

**LAPORAN  
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS  
NASIONAL BATCH I (RUSNAS 1 MILYARD) UNAIR  
TAHUN ANGGARAN 2010**



**PENGEMBANGAN FITOFARMAKA OBAT MALARIA  
DARI FRAKSI DITERPEN LAKTON HERBA  
SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NEES)**

**Ketua Peneliti :**

**Dr. ATY WIDYAWARUYANTI, MSi., Apt.**

**Anggota :**

**Dr. A. FUAD HAFID, MS., Apt.**

**dr. INDAH TANTULAR, MKES., PhD.**

**Dra. LILIS DACHLIYATI**

**Dr. rer.nat. MULYA HADI SANTOSA**

Dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat

Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi

Departemen Pendidikan Nasional

Surat Perjanjian DP2M Nomor : 136/SP2H/PP/DP2M/III/2010

Tanggal : 1 Maret 2010

LAPORAN  
HIBAH KOMPETITIF PENELITIAN UNGGULAN STRATEGIS  
NASIONAL BATCH I (RUSNAS 1 MILYARD) UNAIR  
TAHUN ANGGARAN 2010



kk-2  
kkB  
LP.87/11  
Per

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

**PENGEMBANGAN FITOFARMAKA OBAT MALARIA  
DARI FRAKSI DITERPEN LAKTON HERBA  
SAMBILOTO (*ANDROGRAPHIS PANICULATA* NEES)**

**Ketua Peneliti :**

**Dr. ATY WIDYAWARUYANTI, MSi., Apt.**

**Anggota :**

**Dr. A. FUAD HAFID, MS., Apt.**

**dr. INDAH TANTULAR, MKES., PhD.**

**Dra. LILIS DACHLIYATI**

**Dr. rer.nat. MULYA HADI SANTOSA**

Dibiayai oleh Direktorat Penelitian dan Pengabdian kepada Masyarakat  
Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi  
Departemen Pendidikan Nasional  
Surat Perjanjian DP2M Nomor : 136/SP2H/PP/DP2M/III/2010  
Tanggal : 1 Maret 2010

## Lembar Identitas dan Pengesahan

**Judul Penelitian** : Pengembangan Fitofarmaka Obat Malaria dari Fraksi Ditepen Lakton Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

**Lokasi Kegiatan** : Fakultas Farmasi Unair, Lembaga Penyakit Tropis Unair

**Waktu Penelitian** : Juni 2009 – Nopember 2010

Keterangan Pelaksana Penelitian	
<b>A. Pelaksana Penelitian</b>	
Nama Ketua Peneliti	Dr. Aty Widyawaruyanti, Apt. MSi.
Nama Lembaga/Institusi	Universitas Airlangga
Unit Organisasi	Fakultas Farmasi
Alamat	Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya-60286
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	031-5033710/031-5020514/aty_ww@yahoo.com
<b>B. Anggota Peneliti (1)</b>	
Nama	Dr. A. Fuad Hafid, Apt. MS.
Nama Lembaga	Universitas Airlangga
Alamat	Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya-60286
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	031-5033710/031-5020514/achmadfuad@unair.ac.id
<b>C. Anggota Peneliti (2)</b>	
Nama	dr. Indah Tantular, MSc. Ph.d
Nama Lembaga	Lembaga Penyakit Tropis, Unair
Alamat	Jl Mulyorejo, Kampus C, Unair Surabaya 60115
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	031-5992445/08165435535/ indahst99@yahoo.com
<b>D. Anggota Peneliti (3)</b>	
Nama	Dra. Lilis Dachliiyati
Nama Lembaga	PT. Kimia Farma (Persero), Tbk.(Unit Risbang)
Alamat	Jl. Cihampelas No.5, Bandung 40171
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	08122121447/ lilis_d@melsa.net.id
<b>E. Anggota Peneliti (4)</b>	
Nama	Dr.rer.nat.Mulja Hadi Santosa, Apt.
Nama Lembaga	Universitas Airlangga
Alamat	Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya-60286
Telepon/HP/Faksimil/e-mail	031-5033710/031-5020514

**Pendanaan dan jangka waktu penelitian** : 10 bulan

**Jangka Waktu Penelitian yg diusulkan** : 2 tahun

**Biaya Total yang diusulkan** : Rp. 820.000.000,-

**Biaya yang disetujui tahun 2010** : Rp. 300.000.000,-

Surabaya, 22 November 2010

Ketua Tim Peneliti



Dr. Aty Widyawaruyanti, Apt., MSi  
NIP : 196204261990022001



Dekan  
Fakultas Farmasi  
Dr. Umi Athijah, Apt., MS  
NIP : 195604071981032001



Kepala  
Lembaga Penelitian dan Penmas  
Dr. Djoko Agus Purwanto, Apt, MSi  
NIP : 195908051987011001

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga dapat menyelesaikan segala rangkaian penelitian ini sampai pada penyelesaian laporan. Pada kesempatan ini kami menyampaikan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. DP2M Ditjen Dikti Depdiknas, yang telah memberikan dana dan mempercayakan pelaksanaan penelitian ini kepada kami.
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan yang seluas-luasnya untuk dilakukannya penelitian ini.
3. Direktur Lembaga Penyakit Tropis Unair yang telah menyediakan fasilitas laboratorium dan kerjasama serta dukungan yang diberikan.
4. Direktur PT. Kimia Farma Tbk. Atas dukungan fasilitas penelitian yang diberikan.
5. Kepala Laboratorium Hewan Coba Universitas Airlangga yang sangat berperan pada fasilitas laboratorium dan hewan coba.
6. Kepala Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Unair yang sangat membantu pelaksanaan penelitian ini.
7. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu-persatu yang sangat berperan dalam keberhasilan penelitian ini.

Rasa terima kasih ini menyertai doa kami kepada Allah SWT, semoga budi baik dan jerih payah selama ini memperoleh manfaat yang sebanyak-banyaknya baik bagi diri sendiri maupun bagi keluarga dan Universitas Airlangga serta masyarakat pada umumnya.

Surabaya, 22 November 2010

Penulis

## RINGKASAN

Resistensi parasit terhadap obat antimalaria utama, klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin sampai saat ini masih merupakan hambatan utama dalam upaya penanggulangan malaria di dunia dan mendesak dilakukannya upaya-upaya untuk menemukan obat antimalaria baru dengan target yang berbeda dengan obat-obatan tersebut. Berbagai obat-obatan tradisional yang berasal dari tanaman atau bahan alam telah banyak digunakan di berbagai negara oleh etnik tertentu dan sangat potensial untuk diteliti lebih lanjut untuk mengungkap senyawa bioaktif yang mungkin terdapat di dalamnya.

*Andrographis paniculata* Nees, atau yang biasa dikenal dengan nama daerah sambiloto merupakan tanaman obat yang secara empiris digunakan sebagai antimalaria. Masyarakat Indonesia di Flores (NTT) diketahui menggunakan rebusan herba sambiloto untuk mengobati penderita malaria secara tradisional. Tanaman ini mempunyai kandungan senyawa golongan diterpen lakton dengan kandungan utama senyawa andrografolid, yang memiliki berbagai aktivitas farmakologis termasuk antimalaria.

Penelitian terdahulu menunjukkan bahwa herba sambiloto dengan kandungan utama senyawa diterpen lakton andrografolid berkhasiat sebagai obat antimalaria. Untuk memanfaatkan tanaman ini sebagai obat antimalaria, maka telah dilakukan penelitian untuk mengembangkan fraksi diterpen lakton (DTL) dari herba sambiloto ini sebagai sediaan farmasi dalam bentuk tablet yang aktif.

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahun. Pada tahun pertama, telah dilakukan standarisasi proses pemisahan fraksi diterpen lakton dari ekstrak etanol sambiloto sebagai fraksi aktif antimalaria, pemilihan metode validasi penetapan kadar andrografolid (senyawa marker aktif) di dalam fraksi diterpen lakton sebagai salah satu parameter standarisasi fraksi. Pada tahun pertama, bekerja sama dengan divisi riset PT Kimia Farma telah dilakukan pengembangan produk fitofarmaka fraksi diterpen lakton yang aktif sebagai antimalaria. Pada tahun kedua dilakukan uji preklinik untuk mengetahui khasiat dan keamanan formula terpilih pada hewan coba. Dan juga dilakukan penelitian untuk *scaling up* produksi tablet DTL.

Dari hasil penelitian tahun pertama, telah diperoleh metode fraksinasi yang paling optimal menghasilkan fraksi diterpen lakton dan dapat diterapkan dalam skala industri. Telah diperoleh fraksi diterpen lakton dari herba sambiloto, bentuk serbuk amorf, berwarna kuning kehijauan. Telah diperoleh metode yang valid untuk penetapan kadar marker dalam fraksi diterpen lakton sambiloto secara densitometri.

Hasil uji antimalaria *in vivo* menunjukkan bahwa fraksi diterpen lakton (DTL) sambiloto mempunyai aktivitas antimalaria terhadap parasit *P. berghei* dengan nilai  $ED_{50} = 9,17$  mg/kg BB mencit. Aktivitas antimalaria DTL pada pemberian dosis tunggal (satu kali sehari) per oral dengan dosis 100 (66,41 %) dan 10 mg/kg BB mencit (56,45%) menunjukkan aktivitas yang tidak berbeda nyata meskipun dosis berbeda 10 kalinya. Sedangkan pada pemberian DTL dengan dosis terbagi (10 mg sehari dua kali) menunjukkan aktivitas yang lebih kuat dan mampu menghambat parasit rata-rata 92,22 %.

Hasil studi pengembangan formula dispersi padat dari diterpen lakton menunjukkan bahwa formula III dengan komposisi fraksi diterpen lakton DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) merupakan formula terpilih. Formula ini dibuat tablet (150 mg/tablet) dengan komposisi serbuk dispersi padat DTL = 155,5 mg (77%) dengan kandungan fraksi DTL 60 mg, Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), dan Mg stearat = 1,5 mg (1%). Tablet dengan formula terpilih ini memiliki laju disolusi pada menit ke 15 = 28.21; pada menit ke-30 = 62.15; pada menit ke-60 = 68.12. Untuk kekerasan tablet formula III memiliki rentang 6.80-7.17 kP dan rata-rata 6.80 kP, dan untuk waktu disintegrasi tablet formula III adalah 12 menit 33 detik - 13 menit 05 detik.

Hasil penelitian tahun kedua, telah dilakukan proses ekstraksi dengan metode skala produksi. Dari 15 kg herba sambiloto diperoleh 30 liter ekstrak etanol 96% pekat. Proses scaling up fraksinasi telah dilakukan menggunakan labu ekstraktor cair-cair kapasitas 7 liter. Dari 2 liter fraksi etil asetat diperoleh ±5,6 gram fraksi DTL.

Telah diperoleh tablet diterpen lakton yang diproduksi dengan metode granulasi basah. Metode produksi ini disesuaikan dengan kelayakan untuk dapat diaplikasikan di industri. Formulasi pada tahun kedua ini, dibuat tablet yang mengandung 15 mg fraksi DTL per tablet dengan asumsi pemakaian dosis terapi untuk dewasa adalah sehari 2 x 4 tablet. Bobot tablet 305,3-327,6 mg dengan ukuran rata-rata diameter tablet 10,98 mm dan tebal 2,23 mm. Untuk kekerasan tablet yang dihasilkan memiliki rentang 5,91-7,17 kP dan rata-rata 6,63 kP, kerapuhan tablet adalah sebesar 0,36%, dan untuk uji waktu disintegrasi tablet diperoleh data waktu hancur tablet sebesar 10 menit 14 detik.

Telah dilakukan penetapan kadar fraksi diterpen lakton dalam granul tablet dengan metode KLT Densitometri. Hasil penetapan kadar menunjukkan bahwa kadar diterpen lakton dalam granul adalah 0,0557 mg/ mg granul.

Hasil uji antimalaria *in vivo* menunjukkan bahwa granul fraksi diterpen lakton (DTL) sambiloto mempunyai aktivitas antimalaria terhadap parasit *P. berghei* dengan menghambat pertumbuhan parasit sebesar 71,14% pada pemberian dengan dosis 10 mg/kg BB dua kali sehari selama empat hari. Sedangkan pada pemberian DTL dengan dosis 10 mg dua kali sehari selama 4 hari mampu menghambat pertumbuhan parasit rata-rata 92,22 %. Oleh karena itu, dilakukan peningkatan dosis pada uji aktivitas *in vivo* yaitu dosis 15 mg/kg BB dua kali sehari selama 4 hari untuk menentukan pola penghambatan pertumbuhan parasitnya. Pada uji aktivitas *in vivo* dengan peningkatan dosis diperoleh nilai hambatan pertumbuhan parasit sebesar 82,56%.

Uji toksisitas yang meliputi toksisitas akut dan sub akut telah dilakukan. Pada uji toksisitas akut pada mencit digunakan dosis yang tertinggi untuk bahan yang tergolong relatif tidak berbahaya yaitu 21 g/kg BB mencit. Hasil uji toksisitas akut dengan dosis yang tertinggi tersebut tidak menunjukkan kematian pada mencit sehingga disimpulkan bahwa sediaan granul fraksi diterpen lakton sambiloto tergolong tidak toksik dan aman.

Pada uji toksisitas sub akut menunjukkan bahwa pemberian granul fraksi diterpen lakton dengan dosis 10, 50, 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak berpengaruh pada peningkatan kadar SGOT, SGPT dan kreatinin. Pada pemberian dosis 100 mg/kg BB selama 14 hari menunjukkan peningkatan BUN pada hewan coba sekitar 20% bila dibandingkan dengan kontrol. Namun pada pemberian dosis

10 mg/kg BB dan 50 mg/kg BB tidak ada perbedaan yang bermakna dengan kontrol sehingga dapat disimpulkan bahwa pada dosis tersebut tidak berpengaruh pada peningkatan kadar BUN.

Pada pemeriksaan perubahan histopatologi hati mencit menunjukkan bahwa pemberian granul fraksi diterpen lakton dengan dosis 10, 50, 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak menyebabkan adanya perubahan histopatologi hati berupa degenerasi dan nekrosis sehingga dapat disimpulkan bahwa granul DTL relatif aman.

## SUMMARY

Parasite resistance to antimalarial drug, chloroquine and sulfadoxin-pirimetamin, is still becoming the major problem in malaria control worldwide, therefore, effort to develop new and different target antimalarial drugs is put in high priority. Several plants are used in traditional medicine for the treatment of malaria in many parts of world and very potential to further investigation of bioactive compounds from plant sources.

*Andrographis paniculata* Nees, known as "sambiloto" is widely distributed in Indonesia and has been traditionally used empirically for malarial remedies. Decoction of sambiloto's herb has been used traditionally to cure malaria by people in Flores (NTT-East Indonesia). Our preliminary test revealed that extract from *Andrographis paniculata* exhibit potent antimalarial activities againts *Plasmodium falciparum in vitro* and *Plasmodium berghei in vivo*. Andrographolide, a diterpene lacton compound of sambiloto is a major compound of this plant, which has various pharmacology activities including antimalarial.

Former research indicates that sambilot's herb with main compound of diterpen lacton andrographolide is effective as antimalarial, therefore, it is potential to be developed as antimalarial drugs. The traditionally used of sambiloto's herbs become a problem to ensure the consistency of its efficacy, safety and effectivity. Therefore, the development of sambiloto's herbs through phytopharmaceutical product is very important. The development of phytopharmaceutical product require standardization of plant material. Standardization is a set of procedure and analysis method, that the result parameter is connected to pharmaceutical quality concept, fulfill chemical and biological standard and ensure the stability of product.

The present study aims to develop plant material of antimalarial phytopharmaceutical from standardized diterpene lacton fraction of *sambiloto* (*A. paniculata* Nees) with consistent chemical composition, and ensure consistency of its efficacy, safety and effectivity.

Research will be done in two years. In the first year, standardization of fractionation of diterpene lacton from ethanol extract of sambiloto as an active fraction of antimalarial, the selection of validation method of assay andrographolide (as active marker compound) in diterpene lacton fraction as one of standardization parameter of fraction, have been done. In the first year, the phytopharmaceutical product development of diterpene lactone study has been done by cooperation with research division of PT. Kimia Farma. In the second year, preclinical study of the chosen formula to determine the effectivity and safety using animal test will be done. Also scaling up study to produce DTL tablet will be carried out in this second year research.

The result of research of this first year, has been obtained fractination method which is most optimal yields diterpen lacton fraction and applicable in industrial scale. The amorf powder, rust colored of greenness of diterpene lacton fraction of sambiloto has been obtained, also the valid method for determined the marker compound of diterpene lacton fraction of sambiloto using TLC-densitometry.

This research revealed that diterpene lacton fraction ( DTL) of sambiloto has antimalarial activity against parasite *P. berghei* in vivo with  $ED_{50} = 9,17$



mg/kg BW. Antimalaria activity of DTL at single dose giving (once a day) per oral with dose 100 (66,41 %) and 10 mg/kg (56,45%) WB shows the same activity. While by giving multiple dose (twice a day) shows stronger activity and can pursue parasite of 92,22 %.

The study of formulation development on solid dispersion of diterpene lactone fraction showed that third formula, with below composition DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) was the selected formula. The tablet of these formula (150mg/tablet) with composition : solid dispersion powder of DTL = 155,5 mg (77%) which contain 60 mg of diterpene lacton fraction, Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), and Mg stearate = 1,5 mg (1%). These tablet showed dissolution rate at minutes 15<sup>th</sup> = 28.21; 30<sup>th</sup> = 62.15; and 60<sup>th</sup> = 68.12 respectively. Tablet hardness of the third formula has strength between 6.80-7.17 kP and its average is 6.80 kP, the disintegration time of third formula was 12 minutes 33 seconds – 13 minutes 05 second.

For the second year-research, the extraction process has been developed for up-scale production which could be obtained 30 litres of concentrate 96% ethanolic extract from 15 Kg sambiloto herbs. The method used an extraction flask with its capacity is 7 litres and produced 5.6 gram of diterpene lactone from 2 litres of ethyl acetate fraction.

Diterpene lacton tablet production was conducted by wet granulation. This production method was adopted for applicable in industrial scale. Tablet formulation of the second year, was contain 15 mg of diterpene lacton fraction per tablet, this was assumed for therapeutics dose for adult was 2 x 4 tablets per day. Tablet weight 305.3-327.6 mg with average diameter sizes of tablet 10.98 mm and thickness 2.23 mm. Tablet hardness of the formula had strength between 5.91-7.17 kP and its average was 6.63 kP, tablet friability was 0.36%, and disintegration time was 10 minutes 14 seconds.

Determination of diterpene lacton fraction which contain in the tablet was carried out using TLC-Densitometry method. The result showed that the concentration of diterpen lacton fraction in the tablet was 0.0557 mg/ mg tablet.

Antimalarial test *in vivo* revealed that DTL granule inhibited the growth of *P. berghei* by 71,14% at the dose of 10 mg/kg BW twice a day for 4 days. In given dose at 10 mg twice a day could inhibited the paracite growth as much as 92,2%. Therefore, the dose increased up to 15 mg/Kg body weight twice a day for 4 days treatment of its *in vivo* activity study to determine the paracite growth inhibition. At the dose of 15 mg/kg BW, DTL granule inhibited the paracite growth by 82.56%.

Toxicity test including acute and sub acute was carried out. The acute toxicity was conducted using the dose of 21 g/kg body weight and observed for 7 days. The result showed that there was no mortality occurred and concluded that DTL granule was relatively non toxic.

Subacute toxicity conducted using the dose of 10, 50, 100 mg/kg BW for 14 days. Subacute toxicity test result showed that DTL granule was relatively safe and there was no significant difference in the observed ALT, AST and creatinine activities in serum. At the dose of 100 mg/kg BW showed that BUN was increased approximately 20% compared with control. At the dose of 10 mg/kg BW and 50 mg/kg BW there was no significant difference between treatment

group and control. The result concluded that DTL granule at the dose of 10 mg/kg BW and 50 mg/kg BW was not influenced BUN concentration.

Histopathological changes due to degeneration and necrosis were not observed after administration of DTL granule at the dose of 10, 50, 100 mg/kg BW for 14 days. The result showed that DTL granule was relatively safe.

## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>LEMBAR PENGESAHAN</b> .....	ii
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	iii
<b>RINGKASAN</b> .....	iv
<b>SUMMARY</b> .....	vii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	x
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xii
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xv
<b>BAB I PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	5
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	6
2.1. Tinjauan Tentang Tanaman Sambiloto ( <i>Andrographis paniculata</i> Nees).....	6
2.2. Studi Pendahuluan yang telah Dilakukan.....	7
<b>BAB III BAHAN DAN METODE PENELITIAN</b> .....	9
3.1. Bahan dan Alat yang Digunakan .....	9
3.2. Produksi Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto .....	9
3.3. Produksi Tablet Fraksi Diterpen Lakton .....	10
3.4. Uji Karakteristik Fisik Tablet .....	11
3.4.1. Uji Kekerasan .....	11
3.4.2. Uji Waktu Disintegrasi .....	11
3.5. Penentuan Laju Disolusi Tablet Fraksi Diterpen Lakton... ..	11
3.6. Penetapan kadar fraksi diterpen lakton dalam granul diterpen lakton .....	12

3.7. Uji Aktivitas Antimalaria Granul Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto Pada Mencit Terinfeksi <i>P. berghei</i> .....	13
3.8. Uji Toksisitas Granul Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto Pada Mencit .....	14
<b>BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN</b> .....	17
4.1. Proses produksi fraksi diterpen lakton .....	17
4.1.1. Ekstraksi sambiloto (skala Produksi) .....	17
4.1.2. Fraksinasi Ekstrak Sambiloto .....	18
4.2. Uji Karakteristik Fisik Tablet Fraksi Diterpen Lakton .....	19
4.2.1. Hasil Pemeriksaan Keseragaman Bobot Tablet .....	19
4.2.2. Hasil Pemeriksaan Ukuran Tablet.....	19
4.2.3 Hasil Pemeriksaan Kekerasan Tablet.....	20
4.2.4. Pemeriksaan Kerapuhan Tablet.....	20
4.2.5. Pemeriksaan Waktu Dintegrasi Tablet .....	20
4.3. Penetapan kadar fraksi diterpen lakton dalam granul diterpen lakton .....	21
4.4. Uji Aktivitas Antimalaria Granul Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto Pada Mencit Terinfeksi <i>P. berghei</i> .....	24
4.5. Uji Toksisitas dan Keamanan pada Hewan Coba .....	27
<b>BAB V PENUTUP</b> .....	39
5.1 Kesimpulan.....	39
5.2 Saran .....	40
<b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....	41
<b>LAMPIRAN</b> .....	44

**DAFTAR GAMBAR**

Gambar 2.1	Herba Sambiloto dan struktur andrografolid .....	7
Gambar 4.1	Ekstraktor .....	17
Gambar 4.2	Ekstrak etanol 96% sambiloto .....	18
Gambar 4.3	Ekstraktor cair-cair .....	18
Gambar 4.4	Fraksi DTL .....	19
Gambar 4.5	Granul dan Tablet Diterpen Lakton .....	21
Gambar 4.6	Kromatogram KLT andrografolida, fraksi diterpen lakton, dan granul diterpen lakton dengan sistem silica gel GF <sub>254</sub> , fase gerak kloroform:metanol (90:10), panjang gelombang 233 nm.....	21
Gambar 4.7	Kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU) .....	22
Gambar 4.8	Persen parasitemia pada mencit terinfeksi <i>P.berghei</i> yang diberi granul DTL (10 mg/kg BB) dibandingkan dengan kontrol (-) yang diamati tiap hari .....	25
Gambar 4.9	Persen parasitemia pada mencit terinfeksi <i>P.berghei</i> yang diberi granul DTL (15 mg/kg BB) dibandingkan dengan kontrol (-) yang diamati tiap hari .....	26
Gambar 4.10	Histogram Hubungan aktivitas enzim SGOT hewan coba dengan pemberian granul DTL .....	32
Gambar 4.11	Histogram Hubungan aktivitas enzim SGPT hewan coba dengan pemberian granul DTL .....	33
Gambar 4.12	Histogram Hubungan kadar BUN hewan coba dengan pemberian granul DTL .....	34
Gambar 4.13	Histogram Hubungan kadar kreatinin hewan coba dengan pemberian granul DTL .....	35
Gambar 4.14	Gambaran mikroskopis sel hati mencit pada kelompok control (-) (a), dosis 10 mg/kg BB (b), dosis 50 mg/kg BB (c) dan dosis 100 mg/kg BB (d) dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400x setelah pemberian granul DTL selama 14 hari.....	37

## DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Formula tablet diterpen lakton .....	10
Tabel 3.2	Skor perubahan gambaran histopatologi hati mencit .....	16
Tabel 4.1	Hasil pemeriksaan keseragaman bobot tablet .....	19
Tabel 4.2	Hasil pemeriksaan ukuran tablet .....	20
Tabel 4.3	Hasil pemeriksaan kekerasan tablet fraksi diterpen lakton .....	20
Tabel 4.4	Hasil pemeriksaan kerapuhan tablet fraksi diterpen lakton .....	20
Tabel 4.5	Tabel konsentrasi larutan standar yang diinjekkan pada KCKT (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU) .....	22
Tabel 4.6	Konsentrasi granul dan fraksi diterpen lakton yang ditotolkan pada plate silica gel GF <sub>254</sub> (ug) dengan luas area yang diperoleh (mAU) .....	23
Tabel 4.7	Persen Parasitemia, Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan, dan Persen Penghambatan Rata-rata granul DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda 10 mg/kg BB .....	24
Tabel 4.8	Persen Parasitemia yang diamati per hari, dan Persen Parasitemia Rata-rata granul DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda .....	24
Tabel 4.9	Persen Parasitemia, Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan, dan Persen Penghambatan Rata-rata granul DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda 15 mg/kg BB .....	25
Tabel 4.10	Persen Parasitemia yang diamati per hari, dan Persen Parasitemia Rata-rata granul DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda .....	26
Tabel 4.11	Berat badan mencit sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan yang diamati selama 7 hari .....	28
Tabel 4.12	Hasil uji toksisitas akut sediaan suspensi granul fraksi diterpen lakton pada mencit jantan dan betina .....	28
Tabel 4.13	Berat badan mencit sebelum dan sesudah perlakuan selama 14 hari .....	29
Tabel 4.14	Hasil Pemeriksaan Kadar SGOT, SGPT, BUN dan kreatinin pada Mencit .....	30
Tabel 4.15	Harga Rerata Kenaikan Berat Badan Hewan Coba Tiap Kelompok .....	31
Tabel 4.16	Ringkasan ANAVA Kenaikan Berat Badan Hewan Coba .....	31

Tabel 4.17	Harga Rerata Kadar SGOT Hewan Coba Tiap Kelompok .....	31
Tabel 4.18	Ringkasan ANAVA Kadar SGOT Hewan Coba .....	32
Tabel 4.19	Harga Rerata Kadar SGPT Hewan Coba Tiap Kelompok .....	32
Tabel 4.20	Ringkasan ANAVA Kadar SGPT Hewan Coba .....	33
Tabel 4.21	Harga Rerata Kadar BUN Hewan Coba Tiap Kelompok .....	33
Tabel 4.22	Ringkasan ANAVA Kadar BUN Hewan Coba .....	34
Tabel 4.23	Harga Rerata Kadar Kreatinin Hewan Coba Tiap Kelompok .....	34
Tabel 4.24	Ringkasan ANAVA Kadar Kreatinin Hewan Coba .....	35
Tabel 4.25	Nilai skor perubahan gambatan hitopatologi hati mencit pada kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa degenerasi pada uji tablet DTL .....	37
Tabel 4.26	Nilai skor perubahan gambatan hitopatologi hati mencit pada kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa nekrosis pada uji tablet DTL .....	38

**DAFTAR LAMPIRAN**

Lampiran 1	Hasil analisis data darah pada uji toksisitas sub akut .....	44
Lampiran 2	Hasil analisis data kenaikan berat badan hewan coba pada uji toksisitas sub akut .....	47
Lampiran 3	Skor perubahan histopatologi hati mencit yang mengalami degenerasi .....	49
Lampiran 4	Skor perubahan histopatologi hati mencit yang mengalami nekrosis .....	50
Lampiran 5	Hasil analisis data histopatologi hati berupa degenerasi dengan uji Kruskal- Wallis test .....	51
Lampiran 6	Hasil analisis data histopatologi hati berupa nekrosis dengan uji Kruskal- Wallis test .....	52



## BAB I PENDAHULUAN

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

### 1.1. Latar Belakang

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit utama di dunia yang mengenai hampir 170 juta orang tiap tahunnya. Penyakit ini juga berjangkit di hampir 103 negara, terutama negara-negara di daerah tropik dan subtropik. Di Indonesia, malaria tergolong penyakit menular yang masih bermasalah. Penyakit ini berjangkit di semua pulau di Indonesia, mulai dari dataran rendah hingga dataran tinggi, baik di kota maupun di desa. Sebagian penduduk di 20 provinsi di Indonesia terjangkit malaria. Lebih dari 40 juta penduduk Indonesia bermukim di daerah malaria, sekitar 11 juta diantaranya tinggal di Jawa dan Bali (Mursito, 2002; WHO, 2003).

Pemberantasan terhadap penyakit malaria mengalami berbagai kendala, terutama dengan berkembangnya galur parasit yang resisten terhadap obat-obatan yang ada saat ini. Oleh karena itu pengobatan alternatif yang efektif khususnya dari bahan alam sangat dibutuhkan baik saat ini maupun di masa-masa mendatang.

Penggunaan tumbuhan atau bagian tumbuhan untuk obat malaria sudah dikenal sejak ribuan tahun yang lalu. Dimulai dari ditemukannya obat malaria yang pertama yaitu kinina, suatu senyawa alkaloid yang berhasil diisolasi dari kulit batang kina (*Cinchona succirubra*) pada tahun 1820, sampai penemuan artemisinin, suatu senyawa seskuiterpen lakton yang berhasil diisolasi dari tanaman *Artemisia annua* (Klayman, 1985).

*Andrographis paniculata* Nees. atau yang biasa dikenal dengan nama daerah sambiloto merupakan tanaman obat yang secara empiris digunakan sebagai antimalaria. Masyarakat Indonesia di Flores (NTT) diketahui menggunakan rebusan herba sambiloto untuk mengobati penderita malaria secara tradisional. Tanaman ini mempunyai kandungan senyawa golongan diterpen lakton dengan kandungan utama senyawa andrografolid, yang memiliki berbagai aktivitas farmakologis termasuk antimalaria (Matsuda, 1994).

Penelitian ilmiah membuktikan bahwa tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria. Rahman *et al*, (1999) melaporkan bahwa ekstrak sambiloto menunjukkan aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei in vivo* pada mencit. Serangkaian penelitian telah kami lakukan untuk mengetahui aktivitas antimalaria dari tanaman sambiloto ini. Penelitian terdahulu kami menunjukkan bahwa ekstrak tanaman ini mempunyai aktivitas antimalaria dengan cara menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum in vitro* (Suyanto, 1995; Widyawaruyanti, dkk, 1995). Tidak hanya ekstrak, dari hasil penelitian kami (Dina, 2001; Neni, 2001; Sri, 2001; Widyawaruyanti dkk, 2003) juga diketahui bahwa isolat andrografolid dapat menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium berghei* ( $ED_{50}$ ) secara *in vivo* sebesar 3,6 mg/kg BB. Pada penelitian tersebut juga telah dapat dipisahkan isolat diterpen lakton lainnya yang juga mempunyai aktivitas antimalaria. Isolat diterpen lakton ini mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* pada stadium gametosit *in vitro* ( $IC_{50}$  4,19  $\mu$ g/mL pada inkubasi 72 jam). Aktivitas ini setara dengan aktivitas obat standar primakuin. Isolat diterpen lakton juga mempunyai aktivitas skizontosida dengan nilai  $IC_{50}$  14,12  $\mu$ g/mL.

Dalam upaya membuktikan aktivitas antimalaria dari sambiloto, penelitian terakhir kami menunjukkan bahwa kombinasi ekstrak etanol 80% sambiloto 100 mg/kg BB dan klorokuin 0,1567 mg/kg BB memberikan potensi keberhasilan terapi yang paling besar pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dibandingkan pemberian klorokuin maupun ekstrak sambiloto secara terpisah (Hafid, 2007).

Mengingat potensinya sebagai obat antimalaria, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan sambiloto ini sebagai produk obat malaria baru. Permasalahannya, selama ini pemanfaatan sambiloto secara tradisional oleh masyarakat dalam mengobati penyakit malaria selama ini, tidak dapat menjamin keajegan khasiat, keamanan dan kualitasnya. Sehingga sulit dipertanggungjawabkan secara medis. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemanfaatan tanaman ini sebagai produk fitofarmakanya yang menggunakan pendekatan multikomponen, bukan strategi penemuan zat tunggal seperti pada obat modern.

Dalam bentuk produk fitofarmaka, dapat terjamin keajegan komposisi zat kandungan. Karena itu perlu dilakukan standarisasi terhadap bahan baku obat dan produk akhirnya. Sehingga dapat terkontrol baik khasiatnya sebagai obat malaria, juga kualitas dan keamanannya. Dengan demikian dapat diterima oleh profesi kesehatan baik dokter maupun apoteker dan dapat masuk dalam sistem kesehatan formal untuk mengobati pasien malaria.

Berdasarkan latar belakang tersebut di atas, maka pada penelitian ini telah dikembangkan produk fitofarmaka dari fraksi diterpen lakton herba sambiloto. Selain diketahui aktif sebagai antimalaria baik *in vivo* maupun *in vitro*, fraksi diterpen lakton juga dapat diperoleh dari herba sambiloto dalam jumlah cukup besar. Sehingga sangat potensial sebagai bahan baku obat malaria.

Untuk tujuan manufaktur sediaan obat, maka fraksi diterpen lakton sebagai bahan baku obat harus dibuat dalam bentuk sediaan kering dispersi solida. Hal ini dilakukan untuk memberikan jaminan bahwa obat dalam ekstrak/fraksi terbagi secara molekuler dalam matriks terpilih serta akan dapat memperbaiki nilai parameter farmasetik dan bioavailabilitas. Dispersi solida adalah konsep fisika dimana zat padat terdispersi (terbagi homogen) sebagai partikel kecil atau masa molekuler dalam suatu matriks berupa polimer terpilih.

Selanjutnya untuk mencapai tujuan terapi, maka perlu dilakukan studi mengenai formulasi dan manufaktur sediaan obat (*dosage form*) yang memperhatikan konsep *drug delivery system* (DDS). Komponen senyawa obat dalam ekstrak/fraksi harus dijamin akan dihantarkan menuju target terapi, yaitu dalam rancangan formulasi dan manufaktur dengan penambahan bahan pendukung untuk tercapainya bioavailabilitas yang optimal dan tercapainya tujuan terapi.

Untuk maksud tersebut di atas maka penelitian ini telah dilakukan dalam dua tahap :

1. Pada tahun pertama, telah dilakukan standarisasi proses pemisahan fraksi diterpen lakton dari ekstrak etanol sambiloto sebagai fraksi aktif antimalaria, pemilihan metode validasi penetapan kadar andrografolid (senyawa marker aktif) di dalam fraksi diterpen lakton sebagai salah satu parameter standarisasi fraksi. Pada tahun pertama ini, bekerja sama dengan divisi riset PT. Kimia

Farma telah dilakukan pengembangan produk fitofarmaka fraksi diterpen lakton yang aktif sebagai antimalaria.

Dari hasil penelitian tahun pertama ini, telah diperoleh metode fraksinasi yang paling optimal menghasilkan fraksi diterpen lakton dan dapat diterapkan dalam skala industri. Telah diperoleh fraksi diterpen lakton dari herba sambiloto, bentuk serbuk amorf, berwarna kuning kehijauan. Telah diperoleh metode yang valid untuk penetapan kadar marker dalam DTL secara densitometri.

Hasil uji antimalaria *in vivo* pada tahun pertama ini juga menunjukkan bahwa fraksi diterpen lakton (DTL) sambiloto mempunyai aktivitas antimalaria terhadap parasit *P. berghei in vivo* dengan nilai  $ED_{50} = 9,17$  mg/kg BB mencit. Aktivitas antimalaria DTL pada pemberian dosis tunggal (satu kali sehari) per oral dengan dosis 100 (66,41 %) dan 10 mg/kg BB mencit (56,45%) menunjukkan aktivitas yang tidak berbeda nyata meskipun dosis berbeda 10 kalinya. Sedangkan pada pemberian DTL dengan dosis terbagi (dua kali 10 mg sehari) menunjukkan aktivitas yang lebih kuat dan mampu menghambat parasit rata-rata 92,22 %. Efektifitas pemberian DTL dengan dosis dua kali 10 mg sehari (total pemberian DTL pada mencit 20 mg sehari) masih jauh lebih rendah dibandingkan dosis toksiknya, khususnya pada uji hepatotoksik (Widyawaruyanti, 2001).

Hasil studi pengembangan formula dispersi padat dari diterpen lakton menunjukkan bahwa formula III dengan komposisi fraksi diterpen lakton DTL-PEG 8000-PVPK30-Myrj52 (2 : 1 : 1 : 0.2) merupakan formula terpilih. Formula ini dibuat tablet (150mg/tablet) dengan komposisi serbuk dispersi padat DTL = 155,5 mg (77%) yang mengandung 60 mg fraksi diterpen lakton, Avicel PH 102 = 33 mg (22 %), dan Mg stearat = 1,5 mg (1%). Tablet dengan formula terpilih ini memiliki laju disolusi pada menit ke 15 = 28,21; pada menit ke-30 = 62,15; pada menit ke-60 = 68,12. Untuk kekerasan tablet formula III memiliki rentang 6,80-7,17 kP dan rata-rata 6,80 kP, dan untuk waktu disintegrasi tablet formula III adalah 12 menit 33 detik – 13 menit 05 detik.

2. Pada tahun kedua penelitian ini dilanjutkan untuk mengetahui efektifitas dan keamanan tablet produk fitofarmaka (yang menggunakan formula terpilih) dari DTL pada uji preklinik (pada hewan coba).

### 1.2. Perumusan Masalah

Apakah produk fitofarmaka dari DTL efektif, berkualitas dan aman sebagai obat malaria pada uji preklinik ?

### 1.3. Tujuan Penelitian

**Tujuan Umum :** Mendapatkan produk fitofarmaka obat malaria dari fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees).

**Tujuan Khusus :**

1. Produksi tablet produk fitofarmaka fraksi diterpen lakton herba sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). Tahapan *Scale up* produksi ini bekerja sama dengan PT. Kimia Farma Tbk.
2. Uji preklinik untuk mengetahui aktivitas dan keamanannya pada hewan coba.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Tinjauan Tentang tanaman Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees)

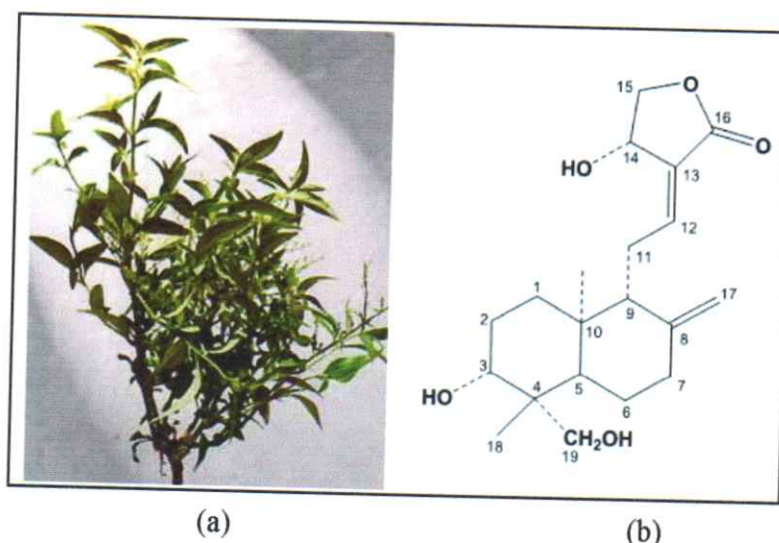
Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) termasuk ke dalam famili Acanthaceae. Banyak tumbuh di India, semenanjung Malaysia dan hampir di seluruh Indonesia pada ketinggian 1-700 m di atas permukaan laut. Digunakan secara tradisional di Indonesia untuk mengobati penyakit malaria, tifus, difteri, diabetes, faringitis, tonsilitis, demam, gatal-gatal, digigit serangga atau ular berbisa, disentri, dan penambah nafsu makan (Heyne, 1987).

Andrografolid adalah senyawa diterpen lakton yang merupakan senyawa utama dari sambiloto dengan kadar sekitar 2,5%. Disamping itu sambiloto juga mengandung glikosida diterpen lakton seperti : neoandrografolid, deoksi-andrografolid, 14-epiandrografolid, isoandrografolid, 14-deoksi-andrografolid, 14-deoksi-12-metoksiandrografolid, 12-epi-14-deoksi-12-metoksiandrografolid, 14-deoksi-12-hidroksi-andrografolid, 14-deoksi-11-hidroksiandrografolid, 14-deoksi-11,12-dihidroksiandrografisida, andrografisida, 6-asetoandrografolid, bisandrografolida-A, B, C dan D. Senyawa-senyawa ini umumnya terdapat pada bagian daun (*aerial parts*). Pada bagian akar umumnya terdapat senyawa golongan flavonoid yang terdiri atas : polimetoksiflavon, andrographin, paniculin, mono-o-metil wightin dan apigenin-7,4 dimetilester (Matsuda, 1994).

Sambiloto mempunyai efek farmakologis yang luas dan menguntungkan misalnya sebagai antiinflamasi, antidiare, antiviral, antimalaria, hepatoprotektif, kardiovaskular, antikanker dan imunostimulan (Jarukamjorn, 2008). Ekstrak etanol sambiloto menghambat pertumbuhan *P.berghei* NK 65 (Misra, 1992). Kombinasi ekstrak metanol sambiloto dan kurkumin dapat meningkatkan hambatan pertumbuhan terhadap *P.falciparum* strain MRC-pf-20 dan MRC-pf-303 (Misra, 2009). Administrasi ekstrak etanol sambiloto (25 mg/kg BB) dan dua senyawa diterpen yaitu andrografolid dan neoandrografolid (6 mg/kg BB) selama dua minggu menunjukkan aktivitas antihepatotoksik terhadap *P.berghei* K173 yang dapat menginduksi kerusakan hepar (Chander, 1995).

Chen (2008) mengisolasi dua pasang senyawa ent-labdane diterpen lakton stereoisomer dari bagian daun *Andrographis paniculata* yaitu 7R-hidroksi-14-deoksiandrografolid dan 7S-hidroksi-14-deoksiandrografolid, 12S,13S-hidroksiandrografolid dan 12R,13R-hidroksiandrografolid yang mempunyai aktivitas antiproliferatif pada sel human leukemia HL-60.

Empat senyawa xanton diisolasi dari akar *Andrographis paniculata* yaitu 1,8-dihidroksi-3,7-dimetoksixanton, 4,8-dihidroksi-2,7-dimetoksixanton, 1,2-dihidroksi-6,8-dimetoksixanton dan 3,7,8-trimetoksi-1-hidroksixanton yang mempunyai aktivitas antimalaria dengan menghambat pertumbuhan *P.falciparum*. Senyawa 1,2-dihidroksi-6,8-dimetoksixanton mempunyai aktivitas tertinggi dengan nilai  $IC_{50}$  sebesar 4  $\mu\text{g/ml}$  (Dua, 2004).



Gambar 2.1. Herba Sambilito (a) dan struktur andrografolid (b)

## 2.2. Studi pendahuluan yang telah dilakukan

1. Widyawaruyanti, dkk, (1995-2000), melaporkan bahwa ekstrak petroleum eter, kloroform dan heksan dari sambilito dapat menghambat pertumbuhan parasit *P. falciparum* secara *in vitro*.
2. Widyawaruyanti, dkk, (2001), melaporkan bahwa senyawa andrografolid hasil isolasi sambilito mempunyai aktivitas sebagai skizontosida ( $IC_{50} = 12,16 \mu\text{g/ml}$ ) dan gametosida ( $IC_{50} = 3,61 \mu\text{g/ml}$ ) *in vitro*.

3. Suyanto, (1995), juga melaporkan bahwa isolat dari fraksi kloroform ekstrak metanol sambiloto yang diduga merupakan salah satu glikosida diterpen lakton dapat menghambat pertumbuhan *P. falciparum*.
4. Najib Rahman, (1999), meneliti aktifitas antimalaria dari ekstrak metanol dan kloroform sambiloto secara *in vitro* dan *in vivo*, hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kloroform lebih aktif menghambat pertumbuhan parasit dibandingkan ekstrak metanol baik secara *in vivo* maupun *in vitro*.
5. Wiwied Ekasari (1998) dan Muhammad Adlan (1997) dalam penelitiannya melaporkan bahwa kadar andrografolid yang terkandung dalam simplisia kering adalah  $\pm 2,5\%$ , sedangkan dalam ekstrak etanol  $\pm 10.69\%$ .
6. Radjaram A. (2001), melakukan penelitian untuk mengembangkan sediaan farmasetika dari senyawa andrografolid dan hasil penelitiannya menunjukkan bahwa sistem dispersi padat andrografolid dengan pembawa HPMC3cp, HPCSL dan PEG 6000(1:4) dapat meningkatkan laju disolusi andrografolid dua kali lebih besar dibandingkan campuran fisik.
7. Widyawaruyanti, A. (2004), mengembangkan formulasi produk tablet dispersi padat dari senyawa andrografolid dan hasil penelitian menunjukkan, tablet andrografolid ini lebih aktif sebagai antimalaria dibandingkan isolat andrografolid
8. Widyawaruyanti, A. (2009), melaporkan metode fraksinasi diterpen lakton yang optimal, metode penetapan kadar marker dalam fraksi diterpen lakton yang valid, aktivitas antimalaria fraksi diterpen lakton terhadap *P.berghei* *in vivo* serta mengembangkan formulasi produk tablet dispersi padat dari fraksi diterpen lakton sambiloto.



### BAB III

#### BAHAN DAN METODE PENELITIAN

##### 3.1. Bahan dan alat yang digunakan

Bahan tanaman sambiloto diperoleh dari Divisi Risbang PT. Kimia Farma, Tbk. Bahan simplisia sudah dalam bentuk serbuk berwarna hijau, rasanya pahit, dengan kadar andrografolid 1,89 %.

Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini berderajat pro analisis, kecuali etanol untuk ekstraksi.

Alat yang digunakan adalah maserator, rotavapor, mikroskop, KLT densitometer, alat disolusi, granulator dll.

##### 3.2. Produksi Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto (Metode skala produksi)

Serbuk herba sambiloto diekstraksi dengan cara maserasi menggunakan etanol 96%. Sebanyak 15 kg herba sambiloto diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 120 liter (maserasi I). Dilakukan pengadukan setiap 1 jam selama 5-10 menit, selama 6 jam (pengadukan 6 kali) dengan temperatur  $\pm 35-40^{\circ}\text{C}$ . Setelah pengadukan selesai, didiamkan semalam kemudian dilakukan penyaringan ekstrak etanol sambiloto ke-1. Dilakukan maserasi ke-2 : residu di ekstraksi lagi menggunakan 75 liter etanol 96%. Dilakukan pengadukan setiap 1 jam selama 5-10 menit, selama 4 jam (pengadukan 4 kali) dengan temperatur  $\pm 35-40^{\circ}\text{C}$ . Setelah selesai, dilakukan pendinginan mesin untuk menurunkan suhu, *cooling*  $\pm 30$  menit, kemudian dilakukan penyaringan ekstrak etanol 2. Ekstrak sambiloto yang diperoleh kemudian dipekatkan hingga 20%.

Selanjutnya dilakukan fraksinasi cair-cair dengan menggunakan etil asetat. Perbandingan yang digunakan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:2,5:2 v/v). Sebanyak 1 liter ekstrak sambiloto ditambahkan air sebanyak 2,5 liter dan etil asetat 2 liter, dilakukan pengadukan kemudian fraksi etil asetat dipisahkan. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali, hingga fraksi etil asetat yang diperoleh berwarna bening, fraksi etil asetat ditampung kemudian langsung dipekatkan sehingga agak kental, diaman selama semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat disaring

untuk mendapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil asetat, kemudian keringkan.

### 3.3. Produksi Tablet Fraksi Diterpen Lakton

Sebanyak 15 mg fraksi diterpen lakton dibuat sediaan tablet dengan bobot 300 mg dengan menggunakan metode granulasi basah.

Tabel 3.1. Formula tablet diterpen lakton

Bahan	Jumlah
Fraksi DTL	15 mg
PEG 6000	15 mg
PVP K-25	3 mg
Laktosa	178.5 mg
Avicel PH 101	76.5 mg
Primogel	6 mg
Mg Stearat	3 mg
Talk	3 mg
Etanol 95 % sebagai pelarut	25 mL

Adapun cara pembuatannya adalah :

Sejumlah PVP K-25 dan PEG 6000 ditimbang seksama kemudian dicampur di mortir dan ditambahkan 25 mL etanol 95%, diaduk sampai larut. Kemudian ditimbang fraksi diterpen lakton, dimasukkan ke dalam massa tersebut dan diaduk sampai larut homogen. Sejumlah laktosa ditimbang, kemudian ditambahkan ke dalam campuran, diaduk sampai homogen. Ditimbang avicel PH 101, kemudian ditambahkan ke dalam massa campuran di atas, diaduk sampai terbentuk massa granul basah.

Massa yang diperoleh diayak basah dengan menggunakan ayakan mesh 12, kemudian dikeringkan di tray dryer pada suhu  $40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  selama 8 jam. Ditimbang Primogel, kemudian ditambahkan ke dalam massa yang telah kering, dicampur homogen (*thumbing*) selama 15 menit. Selanjutnya ditimbang Mg stearat dan talk, kemudian dicampur (*thumbing*) selama 5 menit. Massa yang terbentuk merupakan massa siap cetak. Massa tersebut ditabletasi dengan menggunakan mesin tablet Otto Meyer<sup>®</sup> dengan ukuran punch 11 dan tekanan 1-2 ton.

### **3.4. Uji Karakteristik Fisik Tablet**

Dilakukan uji karakteristik fisik tablet meliputi uji kekerasan dan uji waktu hancur tablet sebagai berikut :

#### **3.4.1. Uji Kekerasan**

Alat : Erweka Hardness Tester

Metode : diambil satu tablet, letakkan pada papan uji. Diatur parameter uji kekerasan yang tertera pada alat meliputi diameter tablet serta jumlah tablet yang diukur. Setelah siap, tekan tombol start, kemudian lihat angka yang tertera pada monitor alat. Uji dilakukan dengan 3 kali replikasi

#### **3.4.2. Uji Waktu Disintegrasi**

Alat : Erweka Disintegration Apparatus

Metode : dimasukkan 1 tablet pada masing-masing tabung pada keranjang, masukkan 1 cakram pada tiap tabung dan jalankan alat. Digunakan air bersuhu  $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$  sebagai media. Pada akhir batas waktu, angkat keranjang dan amati semua tablet. Semua tablet harus hancur sempurna.

### **3.5. Penentuan Laju Disolusi Tablet Fraksi Diterpen Lakton**

Dilakukan uji disolusi tablet fraksi diterpen lakton dengan cara dimasukkan 1 tablet uji pada labu disolusi yang berisi 900 mL aquadest. Uji disolusi dilakukan dengan menggunakan pengaduk tipe dayung dengan kecepatan 100 rpm pada suhu  $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ . Cuplikan diambil sebanyak 5 mL pada setiap interval waktu (menit ke-0, 3, 6, 9, 12, 15, 20, 25, 30, 40, 50, dan 60) kemudian disaring dengan membrane filter  $0,45 \mu\text{m}$ . setiap pengambilan cuplikan, media disolusi diganti dengan media aquadest sebanyak volume yang diambil. Kemudian masing-masing cuplikan diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Kemudian dihitung kadar fraksi diterpen lakton pada setiap sampel dengan koreksi Wurster dan dihitung efisiensi disolusi.

Analisa data dilakukan dengan menggunakan Anava satu arah dan bila terdapat perbedaan dilanjutkan dengan uji HSD.

### 3.6. Penetapan kadar fraksi diterpen lakton dalam granul diterpen lakton

Granul diterpen lakton diproduksi dengan mencampurkan 15 gram fraksi diterpen lakton kering dengan bahan tambahan sehingga bobot total 288 gram. Jumlah fraksi diterpen lakton dalam sediaan dihitung kembali dengan menentukan kadar andrografolid dalam fraksi diterpen lakton dan sediaan granul. Kadar fraksi diterpen lakton dihitung dengan mengkonversikan kadar andrografolid dalam sediaan granul terhadap kadar andrografolid dalam fraksi diterpen lakton, sehingga diperoleh kadar fraksi diterpen lakton = kadar andrografolid dalam granul dibagi kadar andrografolid dalam fraksi diterpen lakton fraksi diterpen lakton (%b/b).

#### a. Preparasi KLT

Dibuat fase gerak untuk KLT dengan mencampurkan 10 ml metanol dan 90 ml kloroform. Setelah campuran dihomogenkan dengan penggojogan, tuang ke dalam chamber yang pada dindingnya sudah terpasang kertas saring. Tutup rapat chamber dan biarkan hingga jenuh.

#### b. Preparasi sampel

Ditimbang fraksi diterpen lakton kering dan granul diterpen lakton masing-masing sebanyak 25 mg dan 75 mg, ditambah metanol sampai volume 2 ml kemudian digetarkan dengan ultrasonik selama 15 menit. Untuk larutan fraksi diterpen lakton diencerkan hingga 10 ml sedangkan larutan granul tidak diencerkan, replikasi 3 kali. Kemudian ditotolkan sebanyak 2  $\mu$ l pada plate silica gel GF<sub>254</sub>.

#### c. Preparasi larutan baku

Dibuat larutan baku induk dengan cara menimbang andrografolid sebanyak 10 mg kemudian dilarutkan dalam 1 ml metanol (1000 ppm). Larutan baku induk 1000 ppm diambil 50  $\mu$ l dan ditambah metanol sampai volume 500  $\mu$ l (larutan baku 100 ppm) dan 100  $\mu$ l larutan lalu ditambah metanol sampai volume 500  $\mu$ l (larutan baku 200 ppm). Dari larutan baku 100 ppm dan 200 ppm, dibuat baku kerja 0,2  $\mu$ g, 0,4  $\mu$ g, 0,6  $\mu$ g, 0,8  $\mu$ g, 1,0  $\mu$ g, dan 1,2  $\mu$ g dengan menotolkan larutan baku pada plate yang sama dengan sampel sebagai berikut:

##### a. Larutan baku kerja 0,2 $\mu$ g

Larutan baku 100 ppm ditotolkan sebanyak 2  $\mu$ l

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

- b. Larutan baku kerja 0,4  $\mu\text{g}$   
Larutan baku 200 ppm ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{l}$
- c. Larutan baku kerja 0,6  $\mu\text{g}$   
Larutan baku 100 ppm ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{l}$  dan 200 ppm ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{l}$
- d. Larutan baku kerja 0,8  $\mu\text{g}$   
Larutan baku 200 ppm ditotolkan sebanyak 4  $\mu\text{l}$
- e. Larutan baku kerja 1,0  $\mu\text{g}$   
Larutan baku 100 ppm ditotolkan sebanyak 2  $\mu\text{l}$  dan 200 ppm ditotolkan sebanyak 4  $\mu\text{l}$
- f. Larutan baku kerja 1,2  $\mu\text{g}$   
Larutan baku 200 ppm ditotolkan sebanyak 6  $\mu\text{l}$

Plate dielusi dengan fase gerak Kloroform : metanol (9:1v/v). Setelah fase gerak mencapai batas atas, plate diangkat dan dikeringkan. Scan plate dengan KLT-Densitometer pada panjang gelombang 233 nm. Hasilnya merupakan % berat dan diukur pula koefisien variasinya.

Linearitas ditentukan dengan menginjeksikan larutan standar dengan konsentrasi 0,2 sampai 1,2  $\mu\text{g}$ . Kemudian dibuat kurva regresi linier antara konsentrasi larutan standar ( $\mu\text{g}$ ) dengan luas area (mAU).

### 3.7. Uji Aktivitas Antimalaria Granul Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto Pada Mencit Terinfeksi *P. berghei*

Uji dilakukan terhadap mencit jantan yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Akan diamati penurunan tingkat parasitemia pada mencit setelah diobati dengan granul fraksi diterpen lakton per oral. Mencit yang telah terinfeksi parasit dibagi sesuai dengan bahan uji masing-masing terdiri atas 5 ekor. Kelompok perlakuan diberi suspensi bahan uji dalam CMC-Na (0,5%) dengan dosis 10 mg/kg BB dan 15 mg/kg BB secara per oral dalam dosis terbagi (dua kali sehari). Kelompok kontrol negatif diberi suspensi CMC-Na (0,5%). Setiap hari terhadap kelompok-kelompok tersebut dilakukan pengambilan darah dari bagian ekor dan dibuat hapusan darah tipis dengan pewarnaan Giemsa. Kemudian dihitung %

parasitemianya. Data dianalisis dengan membandingkan tingkat pertumbuhan parasit pada kontrol negatif.

### **3.8. Uji Toksisitas Granul Fraksi Diterpen Lakton Sambiloto Pada Mencit**

#### **a. Pengujian Toksisitas akut**

##### **Dosis Uji toksisitas Akut**

Sebagai dosis awal yang digunakan harga tertinggi dari suatu bahan yang dikategorikan sebagai "*relatively harmless*" menurut tabel Toxicity Rating (Dorelanko, 1995). Dinyatakan bahwa suatu bahan dikatakan praktis tidak beracun jika jumlah bahan uji pada tikus  $>15$  g/kg BB. Kemudian dilakukan penyetaraan dosis dari tikus ke mencit, dan diperoleh dosis sebesar 21 g/kg BB mencit.

Dosis yang digunakan pada mencit 20 g adalah  $20/1000 \times 21 \text{ g} = 0,42 \text{ g}$  fraksi diterpen lakton. Dari hasil tersebut dosis dinaikkan atau diturunkan untuk mendapatkan dosis yang membunuh mencit kurang dari 50 % tetapi tidak 0 % dan membunuh lebih dari 50 % tetapi tidak 100 % (Ghosh, 1971).

##### **Pengumpulan Data Uji Toksisitas Akut**

Disiapkan 4 kelompok mencit yang masing-masing terdiri dari 5 ekor mencit. Untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol, tiap hewan coba diberi granul diterpen lakton sesuai dengan dosis masing-masing. Pemberian dilakukan secara per oral sebanyak satu kali, kemudian dilakukan pengamatan selama 7 hari.

Kelompok I : Sebagai kelompok kontrol, diberi suspensi CMC Na 0,5%

Kelompok II : Diberi granul DTL dengan dosis tertinggi

Kelompok III : Diberi granul DTL dengan dosis  $\frac{1}{2}$  dosis tertinggi

Kelompok IV : Diberi granul DTL dengan dosis  $\frac{1}{4}$  dosis tertinggi

##### **Analisis Data Uji Toksisitas Akut**

Data yang diperoleh dalam penelitian dalam penelitian ini diolah dengan menggunakan probit analisis, suatu program komputer yang dibuat untuk menentukan  $LD_{50}$  dari granul diterpen lakton yang diuji. Prinsip pengolahan data dari program ini adalah mengekstrapolasikan dosis bahan uji dengan prosen letalitas (kematian) mencit yang diuji.

## **b. Pengujian toksisitas sub akut**

### **Dosis Uji toksisitas Subakut**

Dosis awal yang digunakan adalah dosis efektif (DE) antimalaria yaitu 10 mg/kg BB atau 0,2 mg/20 g BB. Dosis pengujian ditingkatkan sehingga digunakan 1 x DE, 5 x DE dan 10 x DE.

### **Pengumpulan Data Uji Toksisitas Subakut**

Disiapkan 5 kelompok mencit yang masing-masing terdiri dari 10 ekor mencit. Untuk semua kelompok kecuali kelompok kontrol, tiap hewan coba diberi granul DTL sesuai dengan dosis masing-masing. Pemberian dilakukan secara per oral sebanyak 1 kali selama 30 hari, kemudian hewan coba dikorbankan diambil hatinya untuk dibuat preparat.

Kelompok I : Sebagai kelompok kontrol, diberi suspensi CMC Na 0,5 %

Kelompok II : Diberi granul DTL setara dengan dosis efektif

Kelompok III : Diberi granul DTL dengan 5x dosis efektif

Kelompok IV : Diberi granul DTL dengan 10x dosis efektif

### **Analisis Data Uji Toksisitas Subakut**

#### **Pemeriksaan Preparat**

Pada penelitian ini menggunakan mikroskop cahaya agar dapat mengamati secara mikroskopik preparat hati mencit. Mula-mula digunakan perbesaran 100 kali kemudian digunakan perbesaran 400 kali. Setiap preparat hati mencit diamati perubahannya melalui lima lapang pandang yang berbeda.

Pada setiap lapang pandang, diamati perubahan-perubahan yang terjadi. Setiap preparat digeser minimal lima kali lapang pandang kemudian diskor, dijumlah dan dibagi lima, maka hasil dari lima kali pergeseran itu adalah data dari satu preparat. Cara pemberian skor yaitu apabila terjadi perubahan degenerasi kurang dari 50% lapang pandang, maka diberi skor 1 (satu) karena dianggap degenerasi yang terjadi adalah degenerasi ringan. Apabila degenerasi yang terjadi sekitar 50%, dianggap degenerasi yang terjadi adalah degenerasi sedang dan diberi skor 2 (dua). Dikatakan degenerasi berat apabila pada satu lapang pandang terjadi degenerasi lebih dari dari 50% dan diberi skor 3 (tiga). Bila dalam gambaran histopatologi tersebut terdapat perubahan sampai terjadi nekrosis maka perubahan tersebut ditandai 1 (satu) apabila nekrosis yang terjadi kurang dari

50%, diberi skor 2 (dua) apabila nekrosis yang terjadi kurang lebih 50% dan diberi skor 3 (tiga), apabila nekrosis yang terjadi lebih dari 50% (Sukardja, 1998).

Tabel 3.2. Skor perubahan gambaran histopatologi hati mencit

Tingkat Perubahan Gambaran Histopatologi Hati	Skor
Normal	0
Degenerasi Ringan	1
Degenerasi Sedang	2
Degenerasi Berat	3
Nekrosis Ringan	1
Nekrosis Sedang	2
Nekrosis Berat	3

### Analisis Data

Data perubahan gambaran histopatologi hati mencit yang telah diberi skor, diolah dengan penilaian peringkat (rank) lalu dianalisis menggunakan Uji Kruskal Wallis. Dipilih Uji Kruskal Wallis karena data diperoleh berdasarkan nilai skoring atau penilaian derajat perubahan. Bila terjadi perbedaan yang nyata diantara kelompok perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Perbandingan Berganda (uji Z) 5% (Daniel, 1990).

### Pembuatan Preparat Histopatologi

Pembuatan preparat histopatologi dilaksanakan di Laboratorium Patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Cara pembuatannya melalui beberapa tahap sebagai berikut: 1. Fiksasi dengan formalin 10% dilanjutkan pencucian dengan air, 2. Dihidrasi dan clearing, 3. Infiltrasi, 4. Pembuatan blok parafin, 5. Pemotongan blok parafin dengan mikrotom, 6. Pewarnaan dengan menggunakan Hematoxylin Eosin, 7. Pemberian lapisan Kanada balsam pada gelas objek yang telah diwarnai.



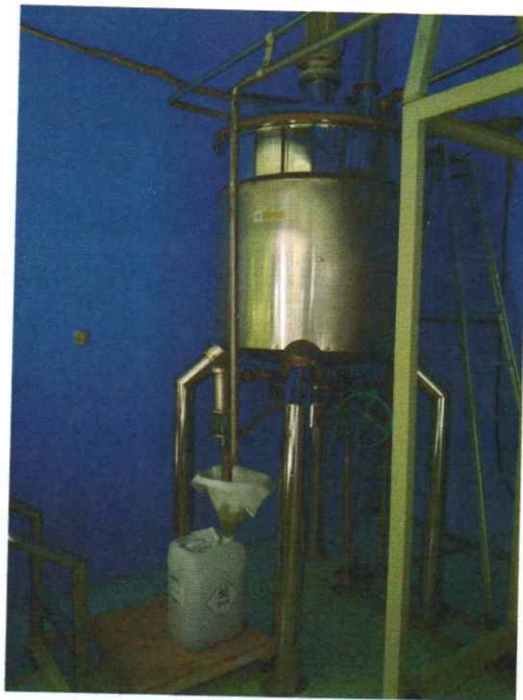
## BAB IV

### HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

#### 4.1. Proses produksi fraksi diterpen lakton

##### 4.1.1. Ekstraksi sambiloto (Skala produksi)

Ekstraksi 15 kg herba sambiloto menggunakan pelarut etanol 96% sebanyak 120 liter (maserasi I). Dilakukan pengadukan setiap 1 jam selama 5-10 menit, selama 6 jam (pengadukan 6 kali) dengan temperatur  $\pm 35-40^{\circ}\text{C}$ . Setelah pengadukan selesai, didiamkan semalam kemudian dilakukan penyaringan ekstrak etanol sambiloto ke-1 dan diperoleh ekstrak etanol sambiloto  $\pm 90$  liter. Dilakukan maserasi ke-2 : residu di ekstraksi lagi menggunakan 75 liter etanol 96%. Dilakukan pengadukan setiap 1 jam selama 5-10 menit, selama 4 jam (pengadukan 4 kali) dengan temperatur  $\pm 35-40^{\circ}\text{C}$ . Setelah selesai, dilakukan pendinginan mesin untuk menurunkan suhu, *cooling*  $\pm 30$  menit, kemudian dilakukan penyaringan ekstrak etanol 2. Diperoleh ekstrak etanol sambiloto  $\pm 62$  liter. Sehingga diperoleh total ekstrak  $\pm 152$  liter. Ekstrak sambiloto yang diperoleh kemudian dipekatkan hingga 20%, sehingga diperoleh ekstrak etanol pekat  $\pm 30$  liter.



Gambar 4.1. Ekstraktor



Gambar 4.2. Ekstrak etanol 96% sambiloto

#### 4.1.2. Fraksinasi ekstrak sambiloto

Selanjutnya dilakukan fraksinasi cair-cair dengan menggunakan etil asetat. Perbandingan yang digunakan : Ekstrak : Air : Etil asetat (1:2,5:2 v/v). Sebanyak 1 liter ekstrak sambiloto ditambahkan air sebanyak 2,5 liter dan etil asetat 2 liter, dilakukan pengadukan kemudian fraksi etil asetat dipisahkan. Fraksinasi dilakukan sebanyak 3 kali, hingga fraksi etil asetat yang diperoleh berwarna bening, fraksi etil asetat ditampung kemudian langsung dipekatkan sehingga agak kental, diamankan selama semalam. Keesokan harinya fraksi etil asetat disaring untuk mendapatkan kristal. Kristal yang didapat dicuci dengan etil asetat, kemudian keringkan.



Gambar 4.3. Ekstraktor cair-cair



Gambar 4.4. Fraksi DTL

## 4.2. Uji Karakteristik Fisik Tablet Fraksi Diterpen Lakton

### 4.2.1. Hasil Pemeriksaan Keseragaman Bobot Tablet

Tabel 4.1. Hasil pemeriksaan keseragaman tablet fraksi Diterpen Lakton

No	Bobot Tablet (mg)	No.	Bobot tablet (mg)
1	323,0	11	316,7
2	320,3	12	323,0
3	324,9	13	322,4
4	318,0	14	323,0
5	315,0	15	327,6
6	319,9	16	293,2
7	324,3	17	305,3
8	323,8	18	312,1
9	318,9	19	302,3
10	324,3	20	321,2
Rentang berat tablet = 305,3 – 327,6 mg			
Persyaratan = 277,5 – 322,5 mg (7.5%)			
Bobot tablet rerata = 317,9 mg			
Simpangan baku relatif = 2,3%			

Dari hasil uji keseragaman bobot tablet diperoleh bahwa sediaan berada pada rentang bobot 305,3 – 327,6 mg dengan bobot tablet rata-rata = 317,9 mg serta simpangan baku relatif < 6,0% yaitu sebesar 2,73%. Hal ini dikarenakan faktor *setting* alat dan jumlah massa cetak yang kurang dari jumlah yang dibutuhkan untuk proses berjalan optimal.

### 4.2.2. Hasil Pemeriksaan Ukuran Tablet

Tablet yang sudah selesai dicetak diukur diameter dan ketebalan tablet dengan menggunakan jangka sorong.

Tabel 4.2. Hasil pemeriksaan Ukuran tablet fraksi Diterpen Lakton

Diameter Tablet (mm)	Ketebalan tablet (mm)
<b>11,05</b>	<b>2,15</b>
10,95	2,25
10,95	2,30
Diameter rata-rata = 10,98 mm	Ketebalan rata-rata = 2,23 mm
SD = 0,06	SD = 0,08

#### 4.2.3 Hasil Pemeriksaan Kekerasan Tablet

Tabel 4.3. Hasil pemeriksaan kekerasan tablet fraksi diterpen lakton

No	Kekerasan (kP)
1	5,91
2	7,17
3	6,80
Rentang kekerasan tablet = 5,91 – 7,17 kP	
Rata-rata	= 6,63 kP
SD	= 0,64 %

#### 4.2.4. Pemeriksaan Kerapuhan Tablet

Tabel 4.4. Hasil pemeriksaan kerapuhan tablet fraksi diterpen lakton

Bobot sebelum uji	6.353,4 mg
Bobot setelah uji	6.330,4 mg
% bobot yang hilang selama uji	0,36%

Dari hasil uji kerapuhan tablet diperoleh hasil bahwa kerapuhan tablet adalah 0,36%.

#### 4.2.5. Pemeriksaan Waktu Dintegrasi Tablet

Berdasarkan hasil uji waktu disintegrasi tablet, diperoleh hasil bahwa seluruh tablet (6 buah tablet) pada tabung disintegrasi telah hancur secara sempurna pada waktu 10 menit 14 detik. Hal ini telah menunjukkan bahwa formula terpilih telah memenuhi persyaratan waktu disintegrasi tablet obat tradisional yakni  $\leq 20$  menit.

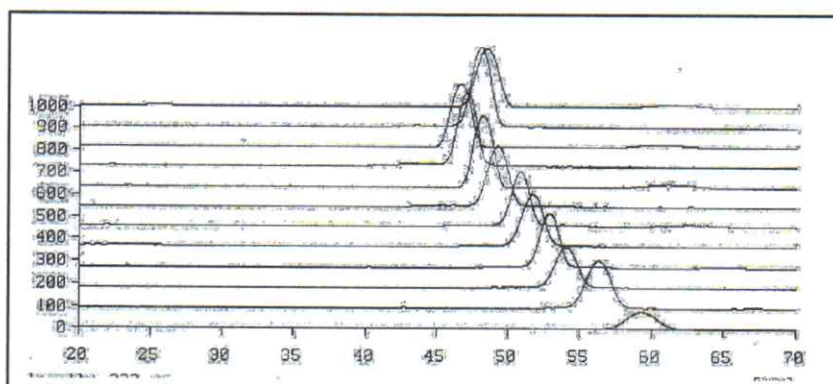


Gambar 4.5. Granul dan Tablet Diterpen Lakton

#### 4.3. Penetapan kadar fraksi diterpen lakton dalam granul diterpen lakton

Penentuan selektivitas dilakukan untuk menentukan kondisi optimal analisis KLT andrografolid dalam fraksi diterpen lakton, yang mana andrografolid dapat terpisah baik dari senyawa-senyawa lain yang ada dalam fraksi.

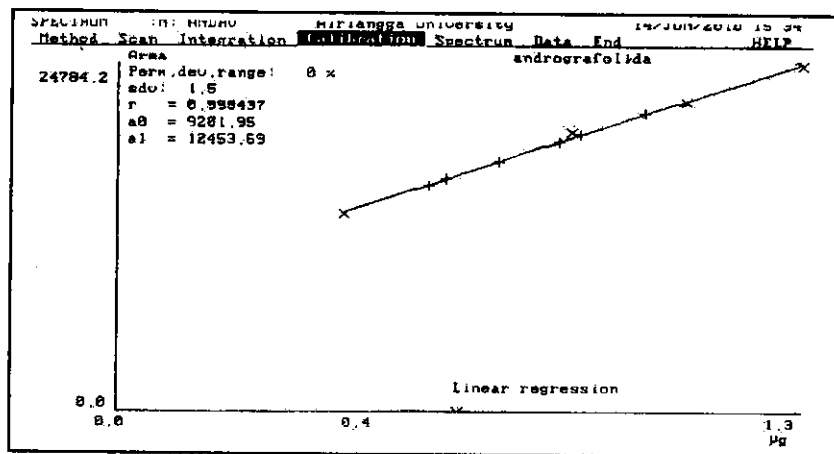
Pada kromatogram KLT dengan kondisi plate silica gel GF<sub>254</sub>, fase gerak kloroform : Metanol (90:10 v/v), Scanning KLT-densitometri pada panjang gelombang maksimum 233 nm tampak bahwa andrografolid merupakan 1 puncak dominan dengan jarak migrasi 55 mm. Sedangkan dalam granul dan fraksi diterpen lakton ada dengan jarak migrasi berturut-turut 54 mm dan 46,6 mm.



Gambar 4.6. Kromatogram KLT andrografolid, fraksi diterpen lakton, dan granul diterpen lakton dengan sistem silica gel GF<sub>254</sub>, fase gerak kloroform : metanol (90 : 10 v/v), panjang gelombang 233 nm.

Tabel 4.5. Tabel konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No	Konsentrasi larutan standar (ppm)	Luas area (mAU)
1	0,42	14271,7
2	0,84	20036,4
3	1,05	22175,5
4	1,26	24784,2



Gambar 4.7. Kurva regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ppm) dengan luas area (mAU)

Berdasarkan hasil analisis regresi linier hubungan antara konsentrasi larutan standar (ug) dengan luas area (mAU), diperoleh persamaan regresi:

$$Y = 9201,95X + 12453,69, \text{ dengan nilai koefisien korelasi } (r) = 0,99944$$

Tabel 4.6. Konsentrasi granul dan fraksi diterpen lakton yang ditotolkan pada plate silica gel GF<sub>254</sub> (ug) dengan luas area yang diperoleh (mAU)

No.	Penimbangan sampel	Luas area (mAUs)	Kadar senyawa marker (ug) $Y = 9201,95X + 12453,69$	Kadar Andrografolid(%)
<b>Granul Diterpen Lakton</b>				
1	76,2	17989,2	0,57	3,74
2	75,7	16753,7	0,48	3,17
3	75,2	16370,4	0,48	2,86
Rata-rata				3,26
SD				0,447
KV				13,7%
<b>Fraksi Diterpen Lakton</b>				
1	15,6	21332,2	0,98	62,8
2	15,2	19372,5	0,86	56,6
3	15,5	19870,9	0,87	56,2
Rata-rata				58,5
SD				3,7
KV				6,4%

Data pada tabel di atas menunjukkan bahwa kadar andrografolid dalam fraksi diterpen lakton sebesar  $58,5 \pm 3,7$  % b/b, pada analisis menggunakan KLT dengan plate silica gel GF<sub>254</sub>, fase gerak kloroform : Metanol (90:10 v/v), Scanning KLT-densitometri pada panjang gelombang maksimum 233 nm dan presisi alat dengan koefisien variasi 6,4 %. Jadi dalam 1 mg fraksi diterpen lakton terdapat 0,585 mg andrografolid.

Sedangkan kadar andrografolid dalam granul sebesar  $3,26 \pm 0,447$  % b/b dengan koefisien variasi 13,7%. Jadi dalam 1 mg granul terdapat 0,0326 mg andrografolid. Sehingga kadar fraksi diterpen lakton dalam granul dapat dihitung sebagai berikut: Kadar diterpen lakton = kadar andrografolid dalam granul/ kadar andrografolid dalam fraksi. Maka kadar diterpen lakton dalam granul adalah  $3,26/58,5 = 0,0557$  mg/ mg granul.

**4.4. Uji Aktivitas Antimalaria Granul Fraksi Diterpen Lakton Sambilotto Pada Mencit Terinfeksi *P.berghei***

Hapusan darah yang dibuat dengan pewarnaan Giemsa diamati dengan mikroskop pada perbesaran 1000 kali. Hasil pengamatan aktivitas antimalaria pemberian dosis ganda (dosis DTL dalam granul sebesar 10 mg/kg BB dan 15 mg/kg BB, diberikan 2 kali sehari selama 4 hari) dapat dilihat pada tabel dibawah.

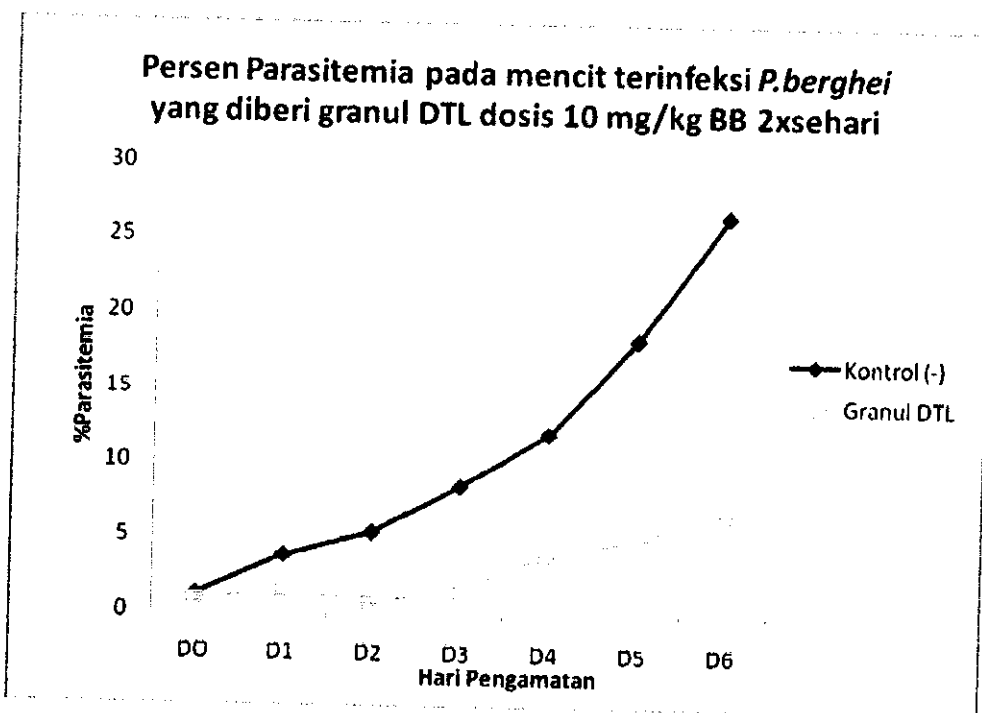
**Tabel 4.7. Persen Parasitemia, Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan, dan Persen Penghambatan Rata-rata granul DTL Sambilotto Pemberian Dosis Ganda 10 mg/kg BB**

Kelompok	R	D0	D4	Persen Pertumbuhan	Persen Penghambatan	Persen Penghambatan Rata-Rata
dosis 10 mg/kgBB	1	0,38	4,28	3,90	64,17	71,14
	2	0,91	3,31	2,40	77,95	
	3	0,18	3,93	3,75	65,55	
	4	1,41	3,95	2,54	76,67	
	5	0,87	3,99	3,12	71,34	
kontrol (-)	1	0,81	12,11	11,30	-	-
	2	0,49	11,34	10,85	-	
	3	0,79	12,44	11,65	-	
	4	1,76	11,63	9,87	-	
	5	2,06	12,82	10,76	-	

**Tabel 4.8. Persen Parasitemia yang diamati per hari, dan Persen Parasitemia Rata-rata granul DTL Sambilotto Pemberian Dosis Ganda 10 mg/kg BB**

Kelompok	R	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Kontrol (-)	1	0,81	4,13	6,23	8,01	12,11	20,33	29,98
	2	0,49	3,13	5,41	6,14	11,34	20,02	28,79
	3	0,79	4,07	6,21	8,17	12,44	21,89	29,92
	4	1,76	2,77	3,64	10,58	11,63	15,61	18,88
	5	2,06	4,91	5,34	9,52	12,82	14,29	25,48
	rata-rata	1,18	3,80	5,36	8,48	12,06	18,42	26,61
granul DTL	1	0,38	1,15	0,89	1,48	4,28	4,82	6,40
	2	0,91	1,30	0,91	2,13	3,31	4,72	6,80
	3	0,18	1,34	0,53	1,29	3,93	5,31	6,40
	4	1,41	1,58	0,77	1,77	3,95	5,02	8,40
	5	0,87	1,60	0,63	1,47	3,99	4,79	5,70
	rata-rata	0,75	1,39	0,74	1,62	3,89	4,93	6,74





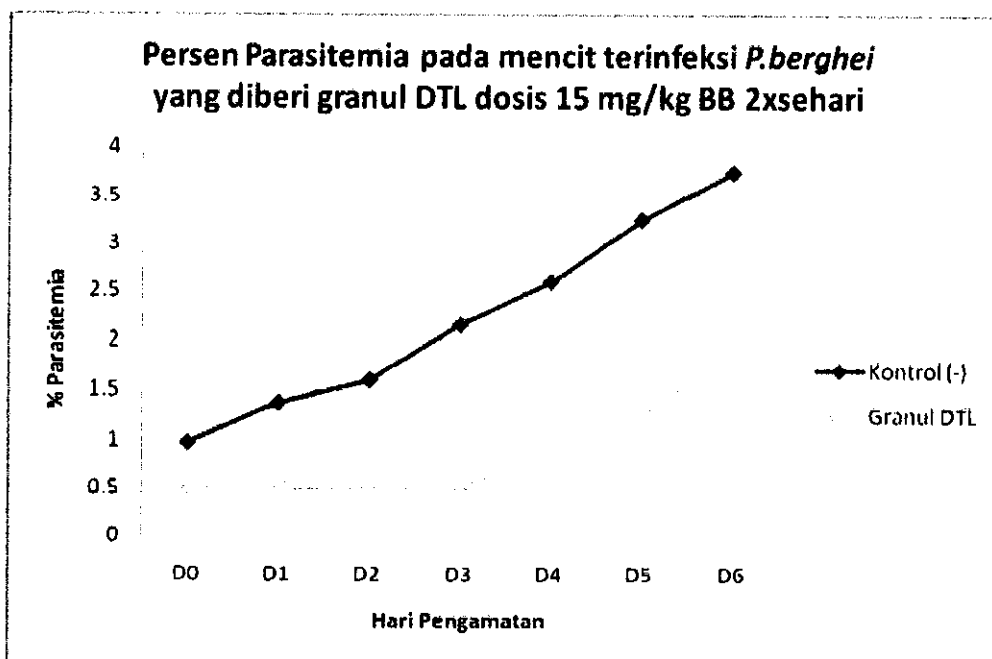
Gambar 4.8. Persen parasitemia pada mencit terinfeksi *P.berghei* yang diberi granul DTL (10 mg/kg BB) dibandingkan dengan kontrol (-) yang diamati tiap hari

Tabel 4.9. Persen Parasitemia, Persen Pertumbuhan, Persen Penghambatan, dan Persen Penghambatan Rata-rata granul DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda 15 mg/kg BB

Kelompok	R	D0	D4	Persen Pertumbuhan	Persen Penghambatan	Persen Penghambatan Rata-Rata
dosis 15 mg/kgBB	1	0,98	1,24	0,26	83,85	82,86
	2	0,50	1,03	0,53	67,08	
	3	0,28	0,67	0,39	75,78	
	4	0,19	0,19	0	100,0	
	5	0,58	0,78	0,20	87,58	
kontrol (-)	1	0,75	2,00	1,25	-	-
	2	1,09	3,27	2,18	-	
	3	1,21	3,15	1,94	-	
	4	0,50	2,34	1,84	-	
	5	1,37	2,21	0,84	-	

Tabel 4.10. Persen Parasitemia yang diamati per hari, dan Persen Parasitemia Rata-rata granul DTL Sambiloto Pemberian Dosis Ganda 15 mg/kg BB

Kelompok	R	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Kontrol (-)	1	0,75	1,28	1,35	1,58	2,00	3,06	5,32
	2	1,09	1,40	1,42	2,07	3,27	3,70	3,77
	3	1,21	1,55	1,88	3,00	3,15	3,75	3,39
	4	0,50	0,94	1,67	1,99	2,34	3,18	3,43
	5	1,37	1,64	1,69	2,15	2,21	2,58	2,78
	rata-rata	<b>0,97</b>	<b>1,37</b>	<b>1,60</b>	<b>2,16</b>	<b>2,60</b>	<b>3,25</b>	<b>3,74</b>
granul DTL	1	0,98	0,78	0,45	0,65	1,24	1,53	1,93
	2	0,50	0,92	0,68	0,91	1,03	1,44	1,89
	3	0,28	0,18	0,44	0,50	0,67	1,75	2,46
	4	0,19	0,09	0,00	0,00	0,19	0,51	1,41
	5	0,58	0,47	0,62	0,60	0,78	0,92	1,86
	rata-rata	<b>0,51</b>	<b>0,49</b>	<b>0,44</b>	<b>0,53</b>	<b>0,78</b>	<b>1,23</b>	<b>1,91</b>



Gambar 4.9. Persen parasitemia pada mencit terinfeksi *P.berghei* yang diberi granul DTL (15 mg/kg BB) dibandingkan dengan kontrol (-) yang diamati tiap hari

### **Analisis Data granul DTL Pemberian Dosis Ganda**

Berdasarkan hasil pengujian aktivitas antimalaria granul DTL Sambiloto dengan dosis ganda (10 mg/kg BB), dapat dilihat pada grafik (Gambar 4.6) bahwa model terapi dosis ganda dapat menghambat pertumbuhan parasitemia bila dibandingkan dengan kontrol negatif. Pola pertumbuhan parasit pada kelompok uji juga menunjukkan penurunan persen parasitemia pada D2. Nilai persen penghambatan pada dosis ganda yaitu 71,14% (pengamatan pada D<sub>4</sub>).

Pada pengujian aktivitas antimalaria granul DTL sambiloto dengan dosis ganda dilakukan peningkatan dosis perlakuan yaitu 15 mg/kg BB. Dapat dilihat pada grafik (Gambar 4.) bahwa pada dosis ini juga menunjukkan pola penurunan persen parasitemia pada D2. Nilai persen penghambatan pertumbuhan parasitemia juga mengalami peningkatan sebanding dengan peningkatan dosis perlakuan, nilai persen penghambatan pada dosis ganda 15 mg/kg BB yaitu 82,86% (pengamatan pada D<sub>4</sub>).

## **4.5. Uji Toksisitas dan Keamanan pada Hewan Coba**

### **4.5.1. Pengujian Toksisitas Akut**

#### **Perhitungan Dosis**

Dosis perlakuan yang digunakan berdasarkan klasifikasi toksisitas dosis tertinggi dimana termasuk kategori bahan yang relatif tidak berbahaya yaitu 21g/kg BB mencit. Dosis perlakuan yang digunakan pada mencit 25 g adalah 525 mg granul Fraksi diterpen lakton. Setelah diadaptasi selama satu minggu, mencit diberi suspensi granul DTL dengan dosis 525 mg/25 g BB per oral pada hari pertama. Selanjutnya dilakukan pengamatan selama 7 hari untuk melihat perubahan perilaku pada mencit dan adanya kematian mencit setelah perlakuan.

### Data Hasil Pengamatan

Tabel 4.11. Berat badan mencit sebelum perlakuan dan sesudah perlakuan yang diamati selama 7 hari

Kelompok	R	BB sebelum perlakuan	BB hari ke-7
Jantan	1	26	27
	2	28	28
	3	21	22
	4	29	30
	5	26	30
Betina	1	25	26
	2	22	23
	3	21	20
	4	23	24
	5	24	24

Tabel 4.12. Hasil uji toksisitas akut sediaan suspensi granul fraksi diterpen lakton pada mencit jantan dan betina

Kelompok	Jumlah Mencit	
	Mati	Hidup
Jantan	0	5
Betina	0	5

Pada uji toksisitas akut pada mencit digunakan dosis yang tertinggi untuk bahan yang tergolong relatif tidak berbahaya yaitu 21 g/kg BB mencit. Hasil uji toksisitas akut dengan dosis yang tertinggi tersebut tidak menunjukkan kematian pada mencit sehingga disimpulkan bahwa semua toksisitas akut yang berbahaya dapat disingkirkan dengan LD<sub>50</sub> tidak perlu ditentukan atau dapat pula dosis yang digunakan yaitu dosis yang tergolong klasifikasi relatif tidak berbahaya tersebut dijadikan sebagai LD<sub>50</sub> untuk sediaan granul fraksi diterpen lakton sambiloto.

#### 4.5.2. Uji Toksisitas Sub akut

##### Perhitungan Dosis

Dosis perlakuan dibagi menjadi tiga dosis yaitu Dosis efektif (D1), 5 kali Dosis efektif (D2) dan 10 kali Dosis efektif (D3). Dosis efektif yang digunakan adalah 10 mg/kg BB, maka D1 : 10 mg/kg BB; D2 : 50 mg/kg BB, D3 : 100 mg/kg BB.

Tabel 4.13. Berat badan mencit sebelum dan sesudah perlakuan selama 14 hari

Kelompok	Replikasi	BB sebelum perlakuan (g)	BB sesudah perlakuan (g)	kenaikan BB (g)
Kontrol	1	27,0	33,0	6,0
	2	27,5	32,5	5,0
	3	26,0	30,0	2,0
	4	27,0	33,0	6,0
	5	30,0	30,0	0
	6	28,0	31,0	3,0
	7	26,0	30,0	4,0
	8	29,0	25,0	4,0
	9	25,0	31,0	6,0
	10	29,0	30,0	1,0
D1	1	29,0	33,0	4,0
	2	26,5	35,0	8,5
	3	25,0	29,0	4,0
	4	24,0	30,0	6,0
	5	25,0	29,5	4,5
	6	26,0	29,0	3,0
	7	28,0	28,5	0,5
	8	29,0	31,5	2,5
	9	27,5	26,0	-1,5
	10	29,0	36,0	7,0
D2	1	25,0	30,0	5,0
	2	27,5	26,0	-1,5
	3	23,0	30,0	7,0
	4	24,0	34,0	10,0
	5	29,0	37,5	8,5
	6	26,5	34,5	8,0
	7	26,0	31,0	5,0
	8	26,5	32,5	6,0
	9	24,5	27,5	3,0
	10	25,0	30,0	5,0
D3	1	27,0	31,0	4,0
	2	27,5	34,0	6,5
	3	27,0	30,0	3,0
	4	24,0	29,5	5,5
	5	25,0	32,0	7,0
	6	25,0	26,0	1,0
	7	29,0	33,5	4,5
	8	29,0	35,5	6,5

	9	27,5	32,5	5,0
	10	29,0	33,0	4,0

Tabel 4.14. Hasil Pemeriksaan Kadar SGOT, SGPT, BUN dan kreatinin pada Mencit

Kelompok uji	Replikasi	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	BUN (mg/dl)	Kreatinin (mg%)
Kontrol (-)	1	63	18	26,97	1,50
	2	51	12	26,16	1,49
	3	39	15	25,23	2,62
	4	73	48	22,20	1,84
	5	74	26	22,44	2,35
	6	74	20	33,60	2,58
	7	70	25	19,75	1,91
	8	64	22	39,26	1,92
	9	31	25	32,63	1,26
	10	18	54	31,90	2,74
D1	1	76	20	22,20	1,77
	2	74	22	21,04	1,06
	3	65	19	32,67	1,96
	4	75	20	14,65	1,92
	5	92	23	29,65	1,32
	6	67	11	23,02	1,91
	7	64	17	23,13	1,54
	8	74	15	33,13	1,73
	9	63	22	30,23	2,39
	10	73	22	23,95	1,27
D2	1	27	33	39,18	1,07
	2	35	54	38,60	1,22
	3	29	20	27,67	1,28
	4	25	13	23,60	1,74
	5	25	29	21,04	1,10
	6	64	36	35,81	1,80
	7	73	24	21,62	1,57
	8	65	20	37,90	2,17
	9	29	18	32,20	0,92
	10	63	14	32,20	1,27
D3	1	33	17	34,88	1,79
	2	25	20	39,18	0,98
	3	25	29	40,46	1,75
	4	31	12	36,74	1,20
	5	60	14	37,20	2,35
	6	63	18	36,39	1,55
	7	31	20	36,97	1,41
	8	47	20	41,51	0,82

	9	70	12	36,92	2,72
	10	62	44	20,11	1,57

### Hasil Analisis Data

Dari data-data yang diperoleh selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metode statistik ANAVA sehingga akan didapatkan harga – harga sebagai berikut:

Analisis berat badan mencit

Tabel 4.15. Harga Rerata Kenaikan Berat Badan Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	BB (g)	Simpangan Baku
Kontrol	10	3,7	2,1
D1	10	3,8	2,9
D2	10	5,6	3,2
D3	10	4,7	1,8

Tabel 4.16. Ringkasan ANAVA Kenaikan Berat Badan Hewan Coba

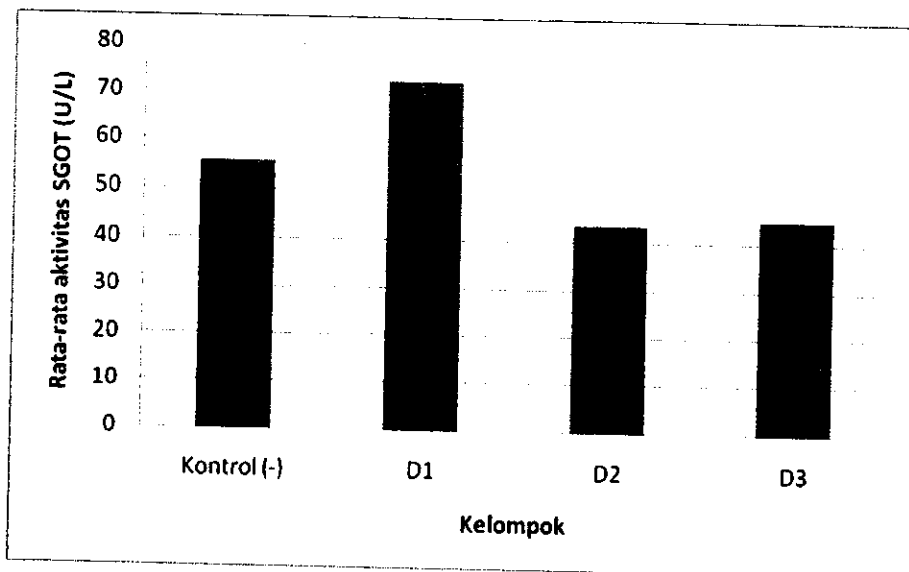
Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	23,0	3	7,6	1,129	0,350
Dalam Kelompok	245,1	36	6,8		
Total	268,1	39			

Dari data diatas menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kenaikan berat badan. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih besar daripada 0,05.

Pada hasil analisis berat badan mencit sebelum dan sesudah perlakuan, tidak ditemukan adanya perbedaan kenaikan berat badan yang bermakna antar kelompok dosis dan control (-). Hal ini berarti pemberian bahan uji dengan dosis 10, 50 dan 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak mempengaruhi kenaikan berat badan hewan coba.

Tabel 4.17. Harga Rerata Kadar SGOT Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar SGOT (U/L)	Simpangan Baku
Kontrol	10	55,7	20,1
D1	10	72,3	8,5
D2	10	43,5	19,9
D3	10	44,7	17,6



Gambar 4.10. Histogram hubungan aktivitas enzim SGOT hewan coba dengan pemberian granul DTL

Tabel 4.18. Ringkasan ANAVA Kadar SGOT Hewan Coba

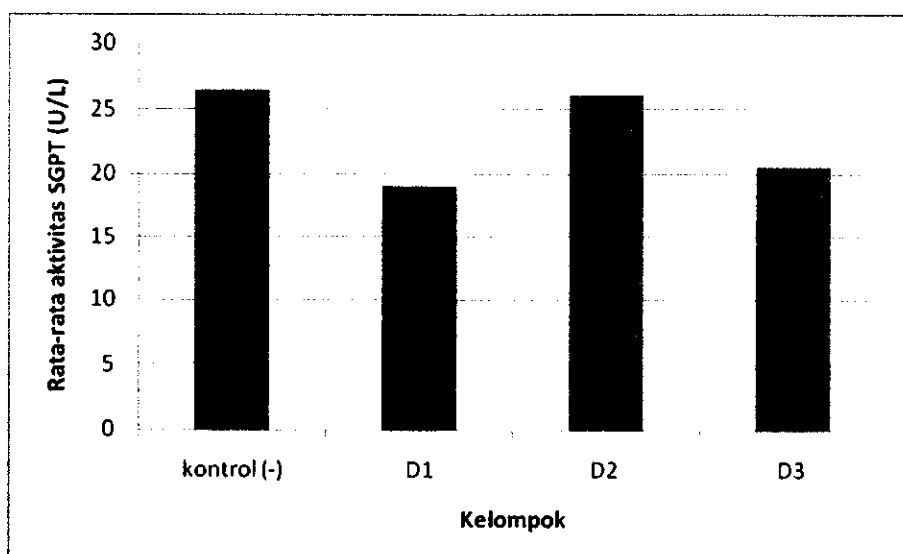
Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	5345,1	3	1781,7	6,014	0,002
Dalam Kelompok	10664,8	36	296,2		
Total	16009,9	39			

Dari data diatas menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar SGOT. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih kecil daripada 0,05.

Tabel 4.19. Harga Rerata Kadar SGPT Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar SGPT (U/L)	Simpangan Baku
Kontrol	10	26,5	13,7
D1	10	19,1	3,7
D2	10	26,1	12,4
D3	10	20,6	9,6





Gambar 4.11. Histogram hubungan aktivitas enzim SGPT hewan coba dengan pemberian granul DTL

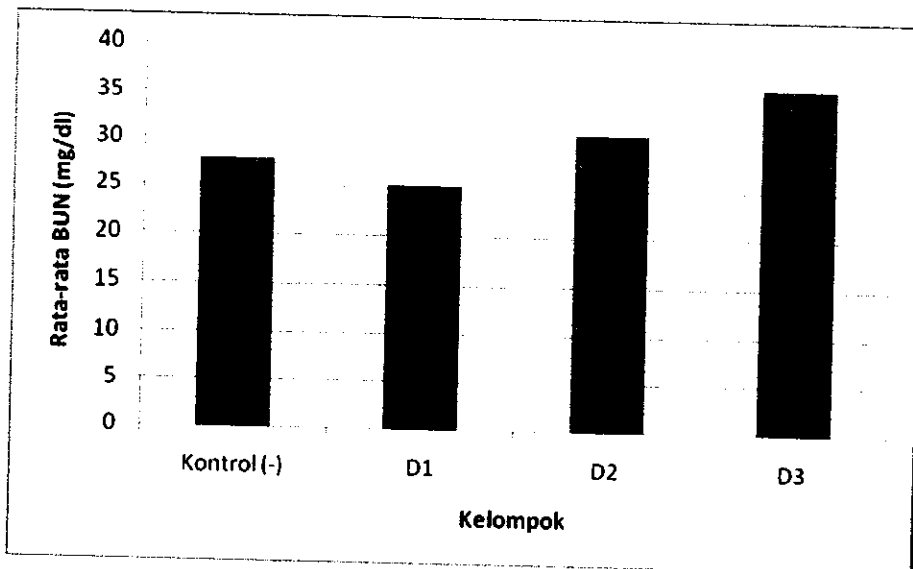
Tabel 4.20. Ringkasan ANAVA Kadar SGPT Hewan Coba

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	428,1	3	142,7	1,267	0,300
Dalam Kelompok	4054,7	36	112,6		
Total	4482,7	39			

Dari data diatas menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar SGPT. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih besar daripada 0,05.

Tabel 4.21. Harga Rerata Kadar BUN Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar BUN (mg/dl)	Simpangan Baku
Kontrol	10	28,0	6,1
D1	10	25,3	5,8
D2	10	30,9	7,0
D3	10	36,0	5,9



Gambar 4.12. Histogram hubungan kadar BUN hewan coba dengan pemberian granul DTL

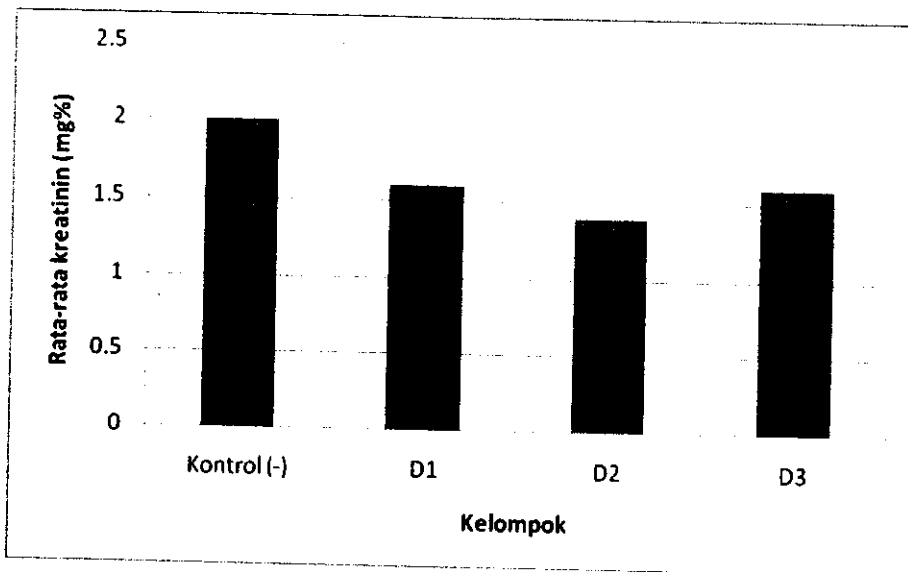
Tabel 4.22. Ringkasan ANAVA Kadar BUN Hewan Coba

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	627,6	3	209,2	5,302	0,004
Dalam Kelompok	1420,6	36	39,4		
Total	2048,2	39			

Dari data diatas menunjukkan ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar BUN. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih kecil daripada 0,05.

Tabel 4.23. Harga Rerata Kadar Kreatinin Hewan Coba Tiap Kelompok

Kelompok	N	Rerata kadar Kreatinin (mg%)	Simpangan Baku
Kontrol	10	2,0	0,5
D1	10	1,6	0,3
D2	10	1,4	0,3
D3	10	1,6	0,5



Gambar 4.13. Histogram hubungan kadar kreatinin hewan coba dengan pemberian granul DTL

Tabel 4.24. Ringkasan ANAVA Kadar Kreatinin Hewan Coba

Sumber Variasi	Jumlah Kuadrat	Derajat Bebas	Kuadrat Rerata	F Hitung	Sig
Antar Kelompok	1,9	3	0,6	2,753	0,057
Dalam Kelompok	8,3	36	0,2		
Total	10,2	39			

Dari data diatas menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna antar kelompok dalam hal kadar kreatinin. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) lebih besar daripada 0,05.

Pada hasil uji ANAVA terhadap kadar SGOT menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok, hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0,05. Selanjutnya dilakukan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan perbedaan antara kontrol dengan kelompok D1. Rata-rata kadar SGOT kelompok D1= 72,3U/L sedangkan harga normal SGOT pada mencit adalah 70-400 U/L. Berarti tidak ada pengaruh peningkatan SGOT terhadap hewan coba terhadap pemberian granul diterpen lakton dengan dosis 10, 50, 100 mg/kg BB.

Pada uji ANAVA terhadap kadar SGPT tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) pada tabel yang lebih besar dari 0,05. Jadi pemberian bahan uji dengan dosis 10, 50 dan 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak mempengaruhi kadar SGPT hewan coba.

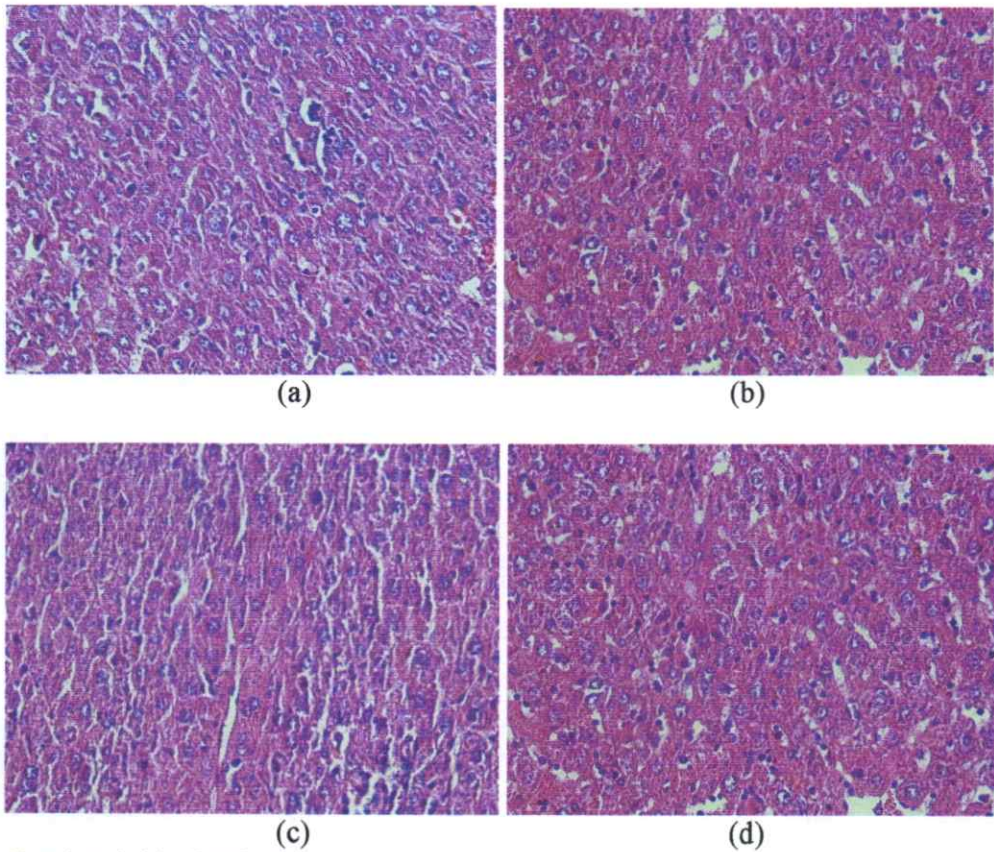
Pada hasil uji ANAVA terhadap kadar BUN menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok, hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) pada tabel yang lebih kecil daripada 0,05. Selanjutnya dilakukan uji Duncan's Multiple Range Test (DMRT) menunjukkan perbedaan antara kontrol dengan kelompok D3. Rata-rata kadar BUN kelompok D3 = 36,03 mg/dl. Sedangkan harga normal BUN pada mencit adalah 13,9 – 28,3 mg/dl. Berarti ada pengaruh peningkatan BUN terhadap hewan coba terhadap pemberian granul diterpen lakton dengan dosis 100 mg/kg BB selama 14 hari.

Rata-rata kadar kreatinin kelompok kontrol = 2,02 mg%, kelompok D1 = 1,68 mg%, kelompok D2 = 1,41 mg%, kelompok D3 = 1,61 mg%. Sedangkan harga normal kreatinin pada mencit adalah 0,3 – 1,0 mg/dl. Pada uji ANAVA terhadap kadar kreatinin tidak menunjukkan adanya perbedaan bermakna antar kelompok. Hal ini dapat dilihat dari harga signifikansi (sig) pada tabel yang lebih besar dari 0,05. Jadi pemberian bahan uji dengan dosis 10, 50 dan 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak mempengaruhi kadar kreatinin hewan coba.

### **Pemeriksaan Histopatologi**

#### **Nilai Skor Perubahan Gambaran Histopatologi Hati Mencit**

Perubahan yang nampak pada gambaran histopatologi hati mencit diperoleh dari pengamatan secara mikroskopik melalui lima lapang pandang yang berbeda terhadap seluruh kelompok perlakuan, dicatat, diskor lalu diolah dengan penilaian peringkat (Rank). Hasil pengamatan preparat histopatologi hati mencit dapat dilihat pada gambar dan tabel berikut.



Gambar 4.14. Gambaran mikroskopis sel hati mencit pada kelompok control (-) (a), dosis 10 mg/kg BB (b), dosis 50 mg/kg BB (c) dan dosis 100 mg/kg BB (d) dengan pewarnaan HE dan perbesaran 400x setelah pemberian granul DTL selama 14 hari.

Tabel 4.25. Nilai skor perubahan gambaran hitopatologi hati mencit pada kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa degenerasi pada uji tablet DTL

No.	Kontrol (-)	D1	D2	D3
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1
5	0	0	0	0

Tabel 4.26. Nilai skor perubahan gambatan histopatologi hati mencit pada kelompok perlakuan yang mengalami perubahan berupa nekrosis pada uji tablet DTL

No.	Kontrol (-)	D1	D2	D3
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0

Berdasarkan hasil pengamatan pada preparat hati mencit melalui lima lapang pandang menunjukkan adanya perubahan histopatologi hati berupa degenerasi pada kelompok dosis 50 mg/kg BB dan 100 mg/kg BB tetapi tidak ditemukan adanya nekrosis. Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan uji statistik Kruskal Wallis (Lampiran 5). Hasil uji statistik menunjukkan tidak adanya perubahan nyata antara kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol (-) yang ditunjukkan dari harga signifikansi (Sig) lebih besar dari 0,05. Dosis tertinggi yang digunakan pada uji toksisitas sub akut adalah 100 mg/kg BB yang diberikan selama 14 hari sehingga total pemberian adalah 35 mg fraksi DTL dalam granul, sedangkan dosis terapi untuk antimalaria adalah 10-15 mg/kg BB yang diberikan selama 4 hari (dosis ganda, 2xsehari) sehingga total pemberian adalah 2-3 mg fraksi DTL dalam granul. Dapat dilihat bahwa dosis uji aktivitas jauh lebih rendah daripada dosis uji toksisitas sub akut sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian granul DTL dosis 10, 50 dan 100 mg/kg BB tidak menyebabkan terjadinya perubahan histopatologi hati pada mencit.

## BAB V

### PENUTUP

#### 5.1. Kesimpulan

1. Telah dilakukan ekstraksi *scaling up* sambiloto dan fraksinasi untuk mendapatkan fraksi diterpen lakton dengan metode yang telah diperoleh dari hasil optimasi. Ekstraksi menggunakan pelarut etanol 96 %, dimaserasi dua kali masing-masing selama 24 jam, dan proses pengadukan tiap 1 jam selama 5-10 menit selama 6 jam pada maserasi I dan 4 jam pada maserasi II.
2. Telah dilakukan fraksinasi ekstrak etanol dengan perbandingan ekstrak : etil asetat : air (1 : 2 : 2,5). Dari 15 kg herba sambiloto diperoleh 30 liter ekstrak etanol 96% pekat. Dari 2 liter ekstrak etanol pekat diperoleh 5,6 gram fraksi diterpen lakton.
3. Telah diperoleh tablet diterpen lakton yang diproduksi dengan metode granulasi basah. Bobot tablet 305,3-327,6 mg dengan ukuran rata-rata diameter tablet 10,98 mm dan tebal 2,23 mm. Untuk kekerasan tablet memiliki rentang 5,91-7,17 kP dan rata-rata 6,63 kP, kerapuhan tablet adalah 0,36%, dan untuk waktu disintegrasi tablet adalah 10 menit 14 detik.
4. Penetapan kadar fraksi diterpen lakton dalam granul tablet DTL menunjukkan bahwa kadar diterpen lakton dalam granul adalah 0,0557 mg/ mg granul.
5. Hasil uji antimalaria *in vivo* menunjukkan bahwa granul DTL dosis 10 mg/kg BB dengan pemberian dua kali sehari selama empat hari dapat menghambat pertumbuhan *P.berghei* sebesar 71,14%. Sedangkan granul DTL dosis 15 mg/kg BB dengan pemberian dua kali sehari selama empat hari dapat menghambat pertumbuhan *P.berghei* sebesar 82,56%.
6. Hasil uji toksisitas akut menunjukkan bahwa tidak ada mencit yang mati dengan pemberian granul DTL dosis tertinggi sehingga granul DTL termasuk dalam bahan yang relatif tidak berbahaya.

7. Pada uji toksisitas sub akut menunjukkan bahwa pemberian granul DTL dengan dosis 10, 50, 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak berpengaruh pada peningkatan kadar SGOT, SGPT dan kreatinin. Pada pemberian dosis 100 mg/kg BB selama 14 hari menunjukkan peningkatan BUN pada hewan coba.
8. Pada uji toksisitas sub akut yang dilakukan pemeriksaan serta analisis perubahan pada organ hati menunjukkan bahwa pemberian granul DTL dengan dosis 10, 50, 100 mg/kg BB selama 14 hari tidak menyebabkan perubahan histopatologi hati pada hewan coba.

## **5.2. Saran**

Mengingat potensinya sebagai antimalaria, perlu dilakukan penelitian lanjutan dengan uji klinik untuk mengetahui efektifitas, khasiat dan keamanannya pada manusia.



## DAFTAR PUSTAKA

- Chander R, Srivasta V, Tandon JS, Kapoor NK, 1995. Antihepatotoxic activity of diterpenes of *Andrographis paniculata* against *Plasmodium berghei* induced hepatic damaged in *Mastomys natalensis*, **Pharm Biol** 33: 135-138.
- Chen L, Zhu H, Wang R, Zhou K, Jing Y, Qiu F, 2008. Ent-labdane diterpenoid lactone stereoisomers from *Andrographis paniculata*, **J Nat Prod** 71(5):852-5.
- Daniel WW, 1989. **Statistika Nonparametrik Terapan** (terjemah oleh Elex Tri Kantjono W), Penerbit PT.Gramedia, Jakarta
- Dina S, 2004. Uji Antimalaria In Vivo Isolat Andrografolid dari *Andrographis paniculata* Nees. Terhadap *Plasmodium berghei* pada Mencit, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Dorelanko MJ, Holinger MA, 1995. **CRC Handbook of Toxicology**, CRC Press, New York
- Dua VK, Ojha VP, Roy R, Joshi BC, Valecha N, Usha Devi C, Bhatnagar MC, Sharmas VP, Subbarao SK, 2004. Antimalarial activity of some xanthenes isolated from the roots of *Andrographis paniculata*, **J Ethnopharmacol** 95:247-251.
- Ekasari W, 1998. Penetapan Kadar Andrografolid dalam Simplisia Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees) dan Produk Obat Tradisionalnya untuk Data Standarisasi, **Laporan Penelitian**, Lembaga Penelitian Universitas Airlangga.
- Ghosh MN, 1971. **Fundamental of Exsperimental Pharmacology**, Scientific Book Agency, Calcutta.
- Hafid FA., Retnowati D., Widyawaruyanti A., 2007. The Combination therapy model of *Andrographis paniculata* extract and chloroquine on mice infected malaria, disampaikan pada **The 6<sup>th</sup> Princess Chulabhorn International Science Congress (PCVI)**, Bangkok, Thailand, 25-29 Nov 2007.

- Heyne, K., 1987. **Tumbuhan Berguna Indonesia II**. Badan Penelitian dan Pengembangan Kehutanan, Departemen Kehutanan. Yayasan Sarana Wana Jaya. Jakarta, hal. 669-670.
- Jarukamjorn K, Nemoto N, 2008. Pharmacological aspects of *Andrographis paniculata* on health and its major diterpenoid constituent andrografolide, **Journal of Health Science** 54 (4): 370-381.
- Klayman DL, 1985. Quinghaosie (Artemisin) an antimalarial drug from China. **Science** 228: 1049-1055.
- Matsuda, T. ,1994, Cell Differentiation-Inducing Diterpenes from *Andrographis paniculata* Nees, **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Vol. 42(6), Hal. 1216-1225
- Misra P, Pal NL, Guru PY, Katiyar JC, Srivastava V, Tandon JS, 1992. Antimalarial activity of *Andrographis paniculata* against *Plasmodium berghei* NK65, **International Journal of Pharmacology** 30:263-274.
- Mishra K, Dash AP, Swain BK, Dey N, 2009. Antimalarial activities of *Andrographis paniculata* and *Hedyotis corymbosa* extract and their combination with curcumin, **Malaria Journal** 8:26.
- Mursito, Bambang. 2002. **Ramuan Tradisional Untuk Penyakit Malaria**. Jakarta. Penebar Swadaya.
- Neni Anggraini, 2001, Uji daya skizontosida diterpen lakton dari *Andrographis paniculata* Nees pada kultur isolat *Plasmodium falciparum*, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Suyanto, 1995, Uji Aktivitas Antimalaria secara In Vitro Isolat *Andrographis paniculata* Nees, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Rahman ANNN, Furuta T, Kojima S, 1999. Antimalarial Activity of Malaysian Medical Plants. **J. Of Ethnopharmacology** 64, p. 249-254.
- Sri Susanti, 2001, Uji aktivits antimalaria andrografolid terhadap *Plasmodium falciparum* stadium gametosit in vitro, **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

- Widyawaruyanti A., 1995, Uji Antimalaria Ekstrak Herba Sambiloto Terhadap *Plasmodium falciparum* Secara In Vitro, Laporan **Penelitian DIP OPF Unair 1994-1995**, Lembaga Penelitian Unair.
- Widyawaruyanti A., 2001, Uji Aktivitas Antimalaria dari Senyawa Diterpena lakton hasil Isolasi *Andrographis paniculata* Nees. **Laporan Penelitian Project Grand-QUE Project Tahun 2000**, Fakultas Farmasi Unair.
- Widyawaruyanti A., Hafid FA., Radjaram A., Ekasari W., 2003, Pengembangan sediaan farmasetika andrografolid hasil isolasi *Andrographis paniculata* Nees sebagai obat antimalaria, **Laporan Penelitian Hibah Bersaing/DP2M/2003-2004**, Lembaga Penelitian Unair.
- Widyawaruyanti A., Hafid FA., Tantular I., Dachliyati L., Santosa M.H., 2009. Pengembangan Fitofarmaka Obat Malaria dari Fraksi Diterpen Lakton Herba Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees), **Laporan Penelitian STRANAS/DP2M/2009**, Lembaga Penelitian Unair.
- World Health Organization. 2003. **WHO Report Meeting on Antimalarial Drug Development**. Manila. <http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai>.

Lampiran 1  
Hasil analisis data darah pada uji toksisitas sub akut

### Oneway

#### Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
SGOT	10	55.7000	20.07780	6.34919	41.3371	70.0629	18.00	74.00
2	10	44.7000	17.64496	5.57982	32.0776	57.3224	25.00	70.00
3	10	43.5000	19.95133	6.30916	29.2277	57.7723	25.00	73.00
4	10	72.3000	8.51208	2.69176	66.2108	78.3892	63.00	92.00
Total	40	54.0500	20.26105	3.20355	47.5702	60.5298	18.00	92.00
SGPT	10	26.5000	13.74571	4.34677	16.8669	36.3331	12.00	54.00
2	10	20.6000	9.60555	3.03754	13.7286	27.4714	12.00	44.00
3	10	26.1000	12.44945	3.93686	17.1942	35.0058	13.00	54.00
4	10	19.1000	3.78447	1.19675	16.3928	21.8072	11.00	23.00
Total	40	23.0750	10.72114	1.69516	19.6462	26.5038	11.00	54.00
BUN	10	28.0140	6.14210	1.94230	23.6202	32.4078	19.75	39.26
2	10	36.0360	5.94442	1.87979	31.7836	40.2884	20.11	41.51
3	10	30.9820	7.08151	2.23937	25.9162	36.0478	21.04	39.18
4	10	25.3870	5.88518	1.86106	21.1570	29.5770	14.65	33.13
Total	40	30.0998	7.24705	1.14586	27.7820	32.4175	14.65	41.51
KREATINI	10	2.0210	.52539	.16614	1.6452	2.3968	1.26	2.74
2	10	1.6140	.58365	.18457	1.1965	2.0315	.82	2.72
3	10	1.4140	.39277	.12421	1.1330	1.6950	.92	2.17
4	10	1.6870	.39508	.12494	1.4044	1.9696	1.06	2.39
Total	40	1.6840	.51284	.08109	1.5200	1.8480	.82	2.74

#### Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
SGOT	6.399	3	36	.001
SGPT	2.223	3	36	.102
BUN	.907	3	36	.447
KREATINI	.669	3	36	.577

#### ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
SGOT	Between Groups	5345.100	3	1781.700	6.014	.002
	Within Groups	10664.800	36	296.244		
	Total	16009.900	39			
SGPT	Between Groups	428.075	3	142.692	1.267	.300
	Within Groups	4054.700	36	112.631		
	Total	4482.775	39			
BUN	Between Groups	627.667	3	209.222	5.302	.004
	Within Groups	1420.601	36	39.461		
	Total	2048.268	39			
KREATINI	Between Groups	1.914	3	.638	2.753	.057
	Within Groups	8.343	36	.232		
	Total	10.257	39			

### Post Hoc Tests

#### Multiple Comparisons

Dependent Variable	LSD	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
SGOT		1	2	11.0000	7.69733	.162	-4.6109	26.6109
			3	12.2000	7.69733	.122	-3.4109	27.8109
			4	-16.8000*	7.69733	.038	-32.2109	-.9891
		2	1	-11.0000	7.69733	.162	-26.6109	4.6109
			3	1.2000	7.69733	.877	-14.4109	16.8109
			4	-27.6000*	7.69733	.001	-43.2109	-11.9891
		3	1	-12.2000	7.69733	.122	-27.8109	3.4109
			2	-1.2000	7.69733	.877	-16.8109	14.4109
			4	-28.8000*	7.69733	.001	-44.4109	-13.1891
		4	1	16.8000*	7.69733	.038	.9891	32.2109
			2	27.6000*	7.69733	.001	11.9891	43.2109
			3	28.8000*	7.69733	.001	13.1891	44.4109
SGPT		1	2	5.8000	4.74617	.222	-3.7257	15.5257
			3	.4000	4.74617	.933	-9.2257	10.0257
			4	7.4000	4.74617	.128	-2.2257	17.0257
		2	1	-5.8000	4.74617	.222	-15.5257	3.7257
			3	-5.5000	4.74617	.254	-15.1257	4.1257
			4	1.5000	4.74617	.754	-8.1257	11.1257
		3	1	-.4000	4.74617	.933	-10.0257	9.2257
			2	5.5000	4.74617	.254	-4.1257	15.1257
			4	7.0000	4.74617	.149	-2.6257	16.6257
		4	1	-7.4000	4.74617	.128	-17.0257	2.2257
			2	-1.5000	4.74617	.754	-11.1257	8.1257
			3	-7.0000	4.74617	.149	-16.6257	2.6257
BUN		1	2	-8.0220*	2.80931	.007	-13.7195	-2.3245
			3	-2.9680	2.80931	.298	-8.6655	2.7295
			4	2.6470	2.80931	.352	-3.0505	8.3445
		2	1	8.0220*	2.80931	.007	2.3245	13.7195
			3	5.0540	2.80931	.080	-.6435	10.7515
			4	10.6690*	2.80931	.001	4.9715	16.3665
		3	1	2.9680	2.80931	.298	-2.7295	8.6655
			2	-5.0540	2.80931	.080	-10.7515	.6435
			4	5.6150	2.80931	.053	-.0825	11.3125
		4	1	-2.6470	2.80931	.352	-8.3445	3.0505
			2	-10.6690*	2.80931	.001	-16.3665	-4.9715
			3	-5.6150	2.80931	.053	-11.3125	.0825
KREATINI		1	2	.4070	.21530	.067	-.0296	.8436
			3	.6070*	.21530	.008	.1704	1.0436
			4	.3340	.21530	.130	-.1026	.7706
		2	1	-.4070	.21530	.067	-.8436	.0296
			3	.2000	.21530	.359	-.2366	.6366
			4	-.0730	.21530	.737	-.5096	.3636
		3	1	-.6070*	.21530	.008	-1.0436	-.1704
			2	-.2000	.21530	.359	-.6366	.2366
			4	-.2730	.21530	.213	-.7096	.1636
		4	1	-.3340	.21530	.130	-.7706	.1026
			2	.0730	.21530	.737	-.3636	.5096
			3	.2730	.21530	.213	-.1636	.7096

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

## Homogeneous Subsets

### SGOT

Duncan <sup>a</sup>	KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
3		10	43.5000	
2		10	44.7000	
1		10	55.7000	
4		10		72.3000
Sig.			.143	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

### SGPT

Duncan <sup>a</sup>	KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05
			1
4		10	19.1000
2		10	20.6000
3		10	26.1000
1		10	26.5000
Sig.			.163

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

### BUN

Duncan <sup>a</sup>	KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
4		10	25.3670	
1		10	28.0140	
3		10	30.9820	30.9820
2		10		36.0360
Sig.			.066	.080

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

### KREATINI

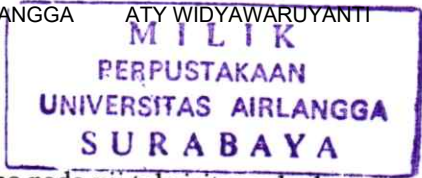
Duncan <sup>a</sup>	KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05	
			1	2
3		10	1.4140	
2		10	1.6140	1.6140
4		10	1.6870	1.6870
1		10		2.0210
Sig.			.240	.081

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

### Keterangan :

- 1 : control (-)
- 2 : granul DTL 100 mg/kg BB mencit
- 3 : granul DTL 50 mg/kg BB mencit
- 4 : granul DTL 10 mg/kg BB mencit



Lampiran 2

Hasil analisis data kenaikan berat badan hewan coba pada uji toksisitas sub akut

Oneway

Descriptives

BB

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	10	3.7000	2.16282	.68394	2.1528	5.2472	.00	6.00
2	10	3.8500	2.96320	.93705	1.7303	5.9697	-1.50	8.50
3	10	5.6000	3.23007	1.02144	3.2893	7.9107	-1.50	10.00
4	10	4.7000	1.82878	.57831	3.3918	6.0082	1.00	7.00
Total	40	4.4625	2.62236	.41463	3.6238	5.3012	-1.50	10.00

Test of Homogeneity of Variances

BB

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
.647	3	36	.590

ANOVA

BB

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.069	3	7.690	1.129	.350
Within Groups	245.125	36	6.809		
Total	268.194	39			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: BB

	(I) KELOMPOK	(J) KELOMPOK	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
LSD	1	2	-.1500	1.16696	.898	-2.5167	2.2167
		3	-1.9000	1.16696	.112	-4.2667	.4667
		4	-1.0000	1.16696	.397	-3.3667	1.3667
	2	1	.1500	1.16696	.898	-2.2167	2.5167
		3	-1.7500	1.16696	.142	-4.1167	.6167
		4	-.8500	1.16696	.471	-3.2167	1.5167
	3	1	1.9000	1.16696	.112	-.4667	4.2667
		2	1.7500	1.16696	.142	-.6167	4.1167
		4	.9000	1.16696	.446	-1.4667	3.2667
	4	1	1.0000	1.16696	.397	-1.3667	3.3667
		2	.8500	1.16696	.471	-1.5167	3.2167
		3	-.9000	1.16696	.446	-3.2667	1.4667

## Homogeneous Subsets

BB

KELOMPOK	N	Subset for alpha = .05
		1
Duncan <sup>a</sup> 1	10	3.7000
2	10	3.8500
4	10	4.7000
3	10	5.6000
Sig.		.146

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 10.000.

Keterangan :

1 : control (-)

2 : granul DTL 10 mg/kg BB mencit

3 : granul DTL 50 mg/kg BB mencit

4 : granul DTL 100 mg/kg BB mencit



**Lampiran 3**  
**Skor perubahan histopatologi hati mencit yang mengalami degenerasi**

**Kontrol (-)**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1	0
3	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0

**D1 : 10 mg/kg BB**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	0	1	1	1	0
2	0	1	0	0	1	0
3	1	0	0	1	0	0
4	0	0	1	1	1	0
5	0	0	1	0	0	0

**D2 : 50 mg/kg BB**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	0	0	0	1	0
2	1	0	0	1	1	0
3	1	1	1	1	1	1
4	0	1	1	0	1	0
5	1	0	0	2	1	0

**D3 : 100 mg/kg BB**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	0	1	0	0	0
2	0	1	0	1	1	0
3	0	1	1	1	0	0
4	1	1	1	1	1	1
5	0	0	1	0	0	0

**Lampiran 4**  
**Skor perubahan histopatologi hati mencit yang mengalami nekrosis**

**Kontrol (-)**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	1	1	0
3	0	0	0	1	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0

**D1 : 10 mg/kg BB**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	1	1	0	1	0
2	0	0	1	1	0	0
3	0	0	1	0	0	0
4	0	1	1	0	0	0
5	0	0	0	1	0	0

**D2 : 50 mg/kg BB**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	1	1	0	0	0
2	0	0	1	0	0	0
3	1	1	1	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0
5	0	0	0	1	0	0

**D3 : 100 mg/kg BB**

n Ke	Lapang pandang					Rata-Rata Skor
	1	2	3	4	5	
1	0	1	0	0	1	0
2	1	0	1	0	0	0
3	0	0	0	0	1	0
4	0	0	0	0	1	0
5	1	0	0	1	0	0

Lampiran 5  
 Hasil analisis data histopatologi hati berupa degenerasi dengan uji Kruskal- Wallis test

### NPar Tests DTL degenerasi Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

SCORE	KELOMPOK	N	Mean Rank
	kontrol negatif	5	9.50
	D1	5	9.50
	D2	5	11.50
	D3	5	11.50
	Total	20	

#### Test Statistics<sup>b,c</sup>

			SCORE
Chi-Square			2.111
df			3
Asymp. Sig.			.550
Monte Carlo Sig.			1.000 <sup>a</sup>
	95% Confidence Interval	Lower Bound	1.000
		Upper Bound	1.000

a. Based on 10000 sampled tables with starting seed 299883525.

b. Kruskal Wallis Test

c. Grouping Variable: KELOMPOK

## Lampiran 6

Hasil analisis data histopatologi hati berupa nekrosis dengan uji Kruskal- Wallis test

**NPar Tests DTL nekrosis  
Kruskal-Wallis Test**

## Ranks

SCORE	KELOMPOK	N	Mean Rank
	kontrol negatif	5	10.50
	D1	5	10.50
	D2	5	10.50
	D3	5	10.50
	Total	20	

Test Statistics<sup>b,c</sup>

	SCORE
Chi-Square	.000
df	3
Asymp. Sig.	1.000
Exact Sig.	1.000 <sup>a</sup>
Point Probability	1.000 <sup>a</sup>

a. Exact results are provided instead of Monte Carlo for this test.

b. Kruskal Wallis Test

c. Grouping Variable: KELOMPOK