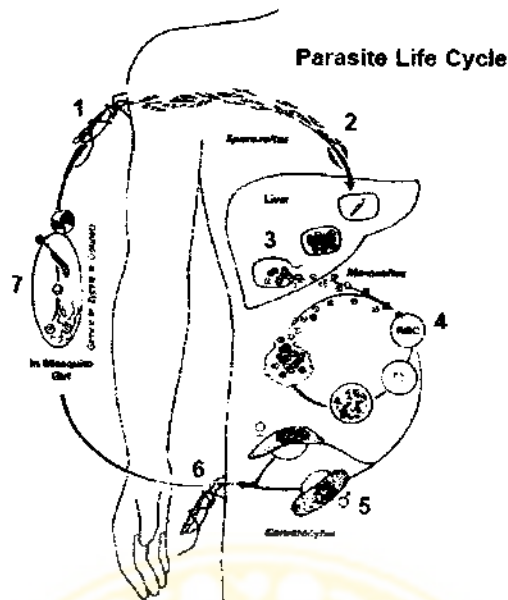
1. Fertilisasi dan perkembangan zigot pada nyamuk

Saat nyamuk menghisap darah inang yang terinfeksi, hanya gametosit dewasa yang terus bisa berkembang dalam perut nyamuk. Gametosit kemudian berkembang lebih lanjut menjadi gamet, makrogametosit berkembang menjadi 1 makrogamet sedangkan mikrogametosit berkembang menjadi 8 mikrogamet yang berbentuk seperti sperma (Janse, 1986).

Fertilisasi dimulai dengan penetrasi mikrogamet kedalam makrogamet menghasilkan zigot diploid antara 10 menit - 1 jam setelah terbentuknya gamet, kemudian fertilisasi dan fusi inti antara kedua gamet dan dilanjutkan dengan pembelahan meiosis. Meiosis tidak langsung diikuti pembelahan inti tetapi didahului pembentukan zigot berinti (ookinet) dengan DNA haploid 2 - 4 kali lebih banyak. Zigot yang awalnya bulat berubah menjadi ookinet seperti pisang yang bisa bergerak bebas dalam 18 - 24 jam. Granul pigmen yang tersebar dalam sitoplasma zigot terkumpul menjadi beberapa kelompok di ookinet (Janse, 1986; Sinden, 1985).

2. Ookista dan perkembangan sporozoit

Ookinet dewasa yang bergerak aktif menembus epitel lambung dan tinggal diantara membran sel terbawah dan basal lamina dinding lambung. Di sini ookinet berubah menjadi ookista dan mengalami replikasi mitosis sampai mengandung ribuan sporozoit. Ookista mengalami pembesaran diameter dari 2-3 μm menjadi 40 μm dalam 10 - 12 hari. Jumlah ookista dan sporozoit berbeda untuk tiap spesies nyamuk *Anopheles*. Pada *Anopheles stephensi* yang terinfeksi *P. berghei* strain ANKA tiap ookistanya mengandung sekitar 8000 sporozoit. Ookista kemudian pecah dan sporozoit terlepas lalu memasuki kelenjar ludah. Sporozoit kemudian bermigrasi keluar dari kelenjar ludah dan memasuki ruang sekretori ekstraselular dimana akan tinggal disana sampai diinjeksikan ke inang baru. Dari tiap gigitan nyamuk hanya sekitar 20 - 50 sporozoit yang masuk ke tubuh inang (Sinden and Billingsley, 2001; Sinden, 1997).



Gambar 2.2 Skema siklus hidup *Plasmodium*

1. Nyamuk anopheles betina memasukkan sporozoit *Plasmodium* ke dalam aliran darah.
2. Sporozoit berpindah ke hati dan menginfeksi sel hati.
3. Sporozoit bereproduksi secara aseksual untuk membentuk ribuan merozoit, dimana merozoit ini segera pecah dari hati menuju aliran darah.
4. Sekali di aliran darah, merozoit menyerang sel darah merah (RBCs). Parasit yang telah dewasa di dalam sel itu dilepaskan untuk menyerang RBCs yang lain. Penyakit dan kematian pada malaria paling sering disebabkan stage penyerangan ini.
5. Beberapa parasit RBCs berdiferensiasi menjadi bentuk jantan dan betina yang disebut gametosit.
6. Ketika nyamuk betina menggigit orang yang terinfeksi, nyamuk tersebut menghisap gametosit dari dalam darah.
7. Di dalam saluran pencernaan nyamuk, gametosit berdiferensiasi membentuk seperti sperma dan telur, sehingga reproduksi seksual terjadi. Parasit yang dihasilkan tumbuh menjadi sporozoit dan berpindah ke kelenjar ludah nyamuk.

2.8.4 Pembiakan *in vivo Plasmodium berghei*

Rodensia yang sering digunakan untuk percobaan (mencit, tikus, hamster) umumnya sensitif terhadap infeksi *P. berghei* baik lewat gigitan nyamuk maupun injeksi dengan darah yang terinfeksi. Penginfeksian dengan menggunakan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* pada mencit bisa dilakukan semenjak hari ke-14 setelah nyamuk tersebut menggigit inang yang terinfeksi, sampai beberapa minggu sesudahnya. Seperti telah dikemukakan diatas bahwa pada kelenjar ludah nyamuk terdapat sekitar 11.000 sporozoit dan hanya 20 - 50 saja yang masuk dalam tubuh inang lewat gigitan nyamuk (Sinden and Billingsley, 2001; Sinden, 1997). Pada strain rodensia yang berbeda kepekaan terhadap infeksiya memiliki perbedaan yang cukup besar, sehingga jumlah nyamuk yang dibutuhkan untuk penginfeksian berbeda-beda pula untuk tiap strain. Sporozoit bisa ditemukan dalam hepatosit mulai beberapa menit sampai beberapa jam setelah inokulasi, sedangkan laju pembelahan aseksual dalam darah untuk *P. berghei* berdasarkan penelitian relatif stabil, yaitu kira-kira 10 pembelahan tiap 24 jam saat fase pertama siklus eritrositik.

Penginfeksian secara buatan dilakukan secara intravena atau intraperitoneal dengan menginjeksikan eritrosit yang mengandung bentukan fase aseksual eritrositiknya (cincin, trophozoit, dan skizon). Prosedur rutin yang banyak digunakan para peneliti adalah dengan mengambil darah dari ekor hewan yang terinfeksi dengan parasitemia lebih dari 20 % dan menyuntikkan $10^5 - 10^8$ eritrosit terinfeksi pada hewan coba secara intraperitoneal. Berdasarkan pengalaman, sekitar 10 % dari parasit yang disuntikkan berhasil hidup dan memasuki peredaran darah. Dengan melihat laju pembelahan *P. berghei* (strain ANKA) pada mencit yang berkisar 10 kali tiap 24 jam dalam fase pertama siklus eritrositiknya, maka bisa diperkirakan parasitemia yang didapatkan dengan penginjeksian dosis eritrosit terinfeksi yang berbeda (Sinden, 1997).

2.8.5 Klasifikasi Antimalaria (Mustler, 1991).

Obat antimalaria menurut cara kerjanya dapat dibagi menjadi 4 macam, yaitu :

1. Skizontosida jaringan

Skizontosida dapat menghambat perkembangan bentuk ekso-eritrosit. Senyawa ini dapat bekerja kausal profilatik jika mempengaruhi stadium perkembangan awal dari parasit sebelum menyerang eritrosit, misalnya : primakuin.

2. Skizontosida darah

Skizontosida darah merupakan obat kemosupresif atau kuratif secara klinik. Obat ini menekan gejala malaria dengan merusak skizon dan merozoit di dalam eritrosit, misalnya kina dan klorokuin.

3. Gametosida

Gametosida bekerja dalam pada bentuk seksual parasit malaria dengan demikian akan mencegah penyebaran dari manusia ke nyamuk, misalnya primakuin.

4. Sporontosida

Sporontosida bekerja dengan mencegah perkembangan parasit dalam nyamuk jika obat ini terbawa nyamuk bersama darah yang dihisap dari manusia.

Terapi dan penanganan penyakit malaria dilakukan dengan dua cara yaitu penanganan untuk serangan malaria akut (penanganan supresif) dan penyembuhan untuk serangan ulang (penanganan radikal). Pada penanganan supresif, obat antimalaria yang digunakan adalah obat yang bekerja pada bentuk eritrositer. Sedangkan pada penanganan radikal, obat antimalaria yang digunakan adalah yang bekerja pada stadium Plasmodium (skizon jaringan, skizon darah dan gametosida).

2.9 Tinjauan Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman Secara *In vivo*

Dua tes utama untuk skrining antimalaria telah dipergunakan selama 50 tahun terakhir. *P. gallinaceum* merupakan spesies yang pertama kali digunakan untuk pengujian selama perang dunia II, tetapi kemudian yang lebih disukai adalah parasit rodensia *P. berghei*. Tikus yang digunakan untuk pengujian memerlukan standarisasi yang ketat untuk menghindari variabel-variabel yang bisa mempengaruhi hasil, misalnya strain parasit, strain induk semang, dan cara pemberian obat. Strain N (normal) dari *P. berghei* dapat berkembang dengan baik pada banyak strain mencit tapi ada yang sukar untuk ditempati sebagai semang.

Pemaparan yang lama pada klorokuin menyebabkan strain N berkembang menjadi strain NS yang memiliki ketahanan yang rendah terhadap klorokuin. Hewan rodensia cenderung makin kebal terhadap infeksi malaria seiring penuaan dan profil farmakokinetik dan metabolismenya bisa bervariasi seiring pertambahan usia. Mencit jantan dengan berat sekitar 20 g agaknya merupakan hewan coba yang paling sesuai. Kondisi lingkungan dan makanan perlu dikontrol dengan hati-hati.

Ada dua tipe uji aktivitas antimalaria yang berbeda untuk pengujian dengan *P. berghei* yang biasanya digunakan sebagai dasar untuk skrining ekstrak tanaman, yaitu tes Peter dan tes Rane.

2.9.1 Tes Peter (*The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*)

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat 20 g ditempatkan dalam ruang bersuhu 22°C (\pm 2°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 di ekor pada hari 0.

Ekstrak tanaman bisa dilarutkan atau dibuat suspensi dengan triturasi atau sonifikasi setelah penambahan 0,2 % larutan Tween atau 0,5 % larutan CMC atau DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan perhari dengan rentang dosis 1 - 100 mg/kg berat badan dimulai semenjak hari mulainya penginfeksi selama 4 hari berturut-turut lewat rute subkutan atau oral. Pada hari kelima, diambil sampel

darah dari ekor dan dilakukan pewarnaan dengan pewarna yang sesuai (misal Giemsa) dan diukur persentase jumlah eritrosit yang mengandung parasit dibandingkan jumlah total eritrosit. Harga ED₅₀ (dalam hal ini berarti adanya penekanan parasit sebanyak 50% bila dibandingkan dengan kontrol) bisa dihitung dengan log dosis/aktivitas probit. Standar deviasi dihitung menggunakan program komputer yang sesuai. Untuk skrining dalam skala besar, sebuah dosis besar (misal 100 mg/kg berat badan) bisa diberikan sebagai pengganti dosis yang lebih kecil tapi diberikan beberapa kali (Phillipson, 1991).

2.9.2 Tes Rane

Dasar dari tes ini adalah membandingkan efek dari perlakuan standar pemberian *P. berghei* yang membunuh mencit dalam 6 hari dengan perpanjangan waktu bertahan hidup sampai 12 hari, dengan perlakuan pemberian sebuah dosis tunggal senyawa yang diujicobakan. Kelompok standar diberikan 10⁶ sel donor yang terinfeksi secara intraperitoneal pada hari 1 dan larutan ekstrak tanaman atau suspensi dalam oleum arachidis yang telah tersonifikasi diberikan secara subkutan dengan dosis 640, 320, 160 dan 80 mg/kg berat badan pada hari ke empat.

Penilaian aktivitas berdasarkan jumlah yang masih hidup, lebih dari dua kali lipat dibandingkan kelompok kontrol. *Minimum Effective Dose* (MED) yang didapat dibandingkan dengan *Maximum Tolerated Dose* (MTD) yang mengakibatkan tidak lebih dari 1/5 jumlah mencit mati karena efek toksik. Dosis yang lebih rendah mungkin dibutuhkan untuk mendapatkan 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 melawan toksisitasnya.

Kedua tes ini tidak bisa digunakan untuk identifikasi senyawa yang bersifat *long acting* dan bila informasi mengenai hal ini dibutuhkan maka bisa digunakan tes dengan *P. yoelli* atau *P. vinckei* pada mencit. Tes malaria pada rodensia juga bisa digunakan untuk pengujian senyawa yang memiliki aktivitas skizontosida dan gametosida jaringan (Phillipson, 1991).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Landasan Teoritik

Malaria merupakan salah satu penyakit yang disebabkan oleh protozoa bergenus *Plasmodium* yang memiliki lebih dari 150 spesies, ditularkan lewat gigitan nyamuk ke manusia, monyet, rodensia, burung, dan reptil. Penyakit ini merupakan sebuah penyakit yang kompleks dengan banyak variasi dalam penampakan epidemis dan klinis pada daerah yang berbeda. Perbedaan ini disebabkan oleh beberapa faktor : spesies atau strain malaria yang menyerang daerah tersebut, kepekaan parasit terhadap obat yang biasa digunakan, distribusi dan efisiensi nyamuk vektor, iklim dan kondisi lingkungan, serta pola hidup dan immunitas dari penduduk yang terpapar.

Resistensi terhadap obat-obat antimalaria telah menjadi salah satu masalah terbesar dalam pengontrolan malaria. Resistensi terhadap obat berperan penting dalam keberadaan dan tingkat keparahan epidemi ini di beberapa bagian dunia karena perpindahan populasi akan membawa strain resisten ke daerah yang sebelumnya bebas dari masalah resistensi (Bloland, 2001). Alternatif pengobatan malaria diperlukan, karena resistensi parasit malaria terhadap beberapa obat modern banyak terjadi. Misal klorokuin di hampir semua provinsi di Indonesia. Daerah endemik malaria pun makin meluas. Perusakan lingkungan yang makin tak terkendali, membuat pemberantasan penyakit maupun vektornya makin berat (Wahjoedi, 2003).

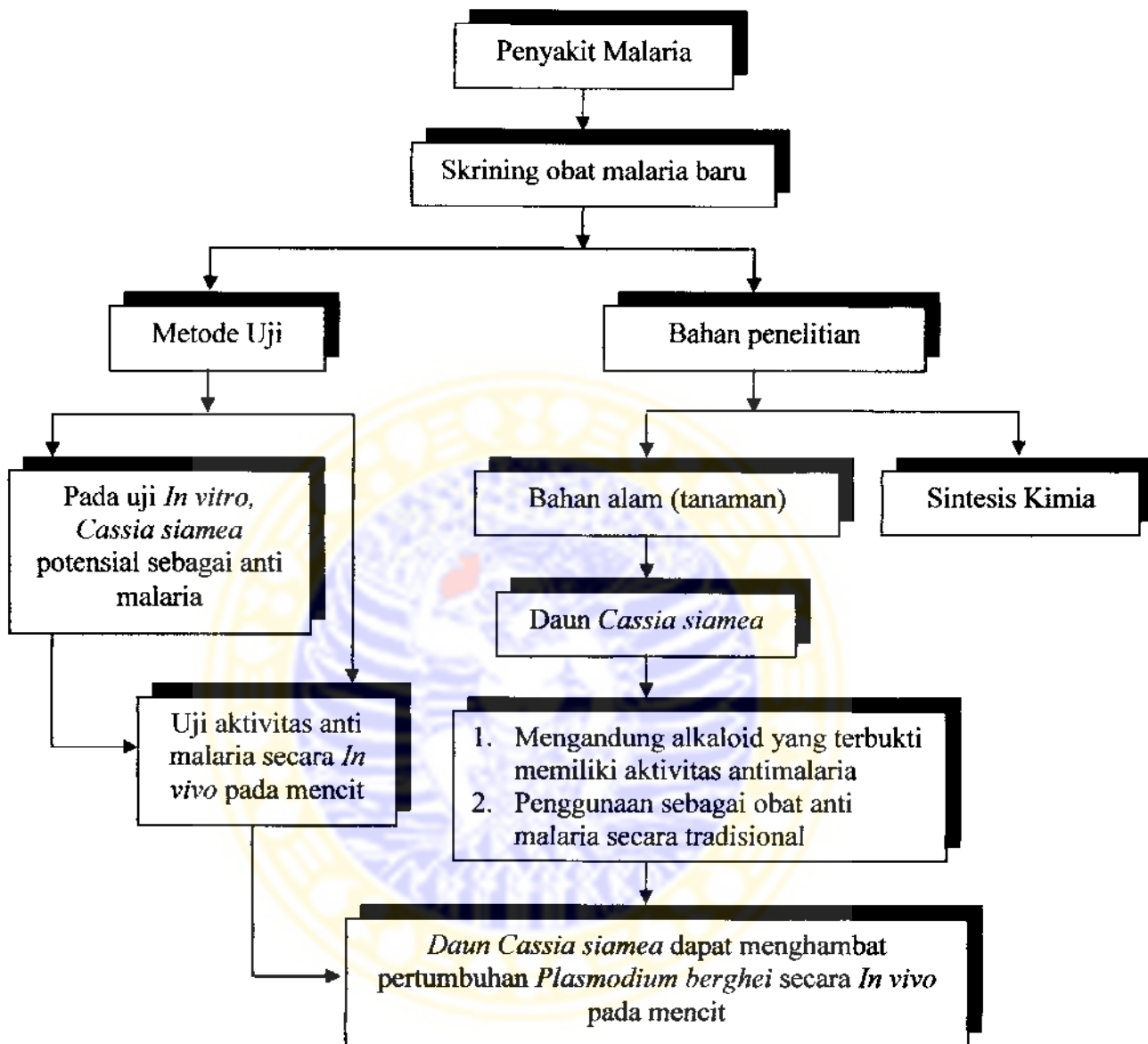
Daun *Cassia siamea* digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria. *Cassia siamea* mengandung senyawa dari golongan alkaloid dengan inti isokuinolina. Beberapa penelitian terdahulu menunjukkan bahwa senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antimalaria terhadap *P. falciparum* yang di uji secara *In vitro* oleh Ekasari (2001) menggunakan pelarut etanol menghasilkan ekstrak etanol mempunyai harga IC_{50} sebesar 7,06 $\mu\text{g/ml}$, lalu ekstraksi dilanjutkan dengan pelarut kloroform yang menghasilkan ekstrak kloroform mempunyai harga IC_{50} sebesar 2,41 $\mu\text{g/ml}$, lalu dilakukan pemisahan dengan kromatografi kolom vakum yang menggunakan pelarut n-heksan, etanol,

kloroform dengan berbagai perbandingan sampai didapatkan fraksi 16 ekstrak kloroform mempunyai harga IC_{50} sebesar $1,70 \mu\text{g/ml}$. Sedangkan Gbeassor (1989) telah menguji efek antimalaria ekstrak air *Cassia siamea* secara *in vitro* dan dinyatakan bahwa tanaman ini dapat menghambat 100 %.

Dengan demikian dapat diketahui pada penelitian secara *In vitro* Daun Johar (*Cassia siamea*) mempunyai aktivitas sebagai antimalaria. Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap Daun Johar (*Cassia siamea*) secara *In vivo* pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* guna pengembangan obat antimalaria dengan menggunakan metode yang dimodifikasi yaitu *The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*.

Pada penelitian ini digunakan pelarut air dalam sediaan infusa karena air merupakan pelarut semesta (dapat melarutkan senyawa polar, sebagian senyawa semipolar dan sedikit sekali senyawa non polar), stabil di suhu tinggi serta air adalah pelarut yang efisien, aman dan ekonomis. Selain itu kadar sari yang larut dalam air ($\pm 21,5 \%$) dan dalam etanol ($\pm 12 \%$), sehingga diharapkan sari yang terserap oleh pelarut air lebih besar. Kemudian sediaan disimpan dalam bentuk ekstrak kering dengan metode *freeze dry* dimana diharapkan sediaan dapat tahan lama, praktis dan cepat saji dalam penggunaannya serta mempermudah dalam penentuan dosis yang diberikan pada mencit.

3.2. Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan konseptual penelitian dan uji aktivitas antimalaria Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei in vivo* pada mencit.

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Bahan tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah semua bagian Daun Johar (*Cassia siamea*) yang diperoleh dan dideterminasi di Kebun Raya Purwodadi.

4.1.2 *Plasmodium berghei*

Plasmodium berghei yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain ANKA yang didapat dari Lembaga Biomolekular Eijkmann, Jakarta dan dikembangkan di laboratorium hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya melalui kultivasi pada mencit.

4.1.3 Hewan coba

Hewan coba yang digunakan dalam penelitian ini adalah mencit jantan galur Balb-C yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) Surabaya. Mencit yang digunakan adalah mencit dengan berat 20 - 30 g.

4.1.4 Bahan Perbandingan

Pada penelitian ini kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah klorokuin difosfat (Sigma C-6628, 25 gram, lot 7740650). Sedangkan untuk kontrol negatif digunakan CMC-Na yang dilarutkan dalam aquadest.

4.1.5 Bahan Lain untuk Uji Antimalaria secara *In vivo*

Bahan lain yang digunakan untuk uji antimalaria secara *In vivo* adalah medium Alceiver, pewarna Giemsa dalam dapar fosfat, metanol absolut, oleum imersi, aqua bidestilata.

4.1.6 Pelarut

Pelarut yang digunakan adalah aquadest.

4.2 Alat-alat

Beberapa alat yang digunakan ekstraksi yaitu : timbangan, toples, kain flanel, gelas ukur, beaker glas, erlenmeyer, alat *freeze dry*, batang pengaduk dan labu alas bulat.

Sedangkan alat-alat yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* antara lain : syringe dan jarum suntik, mikroskop dan glas obyek, corong, pipet tetes, gelas ukur, effendorf, vial, neraca analitik, lemari pendingin, oven, alat sonde, labu ukur 10,0 ml, dan 25,0 ml, pipet volume 5,0 ml dan 25,0 ml.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Pembuatan infusa Daun Johar (*Cassia siamea*)

Pembuatan infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dilakukan melewati beberapa tahapan yaitu :

1. Ditimbang sebanyak 10 gram Daun Johar (*Cassia siamea*).
2. Disiapkan panci infusa yang terdiri dari panci yang besar dengan panci yang kecil.
3. Diambil Daun Johar (*Cassia siamea*) yang telah ditimbang, masukkan ke dalam panci kecil, larutkan dengan aquadest sampai volume 100 ml.
4. Panci besar yang telah berisi air secukupnya dipanaskan sampai mendidih, untuk mengetahui suhu sudah mendidih dapat digunakan termometer.
5. Panci kecil dimasukkan ke dalam panci besar, tunggu ± 10 menit (menaikkan suhu mencapai 90°C) lalu panaskan selama ± 15 menit, sambil diaduk-aduk.
6. Diserkai selagi panas dengan kain flanel, tambahkan air panas secukupnya melalui ampas hingga diperoleh volume yang dikehendaki (100 ml) dan masukkan dalam wadah.

Sedangkan proses *freeze drying* dilakukan dengan cara :

1. Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dimasukkan ke dalam labu alas bulat sebanyak 100 ml, kemudian difreeze dry selama semalam.
2. Hasil berupa serbuk kering diambil, kemudian ditimbang dan masukkan wadah.
3. Disimpan di dalam eksikator.

4.3.2 Identifikasi Senyawa Alkaloid pada Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dengan Metode KLT

Serbuk kering Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dilarutkan dalam air kemudian dilakukan pemeriksaan pada plat KLT, yaitu :

- fase diam : Kieselgel GF 254
fase gerak : Kloroform : etanol (9 : 1)
Penampak noda : Preaksi dragendorf, bila timbul noda jingga pada plat maka hasil yang ditunjukkan adalah adanya alkaloid pada ekstrak tanaman tersebut.

4.3.3 Kultivasi *Plasmodium berghei*

4.3.3.1 Pemiakan *Plasmodium berghei* pada Mencit Donor

Pemiakan *Plasmodium berghei* pada mencit donor dilakukan melalui beberapa tahapan sebagai berikut : darah yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam medium Alsever's (1 : 3) dari simpanan beku dihangatkan di dengan tangan sambil digosok-gosok terus sampai mencair(dithawing), kemudian diinjeksikan sebanyak 200 μ l ke mencit uji secara intraperitoneal.

Setiap hari dilakukan pemeriksaan terhadap tingkat parasitemia dari mencit donor. Bila tingkat parasitemia mencit donor telah mencapai lebih dari 20 % maka telah dapat dilakukan pengambilan darah untuk pembuatan sediaan beku ataupun penularan pada mencit yang akan diberi perlakuan. Darah dapat dikumpulkan melalui ekor atau diambil dari jantung (melalui pembedahan).

Jika hendak dibuat simpanan beku, darah yang terkumpul ditambah dengan medium Alsever's (1:3) dan disimpan dalam freezer.

4.3.3.2 Pembiakan *Plasmodium berghei* pada Mencit yang Diberi Perlakuan

Mencit yang digunakan dalam pengujian ekstrak dibagi atas 8 kelompok, terdiri dari 6 kelompok coba dan 2 kelompok kontrol (negatif dan positif). Sebelum diuji, tiap kelompok tersebut terlebih dulu diinfeksi dengan *Plasmodium berghei* dengan cara :

1. Darah yang telah diperoleh dari mencit donor atau simpanan beku (telah dicairkan) diperiksa tingkat parasitemianya.
2. Sediaan darah diinjeksikan 0,2 ml secara intraperitoneal pada tiap mencit. Parasitemia dari mencit terinfeksi diamati hingga mencapai 1-5 % baru dapat diberi perlakuan.

4.3.3.3 Pembuatan Preparat Darah dan Perhitungan Parasitemia

4.3.3.3.1 Pembuatan Preparat Darah Tipis

Pada pembuatan preparat darah tipis ini menggunakan gelas objek sebagai tempat lapisan darah tipis, yaitu :

1. Ditetaskan ± 1 tetes darah yang diperoleh dengan jalan memotong ujung ekor mencit ke atas gelas obyek mikroskop, dengan bantuan satu sisi gelas obyek yang lain, ratakan darah tersebut, kemudian dikeringkan.
2. Setelah dikeringkan, fiksasi lapisan tipis tersebut dengan metanol absolut selama ± 1 detik.
3. Kemudian lapisan tipis dikeringkan pada suhu kamar.
4. Ditambahkan pewarna Giemsa.
5. Sediaan hapusan darah tipis diperiksa dengan mikroskop dengan perbesaran 1.000 kali.

Untuk parasit malaria inti berwarna merah dan plasma berwarna biru, sel darah berwarna merah muda, titik "Schuffner" berwarna merah tua.

4.3.3.3.2 Menghitung Parasitemia

Parasitemia adalah perbandingan sel darah merah yang terinfeksi parasit malaria dengan sel darah merah yang tidak terinfeksi. Parasitemia dapat ditentukan dengan mikroskop dihitung 4 lapang pandang yang berisi ± 100 eritrosit per lapang pandang. Sedangkan untuk jumlah parasitemia yang kecil (<1%), dihitung sampai 4.000 eritrosit. (Fidock *Et al.*, 2004)

4.3.4 Penyiapan Bahan Uji

Sebagai bahan uji adalah infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) yang dibuat dengan dosis 400, 200, 100, 50, 25, dan 12.5 mg/kg berat badan mencit dengan cara :

1. Ditimbang serbuk kering 1000 mg, kemudian dilarutkan dalam aquadest lalu ditambah CMC-Na 0,5 % dalam aquadest ad 25,0 ml (400 mg/kgBB), larutan ini disebut D₁.
2. Dipipet dari D₁ sebanyak 12,5 ml, dilarutkan dalam CMC-Na 0,5 % dalam aquadest ad 25,0 ml (200 mg/kgBB), larutan ini disebut D₂.
3. Dipipet dari D₂ sebanyak 12,5 ml, dilarutkan dalam CMC-Na 0,5 % dalam aquadest ad 25,0 ml (50 mg/kgBB), larutan ini disebut D₃.
4. Dipipet dari D₃ sebanyak 12,5 ml, dilarutkan dalam CMC-Na 0,5 % dalam aquadest ad 25,0 ml (25 mg/kgBB), larutan ini disebut D₄.
5. Dipipet dari D₄ sebanyak 12,5 ml, dilarutkan dalam CMC-Na 0,5 % dalam aquadest ad 25,0 ml (12,5 mg/kgBB), larutan ini disebut D₅.

Sebagai kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan 10 mg/kgBB larutan ini disebut K+, sedangkan pada kontrol negatif aquadest dilarutkan dalam CMC-Na 0,5 % dalam aquadest ad 10,0 ml disebut K-.

4.3.4.1 Pelaksanaan Uji Aktivitas Antimalaria Secara *In vivo*

Setelah mencit coba dan mencit kontrol mencapai tingkat parasitemia antara 1-5 % maka pengujian aktivitas antimalaria dari ekstrak dapat dilakukan dengan cara sebagai berikut :

1. Dilakukan pengambilan sampel darah dari ekor mencit untuk dihitung parasitemia pada hari sebelum pengujian.
2. Ekstrak uji, terdiri dari dosis 400, 100, 50, 25 dan 12,5 mg/kg berat badan dalam vial disiapkan beserta alat sonde yang akan digunakan.
3. Satu persatu mencit diberi perlakuan secara oral dengan 200 μ l suspensi ekstrak uji sesuai dengan pembagian dosis yang telah ditentukan, selama 4 hari (h₀-h₃).

4. Pada hari-hari berikutnya dilakukan pengambilan sampel darah sebelum mencit diberi perlakuan berikutnya. Pengambilan darah dilakukan hingga hari ke-7 setelah perlakuan dimulai (h_0-h_6).

Pengamatan parasitemia dilakukan setiap hari mulai hari pertama penginfeksi sampai dengan hari ke tujuh dengan mengambil sampel darah dari ekor dan dibuat hapusan tipis bertujuan untuk mengamati perkembangan aksi obat di dalam tubuh, sedangkan nilai ED_{50} dihitung dari data sampai hari kelima penginfeksi.

4.3.5 Analisis Parasit

4.3.5.1 Perhitungan Jumlah Parasit

Dari hapusan darah tipis diamati jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit malaria kemudian dihitung berapa persen penghambatan dengan cara penghitungan sebagai berikut :

1. Prosentase Parasitemia :

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

2. Prosentase Pertumbuhan :

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \frac{P(d_2-d_1) + P(d_3-d_2) + \dots + P(d_7-d_6)}{(n-1)}$$

Keterangan :

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

3. Prosentase Penghambatan

Prosentase penghambatan dihitung dengan rumus :

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

Keterangan :

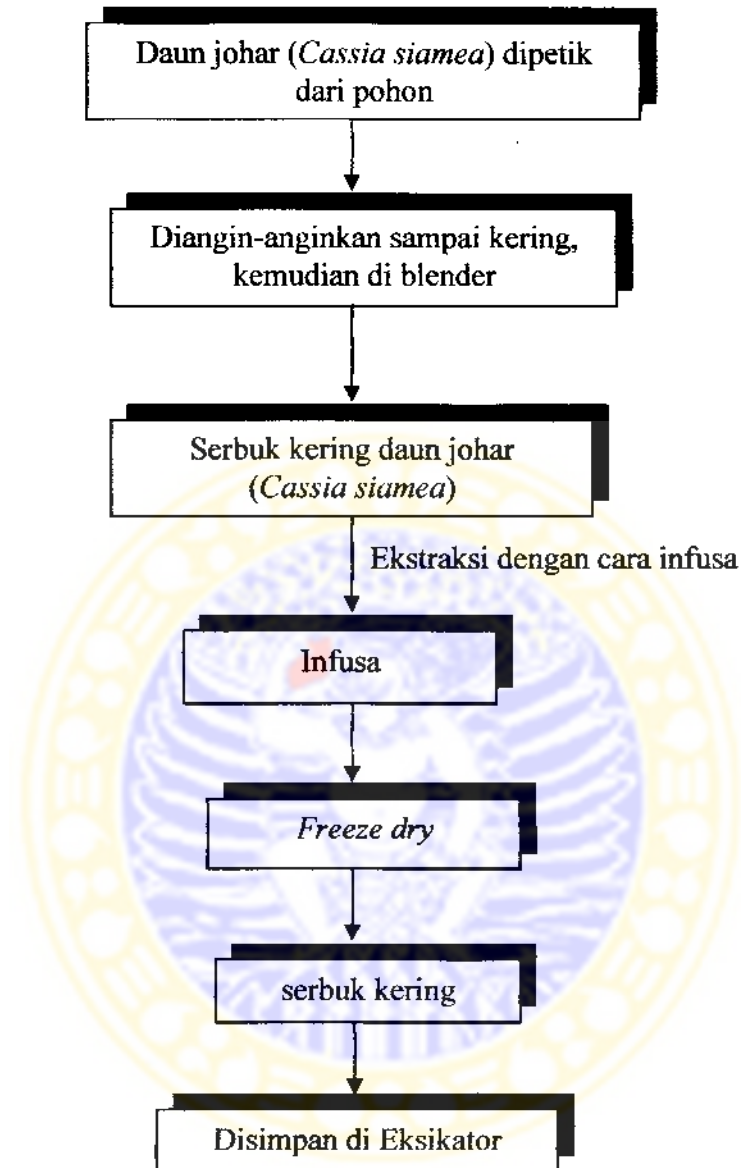
X_e = % pertumbuhan rata-rata parasit pada tiap dosis bahan uji.

X_k = % pertumbuhan rata-rata parasit pada kontrol negatif.

4.3.5.2 Analisis Data

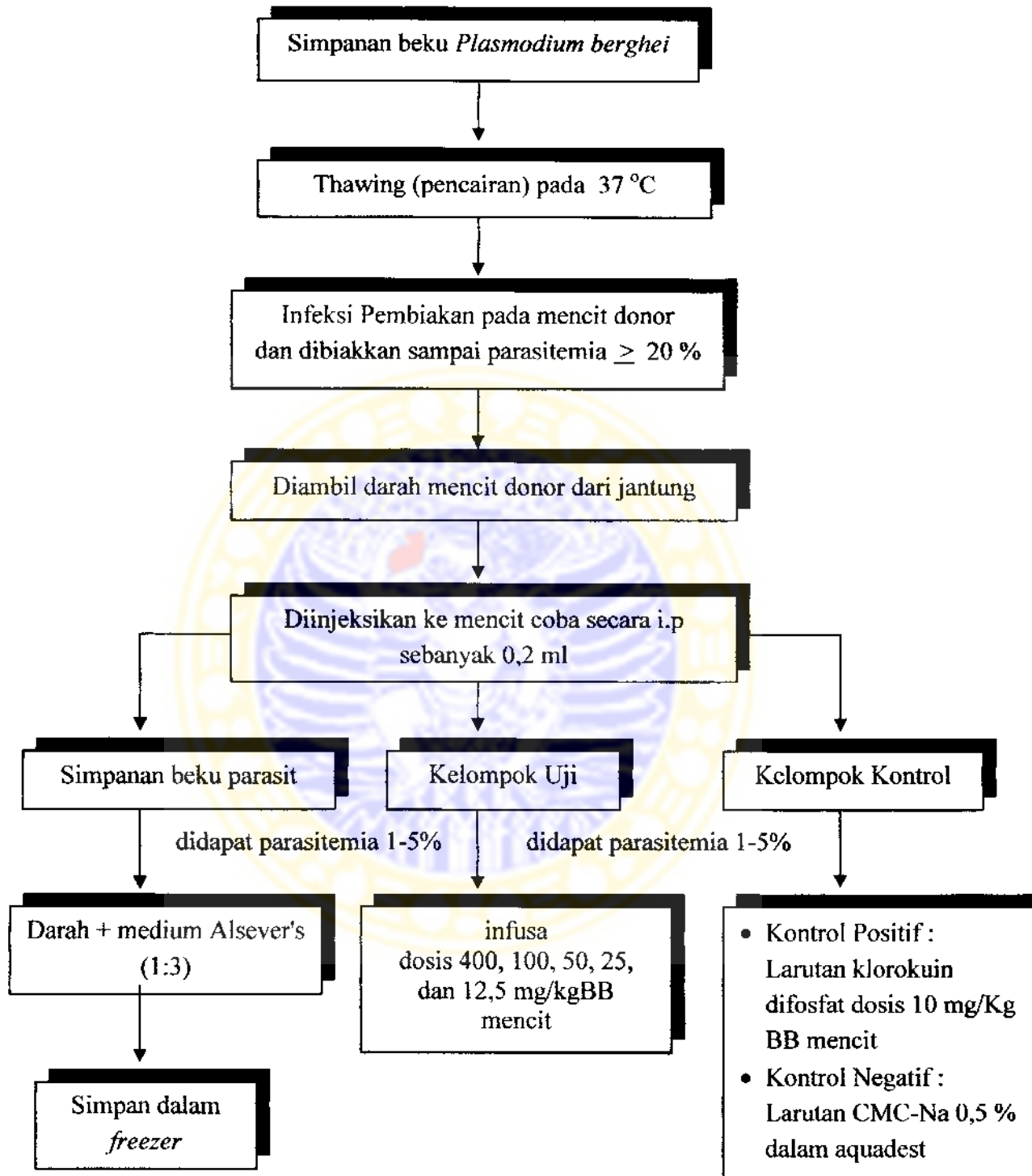
Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan analisis probit yang selanjutnya digunakan untuk menghitung ED_{50} (konsentrasi infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) yang mempunyai daya hambat terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebesar 50 %).

4.4 Skema Pembuatan Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*)



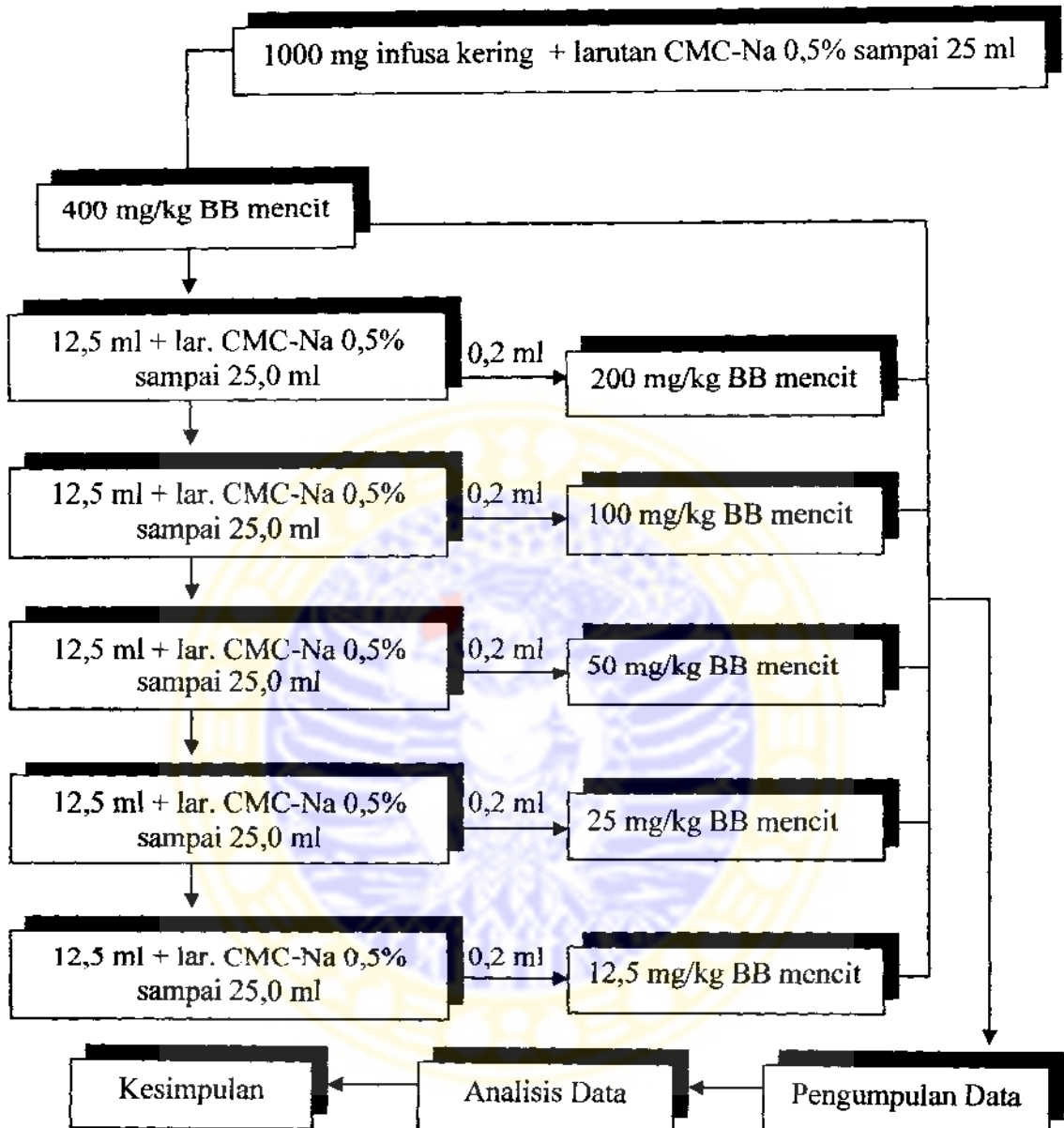
Gambar 4.1 Skema proses pembuatan Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*)

4.5 Skema Penyiapan Parasit dan Uji Aktivitas Antimalaria



Gambar 4.2 Skema penyiapan parasit dan uji aktivitas antimalaria

4.6 Skema Rancangan Penelitian Aktivitas Antimalaria Infusa Daun Johar (*Cassia Siamea*) Secara *In Vivo*



Gambar 4.3 Skema rancangan penelitian aktivitas antimalaria infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vivo* pada mencit.

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

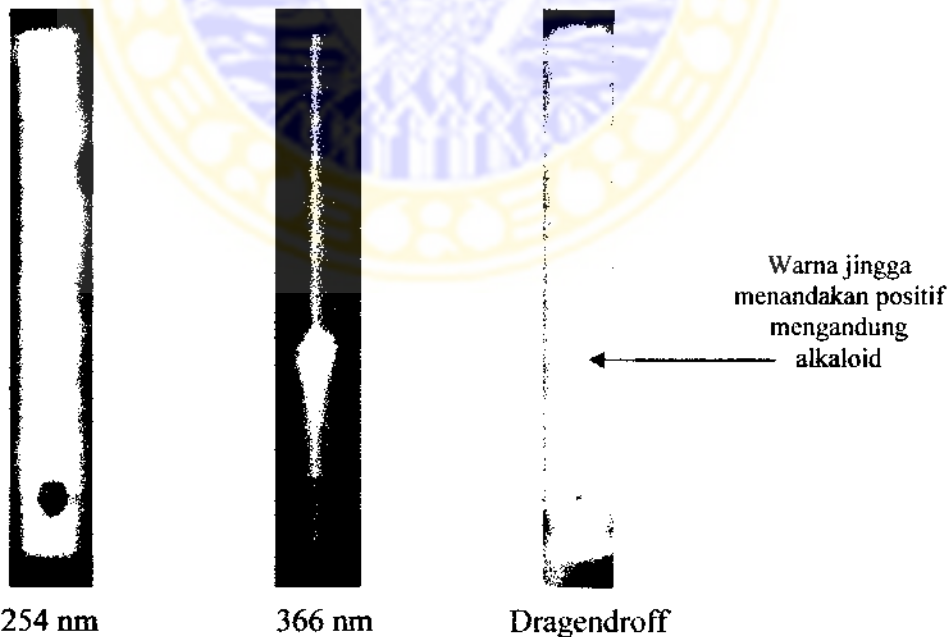
5.1 Pembuatan infusa Simplisia Daun *Cassia siamea*

Dari Daun Johar (*Cassia siamea*) sebanyak 10 gram didapatkan infusa dengan volume 100 ml. Kemudian proses *freeze dry* selama semalam lalu ditimbang dihasilkan 2,4 gram serbuk dan dimasukkan wadah lalu disimpan di dalam eksikator.

5.2 Profil KLT Senyawa Alkaloid dari Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*)

Profil KLT Senyawa Alkaloid infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dilakukan dengan uji senyawa golongan alkaloid dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT).

- Bahan : infusa Daun Johar (*Cassia siamea*)
 Fase diam : Kieselgel GF 254
 Fase gerak : Kloroform : Etanol = 9 : 1
 Penampak noda : Dragendroff
 Hasil : Terdapat noda berwarna jingga dengan $R_f = 0,26$



Gambar 5.1 Hasil KLT dari infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) terhadap senyawa alkaloid

5.3 Pembuatan Suspensi Uji

Dari infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) berupa serbuk, dibuat suspensi dengan menimbang 1000 mg dan dilarutkan dalam CMC Na 0.5 % dalam labu ukur sampai tepat 25 ml, kemudian diencerkan dan dibuat 6 macam dosis, yaitu dosis 400 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg, 25 mg/kg dan 12,5 mg/kg berat badan.

5.4 Pembuatan Larutan Kontrol

Pada penelitian ini digunakan larutan kontrol negatif yang digunakan yaitu suspensi CMC Na 0,5 %. Cara pembuatannya adalah ditimbang 0,5 gram CMC Na, ditaburkan sedikit demi sedikit secara merata di atas 10 ml aquades panas. Dibiarkan selama 10-15 menit, kemudian diaduk sampai homogen, dan ditambah aquades. Setelah homogen dimasukkan dalam labu ukur dan ditambah aquades sampai tepat 100 ml.

Sedangkan untuk kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan menimbang 10 mg dan dilarutkan dalam CMC Na 0,5 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml. Dosis yang digunakan untuk kontrol positif 10 mg/kgBB; 5 mg/kgBB; 1 mg/kgBB; 0,5 mg/kgBB; 0,1 mg/kgBB; 0,05 mg/kgBB; 0,01 mg/kgBB.

5.5 Hasil Uji Aktivitas Antimalaria

Pengambilan hapusan darah yang dibuat dengan pewarnaan Giemsa diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000 kali mulai D₀ sampai D₆. Hasil pengamatan terhadap aktivitas antimalaria dapat dilihat pada tabel V.2.

Tabel V.1 Persen Parasitemia dari Pengujian infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dan kontrol secara *in vivo*

Dosis (mg/kg BB)	Replikasi	% Parasitemia						
		Hari						
		H ₀	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆
400	1	2,99	6,01	9,12	10,36	11,26	14,88	21,92
	2	2,71	5,64	7,88	8,82	10,24	13,85	18,10
	3	3,10	5,20	7,52	8,26	11,07	13,24	16,22
200	1	3,31	3,76	6,86	8,99	11,64	-	-
	2	2,55	6,65	9,00	10,00	11,04	13,28	19,41
	3	3,94	6,18	8,73	11,79	12,04	16,15	19,90
100	1	3,02	5,19	6,63	9,29	11,89	15,20	19,67
	2	2,67	4,46	7,52	10,05	11,12	18,28	-
	3	2,21	5,81	7,22	10,33	11,53	15,21	19,57
50	1	1,89	4,26	6,67	10,73	11,71	16,47	20,49
	2	3,69	6,01	7,55	9,93	12,96	15,59	18,41
	3	2,43	5,51	7,39	9,64	12,08	17,25	20,09
25	1	2,23	5,40	8,16	10,38	11,57	17,45	22,17
	2	2,64	5,02	9,34	10,46	12,57	13,64	17,83
	3	2,78	5,22	8,65	10,95	13,64	-	-
12,5	1	3,07	6,13	7,49	10,87	13,21	18,15	22,42
	2	2,41	5,31	8,01	10,54	13,71	14,76	19,31
	3	2,85	4,38	6,86	9,85	14,56	17,05	20,98
Kontrol Negatif	1	3,26	9,09	13,60	15,65	20,93	23,33	25,93
	2	2,46	9,69	10,60	12,86	20,99	27,55	30,70
	3	1,84	9,26	9,54	16,27	19,89	20,35	20,50

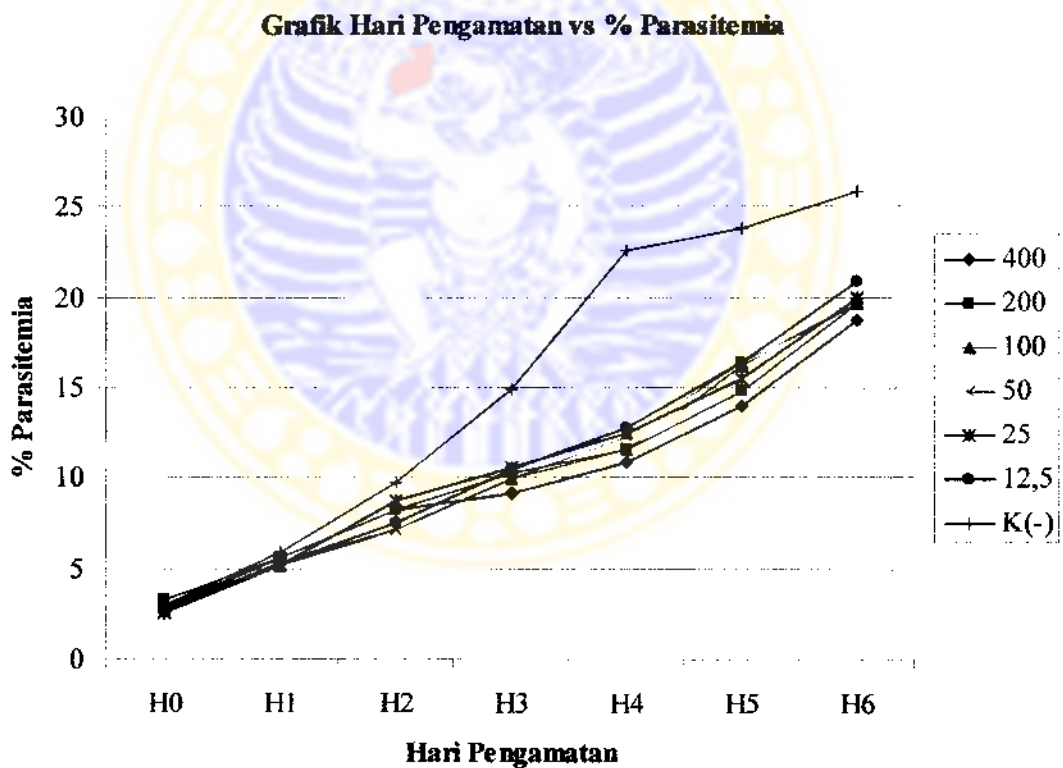
Keterangan :

H₀ – H₆ : Hari ke-0 sampai hari ke-6

- : mencit mati

Tabel V.2 Persen Parasitemia Rata-rata dari pengujian infusa Daun Johar (*Cassia siamea*)

Hari	400 mg/kgBB	200 mg/kgBB	100 mg/kgBB	50 mg/kg BB	25 mg/kgBB	12,5 mg/kgBB	K(-) mg/kgBB
H ₀	2,93	3,27	2,63	2,67	2,55	2,78	4,27
H ₁	5,61	5,53	5,15	5,26	5,21	5,27	8,64
H ₂	8,17	8,19	7,12	7,20	8,71	7,45	12,96
H ₃	9,15	10,26	9,89	10,10	10,59	10,42	13,36
H ₄	10,85	11,57	11,51	12,25	12,59	13,83	23,16
H ₅	13,99	14,75	16,23	16,43	15,55	16,46	23,11
H ₆	18,75	19,65	19,62	19,66	20,00	20,90	31,83

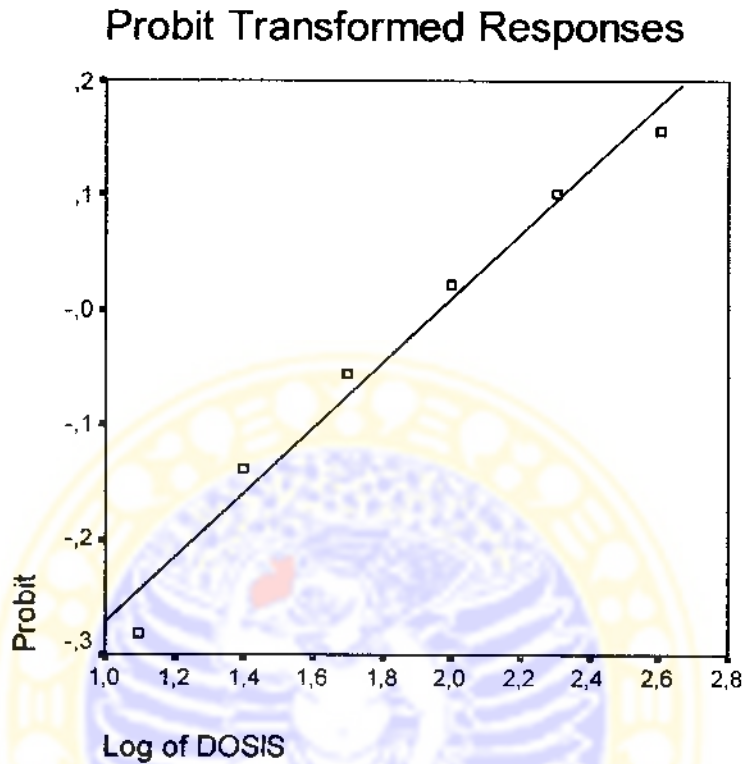


Gambar 5.2 Grafik Persen parasitemia pengujian infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) selama 7 hari pengamatan

Tabel V.3 Persen Parasitemia Rata-rata dari infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dan kontrol secara *in vivo*

Dosis (mg/kg BB)	Replikasi	Persen pertumbuhan (%)	Persen pertumbuhan rata-rata (%)	Persen penghambatan (%)
400	1	2,06	1,98	56,19
	2	1,88		
	3	1,99		
200	1	2,08	2,08	53,98
	2	2,12		
	3	2,03		
100	1	2,21	2,22	50,88
	2	2,12		
	3	2,33		
50	1	2,45	2,36	47,79
	2	2,23		
	3	2,41		
25	1	2,34	2,51	44,47
	2	2,48		
	3	2,72		
12,5	1	2,54	2,76	38,94
	2	2,83		
	3	2,93		
Kontrol Negatif	1	4,42	4,52	-
	2	4,63		
	3	4,51		

Harga ED_{50} dari infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dan kontrol secara *in vivo* diperoleh sebesar 92,38 mg/kg BB. Profil kurva probit persen penghambatan terhadap log dosis dapat dilihat dibawah ini :



Gambar 5.3 Kurva Hubungan Probit Persen Penghambatan Terhadap Log Dosis infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) dan kontrol secara *in vivo*

Tabel V.4 Persen pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada klorokuin difosfat sebagai kontrol positif

Dosis (mg/kgBB)	Replikasi	% Parasetimia						
		Hari pengamatan						
		H ₀	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆
10	1	3,84	3,13	0,99	0,98	0,96	1,10	2,94
	2	1,05	0,94	0,72	0,65	0,53	0,55	1,24
	3	2,91	2,08	0,79	0,65	0,43	1,08	1,96
5	1	3,14	1,82	2,99	2,05	4,75	4,56	13,33
	2	3,66	2,66	1,36	4,00	5,08	6,09	10,43
	3	2,76	2,22	1,30	1,36	4,70	3,18	13,83
1	1	3,34	4,07	5,42	7,42	8,71	12,58	23,03
	2	3,28	5,16	6,17	9,93	7,84	7,77	13,44
	3	3,08	4,89	7,22	-	-	-	-
0,5	1	4,06	11,37	7,44	8,79	6,81	15,20	18,43
	2	3,20	7,12	8,81	9,12	10,40	16,88	18,92
	3	1,99	3,26	7,64	-	-	-	-
0,1	1	2,80	5,51	7,81	7,24	10,87	10,16	15,56
	2	1,18	4,44	6,25	8,47	11,10	17,28	18,82
	3	4,81	15,74	16,74	-	-	-	-
0,05	1	3,38	11,00	8,57	8,96	10,83	17,71	23,80
	2	4,02	5,74	6,41	7,68	15,98	16,82	19,79
	3	2,51	4,91	8,60	6,46	11,00	14,73	18,48
Kontrol negatif	1	3,26	9,09	13,60	15,65	20,93	23,33	25,93
	2	2,46	9,69	10,60	12,86	20,99	27,55	30,70
	3	1,84	9,26	9,54	16,27	19,89	20,35	20,50

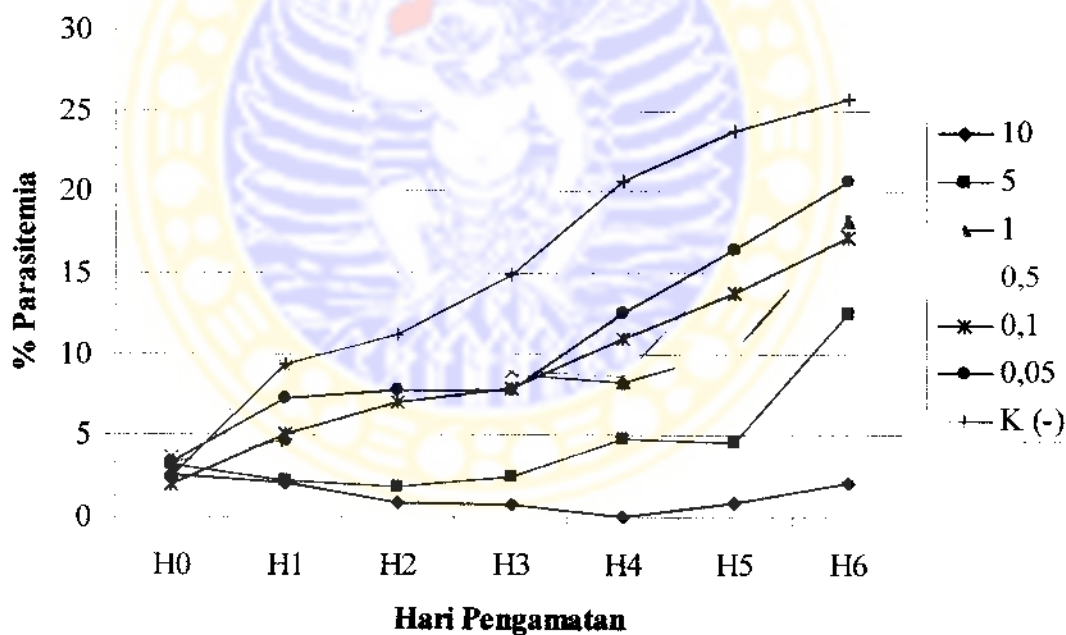
Keterangan :

H₀ – H₆ : Hari ke-0 sampai hari ke-6

- : mencit mati

Tabel V.5 Persen parasitemia rata-rata hasil pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif selama 7 hari pengamatan

Hari	10 mg/kgBB	5 mg/kgBB	1 mg/kgBB	0,5 mg/kg BB	0,1 mg/kgBB	0,05 mg/kgBB	K(-) mg/kgBB
H ₀	2,60	3,19	3,31	3,63	1,99	3,30	2,52
H ₁	2,05	2,23	4,62	9,25	4,98	7,22	9,36
H ₂	0,83	1,88	5,80	8,13	7,03	7,80	11,25
H ₃	0,76	2,47	8,68	8,96	7,86	7,70	14,93
H ₄	0,64	4,84	8,28	8,61	10,99	12,60	20,6
H ₅	0,91	4,61	10,18	16,04	13,72	16,42	23,74
H ₆	2,05	12,53	18,24	18,68	17,19	20,69	25,71

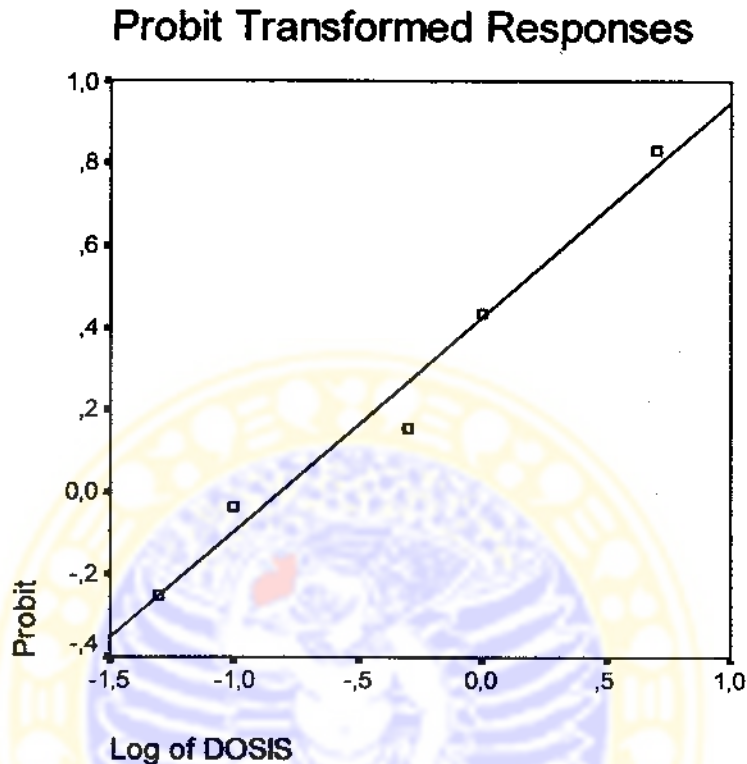


Gambar 5.4 Grafik persen parasitemia pemberian klorokuin difosfat dan kontrol negatif selama 7 hari pengamatan

Tabel V.6 Persen pertumbuhan *Plasmodium berghei* dan persen penghambatan dari klorokuin difosfat sebagai kontrol positif dari $H_0 - H_4$

Dosis (mg/kg BB)	Replikasi	% pertumbuhan parasitemia	% pertumbuhan rata-rata	% penghambatan
10	1	0,00	0,00	100,00
	2	0,00		
	3	0,00		
5	1	1,34	0,92	79,74
	2	0,93		
	3	0,85		
1	1	1,34	1,50	66,76
	2	1,66		
	3	-		
0,5	1	2,17	1,98	56,15
	2	1,80		
	3	-		
0,1	1	2,16	2,32	48,68
	2	2,48		
	3	-		
0,05	1	2,47	2,71	40,15
	2	2,99		
	3	2,66		
Kontrol negatif	1	4,42	4,52	-
	2	4,63		
	3	4,51		

Harga ED_{50} dari Klorokuin difosfat sebagai kontrol positif diperoleh sebesar 0,1561 mg/kg BB. Profil kurva probit persen penghambatan terhadap log dosis dapat dilihat dibawah ini :



Gambar 5.5 Kurva Hubungan Probit Persen Penghambatan Terhadap Log Dosis Klorokuin Difosfat

5.6 Analisis Data

Data persen penghambatan dan dosis dari uji aktivitas antimalaria terhadap hewan coba berupa mencit setelah dianalisis dengan analisis probit diperoleh informasi mengenai ED_{50} dari infusa daun *Cassia siamea* terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit sebesar 92,38 mg/kgBB, sedangkan untuk kontrol positif didapatkan ED_{50} sebesar 0,16 mg/kgBB.

BAB VI

PEMBAHASAN

Pada penelitian terdahulu telah diuji aktivitas antimalaria dari Daun Johar (*Cassia siamea*) secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* yang dilakukan oleh Ekasari (2001) dengan harga IC_{50} untuk ekstrak etanol sebesar 7,06 $\mu\text{g/ml}$, ekstrak kloroform dengan harga IC_{50} 2,41 $\mu\text{g/ml}$ untuk fraksi 16 ekstrak kloroform didapatkan harga IC_{50} 1,70 $\mu\text{g/ml}$, penelitian juga dilakukan oleh Kusumaningrum (2004) didapatkan ED_{50} dari ekstrak kloroform Daun Johar (*Cassia siamea*) sebesar 19,59 mg/kgBB secara *in vivo*. Dengan demikian dapat diketahui pada penelitian secara *In vitro* Daun Johar (*Cassia siamea*) mempunyai aktivitas sebagai antimalaria. Berdasarkan hasil penelitian tersebut perlu dilakukan penelitian lebih lanjut yaitu uji aktivitas Daun Johar (*Cassia siamea*) dengan pelarut air dengan metode infusa.

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah infusa, dimana banyak sediaan obat tradisional yang pengolahannya mirip dengan metode ini dan merupakan metode yang paling mudah dan hemat biaya. Selain itu, pada penelitian terdahulu banyak digunakan pelarut organik yang bisa berbahaya bagi tubuh, sedang pada infusa digunakan pelarut air. Penggunaan pelarut air dalam penelitian ini dipilih karena dari beberapa penelitian di atas telah menggunakan beberapa pelarut yang biasa dipakai, maka digunakan pelarut air untuk mengetahui aktivitas senyawa dalam pelarut air. Selain itu air adalah pelarut semesta yang bisa melarutkan banyak senyawa.

Penelitian ini dimulai dari pengumpulan bahan, dicuci dan dikeringkan dalam oven 30°-40°C sampai kering kemudian daun dipetik dan diblender untuk mendapatkan serbuk kering.

Pada proses pembuatan infusa, ditambahkan air tujuan penambahan air ekstra dalam infusidasi adalah untuk membasahi serbuk yang akan diinfusidasi. Volume infusa dalam penelitian ini adalah 100 ml, jika tidak didapat volume 100 ml maka ditambahkan air mendidih melalui ampasnya sampai dengan diperoleh 100 ml, sediaan infusa ini merupakan larutan stok untuk pembuatan variasi dosis sediaan infusa untuk perlakuan.

Sebelum dilakukan uji pada mencit, sediaan infusa difreeze dry, sehingga dalam bentuk serbuk. Pada proses pembuatan infus dari 100 ml difreeze dry menghasilkan 2,4 gram serbuk kemudian disimpan dalam eksikator. Perlakuan ini bertujuan yaitu karena kekurangan pelarut air adalah tidak tahan lama (tidak bisa bertahan lebih dari 1 minggu dalam penyimpanan) sehingga sediaan dapat tetap awet jika dipergunakan berkali-kali tanpa harus membuat infusa baru lagi yang bisa mempengaruhi kadar dari ekstrak.

Metode uji pada makhluk hidup yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Peter dengan berbagai penyesuaian. Pada pemberian ekstrak uji, diberikan dosis antara 12,5-400 mg/kgBB, sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Wahjoedi (1996) infus dari daun *Cassia siamea* pada pemberian tiap hari sampai 4 bulan dengan dosis sampai 500mg/100 gBB pada tikus(\pm 150 mg/kgBB mencit) tidak menunjukkan efek toksikologi pada internal organ tubuh hewan coba seperti hati, paru-paru, pankreas, ginjal dan usus. Jadi pemberian dosis diberikan dengan interval 12,5 mg/kgBB, 25 mg/kgBB, 50 mg/kgBB, 100 mg/kgBB, 200 mg/kgBB dan 400 mg/kgBB.

Sedangkan untuk parasit yang digunakan adalah *Plasmodium berghei* karena sesuai untuk objek uji yaitu mencit dan memiliki sifat infeksi yang lebih ganas dari parasit yang lain.

Uji aktivitas pada malaria pada penelitian ini dilakukan secara eksperimental *in vivo* (hewan utuh). Kelebihan dari penggunaan hewan utuh sebagai subyek uji dibanding dengan organ terisolir karena hewan utuh memberikan *over all/net effect* dari suatu obat karena obat telah mengalami proses ADME sedangkan pada organ terisolir obat tidak mengalami proses ADME. Selain itu uji *in vivo* pada hewan merupakan termasuk uji praklinis dimana jika mempunyai efek positif bisa dilanjutkan dengan uji klinis pada manusia.

Untuk mengetahui potensi infusa Daun Johar (*Cassia siamea*), maka hasilnya dibandingkan dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin difosfat yang selama ini dikenal sebagai standar uji aktivitas antimalaria. Sebagai parameter yang dapat dibandingkan adalah ED₅₀. Untuk mendapatkan ED₅₀ dari klorokuin difosfat, seperti halnya uji pada infusa

juga dilakukan uji pada beberapa dosis klorokuin difosfat. Dosis yang akan digunakan untuk uji kontrol positif (klorokuin difosfat) adalah 10 mg/kg BB; 5 mg/kg BB; 1 mg/kg BB; 0,5 mg/kg BB; 0,1 mg/kg BB; 0,05 mg/kg BB. Sedangkan untuk kontrol negatif digunakan CMC Na yang dengan maksud untuk menjaga homogenitas dosis dan sebagai suspending agent untuk mensuspensikan serbuk serbuk hasil *freeze dry*.

Hasil dari aktivitas anti malaria adalah berupa sampel hapusan darah tipis bertujuan menguji sampel secara kuantitatif dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi dengan menggunakan mikroskop cahaya pada pembesar 1000x. Dalam teknik pengambilan sampel hapusan daerah tipis, hapusan yang telah kering dibasahi dengan metanol, tujuannya adalah untuk fiksasi (menghilangkan tapak-tapak air yang berasal dari darah menciit dan menghindari kerusakan hapusan darah setelah diambil).

Sampel yang diperoleh merupakan sampel dari tiap perlakuan baik kontrol negatif, kontrol positif maupun sampel pada berbagai dosis pada masing-masing uji tiap kelompok. Setiap hari selama 4 hari dari sampel tersebut dilakukan penghitungan banyaknya jumlah eritrosit yang terinfeksi *P. berghei* setiap 5000 eritrosit tiap sampel. Pengambilan darah dilanjutkan sampai pada hari ke 6 dengan tanpa pemberian ekstrak, hal ini bertujuan untuk mengetahui efek obat terhadap tubuh.

Dari hasil pengamatan, diketahui laju pertumbuhan *P. berghei* pada tiap kelompok perlakuan mengalami peningkatan dan laju pertumbuhan *P. berghei* terbesar ada pada kelompok kontrol negatif, sedang pada kontrol positif hampir seperti tidak ada. Peningkatan laju pertumbuhan pada kelompok perlakuan sediaan infusa tersebut ada pada dosis 12,5 mg/kgBB dan terkecil pada dosis 400 mg/kgBB, Dari grafik dapat diketahui bahwa pemberian perlakuan pada tiap kelompok perlakuan sediaan infusa mempengaruhi laju pertumbuhan pada *P. berghei* pada menciit yang terinfeksi.

Sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Peters (1970) pada penelitian ini data yang diolah untuk pengambilan kesimpulan adalah parasitemia hari ke 4, untuk prosentase parasitemia hari ke 4 tiap kelompok perlakuan dapat dilihat pada tabel. Prosentase parasitema hari ke-4 kelompok kontrol positif dan

sediaan infusa pada tiap dosis pada masing-masing mencit uji kemudian diubah menjadi prosen penghambatan dengan rumus prosen penghambat. Hasil perhitungan prosen penghambatan pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan infusa pada masing-masing dapat dilihat pada tabel.

Dari data tersebut dapat dilihat semakin dosis sediaan infusa yang diberikan hingga dosis 400 mg/kgBB semakin besar pula efek penghambat pada pertumbuhan dan perkembangan *P. berhei*. Dari data tersebut diketahui penghambat terbesar terlihat pada dosis 400 mg/kgBB dengan besar penghambatan 56,19 %.

Untuk mendapatkan ED₅₀ dilakukan penghitungan mulai D₀ sampai D₄ dan dilanjutkan D₆ dengan tujuan memperoleh profil pertumbuhan parasit setelah pemberian suspensi uji dihentikan. Dari prosen penghambatan pada tiap dosis, dicari harga ED₅₀ sedang untuk pengolahan data untuk mendapatkan harga ED₅₀ ini dengan menggunakan metode analisis probit. Dari data yang dimasukkan kemudian diolah diperoleh harga ED₅₀ infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) sebesar 92,38 mg/kgBB.

Dari Grafik hubungan antara persen parasitemia pengujian infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) selama 7 hari pengamatan pada halaman 38, terlihat profil penghambatan dari infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) jika dibandingkan dengan kontrol negatif. Terlihat bahwa terjadi hambatan tetapi jika dibandingkan dengan grafik kontrol positif jarak hambatan antar dosis sangat kecil sehingga terlihat pembagian dosis tidak begitu signifikan terhadap parasit, sehingga pada penelitian lanjutan perlu dilakukan uji secara *multiple dose*.

Selama empat hari pemberian suspensi uji, yaitu D₀ sampai D₃ terlihat adanya penghambatan pertumbuhan parasit. Meskipun jumlah parasit tidak mengalami penurunan, tetapi pertumbuhan dari parasit tidak mengalami peningkatan yang besar. Setelah pemberian suspensi uji dihentikan terjadi peningkatan pertumbuhan parasit yang berarti pada mencit coba. Dari data ini diperkirakan bahwa senyawa aktif yang diduga efektif sebagai antimalaria yaitu alkaloid dari daun *Cassia siamea* ini efeknya tidak bertahan lama dalam tubuh, hal ini dapat disebabkan terjadinya metabolisme yang berlangsung secara cepat sehingga dalam tubuh diubah menjadi bentuk yang tidak aktif atau ada mekanisme

lain yang belum diketahui dapat mempengaruhinya. Sehingga berkurangnya kadar senyawa berkhasiat dalam darah tersebut menyebabkan populasi parasit yang tidak terpengaruh pertumbuhannya oleh pemberian larutan uji bermultiplikasi kembali. Hal ini menunjukkan bahwa infusa daun *Cassia siamea* belum dapat mematikan parasit, tetapi hanya dapat menghambat pertumbuhan parasit.

Pada penelitian yang lain, yaitu efek hepatoprotektif infus Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) telah dibuktikan bahwa ekstrak Daun Johar termasuk bahan yang tidak beracun. Secara *in vivo* ekstrak tersebut tidak bersifat *plasmocidic* pada *P. berghei*, tapi memperpanjang masa hidup mencit tertular, karena limpa dan hatinya tidak rusak. Daun Johar juga memiliki daya imunostimulasi (merangsang produksi zat kekebalan tubuh), bersifat antipiretik yang potensinya seperti asetosal. Infusnya juga bersifat hepatoprotektif (melindungi hati dari kerusakan). (Setyandarta, 1993)

Persen penghambatan klorokuin difosfat secara peroral sampai hari ketujuh dosis 10 mg/kg BB menghasilkan penghambatan 100% pada dosis 10 mg/kg BB. Setelah pemberiannya dihentikan, klorokuin difosfat masih menunjukkan adanya penghambatan terhadap pertumbuhan parasit. Hal ini dikarenakan Klorokuin difosfat mempunyai $t_{1/2}$ yang sangat panjang, yaitu 127 jam (Ritchel, 1986) sehingga saat pemberian ekstrak dihentikan, masih terdapat sejumlah obat dalam tubuh dalam waktu yang cukup lama sehingga dapat memberikan penghambatan terhadap pertumbuhan parasit.

Karena sediaan infusa diketahui berefek terhadap pertumbuhan *P. berghei* maka dilakukan skrining dengan menggunakan metode KLT. Penggunaan metode KLT ini diarahkan pada deteksi adanya senyawa alkaloid, yang sudah diketahui aktif terhadap malaria. Dalam sediaan infusa untuk menampakkan alkaloid digunakan pereaksi semprot dragendrof, untuk mengetahui keberadaan senyawa selain itu juga angka RF yang diperoleh. Hasil penelitian membuktikan bahwa sediaan uji terdapat senyawa alkaloid karena pada lempeng KLT yang telah disemprot dragendrof memberi bercak berwarna jingga yang menunjukkan positif mengandung alkaloid. Bercak berwarna jingga tersebut kemungkinan bercak tersebut merupakan senyawa alkaloid (stahl, 1985) hal ini ditegaskan oleh Kosasih dkk (1985) yang menyatakan adanya alkaloid.

Pada penelitian yang dilakukan sebelumnya oleh Dzulkarnain, B. et. al., (1992/1993) diketahui, sampai dosis 100 mg serbuk daun/100 g tikus dalam bentuk infus oral tidak mengurangi jumlah eritrosit (sel darah merah) tertular parasit (*Plasmodium*). Sehingga dalam penelitian ini dosis diberikan dengan dosis yang lebih besar pada mencit uji, ternyata menunjukkan hasil yang positif pada dosis 92,38 mg/kgBB. Kemudian jika dihitung banyaknya serbuk yang digunakan maka jumlahnya tidak efektif karena akan memerlukan serbuk yang dalam jumlah besar, akan tetapi bila penggunaannya bagi masyarakat dengan metode infusa yang mudah dibuat dan bahannya mudah didapatkan, selain itu upaya menjamin kadar obat dalam darah yang signifikan untuk mematikan parasit perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap pemberian terapi obat dilakukan dengan *multiple dose* dan berapa lama pemberiannya. Selanjutnya perlu dilakukan uji selanjutnya untuk penggunaan infusa sampai pada uji toksisitasnya sehingga dapat dinyatakan aman untuk manusia, sehingga bisa dilakukan uji pada manusia menggunakan infusa Daun Johar sebagai salah satu pengembangan obat-obatan tradisional.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Dari penelitian uji aktivitas antimalaria infusa daun *Cassia siamea* terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit dapat diambil kesimpulan bahwa Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*) mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit dengan harga ED₅₀ dari infusa daun *Cassia siamea* sebesar 92,38 mg/kgBB.

7.2 Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan maka perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan melakukan pemberian dengan *multiple dose* dan berapa lama pemberiannya untuk meningkatkan aktivitas Infusa Daun Johar (*Cassia siamea*).

Perlu dilakukan uji selanjutnya untuk penggunaan infusa sampai pada uji toksisitasnya sehingga dapat dinyatakan aman untuk manusia, sehingga bisa dilakukan uji pada manusia menggunakan infusa Daun Johar sebagai salah satu pengembangan obat-obatan tradisional.

DAFTAR PUSTAKA

- Anam, Khairul. 2000. **Efek Sediaan Infusa Artemisia Cina O. Berg dan C. F. Schmidt terhadap Perkembangan *Plasmodium berghei* pada Mencit yang diberikan Peroral.** Yogyakarta : Fakultas Farmasi UGM.
- Anonim. 2003. **The *Plasmodium berghei* research model of malaria.** <http://www.lumc.nl>, 3 Januari 2003
- Anonim, 2004. **Kuliah 1 – Pengenalan**
<http://spc.upm.edu.my/webkursus/mcb3101/pelajar/nota.cgi?kuliah1.html>
- Becker, C. A. And Backhuizen, 1963. ***Flora of Java Spermatopyta Only.*** Netherlands : Walters Noordhoff N. V. Groningen. hal 539 – 540.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1985. **Farmakope Indonesia**, Edisi Ketiga, Jakarta : Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. Hal. 12 - 13.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1977. **Materia Medika**, jilid V. Jakarta : Direktorat Pengawasan Obat dan Makanan. Hal. 129 – 133.
- Dzulkarnain, B. et. al. 1992/1993. **Laporan Penelitian Pendahuluan Efek Beberapa Tanaman Terhadap *Plasmodium berghei* Pada Mencit.** Jakarta.
- Ekasari, Wiwied, 2001. **Uji Anti Malaria In vitro dari Ekstrak Etanol dan Kloroform Daun *Cassia siamea* Linn.** Surabaya : FFUA.
- Fidock, David A. *Et al.* **Antimalarial Drug Discovery : efficiacy models for compound screening(supplementary document).** www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/Malaria/Epid/Originlist/rodstrain.html. 2 Agustus 2004.
- Hargono, Djoko dkk. 1986. **Sediaan Galenika.** Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Hal. 8 - 10.
- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia, Jilid III**, Jakarta : diterjemahkan oleh Badan Litbang Kehutanan, Departemen Kehutanan. Hal. 926 – 927.
- Khotimah, Nurul. 2005. **Uji Fraksi Positif Terpenoid dari Daun Johar (*Cassia Siamea*) terhadap *Plasmodium Berghei* secara *In Vivo*.** Surabaya : FFUA.
- Kurniawan, Widiyanto. 2005. **Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi Alkaloid Hasil Isolasi dari Daun *Cassia siamea* terhadap Pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *In Vivo*.** Surabaya : FFUA.

- Kudo, R.R., 1996. **Protozoology**, 5th Ed. USA : Charles C. Thomas Publizer, Springfield, Illinois. Hal. 717-737
- Kusumaningrum, Diana, 2004. **Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kloroform Daun Johar (*Cassia siamea*) Terhadap *Plasmodium berghei* Secara *In vivo***. Surabaya : FFUA.
- Leiden University Medical Center, 2002. **The *Plasmodium berghei* Research Model of Malaria**.
<http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model01.html>. 19 Juli 2002
- Masroerah, S., Sutaryo, Broto., 1994. Tumbuhan sebagai sumber obat antimalaria. **Bulletin ISFI**. Vol. 22 (1), Hal. 8-17
- Oemijati, S., 1991. Masalah malaria di Indonesia. **Kumpulan Makalah Simposium Malaria**, Jakarta : FKUI. Hal. 2-3
- Purna, Salim Hanggara. 1991. **Efek Hipoglikemik Air Rebusan Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk.) pada Tikus Putih Jantan**. Yogyakarta : Fakultas Farmasi UGM.
- Pebley, Walter S. PE and Baglien, James S. 2003. **What Are The Benefits Of Freeze Drying**. <http://www.klamathbluegreen.com/whyfreezedry.htm>. USA : Oregon Freeze Dry Inc., Albany, Oregon.
- Puspadina, Valiandri. 2005. **Uji Aktivitas Antimalaria Fraksi total Alkaloid Daun Johar (*Cassia siamea*) pada *Plasmodium berghei* secara *In Vivo***. Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga.
- Phillipson, J. D., 1991. Assay for antimalarial and amoebicidal activities. **Methods in Plant Biochemistry**, Volume 6, London : Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich Publisher, p. 140
- Raharjo, Ardhistia. 2005. **Uji aktivitas antimalaria Ekstrak air Daun Johar (*cassia siamea*) terhadap *Plasmodium berghei* Secara *in vivo***. Surabaya : FFUA.
- Ross, S. A., Sayed, S. M., 1986. **New Isoquinolin Alkaloid From The Leaves of *Cassia siamea* Lamk**, *Journf Natural Product*. Vol 47(4), hal 708 – 710.
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal Edisi 2**. Surabaya : Airlangga University Press. hal 84 – 86.
- Suharto dan Susaniwati, 2001. Perkembangan vaksin malaria. **Majalah Kedokteran Tropis Indonesia**, Volume 12 (1), Mei, Hal. 11

Trubus 389/April 2002 XXXIII, **Johar Pecundangi Kaki Gajah**.
<http://cybermed.cbn.net.id/detil.asp?kategori=Health&newsno=897>. 8 April 2002.

Wahjoedi, Bambang. 1996. **Penelitian Toksisitas Subkronik Infus Daun Johar (*Cassia siamea* Lamk) pada Tikus Putih**
http://digilib.unmer.ac.id/go.php?node=1262&PHPSESSID=aacbbb6f790f8f71f6decbe5f02adfa_jkpkbppk-gdl-grey-1996-wahjoedi2c-322-penelitian. 7 Maret 2002.

Wahjoedi, Bambang. 2003. **Obati Malaria dengan Tanaman Johar ..!**. Kompas.
<http://www.yanfar.go.id/yanfar/detil.asp?m=16&s=1&i=207>. 1 Mei 2003.

Zulkarnain, I, 1987. **Ilmu Penyakit Dalam**, Jilid I Edisi 2, Persatuan Ahli Penyakit Dalam Indonesia. Jakarta : Balai Penerbit FKUI. hal 75 – 79.



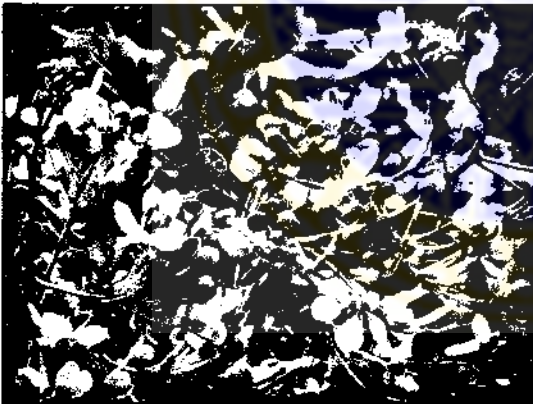
Lampiran 1 : Gambar *Cassia siamea*



Pohon Johar (*Cassia siamea*)



Daun Johar (*Cassia siamea*)



Bunga Johar (*Cassia siamea*)



Biji Johar (*Cassia siamea*)

Lampiran 2 : Morfologi *Plasmodium berghei*

MORFOLOGI *Plasmodium berghei*

Mikroskop cahaya

Bentuk cincin dari infeksi secara bersamaan *in vivo*, 4 jam setelah invasi. Pewarnaan giemsa.

Trophozoit, 'dewasa', murni. 16 jam setelah invasi, sesaat sebelum pembelahan inti dimulai. Trophozoit yang dimurnikan dari tahapan darah yang terinfeksi secara bersamaan menggunakan *Nycodenz density gradient purification*. Pada infeksi ini banyak muncul retikulosit yang terinfeksi double atau triple. Pada eritrosit yang terinfeksi double, parasit berkembang normal menjadi schizon dewasa. Pewarnaan giemsa.

Schizon, dewasa, dimurnikan dari kultur *in vitro* dengan *Nycodenz density gradient centrifugation*.

Schizont, dewasa. Noktah besar berkelompok berwarna kuning kecoklatan dan 18 merozoit. Biasanya schizon berisi antara 12 dan 24 merozoit. Pewarnaan giemsa.

Schizon, dewasa, dan gametosit betina, kultur *in vitro*, pewarnaan giemsa

Gametosit, jantan belum dewasa dan jantan dewasa. Jantan belum dewasa (20-26 jam setelah invasi ke eritrosit) menyerupai gametosit betina yang belum dewasa karena pewarnaan sitoplasma berwarna biru oleh karena itu sulit untuk membedakan dari yang betina. Dalam hal ini inti yang besar dengan arcola yang merah muda menunjukkan bahwa gametocyte yang biru adalah jantan belum dewasa. Pewarnaan giemsa.

Lampiran 3

Sertifikat Determinasi



LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA
 PUSAT KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA BOGOR
 UPT BALAI KONSERVASI TUMBUHAN KEBUN RAYA PURWODADI
 PASURUAN - JAWA TIMUR

KOTAK POS NO. 104 LAWANG 65201

TELP. /FAX. (0341) 426046

E-MAIL : kripip@malang.wasantara.net.id

SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI

No. 466/IPH.UPT.03/HM/2004

Kepala Kebun Raya Purwodadi dengan ini menerangkan bahwa materi tanaman yang dibawa oleh :

Dwi Agung Nugroho / NIM 050112447

Mahasiswa Fakultas Farmasi, Universitas Airlangga Surabaya di Surabaya, datang di UPT Balai Konservasi Tumbuhan Kebun Raya Purwodadi pada tanggal 12 Juni 2004 berdasarkan buku *Flora of Java*, karangan C.A. Backer, Vol 1, (1963), hal 541. nama ilmiahnya adalah :

Marga : *Cassia*
 Jenis : *Cassia siamea* Lmk

Adapun menurut buku *The Standard Cyclopedia of Horticulture* karangan L.H. Bailey jilid I (1953) halaman 3, klasifikasinya adalah sebagai berikut :

Divisio : Spermatophyta
 Sub Divisio : Angiospermae
 Kelas : Dicotyledoneae
 Ordo / Bangsa : Rosales
 Family / Suku : Fabaceae

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Purwodadi, 12 Juni 2004

An Kepala
 UPT Balai Konservasi Tumbuhan
 Kebun Raya Purwodadi
 Unit Jasa & Informasi



M. SOLKHAN, S.Hut.
 NIP. 320004506

Lampiran 4**Perhitungan Dosis *Cassia siamea***

Pemberian dosis antara 1-400 mg/kgBB

$$\text{a. } 400 \text{ mg/kgBB} \rightarrow \frac{20}{1000} \times 400 \text{ mg} = 8 \text{ mg} \times 4 \text{ hari} \times 6 \text{ kali} = 192 \text{ mg}$$

$$\text{b. } 200 \text{ mg/kgBB} \rightarrow \frac{20}{1000} \times 200 \text{ mg} = 4 \text{ mg} \times 4 \text{ hari} \times 6 \text{ kali} = 96 \text{ mg}$$

$$\text{c. } 100 \text{ mg/kgBB} \rightarrow \frac{20}{1000} \times 100 \text{ mg} = 2 \text{ mg} \times 4 \text{ hari} \times 6 \text{ kali} = 48 \text{ mg}$$

$$\text{d. } 50 \text{ mg/kgBB} \rightarrow \frac{20}{1000} \times 50 \text{ mg} = 1 \text{ mg} \times 4 \text{ hari} \times 6 \text{ kali} = 24 \text{ mg}$$

$$\text{e. } 25 \text{ mg/kgBB} \rightarrow \frac{20}{1000} \times 25 \text{ mg} = 0,5 \text{ mg} \times 4 \text{ hari} \times 6 \text{ kali} = 12 \text{ mg}$$

$$\text{f. } 12,5 \text{ mg/kgBB} \rightarrow \frac{20}{1000} \times 12,5 \text{ mg} = 0,25 \text{ mg} \times 4 \text{ hari} \times 6 \text{ kali} = 6 \text{ mg}$$

Jumlah total serbuk yang digunakan 372 mg

Uji coba Ekstrak infusa Daun Johar (sonde 200 ml)

- a. Ditimbang ekstrak 1000 mg, kemudian dilarutkan aquadest ad 25 ml (40 mg/ml), larutan ini disebut K_1 (400 mg/kg BB)

$$\frac{0,2}{1} \times 40 \text{ mg / ml} = 8 \text{ mg}$$

- b. Dipipet dari K_1 sebanyak 12,5 ml kemudian dilarutkan aquadest ad 25 ml (20 mg/ml), larutan ini disebut K_2 (200 mg/kg BB)

$$\frac{0,2}{1} \times 20 \text{ mg / ml} = 4 \text{ mg}$$

- c. Dipipet dari K_2 sebanyak 12,5 ml kemudian dilarutkan aquadest ad 25 ml (10 mg/ml), larutan ini disebut K_3 (100 mg/kg BB)

$$\frac{0,2}{1} \times 10 \text{ mg / ml} = 2 \text{ mg}$$

- d. Dipipet dari K_3 sebanyak 12,5 ml kemudian dilarutkan aquadest ad 25 ml (5 mg/ml), larutan ini disebut K_4 (50 mg/kg BB)

$$\frac{0,2}{1} \times 5 \text{ mg / ml} = 1 \text{ mg}$$

- e. Dipipet dari K₄ sebanyak 12,5 ml kemudian dilarutkan aquadest ad 25 ml (2,5 mg/ml), larutan ini disebut K₅ (25 mg/kg BB)

$$\frac{0,2}{1} \times 2,5 \text{ mg / ml} = 0,5 \text{ mg}$$

- f. Dipipet dari K₅ sebanyak 12,5 ml kemudian dilarutkan aquadest ad 25 ml (1,25 mg/ml), larutan ini disebut K₆ (12,5 mg/kg BB)

$$\frac{0,2}{1} \times 1,25 \text{ mg / ml} = 0,25 \text{ mg}$$



Lampiran 5**Pembuatan Medium Alceiver**

Misalnya dibuat 100 ml larutan

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



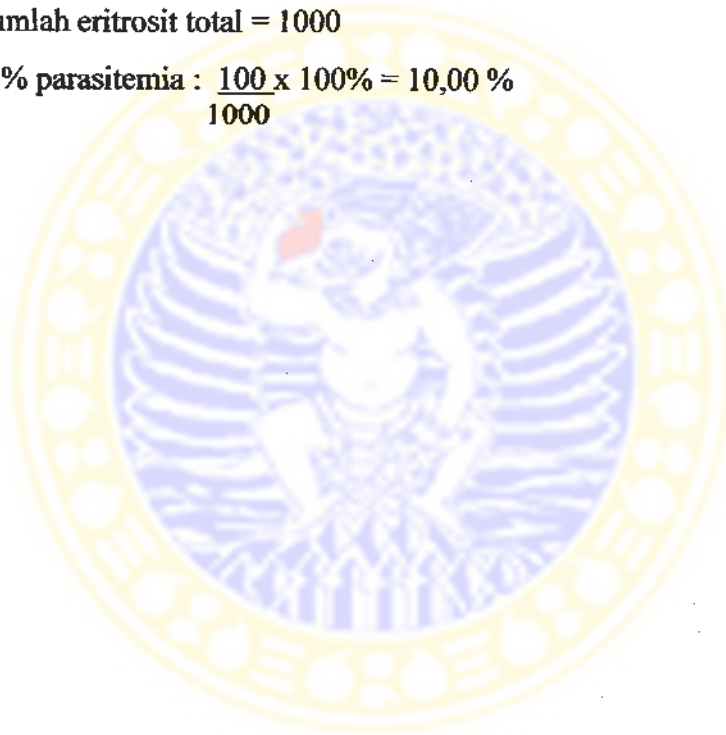
Lampiran 6**PERSEN PARASITEMIA**

Untuk menghitung persen parasitemia digunakan rumus sebagai berikut:

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

Misalnya:

- Jika jumlah eritrosit yang terinfeksi = 100
- Jika jumlah eritrosit total = 1000
- Maka % parasitemia : $\frac{100}{1000} \times 100\% = 10,00 \%$



Lampiran 7**PERSEN PERTUMBUHAN**

Untuk mencari harga % pertumbuhan digunakan rumus :

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \frac{P(d_2-d_1) + P(d_3-d_2) + \dots + P(d_7-d_6)}{(n-1)}$$

$P(dx-dx-1)$ = % pertumbuhan hari x dikurangi % parasitemia hari sebelumnya

Apabila terjadi penurunan % parasitemia antara sebuah hari dan hari sesudahnya maka pertumbuhan dianggap 0.

Misalnya perhitungan sebagai berikut :

Data % parasitemia dosis 0,313 mg/kg BB hari ke1 sampai hari ke 4 adalah :

Replikasi 1 : 2,20; 3,31; 14,22; 20,09; 22,60

Replikasi 2 : 0,90; 3,78; 6,41; 19,79; 21,30

Replikasi 3 : 0,97; 3,74; 7,25; 13,86; 18,77

% pertumbuhan replikasi 1 :

$$\frac{(3,31 - 2,20) + (14,22 - 3,31) + (20,09 - 14,22) + (22,60 - 20,09)}{4} = 5,10$$

% pertumbuhan replikasi 2 :

$$\frac{(3,78 - 0,90) + (6,41 - 3,78) + (19,79 - 6,41) + (21,30)}{4} = 5,10$$

% pertumbuhan replikasi 3 :

$$\frac{(3,74 - 0,97) + (7,25 - 3,74) + (13,86 - 7,25) + (18,77 - 13,86)}{4} = 4,45$$

$$\% \text{ pertumbuhan rata-rata} : \frac{5,10 + 5,10 + 4,45}{3} = 4,88$$

Lampiran 8**PERSEN PENGHAMBATAN**

Untuk mencari harga % penghambatan digunakan rumus :

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

Keterangan : X_e = % pertumbuhan rata-rata parasit pada tiap dosis bahan uji

X_k = % pertumbuhan parasit pada kontrol negatif

Misalnya perhitungan sebagai berikut :

% pertumbuhan rata-rata dosis 100 mg/kg BB sebesar 0,15%

% pertumbuhan rata-rata kontrol negatif sebesar 2,50%

maka % penghambatan dosis 100 mg/kg BB adalah :

$$100\% - \left[\frac{0,15}{2,50} \times 100\% \right] = 94,00\%$$

Misalnya perhitungan lain :

% pertumbuhan rata-rata dosis 50 mg/kg BB sebesar 0,60%

% pertumbuhan rata-rata kontrol negatif sebesar 2,50%

maka % penghambatan dosis 50 mg/kg BB adalah :

$$100\% - \left[\frac{0,60}{2,50} \times 100\% \right] = 76,00\%$$

Lampiran 9

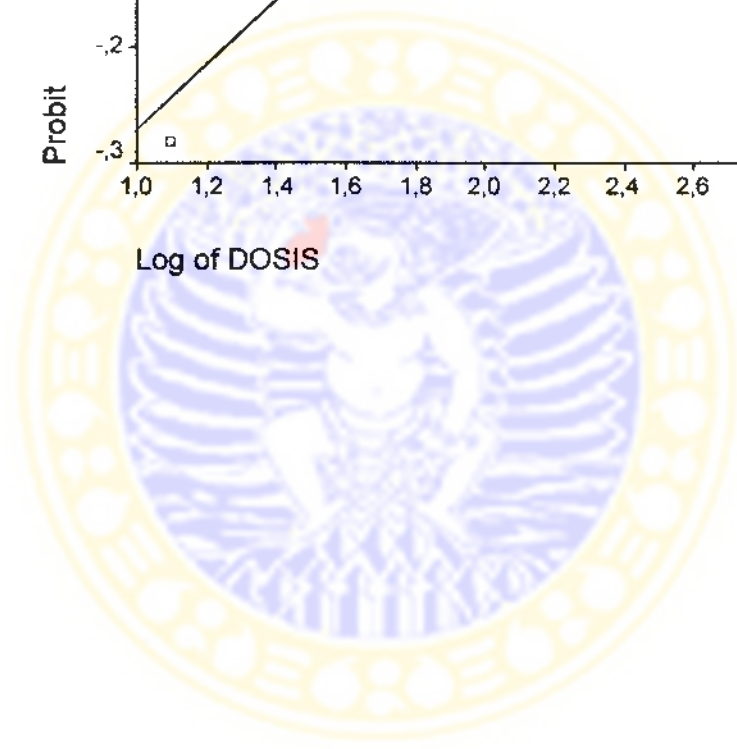
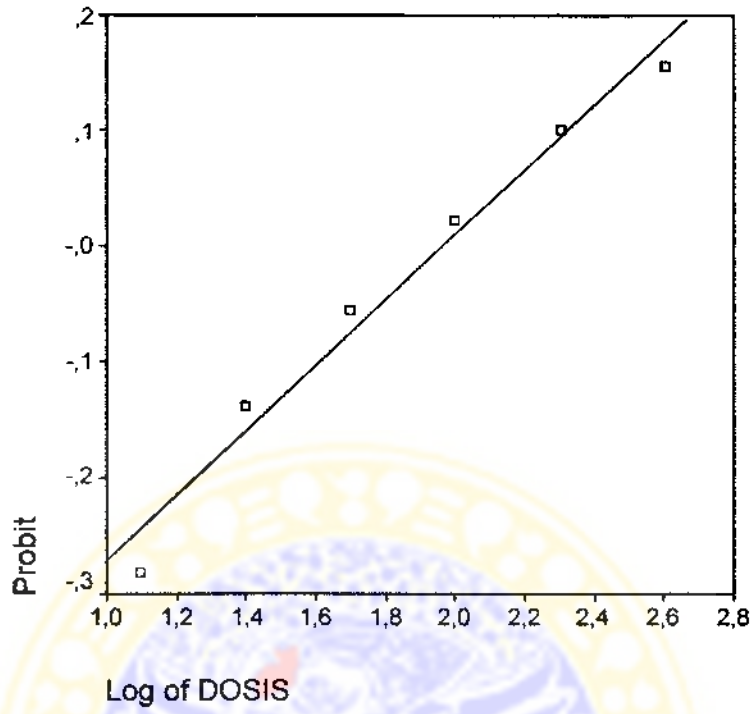
ANALISIS PROBIT INFUSA DAUN *Cassia siamea*

***** PROBIT ANALYSIS *****

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	,00000	1,365567E-25	,00118
,02	,00000	2,027476E-22	,00439
,03	,00002	2,084637E-20	,01010
,04	,00006	6,799516E-19	,01893
,05	,00014	1,157246E-17	,03157
,06	,00029	1,291363E-16	,04879
,07	,00055	1,070316E-15	,07149
,08	,00098	7,108809E-15	,10066
,09	,00165	3,976915E-14	,13745
,10	,00267	1,939847E-13	,18311
,15	,01971	1,367820E-10	,60213
,20	,09654	,00000	1,55850
,25	,37728	,00000	3,54774
,30	1,28306	,00012	7,50539
,35	3,98877	,00467	15,33077
,40	11,70201	,14663	31,66021
,45	33,15099	3,48469	75,43521
,50	92,37670	35,70745	391,01025
,55	257,41176	107,76078	6881,68794
,60	729,22972	229,29289	183133,19046
,65	2139,37115	459,96435	5919705,80361
,70	6650,86729	929,23815	237865688,773
,75	22618,44050	1955,49251	12995193698,3
,80	88390,80086	4438,41661	1128143867471
,85	432902,97960	11467,24718	2,064029E+14
,90	3195562,95821	37662,08225	1,457157E+17
,91	5178852,67904	50165,22896	7,109092E+17
,92	8750424,23207	68481,78446	3,977824E+18
,93	15577670,9473	96409,99256	2,642460E+19
,94	29664845,6255	141233,48328	2,190519E+20
,95	61842429,0738	218249,85254	2,444796E+21
,96	146596196,470	363841,01232	4,161616E+22
,97	423580652,996	681777,42859	1,357631E+24
,98	1735830294,58	1570368,68093	1,396149E+26
,99	16032277117,5	5845106,75995	2,073295E+29

Probit Transformed Responses



Lampiran 10

**ANALISIS PROBIT AKTIVITAS ANTIMALARIA
KLOROKUIN DIFOSFAT**

* * * * * P R O B I T A N A L Y S I S * * * * *

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
,01	,00009	5,974494E-11	,00263
,02	,00021	5,974787E-10	,00458
,03	,00037	2,571099E-09	,00653
,04	,00056	7,699378E-09	,00853
,05	,00078	,00000	,01060
,06	,00105	,00000	,01277
,07	,00135	,00000	,01504
,08	,00169	,00000	,01742
,09	,00208	,00000	,01993
,10	,00252	,00000	,02256
,15	,00556	,00000	,03789
,20	,01041	,00002	,05772
,25	,01783	,00006	,08357
,30	,02892	,00021	,11779
,35	,04527	,00066	,16409
,40	,06926	,00188	,22886
,45	,10451	,00506	,32392
,50	,15667	,01292	,47351
,55	,23486	,03113	,73323
,60	,35437	,06981	1,24679
,65	,54215	,14283	2,43025
,70	,84863	,26504	5,62695
,75	1,37633	,45523	15,79706
,80	2,35816	,75239	55,10218
,85	4,41728	1,25352	254,85137
,90	9,73025	2,24360	1858,98244
,91	11,77501	2,56676	3022,28612
,92	14,48615	2,96519	5133,86479
,93	18,19297	3,46831	9210,89932
,94	23,46475	4,12341	17729,67846
,95	31,36577	5,01192	37497,84531
,96	44,10996	6,28798	90627,51019
,97	67,07846	8,28604	268960,09240
,98	117,10678	11,91150	1146512,88531
,99	281,83987	20,96860	11341630,7812

