

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN BERBASIS KOMPETENSI**



**EFIKASI DAN KEAMANAN EKSTRAK ETANOL DAUN  
*CASSIA SPECTABILIS* SEBAGAI OBAT ANTIMALARIA DARI  
BAHAN ALAM**

**TAHUN KE – 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>Dr. Wiwied Ekasari, Apt., M.Si.</b> | <b>0022016902</b> |
| <b>Dra. Heny Arwaty, M.Sc., Ph.D.</b>  | <b>0029026404</b> |
| <b>Tutik Sri Wahyuni, S.Si., M.Si.</b> | <b>0025107704</b> |

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

**LAPORAN TAHUN TERAKHIR  
PENELITIAN BERBASIS KOMPETENSI**



KKP  
KK-2  
LP.92/19  
Eka  
e

**EFIKASI DAN KEAMANAN EKSTRAK ETANOL DAUN  
*CASSIA SPECTABILIS* SEBAGAI OBAT ANTIMALARIA DARI  
BAHAN ALAM**

**TAHUN KE - 3 DARI RENCANA 3 TAHUN**

|  |                   |
|--|-------------------|
| <b>Dr. Wiwied Ekasari, Apt., M.Si.</b> | <b>0022016902</b> |
| <b>Dra. Heny Arwaty, M.Sc., Ph.D.</b>  | <b>0029026404</b> |
| <b>Tutik Sri Wahyuni, S.Si., M.Si.</b> | <b>0025107704</b> |

**DIBIYAI OLEH:  
DIREKTORAT RISET DAN PENGABDIAN MASYARAKAT  
DIREKTORAT JENDERAL PENGUATAN RISET DAN PENGEMBANGAN  
KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
SESUAI DENGAN PERJANJIAN PENDANAAN PENELITIAN DAN PENGABDIAN  
KEPADA MASYARAKAT  
NOMOR: 122/SP2H/PTNBH/DRPM/2018**

**UNIVERSITAS AIRLANGGA  
NOVEMBER 2018**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul : Efikasi dan Keamanan Ekstrak Etanol Daun Cassia spectabilis Sebagai Obat Antimalaria Dari Bahan Alam

**Peneliti/Pelaksana**

Nama Lengkap : Dr. Dra WIWIED EKASARI, Apt, M.Si  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga  
NIDN : 0022016902  
Jabatan Fungsional : Lektor  
Program Studi : Ilmu Farmasi  
Nomor HP : 08123184315  
Alamat surel (e-mail) : wiwiedeka@hotmail.com

**Anggota (1)**

Nama Lengkap : Dra HENY ARWATI M.Sc., Ph.D  
NIDN : 0029026404  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Anggota (2)**

Nama Lengkap : TUTIK SRI WAHYUNI S.Si, Apt, M.Si, Ph.D  
NIDN : 0025107704  
Perguruan Tinggi : Universitas Airlangga

**Institusi Mitra (jika ada)**

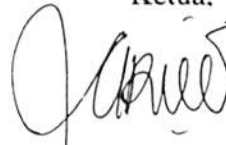
Nama Institusi Mitra : -  
Alamat : -  
Penanggung Jawab : -  
Tahun Pelaksanaan : Tahun ke 3 dari rencana 3 tahun  
Biaya Tahun Berjalan : Rp 225,000,000  
Biaya Keseluruhan : Rp 511,050,000

Mengetahui,  
W.D II Fak Farmasi Unair




(Dr. Dwi Setyawan, S.Si., MSi)  
NIP/NIK 197111301997031003

Kota Surabaya, 12 - 11 - 2018  
Ketua.



(Dr. Dra WIWIED EKASARI, Apt, M.Si)  
NIP/NIK 196901221994032001

Menyetujui,  
Ketua LPI Unair



(Prof. Hery Purnobasuki, Drs., MSi, PhD)  
NIP/NIK 196705071991021001



**IDENTITAS DAN URAIAN UMUM**

1. Judul Penelitian : Efikasi dan Keamanan Ekstrak Etanol Daun *Cassia spectabilis* Sebagai Obat Antimalaria Dari Bahan Alam

2. Tim Peneliti

| No | Nama                                    | Jabatan          | Bidang Keahlian            | Instansi Asal         | Alokasi Waktu (jam/minggu) |
|----|---|------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1  | Dr. Dra WIWIED EKASARI M.Si, Apt        | Ketua Pengusul   | Farmakognosi               | Universitas Airlangga | 20,00                      |
| 2  | Dra HENY ARWATI Ph.D, M.Sc.             | Anggota Pengusul | Parasitologi, Imunologi    | Universitas Airlangga | -                          |
| 3  | TUTIK SRI WAHYUNI S.Si, M.Si, Ph.D, Apt | Anggota Pengusul | Farmakognosi dan fitokimia | Universitas Airlangga | -                          |

3. Objek Penelitian (jenis material yang akan diteliti dan segi penelitian):

Daun *Cassia spectabilis* untuk antimalaria

4. Masa Pelaksanaan

Mulai tahun: 2018

Berakhir tahun: 2020

5. Usulan Biaya DRPM Ditjen Penguatan Risbang

- Tahun ke-3: Rp317.000.000

6. Lokasi Penelitian (lab/studio/lapangan)

: Lab. Botani, Lab Fitokimia dan lab Hewan Fak Farmasi Unair

7. Instansi lain yang terlibat (jika ada, dan uraikan apa kontribusinya)

8. Temuan yang ditargetkan (produk atau masukan untuk kebijakan)

Ekstrak etanol daun *C.spectabilis* yang aman dan berkhasiat sebagai antimalaria baru

9. Kontribusi mendasar pada suatu bidang ilmu (uraikan tidak lebih dari 50 kata, tekankan pada gagasan fundamental dan orisinal yang mendukung pengembangan iptek)

Saat ini telah terjadi resistansi terhadap obat malaria klorokuin, dan dilaporkan terjadi pula pada artemisinin sebagai pengganti klorokuin. Daun *C.spectabilis* berdasar penelitian yang sudah dilakukan menunjukkan potensi yang bagus sebagai antimalaria. Diharapkan dari daun *C.spectabilis* dapat ditemukan bahan baku obat antimalaria baru pengganti yang sudah ada yang berasal dari alam.

10. Jurnal ilmiah yang menjadi sasaran (tuliskan nama terbitan berkala ilmiah internasional bereputasi, nasional terakreditasi, atau nasional tidak terakreditasi dan tahun rencana publikasi):

-African Journal Infectious Disease, -Jurnal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian

11. Rencana luaran HKI, buku, purwarupa atau luaran lainnya yang ditargetkan, tahun rencana perolehan atau penyelesaiannya

- Publikasi Ilmiah Jurnal Internasional, tahun ke-3 Target: accepted/published
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Terakreditasi, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-3 Target: terdaftar
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-3 Target: terdaftar
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Internasional, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Nasional, tahun ke-3 Target: terdaftar
- Visiting Lecturer Internasional, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Paten, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Paten Sederhana, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Hak Cipta, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Merk Dagang, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Rahasia Dagang, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Desain Produk Industri, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Indikasi Geografis, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Varietas Tanaman, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Perlindungan Topografi Sirkuit Terpadu, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Teknologi Tepat Guna, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Buku Ajar (ISBN), tahun ke-3 Target: sudah terbit
- Tingkat Kesiapan Teknologi (TKT), tahun ke-3 Target: Skala 3
- Publikasi Ilmiah Jurnal Nasional Tidak Terakreditasi, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Pemakalah dalam pertemuan ilmiah Lokal, tahun ke-3 Target: terdaftar
- Keynote Speaker dalam pertemuan ilmiah Lokal, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Model, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Purwarupa/Prototipe, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Desain, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Karya Seni, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Rekyasa Sosial, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Bahan Ajar, tahun ke-3 Target: draft
- Tesis, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Disertasi, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Kebijakan, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Sistem, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Metode, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Produk, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Strategi, tahun ke-3 Target: belum/tidak ada
- Keikutsertaan dalam Seminar Internasional, tahun ke-3 Target: terdaftar
- Keikutsertaan dalam seminar Nasional, tahun ke-3 Target: terdaftar

Salah satu tumbuhan di Indonesia yang telah diakui secara tradisional dapat mengobati malaria adalah *Cassia spectabilis* Lamk dari familia Caesalpiniaceae. Peneliti telah melakukan serangkaian penelitian mengenai aktivitas tanaman ini sebagai antimalaria dengan hasil yang memuaskan. Saat ini telah didapatkan ekstrak dari tanaman *C. spectabilis* yang potensial sebagai bahan baku obat antimalaria.

Permasalahannya, selama ini pemanfaatan daun *C. spectabilis* secara tradisional oleh masyarakat dalam mengobati penyakit malaria tidak dapat menjamin keajegan khasiat, keamanan dan efektifitasnya. Sehingga sulit dipertanggungjawabkan secara medis. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemanfaatan tanaman ini sebagai produk fitofarmaka .

Pada tahun I penelitian ini telah didapatkan dosis efektif dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebesar 150 mg/kgBB yang diberikan 3 kali sehari. Kemudian sesuai dengan dengan rekomendasi WHO untuk mencegah terjadinya resistensi, maka juga telah dilakukan terapi kombinasi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dengan artesunat yang merupakan salah satu turunan artemisinin dan didapatkan model terapi kombinasi yang terbaik dengan penghambatan sebesar 99,6 % adalah kelompok dengan model kombinasi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB yang diberikan tiga kali sehari selama tiga hari dengan artesunat 36,4 mg/kgBB yang diberikan sekali sehari pada hari ke-3.

Selanjutnya pengembangan dan penemuan obat antimalaria diharapkan dapat menyediakan obat baru dengan mekanisme obat yang potensial dan aman bagi manusia. Penelitian yang berhubungan dengan proses biokimiawi parasit malaria berperan penting untuk pengembangan obat antimalaria baru. Berdasar hal ini pada tahun ke II penelitian telah pula didapat data kadar flavonoid total ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap pembanding rutin sebesar  $24,26 \pm 1,91$ , aktivitas ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalaria dengan harga  $ED_{50}$  sebesar 161,20 mg/kgBB, data pertumbuhan dan penghambatan parasit *P. falciparum* yang diberi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* pada masa inkubasi 6, 12, 24, dan 48 jam dan mekanisme kerjanya dalam penghambatan proses detoksifikasi heme yang lebih potensial dibandingkan klorokuin dengan harga  $IC_{50}$  sebesar 0,375 mg/mL.

Kemudian pada tahun ke III sebagai akhir dari penelitian ini, maka akan diuji keamanan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai antimalaria yang meliputi uji toksisitas akut, subakut, pengaruh ekstrak etanol daun *C. spectabilis* pada hepar dan ginjal mencit terinfeksi parasit, serta efek sedasi yang umum dilaporkan pada genus *Cassia*, sehingga pada akhir penelitian akan didapatkan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* yang siap dikembangkan sebagai obat fitofarmaka antimalaria

Key word : *C. spectabilis*, antimalaria, detoksifikasi heme, *P. berghei*, toksisitas



## PRAKATA

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahNYA sehingga kami dapat menyelesaikan Laporan Akhir penelitian ini dengan judul :

**“Efikasi dan Keamanan Ekstrak Etanol Daun *Cassia spectabilis* sebagai Obat Antimalaria dari Bahan Alam”**

Pada kesempatan ini TIM PENELITI menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat :

1. Rektor Universitas Airlangga yang mendukung penelitian
2. Ketua Lembaga Penelitian dan Inovasi Unair yang mendukung dan membantu penelitian ini
3. Kepala DIPA DRPM Kementerian Riset, Teknologi dan Pendidikan Tinggi RI atas bantuan dana riset yang diberikan
4. Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu menyediakan fasilitas dan sarana penelitian.
5. Seluruh staf Pengajar dan karyawan Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Unair
6. Semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

Semoga amal ibadah Bapak-Bapak, Ibu-ibu serta rekan-rekan semuanya diterima oleh Allah SWT.

Kami menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini masih jauh dari sempurna, oleh sebab itu TIM PENELITI mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini dapat menjadi lebih baik .

Surabaya, Nopember 2018

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

|   | <b>Halaman</b> |
|---|----------------|
| HALAMAN SAMPUL .....  | 1              |
| HALAMAN PENGESAHAN .....  | 2              |
| RINGKASAN.....  | 5              |
| PRAKATA .....   | 6              |
| DAFTAR ISI .....  | 7              |
| DAFTAR TABEL .....  | 9              |
| DAFTAR GAMBAR.....  | 11             |
| DAFTAR LAMPIRAN .....   | 12             |
| BAB 1 PENDAHULUAN.....  | 13             |
| BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA.....   | 16             |
| 2.1 Tinjauan tentang Tanaman <i>C. spectabilis</i> .....  | 16             |
| 2.2 Studi pendahuluan yang telah dilakukan.....   | 16             |
| 2.3. Tinjauan Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam .....  | 17             |
| 2.4. Tinjauan tentang Toksisitas.....   | 17             |
| 2.4.1. Toksisitas Akut .....  | 17             |
| 2.4.2. Uji Toksisitas Subakut dan Akut .....  | 18             |
| 2.5. Tinjauan Aktivitas Antimalaria secara <i>in Vivo</i> .....   | 19             |
| 2.6. Tinjauan tentang Tes Rotarod untuk Menilai Koordinasi Motorik (Efek Sedasi) ....   | 19             |
| BAB 3 TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN.....  | 21             |
| 3.1. Tujuan Penelitian.....   | 21             |
| 3.2. Manfaat Penelitian.....  | 21             |
| BAB 4 METODE PENELITIAN .....   | 22             |
| 4.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun <i>C. spectabilis</i> .....  | 22             |
| 4.2. Uji Toksisitas Akut.....   | 22             |
| 4.3. Uji Toksisitas Subkronik.....  | 22             |
| 4.4. Pengujian Pengaruh Ekstrak Etanol Daun <i>C. spectabilis</i> pada Hati dan Ginjal<br>Mencit Terinfeksi <i>P. berghei</i> ..... | 23             |
| 4.5. Uji Efek Sedasi .....  | 24             |
| BAB 5 HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI .....   | 25             |
| 5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol 90% Daun <i>C. spectabilis</i> .....  | 25             |



|  |    |
|--|----|
| 5.2. Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol 90% Daun <i>C. spectabilis</i> .....   | 25 |
| 5.3. Hasil Uji Toksisitas Subkronis Ekstrak Etanol Daun <i>C. spectabilis</i> .....  | 26 |
| 5.3.1. Data Kerusakan Hepar Uji Toksisitas Subkronik (28 hari) .....   | 26 |
| 5.3.2. Data Kerusakan Ginjal Uji Toksisitas Subkronik (28 hari).....   | 30 |
| 5.4. Hasil Uji Pengaruh Ekstrak Etanol Terstandard Daun <i>C. spectabilis</i> pada<br>Hepar dan Ginjal Mencit Terinfeksi <i>P. berghei</i> ..... | 34 |
| 5.4.1. Data Kerusakan Hepar Mencit.....  | 34 |
| 5.4.2. Data Kerusakan Ginjal Mencit.....   | 43 |
| 5.5. Hasil Uji Efek Sedatif Ekstrak Etanol 90% Daun <i>C. spectabilis</i> .....  | 49 |
| BAB 6 RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA .....   | 50 |
| BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN .....   | 51 |
| DAFTAR PUSTAKA.....  | 52 |

## DAFTAR TABEL

| Tabel  | Halaman |
|--|---------|
| 1.1. Rencana target capaian tahunan .....  | 13      |
| 5.1. Hasil pengamatan angka kematian hewan coba mencit setelah pemberian ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> ..... | 25      |
| 5.2. Data kerusakan hepar kelompok uji dosis 1 kali (150 mg/kgBB) .....  | 26      |
| 5.3. Data kerusakan hepar kelompok uji dosis 5 kali (150 mg/kgBB) .....  | 26      |
| 5.4. Data kerusakan hepar kelompok uji dosis 10 kali (150 mg/kgBB) .....   | 27      |
| 5.5. Data kerusakan hepar kelompok kontrol sehat .....   | 27      |
| 5.6. Hasil pemeriksaan histopatologi hepar .....   | 27      |
| 5.7. Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis hepar.....  | 29      |
| 5.8. Nilai a pada uji Mann Whitney antar kelompok (kerusakan nekrosis hepar).....  | 29      |
| 5.9. Hasil uji Mann Whitney degenerasi hepar .....   | 29      |
| 5.10. Nilai a pada uji Mann Whitney antar kelompok (degenerasi hepar) .....  | 30      |
| 5.11. Data kerusakan ginjal kelompok uji dosis 1 kali (150 mg/kgBB) .....  | 30      |
| 5.12. Data kerusakan ginjal kelompok uji dosis 5 kali (150 mg/kgBB) .....  | 30      |
| 5.13. Data kerusakan ginjal kelompok uji dosis 10 kali (150 mg/kgBB) .....   | 31      |
| 5.14. Data kerusakan ginjal kelompok kontrol sehat .....   | 31      |
| 5.15. Hasil pemeriksaan histopatologi ginjal .....   | 32      |
| 5.16. Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis ginjal .....   | 33      |
| 5.17. Nilai a pada uji Mann Whitney antar kelompok (kerusakan nekrosis ginjal).....  | 33      |
| 5.18. Hasil uji Mann Whitney degenerasi ginjal.....  | 34      |
| 5.19. Nilai a pada uji Mann Whitney antar kelompok (degenerasi ginjal) .....   | 34      |
| 5.20. Persen parasitemia hasil kelompok perlakuan .....  | 34      |
| 5.21. Morfologi hepar mencit perlakuan.....  | 35      |
| 5.22. Hasil pemeriksaan enzim SGPT dan SGOT .....  | 36      |
| 5.23. Hasil kerusakan nekrosis hepar .....   | 38      |
| 5.24. Hasil kerusakan degenerasi hepar .....   | 38      |
| 5.25. Hasil uji Tukey HSD <sup>a</sup> SGOT hepar mencit .....   | 40      |
| 5.26. Hasil uji Tukey HSD <sup>a</sup> SGPT hepar mencit .....   | 41      |
| 5.27. Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis hepar.....   | 42      |
| 5.28. Hasil uji Mann Whitney kerusakan degenerasi hepar.....   | 42      |

**5.29. Persen parasitemia hasil kelompok perlakuan ..... 43**

**5.30. Gambaran histologi dan morfologi ginjal mencit perlakuan..... 44**

**5.31. Hasil kerusakan nekrosis ginjal..... 45**

**5.32. Hasil kerusakan degenerasi hepar ..... 45**

**5.33. Hasil pemeriksaan enzim SGPT dan SGOT ..... 46**

**5.34. Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis ginjal ..... 47**

**5.35. Hasil uji Mann Whitney kerusakan degenerasi ginjal..... 48**

**5.36. Data waktu jatuh mencit sebelum dan sesudah perlakuan dengan menggunakan alat rotarod pada kecepatan 30 rpm ..... 49**

## DAFTAR GAMBAR

| <b>Gambar</b>  | <b>Halaman</b> |
|--|----------------|
| 5.1. Anatomi dan histologi ginjal mencit penampang longitudinal (Bachmann dan Kriz, 1998) .....  | 31             |
| 5.2. Menunjukkan lesi patologis di sekitar vena sentralis di antara perlakuan. Slide A sel hepatosit normal di sekitar vena sentralis (panah), slide B sel hepatosit degeneratif, slide C infiltrasi sel radang (panah), slide D sel-sel hepatosit nekrotik (panah) ( <i>pewarnaan HE. Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel</i> ) ..... | 37             |
| 5.3. Histogram rata-rata nilai SGOT hepar mencit .....   | 39             |
| 5.4. Histogram rata-rata nilai SGPT hepar mencit .....   | 40             |

| <b>Lampiran</b>                                     | <b>Halaman</b> |
|---|----------------|
| 1. Publikasi Jurnal Internasional .....             | 55             |
| 2. Buku Ajar .....                                  | 61             |
| 3. Sertifikat sebagai Invited speaker .....         | 62             |
| 4. Sertifikat sebagai Pembawa makalah seminar ..... | 63             |
| 5. Bukti Submit Jurnal Internasional .....          | 66             |
| 6. Draft Jurnal Internasional .....                 | 75             |
| 7. Draft HKI .....                                  | 81             |

## BAB I PENDAHULUAN

MILIK  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SURABAYA

Malaria sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan masyarakat yang serius. Dilaporkan pada tahun 2006 terdapat 247 juta kasus malaria dari 3,3 miliar penduduk dunia yang berisiko terkena malaria yang menyebabkan hampir 1 juta kematian. Data terbaru lainnya menyebutkan sebanyak 109 negara dinyatakan sebagai wilayah endemik untuk penyakit malaria dalam tahun 2008 (WHO, 2008). Angka kesakitan malaria di Indonesia pun dilaporkan juga meningkat dari tahun ke tahun.

Upaya penanggulangan terhadap penyakit ini memang telah banyak dilakukan, namun angka kesakitan dan kematian malaria di beberapa negara masih tinggi. Tumbuh dan menyebarnya resistensi terhadap semua obat antimalaria lapis pertama (*front-line antimalarial compound*) yang dipakai pada pengobatan dan pencegahan malaria telah menimbulkan banyak masalah pada program penanggulangan malaria. Seiring dengan belum berhasilnya upaya untuk menemukan vaksin malaria yang ideal, maka aktivitas riset yang bertujuan untuk penemuan obat baru dan mengidentifikasi target intervensi kemoterapi tetap menjadi tujuan utama dalam upaya penanggulangan malaria. Obat baru yang terjangkau bagi masyarakat di daerah penularan malaria sangat mutlak diperlukan bila dampak malaria ingin dikurangi atau bahkan diatasi (Burke, 2003; Sjafruddin, 2004).

Penelitian untuk mendapatkan obat antimalaria baru, baik obat sintesis maupun yang berasal dari bahan alam, khususnya dari tumbuhan masih terus berlanjut. Penelitian terhadap bahan alam dalam usaha menemukan senyawa baru antimalaria dilakukan secara intensif oleh para peneliti di dunia pada dasawarsa terakhir ini.

Berbagai hal tersebut di atas telah mendorong eksplorasi dan isolasi tanaman obat lainnya begitu pula yang berasal dari Indonesia, yang diduga mengandung senyawa aktif antimalaria. Sampai saat ini telah diketahui beberapa senyawa baru hasil isolasi tanaman obat dari golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid, kumarin, lignan, kalkon dan santon yang memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* dan *in vivo* (Saxena, 2003; Wright, 2005).

Salah satu tumbuhan di Indonesia yang telah diakui secara tradisional dapat mengobati malaria adalah *Cassia spectabilis* Lamk dari familia Caesalpiniaceae. Peneliti telah melakukan serangkaian penelitian mengenai aktivitas tanaman ini sebagai antimalaria dengan hasil memuaskan. Telah pula didapatkan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* yang potensial untuk dijadikan bahan baku obat antimalaria. Hasil uji aktivitas antimalaria secara *in vitro*

terhadap *P. falciparum* dan *in vivo* terhadap hewan coba terinfeksi *P. berghei* dari ekstrak etanol ini juga menunjukkan hasil yang sangat potensial (Wiwied, 2012).

Permasalahannya, selama ini pemanfaatan daun *C. spectabilis* secara tradisional oleh masyarakat dalam mengobati penyakit malaria tidak dapat menjamin keajegan khasiat, keamanan dan efektifitasnya. Sehingga sulit dipertanggungjawabkan secara medis. Oleh karena itu perlu dikembangkan pemanfaatan tanaman ini sebagai produk fitofarmaka. Penelitian ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sampai saat ini belum menemukan dosis efektif yang tepat sebagai antimalaria. Mengingat potensinya sebagai obat antimalaria, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengembangkan daun tanaman ini sebagai produk obat malaria baru. Salah satu langkah untuk menuju obat fitofarmaka adalah terjaminnya kualitas, efikasi dan keamanannya sebagai antimalaria.

Saat ini diketahui resistensi parasit terhadap beberapa obat antimalaria yang ada menjadi permasalahan terbesar dalam penanggulangan penyakit ini terutama untuk wilayah-wilayah endemik malaria (M. Ridzuan *et al.*, 2007). Untuk itu terapi kombinasi dengan turunan artemisinin atau biasa disebut dengan istilah ACT (*Artemisinin-based Combination Therapy*) sangat disarankan oleh WHO sebagai terapi pilihan yang mampu mengendalikan penyebaran resistensi dari *P. falciparum* (WHO, 2003; Nandakumar, 2006).

Pada penelitian tahun ke I telah didapatkan data parameter spesifik dan non spesifik dari simplisia daun *C. spectabilis*, dosis optimal ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai antimalaria secara *in vivo* pada mencit terinfeksi *P. berghei* sebesar 150 mg/kgBB yang diberikan tiga kali sehari dan model kombinasi terbaik dengan derivat artemisinin adalah kombinasi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB yang diberikan tiga kali sehari selama tiga hari dengan artesunat 36,4 mg/kgBB yang diberikan sekali sehari pada hari ke-3.

Selanjutnya pengembangan dan penemuan obat antimalaria diharapkan dapat menyediakan obat baru dengan mekanisme obat yang potensial dan aman bagi manusia. Penelitian yang berhubungan dengan proses biokimiawi parasit malaria berperan penting untuk pengembangan obat antimalaria baru. Untuk itu pada tahun ke II penelitian juga telah didapatkan data hasil mengenai kadar flavonoid total ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap perbandingan rutin sebesar  $24,26 \pm 1,91$ , aktivitas ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalaria dengan harga  $ED_{50}$  sebesar 161,20 mg/kgBB, data pertumbuhan dan penghambatan parasit *P. falciparum* yang diberi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* pada masa inkubasi 6, 12, 24, dan 48 jam dan mekanisme kerjanya dalam

penghambatan proses detoksifikasi hepar yang lebih potensial dibandingkan klorokuin dengan harga IC<sub>50</sub> sebesar 0,375 mg/mL.

Sebagai akhir dari penelitian ini, maka pada tahun ke III akan diuji keamanan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai antimalaria yang meliputi uji toksisitas akut, subakut, pengaruh ekstrak etanol daun *C. spectabilis* pada hepar dan ginjal mencit terinfeksi parasit, serta efek sedasi yang umum dilaporkan pada genus *Cassia*, sehingga pada akhir penelitian akan didapatkan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* yang siap dikembangkan sebagai obat fitofarmaka antimalaria.

**Tabel 1.1.** Rencana target capaian tahunan

| No. | Jenis luaran                             |                 | Indikator capaian  |                    |                    |
|-----|--|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|     |  |                 | TS                 | TS+1               | TS+2               |
| 1   | Publikasi Ilmiah                         | Internasional   | <i>Submitted</i>   | <i>Accepted</i>    | <i>Published</i>   |
|     |  | Nasional        | <i>Reviewed</i>    | <i>Published</i>   | <i>Accepted</i>    |
| 2   | Pemakalah dalam Temu Ilmiah              | Internasional   | Sudah dilaksanakan | Sudah dilaksanakan | Sudah dilaksanakan |
|     |  | Nasional        | Tidak ada          | Tidak ada          | Sudah dilaksanakan |
| 3   | <i>Invited Speaker</i> dalam Temu Ilmiah | Internasional   | Tidak ada          | Tidak ada          | Draft              |
|     |  | Nasional        | Tidak ada          | Ada                | Draft              |
| 4   | <i>Visiting Lecture</i>                  |                 | Tidak ada          | Tidak ada          | Tidak ada          |
| 5   | HKI                                      | Paten sederhana | Tidak ada          | Tidak ada          | Draft              |
| 6   | Teknologi Tepat Guna                     |                 | Tidak ada          | Tidak ada          | Tidak ada          |
| 7   | Model/desain                             |                 | Tidak ada          | Tidak ada          | Tidak ada          |
| 8   | Buku Ajar                                |                 | Tidak ada          | Draft              | Sudah terbit       |
| 9   | Tingkat Kesiapan Teknologi               |                 | 1                  | 2                  | 3                  |



## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA



#### 2.1. Tinjauan tentang Tanaman *C. spectabilis*

*C. spectabilis* adalah tanaman asli daerah Sumatra sekitar katulistiwa. Merupakan salah satu jenis pohon yang banyak dibudidayakan di pulau Jawa dan banyak terdapat di sepanjang jalan sebagai pohon peneduh. Tanaman ini mampu tumbuh pada ketinggian 1000 m di atas permukaan laut dan tidak memerlukan kondisi tanah yang terlalu baik (Heyne, 1987). Kandungan dari tanaman ini diantaranya adalah pada daun telah ditemukan adanya senyawa dari golongan alkaloid (Aji, 2008). Selain itu juga terdapat triterpenoid, dan senyawa golongan antrakinon (dioksifenalen, krisofanolantron). Sedang pada kayu/batang ditemukan tanin, antrakinon, lignin dan pentosa hidrosianat. Pada bunga juga terdapat senyawa alkaloid dengan inti kromom, yaitu Cassia denindihidroisokumarin, asam kumarat dan sterol (Harboune, 1971; Biswas, 1986).

#### 2.2. Studi pendahuluan yang telah dilakukan

Telah diteliti aktivitas antimalaria ekstrak metanol dari 9 macam daun genus *Cassia*, yaitu *C. spectabilis*, *C. javanica*, *C. moschata*, *C. grandis*, *C. alata*, *C. multijuga*, *C. garrettiana*, *C. fistula* dan *C. tora*. Pemilihan tanaman tersebut didasarkan atas kekerabatannya dengan tanaman *C. siamea* serta pemakaiannya sebagai obat tradisional antimalaria. Didapatkan hasil bahwa *C. spectabilis* mempunyai aktivitas antimalaria yang paling potensial dengan harga  $IC_{50}$  sebesar 2,67  $\mu\text{g/mL}$  (Adji, 2009). Berdasar pustaka, ekstrak yang memiliki harga  $IC_{50}$  kurang dari 50  $\mu\text{g/mL}$  dianggap potensial sebagai antimalaria (Kohler, 2002).

Uji aktivitas antimalaria ekstrak dan fraksi alkaloid daun *C. spectabilis* Lamk dilakukan secara *in vitro* pada *P. falciparum* menunjukkan bahwa dari ekstrak heksana daun *C. spectabilis* didapatkan harga  $IC_{50}$  sebesar  $> 100 \mu\text{g/mL}$ . Sedang ekstrak metanol daun *C. spectabilis* sebesar 2,66  $\mu\text{g/mL}$ , dari fraksi etil asetat daun *C. spectabilis* sebesar 1,18  $\mu\text{g/mL}$  dan dari fraksi kloroform daun *C. spectabilis* sebesar 0,64  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil diatas menunjukkan bahwa fraksi kloroform mempunyai aktivitas antimalaria yang paling baik yaitu sebesar 0,64  $\mu\text{g/mL}$ , dengan hasil profil KLT fraksi kloroform yang menunjukkan kandungan alkaloid terbesar dibanding ekstrak dan fraksi lainnya (Ekasari *et al.*, 2012).

### 2.3. Tinjauan Ekstraksi dan Isolasi Senyawa Bahan Alam

Kata “ekstraksi” berasal dari bahasa Latin “*extractio* atau *extrahere*” yang berarti menarik keluar. Yang ditarik keluar adalah senyawa-senyawa kimia dari tumbuhan dan atau hewan. Cara menarik keluar senyawa-senyawa tersebut dapat dilakukan dengan cara penyarian, diperas atau destilasi. Bahan baku alami berupa tumbuhan atau hewan biasanya susunannya kompleks dan tidak tunggal. Bahan aktifnya sendiri ada yang larut dalam satu atau lebih pelarut, sehingga dalam pengerjaannya harus selalu dipertimbangkan pemilihan pelarut yang tepat atau menstruum yang dapat melarutkan dan menarik keluar bahan aktif tersebut.

Prosedur isolasi senyawa dari tumbuhan juga sangat beragam sesuai dengan ragam zat kandungan yang akan diisolasi. Salah satu hal yang harus diperhatikan adalah menghindari kerusakan zat kandungan karena panas atau reaksi enzimatis. Untuk pemurnian senyawa, metode kromatografi merupakan metode yang paling disukai (Robinson, 1983). Kromatografi yang sering digunakan antara lain kromatografi lapis tipis dan kromatografi kolom.

### 2.4. Tinjauan tentang Toksisitas

Toksikologi telah didefinisikan sebagai studi tentang efek zat kimia atas material biologi dengan penekanan khusus pada efek yang membahayakan (Loomis, 1978). Sebagai langkah awal untuk melindungi konsumen terhadap kemungkinan bahaya suatu obat, manfaat yang dapat diperoleh dari studi toksisitas ini antara lain:

- Untuk mendapatkan gejala-gejala yang mungkin timbul akibat pemberian obat
- Untuk mengetahui batas keamanan suatu obat
- Untuk mengetahui derajat kematian hewan coba akibat pemberian obat

Dari hasil tersebut diatas, akan dapat dilakukan evaluasi terhadap suatu obat dalam bidang medis. Selain itu penelitian dapat menunjukkan organ sasaran (misalnya hati dan ginjal) yang membutuhkan penelitian lebih lanjut.

#### 2.4.1. Toksisitas Akut

Uji ini dilakukan dengan memberikan zat kimia atau suatu senyawa yang sedang diuji sebanyak satu kali atau beberapa kali dalam jangka waktu 24 jam. Sebagian besar penelitian ini dirancang untuk menentukan dosis letal median ( $LD_{50}$ ) toksikan.  $LD_{50}$  didefinisikan sebagai dosis tunggal suatu zat yang secara statistik diharapkan akan membunuh 50% hewan coba. Pengujian ini juga menunjukkan organ sasaran yang mungkin akan dirusak dan efek toksik spesifiknya, serta memberikan petunjuk tentang dosis yang sebaiknya digunakan dalam pengujian lebih lama (Lu, 1995).

Secara umum penentuan LD<sub>50</sub> digunakan tikus dan mencit. Hewan ini dipilih karena banyak toksikologi tentang jenis hewan ini. Selain itu hewan tersebut murah dan mudah ditangani. Penentuan LD<sub>50</sub> sebaiknya dilakukan pada kedua jenis kelamin, juga pada hewan dewasa yang masih muda, karena kerentanannya mungkin berbeda (Anderson Diana, 1988).

#### 2.4.2. Uji Toksisitas Subakut dan Akut

Perbedaan uji toksisitas akut dan subakut adalah terletak pada lama waktu pemberian. Untuk pemberian dengan jangka 4 minggu sampai 3 bulan disebut toksisitas subakut. Sedangkan bila diberikan dengan jangka waktu lebih dari 3 bulan sampai 24 bulan disebut toksisitas akut. Uji toksisitas diatas bertujuan untuk mengevaluasi efek suatu senyawa apabila senyawa itu diberikan kepada hewan uji secara berulang-ulang. Studi ini penting karena dapat mengamati kemungkinan adanya gejala yang tidak atau belum terlihat pada uji toksisitas akut dengan dosis tunggal.

Metode-metode yang digunakan dalam uji toksisitas akut dan subakut antara lain:

1. Uji analisis dan uji fungsional meliputi hematologi, misalnya pemeriksaan laju endap darah, hemoglobin, jumlah eritrosit dan leukosit; analisis air seni, misalnya pemeriksaan pH, glukosa, protein total dan bilirubin; analisis kimia darah, misalnya kadar SGOT dan SGPT, BUN dan alkali fosfatase serum uji.
2. Pemeriksaan hispatologi, misalnya pemeriksaan organ hati, ginjal, usus dan lambung. Pada metode ini bisa ditemukan gambaran-gambaran abnormal yang kemungkinan tidak ditemukan pada metode lain. Selain itu dapat juga dilihat derajat reversibilitas akibat efek patologisnya.
3. Pemeriksaan berat meliputi berat badan, tiroid, jantung, hati, limpa dan lain-lain.

Karena durasi pengamatan panjang maka uji toksisitas subakut memiliki dua keterbatasan yakni pertama, rute pemakaiannya hanya secara peroral karena rute yang digunakan harus aman sehingga pada pemberian obat yang berulang tidak akan menginduksi terjadinya efek samping yang berbahaya pada hewan coba. Kedua, penggunaan dari spesies hewan coba harus sesuai dimana dilakukan pengambilan sampel darah dan urin dengan interval yang cukup sering tidak boleh menginduksi terjadinya efek samping yang signifikan pada hewan coba (Loomis, 1978).

Hewan coba yang umumnya digunakan adalah tikus dan anjing. Dosis yang digunakan terdiri dari tiga tingkat kelompok dosis. Tiap kelompok dosis terdiri dari 10-20 ekor tikus jantan dan betina atau anjing dengan jumlah 3-4 ekor jantan dan betina. Semua hewan coba ditempatkan secara individu dan diperiksa serta ditimbang tiap minggu (Paget and Barner, 1964; Ghosh, 1971; Loomis, 1978).

## 2.5. Tinjauan Aktivitas Antimalaria secara *in Vivo*

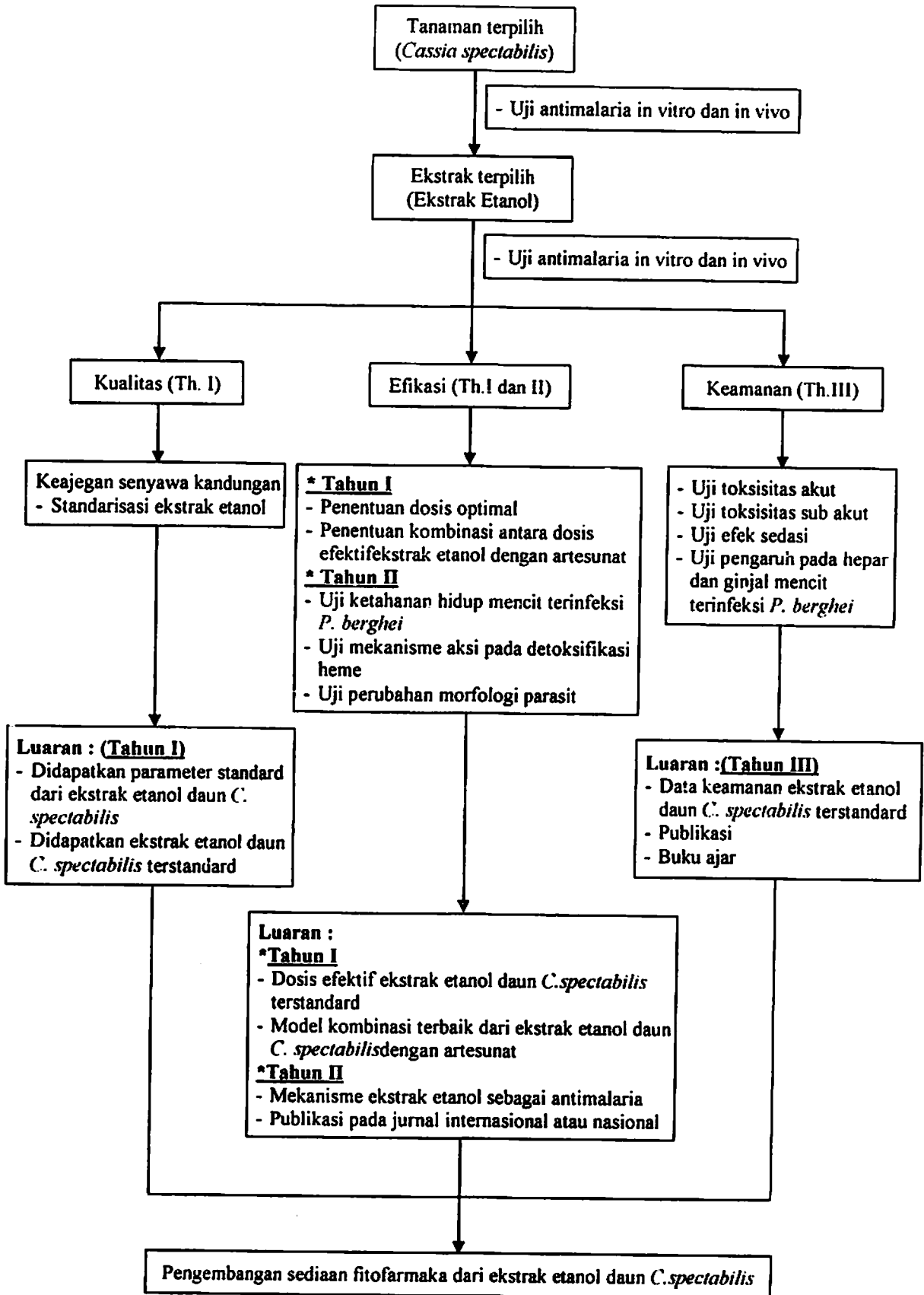
Tes Peter (*The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*).

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat  $20 \pm 2$  g ditempatkan dalam ruang bersuhu  $22^{\circ}\text{C} (\pm 2^{\circ}\text{C})$  sebanyak 5 kelompok dan diberi makanan dengan menu standar. Darah dari mencit donor dengan parasitemia yang sudah tinggi (sekitar 20% erosit yang terinfeksi) dilarutkan dalam medium kultur (TC199) sampai tiap 0,2 mL mengandung  $10^7$  erosit yang terinfeksi. Tiap mencit diberi 0,2 ml secara intravena diekor pada hari 0. Ekstrak tanaman bisa dilarutkan atau dibuat suspensi dengan triturasasi atau sonifikasi setelah penambahan 0,2% larutan tween atau 0,5% larutan CMC atau DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan perhari dengan rentang dosis 1-100 mg/kg berat badan dimulai semenjak hari mulainya penginfeksi selama 4 hari berturut-turut lewat rute subkutan atau oral. Pada hari kelima, diambil sampel darah dari ekor dan dilakukan pewarnaan dengan pewarna yang sesuai (misal *Giemsa*) dan diukur persentase jumlah eritrosit yang mengandung parasit dibandingkan jumlah total eritrosit. Harga  $\text{ED}_{50}$  (dalam hal ini berarti adanya penekanan parasit sebanyak 50% bila dibandingkan dengan kontrol) bisa dihitung dengan log dosis/aktivitas probit.

## 2.6. Tinjauan tentang Tes Rotarod untuk Menilai Koordinasi Motorik (Efek Sedasi)

Tes rotarod digunakan untuk menilai koodinasi motorik dan keseimbangan pada hewan pengerat. Tikus harus menjaga keseimbangan pada batang berputar. Hal ini diukur waktu (*latency*) dibutuhkan tikus jatuh dari batang berputar pada kecepatan yang berbeda (misalnya dari 4 sampai 40rpm). Selain itu digunakan untuk menilai inoktifitas, sedatif, dan kekuatan atau stamina. Tes ini berguna untuk mengetahui efek yang tidak menjadi tujuan utama. Apabila nantinya hasil menunjukkan adanya efek sedasi, maka akan menjadi perhatian pada pemakaian ekstrak etanol daun *C. spectabilis*, karena akan mempengaruhi koordinasi motorik.

**PETA JALAN PENELITIAN**



### BAB 3

## TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

### 3.1. Tujuan Penelitian

Secara umum penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan data keamanan ekstrak etanol terstandar daun *C. spectabilis* sebagai antimalaria untuk mencapai hal tersebut maka dilakukan tahapan penelitian dengan tujuan khusus yaitu:

1. Menguji toksisitas akut ekstrak etanol terstandar daun *C. spectabilis*.
2. Menguji toksisitas subakut ekstrak etanol terstandar daun *C. spectabilis*.
3. Menguji pengaruh ekstrak etanol terstandar daun *C. spectabilis* pada hepar dan ginjal mencit terinfeksi parasit.
4. Menguji efek sedasi yang umum dilaporkan pada genus *Cassia* sebagai efek yang perlu diperhatikan.

### 3.2. Manfaat Penelitian

1. Mendapatkan data parameter standard dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis*.
2. Mendapatkan dosis efektif dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terstandar sehingga dapat digunakan sebagai bahan baku obat antimalaria.
3. Mendapatkan model kombinasi terbaik dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dengan artesunat sehingga dapat digunakan sebagai obat antimalaria.
4. Mengetahui mekanisme aksi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai obat antimalaria.
5. Mendapatkan data keamanan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terstandar sebagai obat antimalaria.
6. Memberikan informasi ilmiah tentang obat antimalaria yang berasal dari tanaman sehingga memperkaya wacana tentang obat tradisional.
7. Untuk memacu penelitian yang berasal dari sumber daya alam nabati beserta pengembangannya terutama yang berkhasiat sebagai antimalaria



## BAB 4

### METODE PENELITIAN

Penelitian ini dirancang dengan tahapan-tahapan sebagai berikut:

1. Melakukan pembuatan ekstrak etanol daun *C. spectabilis*.
2. Menguji toksisitas akut ekstrak etanol terstandard daun *C. spectabilis*.
3. Menguji toksisitas subakut ekstrak etanol terstandard daun *C. spectabilis*.
4. Menguji pengaruh ekstrak etanol terstandard daun *C. spectabilis* pada hepar dan ginjal mencit terinfeksi parasit.
5. Menguji efek sedasi yang umum dilaporkan pada genus *Cassia* sebagai efek yang perlu diperhatikan.

#### 4.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *C. spectabilis*

Ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dibuat dari simplisia daun *C. spectabilis* yang telah diekstraksi dengan cara dimaserasi dengan etanol sebanyak 3 kali, kemudian maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak yang pekat.

#### 4.2. Uji Toksisitas Akut

Hewan coba mencit dibagi menjadi 5 kelompok yang masing-masing terdiri dari 10 ekor. Kemudian dibagi dalam kelompok dosis 1,25 g/kgBB; 2,50 g/kgBB; 5g/kgBB; 10 g/kgBB dan CMC-Na 0,5% (kelompok kontrol). Setiap hewan coba diberi sediaan sesuai dengan dosis masing-masing per oral. Setelah 24 jam diamati apakah ada hewan coba yang mati, dan dihitung jumlah yang mati. Setelah 7 hari diamati apakah ada penurunan berat badan dan perubahan perilaku hewan coba.

Cara analisis data:

Data jumlah hewan coba yang mati dari kelompok 1 sampai dengan 5 digunakan untuk mencari harga LD<sub>50</sub> dengan metode analisis probit. Apabila sampai dengan dosis tertinggi yang diberikan, yaitu 21 g/kgBB tidak ada hewan coba yang mati, berarti sampel termasuk kategori relatif tidak berbahaya.

#### 4.3. Uji Toksisitas Subkronik

Setiap hewan coba diberi sediaan uji sesuai dengan dosis masing-masing per oral (1 kali, 5 kali dan 10 kali) dosis efektif, sehari sekali, selama 30 hari. Setelah 30 hari pemberian

sediaan uji, dilakukan pembedahan hewan coba untuk mengambil hati dan ginjal, lalu dibuat sediaan histologiknya.

Cara pembuatan preparat hispatologi hati dan ginjal tikus:

1. Fiksasi dalam larutan formalin dan pencucian dengan air.
2. Dehidrasi dengan alkohol dan xylol.
3. Impregnasi (penanaman organ) sediaan ke dalam parafin.
4. Pembuatan balok parafin.
5. Pengirisan tipis dengan alat.
6. Diletakkan pada gelas obyek dengan direndam pada air hangat.
7. Pewarnaan.
8. Pemeriksaan mikroskopis.

Cara analisis data:

Untuk pemeriksaan histopatologi hati dan ginjal, dilakukan analisis statistik nonparametrik menggunakan uji Kruskal-Wallis.

#### **4.4. Pengujian Pengaruh Ekstrak Etanol Daun *C. spectabilis* pada Hati dan Ginjal Mencit Terinfeksi *P. berghei***

Pada penelitian uji pengaruh pemberian ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap hepar mencit yang terinfeksi *P. berghei* dengan pemberian terapi berbagai dosis ekstrak *C. spectabilis* yang disuspensikan masing-masing dalam CMC-Na 0,5%.

Terapi dilakukan selama 4 hari terhitung saat jumlah persentase parasitemia dalam mencit yang telah diinfeksi parasit *P. berghei* sekitar 1-1,5%. Pembedahan dilakukan setelah tepat hari terakhir terapi kemudian darah diambil dari jantung untuk sampel pemeriksaan SGOT dan SGPT, serta dilakukan pengambilan hepar mencit. Analisis data dari histopatologi hepar serta hasil SGOT dan SGPT dapat menunjukkan adanya perubahan yang diakibatkan oleh pemberian dosis ekstrak yang berbeda terhadap hepar yang terinfeksi oleh *P. berghei*.

Jumlah hewan uji mencit berjumlah 4 ekor tiap kelompok, hal ini ditinjau dari jumlah kelompok yang akan diuji sehingga dapat diketahui jumlah minimal mencit yang diuji dari rumus *sample size* (Lwanga and Lemeshow, 1991).

Pembuatan preparat histopatologi hati mencit (BALB/c) jantan dilaksanakan di laboratorium patologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga melalui beberapa tahap yaitu fiksasi dan pencucian, dehidrasi dan *clearing*, infiltrasi, pembuatan blok parafin, pengirisan dengan mikrotom, pewarnaan dan *mounting*.

Data yang diperoleh dari pengukuran kadar enzim dalam serum, pengukuran spleen dan



pengamatan histopatologi pada 5 lapang pandang dianalisis secara statistik menggunakan analisis multivariat dan dilanjutkan dengan analisis univariat (ANOVA), bila terdapat perbedaan diantara kelompok perlakuan dilanjutkan dengan uji LSD untuk data yang homogen dan uji Tamhane untuk data yang tidak homogen.

#### 4.5. Uji Efek Sedasi

Pada penelitian ini terdapat empat kelompok yaitu tiga kelompok diberi ekstrak dengan dosis tertentu dan satu kelompok menggunakan obat sedatif. Tiap kelompok menggunakan lima ekor mencit jantan. Diterapi satu kali pemberian sesuai dosis. Setelah 1 menit diberi ekstrak etanol daun *C. spectabilis* dan obat perbandingan, mencit diputar pada rotarod semapai dengan 30 rpm selama 5 menit. Catat waktu mencit mempertahankan posisi pada alat rotarod. Percobaan diulangi 3 kali, selanjutnya dilakukan analisa data.

Cara analisis data:

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan *the analysis of variance method* (ANOVA) *one way* yang dilanjutkan dengan Post Hoc Test metode Duncan. Nilai presentase kepercayaan sebesar 95% ( $P < 0,05\%$ ) artinya jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 atau apabila  $F_{hitung} > F_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak dan menerima  $H_a$  yang mengindikasikan adanya perbedaan bermakna antar kelompok perlakuan. Hipotesa yang diajukan adalah sebagai berikut:

$H_0$ : Tidak terdapat perbedaan bermakna antar satu pasang kelompok.

$H_a$ : Ada perbedaan bermakna minimal satu pasang kelompok.

## BAB 5

## HASIL DAN LUARAN YANG DICAPAI

5.1. Pembuatan Ekstrak Etanol 90% Daun *C. spectabilis*

Hasil pembuatan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* adalah sebagai berikut:

Berat simplisia daun *C. spectabilis* awal = 50,0 gram  
 Jumlah etanol 90% yang digunakan = 250 ml  
 Berat ekstrak etanol kental yang diperoleh = 5,0980 gram

Dari data tersebut maka dapat dihitung rendemen sebagai berikut:

$$\frac{\text{Berat ekstrak yang diperoleh}}{\text{Berat simplisia awal}} \times 100 = \frac{5,0980}{50,0} \times 100 = 10,2\%$$

5.2. Hasil Uji Toksisitas Akut Ekstrak Etanol 90% Daun *C. spectabilis*

Berikut hasil uji toksisitas akut dari ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis*:

Tabel 5.1. Hasil pengamatan angka kematian hewan coba mencit setelah pemberian ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis*

| No. | Dosis (g/kgBB) | Jumlah mencit | Mortalitas | Periode pengamatan (jam) | Jumlah kematian mencit dalam satu kelompok(r) |
|-----|----------------|---------------|------------|--------------------------|---|
| 1   | 1,25           | 5             | 0/5        | 24                       | 0   |
| 2   | 2,5            | 5             | 0/5        | 24                       | 0   |
| 3   | 5              | 5             | 0/5        | 24                       | 0   |
| 4   | 10             | 5             | 1/5        | 24                       | 1   |
| 5   | 21             | 5             | 2/5        | 24                       | 2   |

Berdasarkan jumlah kematian hewan coba dari lima tingkat dosis ekstrak, menghasilkan nilai r yaitu 0, 0, 0, 1, 2 dengan asumsi bahwa semua hewan coba mengalami kematian pada dosis lebih besar dari 21 g/kgBB. Menurut tabel perhitungan LD<sub>50</sub> Thomson dan Weil, nilai r tersebut memiliki nilai f sebesar 0,25000 dan δf sebesar 0,25000 yang kemudian digunakan untuk menghitung nilai LD<sub>50</sub> yaitu sebesar 2,9730 g/kgBB. Didapatkan nilai kisaran LD<sub>50</sub> yaitu 2,4997-3,5359 g/kgBB.

Nilai LD<sub>50</sub>

$$\begin{aligned} \text{Log LD}_{50} &= \text{Log D} + d(f+1) \\ &= \log 1,25 + \log 2(0,25000 + 1) \\ &= 0,0969 + 0,3763 \end{aligned}$$

$$\text{Log LD}_{50} = 0,4732$$

$$\text{LD}_{50} = 2,9730 \text{ g/kgBB}$$

MILIK  
 PERPUSTAKAAN  
 UNIVERSITAS AIRLANGGA  
 SURABAYA

**Kisaran LD<sub>50</sub>**

$$\begin{aligned}\text{Log LD}_{50} &= \text{Log LD}_{50} \pm 2 \text{ d } \delta f \\ &= 0,4732 \pm \log 2 (0,25000) \\ &= 0,3979 - 0,5485\end{aligned}$$

$$\text{LD}_{50} = 2,4997 - 3,5359 \text{ g/kgBB}$$

Keterangan :

D = dosis terkecil yang digunakan

d = logaritma kelipatan

f = suatu faktor pada daftar perhitungan LD<sub>50</sub>

Berdasarkan klasifikasi toksisitas menurut Lu (1995), ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* termasuk kategori praktis tidak toksik.

**5.3. Hasil Uji Toksisitas Subkronis Ekstrak Etanol Daun *C. spectabilis*****5.3.1. Data Kerusakan Hepar Uji Toksisitas Subkronik (28 hari)**

Berikut hasil uji toksisitas subkronis dari ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* terhadap hepar mencit:

**Tabel 5.2.** Data kerusakan hepar kelompok uji dosis 1 kali (150 mg/kgBB)

| Kode | BB (g) | Warna hepar      | Berat hepar (g) | Nekrosis |   |   |   |   | Degenerasi |   |   |   |   |   |        |
|------|--------|------------------|-----------------|----------|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------|
|      |        |                  |                 | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| 1.1  | 25     | Merah            | 2.151           | 2        | 3 | 2 | 3 | 2 | 2,4        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,0    |
| 1.2  | 26     | Merah kecoklatan | 2.234           | 2        | 2 | 2 | 3 | 2 | 2,2        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2    |
| 1.3  | 22     | Merah kecoklatan | 2.211           | 2        | 2 | 2 | 3 | 3 | 2,4        | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,4    |
| 1.4  | 22     | Merah kecoklatan | 2.272           | 2        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,2        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2    |
| 1.5  | 27     | Merah            | 3.304           | 2        | 2 | 3 | 2 | 3 | 2,4        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,0    |
| 1.6  | 30     | Merah kecoklatan | 2.512           | 3        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,4        | 2 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2,4    |
| 1.7  | 30     | Merah            | 2.817           | 2        | 3 | 2 | 3 | 2 | 2,4        | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,2    |

**Tabel 5.3.** Data kerusakan hepar kelompok uji dosis 5 kali (150 mg/kgBB)

| Kode | BB (g) | Warna hepar      | Berat hepar (g) | Nekrosis |   |   |   |   | Degenerasi |   |   |   |   |   |        |
|------|--------|------------------|-----------------|----------|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------|
|      |        |                  |                 | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| 5.1  | 25     | Merah            | 2,163           | 3        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,2        | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2,2    |
| 5.2  | 24     | Merah kecoklatan | 2,017           | 2        | 2 | 3 | 1 | 2 | 2,0        | 2 | 3 | 2 | 2 | 3 | 2,4    |
| 5.3  | 28     | Merah kecoklatan | 2,088           | 2        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,0        | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 2,8    |
| 5.4  | 25     | Merah kecoklatan | 2,123           | 1        | 3 | 3 | 3 | 3 | 2,6        | 4 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,4    |
| 5.5  | 30     | Merah kecoklatan | 2,649           | 2        | 2 | 2 | 2 | 3 | 2,2        | 3 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,6    |
| 5.6  | 28     | Coklat           | 2,513           | 3        | 2 | 3 | 3 | 3 | 2,8        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2    |
| 5.7  | 27     | Merah kecoklatan | 2,205           | 2        | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2        | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,4    |

Tabel 5.4. Data kerusakan hepar kelompok uji dosis 10 kali (150 mg/kgBB)

| Kode | BB (g) | Warna hepar      | Berat hepar (g) | Nekrosis |   |   |   |   |        | Degenerasi |   |   |   |   |        |
|------|--------|------------------|-----------------|----------|---|---|---|---|--------|------------|---|---|---|---|--------|
|      |        |                  |                 | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata | 1          | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| 10.1 | 28     | Merah kecoklatan | 2,171           | 3        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,4    | 2          | 2 | 2 | 3 | 3 | 2,4    |
| 10.2 | 25     | Merah kecoklatan | 2,443           | 3        | 2 | 2 | 3 | 3 | 2,6    | 2          | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,4    |
| 10.3 | 25     | Coklat           | 3,096           | 3        | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,6    | 2          | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2    |
| 10.4 | 24     | Coklat           | 2,051           | 3        | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,4    | 2          | 2 | 3 | 3 | 3 | 2,6    |
| 10.5 | 24,5   | Merah kecoklatan | 2,409           | 2        | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2    | 3          | 2 | 3 | 3 | 3 | 2,8    |
| 10.6 | 23,5   | Coklat           | 2,540           | 0        | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,0    | 4          | 4 | 4 | 4 | 4 | 4,0    |
| 10.7 | 30     | Merah kecoklatan | 2,866           | 2        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,0    | 3          | 3 | 3 | 3 | 3 | 3,0    |

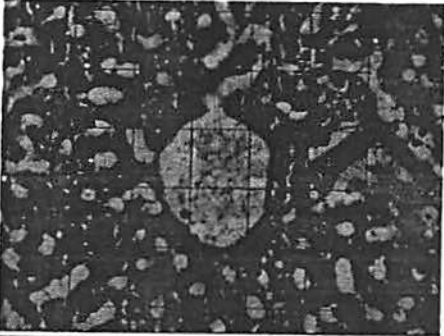
Tabel 5.5. Data kerusakan hepar kelompok kontrol sehat

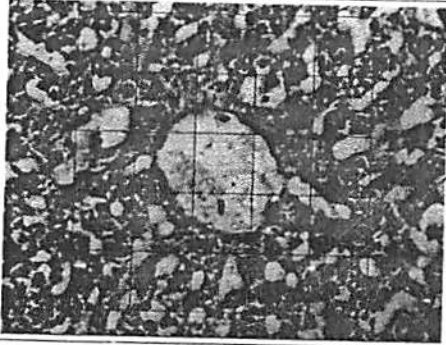
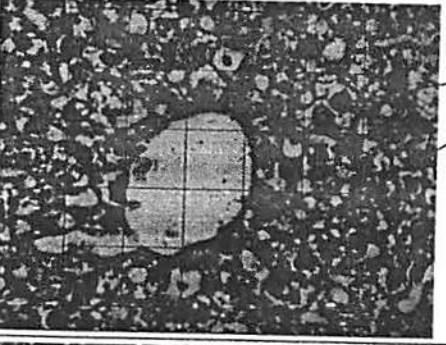
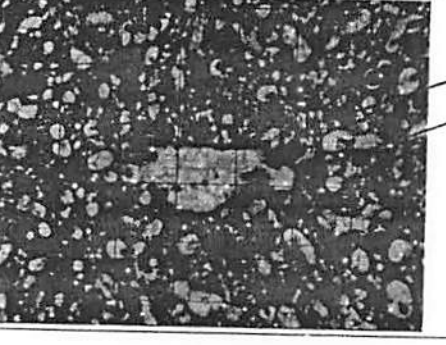
| Kode | BB (g) | Warna hepar      | Berat hepar (g) | Nekrosis |   |   |   |   |        | Degenerasi |   |   |   |   |        |
|------|--------|------------------|-----------------|----------|---|---|---|---|--------|------------|---|---|---|---|--------|
|      |        |                  |                 | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata | 1          | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| H1   | 24,5   | Coklat           | 1,954           | 2        | 2 | 1 | 2 | 2 | 1,8    | 2          | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,4    |
| H2   | 25     | Merah kecoklatan | 2,113           | 3        | 3 | 3 | 3 | 2 | 2,8    | 2          | 2 | 2 | 2 | 3 | 2,2    |
| H3   | 30     | Merah kecoklatan | 3,412           | 3        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,4    | 2          | 3 | 2 | 3 | 3 | 2,6    |
| H4   | 25,5   | Coklat           | 1,987           | 3        | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,6    | 2          | 2 | 2 | 3 | 2 | 2,2    |
| H5   | 30     | Merah tua        | 2,228           | 2        | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,2    | 1          | 2 | 2 | 2 | 2 | 1,8    |
| H6   | 30,5   | Merah tua        | 2,324           | 2        | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,2    | 2          | 2 | 2 | 2 | 3 | 2,2    |
| H7   | 28     | Merah tua        | 2,496           | 2        | 3 | 2 | 3 | 3 | 2,6    | 3          | 2 | 3 | 2 | 2 | 2,4    |

**Gambaran Histopatologi Hepar**

Setelah diterapi selama 28 hari, dilakukan pengambilan organ hepar dan ginjal mencit jantan dan diamati morfologinya. Hasil pengamatan terhadap gambaran histopatologi untuk mengetahui tingkat keparahan hepar dan ginjal. Preparat histologi yang sudah dibuat kemudian dicek pada mikroskop dengan perbesaran 100X dilanjutkan dengan perbesaran 400X. Parameter kerusakan ginjal yang diamati yaitu nekrosis dan degenerasi pada 5 lapang pandang.

Tabel 5.6. Hasil pemeriksaan histopatologi hepar

| GAMBAR  | KETERANGAN  |
|---|---|
|  | <p><b>K1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :<br/>                     Kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150 mg/kgBB (1x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari</p> |

|  |  |
|--|--|
|   | <p><b>K2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :<br/>Kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150mg/kgBB (5x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari</p>  |
|   | <p><b>K3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :<br/>Kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150mg/kgBB (10x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari</p> |
|  | <p><b>KS</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :<br/>Kelompok mencit yang tidak diinfeksi <i>P. berghei</i> dan dikondisikan pada lingkungan yang sama dengan kelompok uji selama 28 hari</p>                 |

### Analisis Data Histologi Hepar

Data yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis diuji statistik menggunakan program SPSS ver.16. Dilakukan uji statistik berupa uji statistik Kruskal-Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan pada seluruh kelompok populasi. Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis dari kerusakan nekrosis hepar, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok hal ini dapat dilihat dari nilai  $\alpha > 0,05$ . Kemudian dilakukan uji statistik Mann Whitney untuk mengetahui letak perbedaan antar kelompok. Uji Mann Whitney dilakukan dengan cara membandingkan masing-masing kelompok. Kelompok perlakuan I (dosis 1x) dibandingkan dengan kelompok perlakuan II (dosis 5x), kelompok perlakuan I (dosis 1x) dibandingkan dengan kelompok perlakuan III (dosis 10x), kelompok perlakuan I (dosis 1x) dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (KS), kelompok perlakuan II (dosis 5x) dibandingkan dengan kelompok perlakuan III (dosis 10x), kelompok perlakuan II (dosis 5x) dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (KS), dan kelompok perlakuan III (dosis 10x) dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (KS). Berdasarkan hasil uji Mann Whitney

pada tingkat kerusakan nekrosis hepar, diketahui tidak terdapat perbedaan bermakna antar dilihat dari nilai  $\alpha > 0,05$ . Begitu juga pada kerusakan degenerasi hepar. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel berikut:

**Tabel 5.7.** Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis hepar

| Kelompok Perlakuan | Keterangan             |
|--------------------|------------------------|
| K1 dan K2          | Tidak berbeda bermakna |
| K1 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K1 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K3 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |

**Tabel 5.8.** Nilai  $\alpha$  pada uji Mann Whitney antar kelompok (kerusakan nekrosis hepar)

| Kelompok | K1    | K2    | K3    | KS    |
|----------|-------|-------|-------|-------|
| K1       |       | 0,315 | 0,945 | 0,686 |
| K2       | 0,315 |       | 0,896 | 0,511 |
| K3       | 0,945 | 0,896 |       | 0,557 |
| KS       | 0,686 | 0,511 | 0,557 |       |

Keterangan:

Terdapat perbedaan bermakna ( $\alpha < 0,05$ )

**K1** : kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB (1x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari

**K2** : kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB (5x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari

**K3** : kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB (10x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari

**KS** : kelompok mencit yang tidak diinfeksi *P. berghei* dan dikondisikan pada lingkungan yang sama dengan kelompok selama 28 hari

**Tabel 5.9.** Hasil uji Mann Whitney degenerasi hepar

| Kelompok Perlakuan | Keterangan             |
|--------------------|------------------------|
| K1 dan K2          | Tidak berbeda bermakna |
| K1 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K1 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K3 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |

Tabel 5.10. Nilai a pada uji Mann Whitney antar kelompok (degenerasi hepar)

| Kelompok | K1   | K2   | K3   | KS   |
|----------|------|------|------|------|
| K1       |      | 0,52 | 0,13 | 0,50 |
| K2       | 0,52 |      | 0,21 | 0,22 |
| K3       | 0,13 | 0,21 |      |      |
| KS       | 0,50 | 0,22 |      |      |

Keterangan: idem.

Dari kedua tabel tersebut, maka dapat diketahui bahwa keempat kelompok perlakuan tersebut menunjukkan tidak ada peredaan bermakna karena tidak ada perbedaan yang signifikan (tidak toksik terhadap organ hepar).

### 5.3.2. Data Kerusakan Ginjal Uji Toksisitas Subkronik (28 hari)

Berikut hasil uji toksisitas subkronis dari ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* terhadap ginjal mencit:

Tabel 5.11. Data kerusakan ginjal kelompok uji dosis 1 kali (150 mg/kgBB)

| Kode | BB (g) | Berat ginjal 1 (g) | Berat ginjal 2 (g) | Nekrosis |   |   |   |   | Degenerasi |   |   |   |   |   |        |
|------|--------|--------------------|--------------------|----------|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------|
|      |        |                    |                    | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| 1.1  | 25     | 0,3156             | 0,3213             | 0        | 1 | 3 | 2 | 3 | 1,8        | 2 | 2 | 0 | 1 | 1 | 1,2    |
| 1.2  | 26     | 0,2406             | 0,2511             | 3        | 2 | 2 | 2 | 3 | 2,4        | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0,8    |
| 1.3  | 22     | 0,2912             | 0,2568             | 2        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,0        | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0,6    |
| 1.4  | 22     | 0,2295             | 0,2744             | 1        | 1 | 2 | 1 | 2 | 1,4        | 1 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1,8    |
| 1.5  | 27     | 0,3541             | 0,3394             | 3        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,2        | 1 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1,4    |
| 1.6  | 30     | 0,3149             | 0,3025             | 3        | 2 | 2 | 2 | 1 | 2,0        | 2 | 1 | 1 | 1 | 3 | 1,6    |
| 1.7  | 30     | 0,3779             | 0,4120             | 2        | 2 | 1 | 2 | 2 | 1,8        | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,6    |

Tabel 5.12. Data kerusakan ginjal kelompok uji dosis 5 kali (150 mg/kgBB)

| Kode | BB (g) | Berat ginjal 1 (g) | Berat ginjal 2 (g) | Nekrosis |   |   |   |   | Degenerasi |   |   |   |   |   |        |
|------|--------|--------------------|--------------------|----------|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------|
|      |        |                    |                    | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| 5.1  | 25     | 0,3097             | 0,2788             | 0        | 2 | 2 | 2 | 0 | 1,2        | 1 | 2 | 0 | 4 | 3 | 2      |
| 5.2  | 24     | 0,2445             | 0,2861             | 0        | 0 | 2 | 0 | 2 | 0,8        | 2 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1,6    |
| 5.3  | 28     | 0,3382             | 0,3302             | 0        | 1 | 2 | 1 | 0 | 0,8        | 3 | 1 | 2 | 1 | 2 | 1,8    |
| 5.4  | 25     | 0,3765             | 0,3715             | 0        | 2 | 1 | 1 | 0 | 0,8        | 3 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1,8    |
| 5.5  | 30     | 0,2746             | 0,3050             | 2        | 2 | 3 | 3 | 2 | 2,4        | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1,4    |
| 5.6  | 28     | 0,2935             | 0,2805             | 1        | 1 | 0 | 1 | 1 | 0,8        | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1,8    |
| 5.7  | 27     | 0,3067             | 0,3114             | 2        | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,8        | 2 | 1 | 2 | 2 | 2 | 1,8    |

Tabel 5.13. Data kerusakan ginjal kelompok uji dosis 10 kali (150 mg/kgBB)

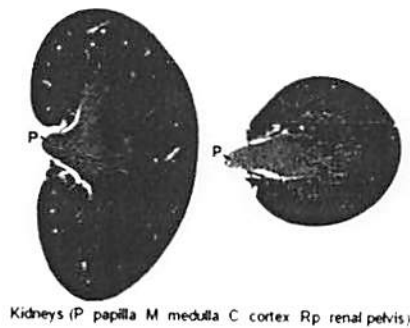
| Kode | BB (g) | Berat ginjal 1 (g) | Berat ginjal 2 (g) | Nekrosis |   |   |   |   | Degenerasi |   |   |   |   |   |        |
|------|--------|--------------------|--------------------|----------|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------|
|      |        |                    |                    | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| 10.1 | 28     | 0,3478             | 0,3082             | 2        | 0 | 2 | 2 | 2 | 1,6        | 1 | 4 | 2 | 2 | 3 | 2,4    |
| 10.2 | 25     | 0,2923             | 0,3479             | 0        | 1 | 1 | 2 | 0 | 0,8        | 2 | 3 | 3 | 2 | 1 | 2,5    |
| 10.3 | 25     | 0,3074             | 0,2759             | 2        | 0 | 0 | 2 | 1 | 1          | 3 | 4 | 4 | 2 | 2 | 3      |
| 10.4 | 24     | 0,3474             | 0,2933             | 2        | 0 | 0 | 2 | 1 | 1          | 0 | 2 | 2 | 2 | 0 | 1,2    |
| 10.5 | 24,5   | 0,2810             | 0,3386             | 4        | 2 | 0 | 1 | 2 | 1,8        | 0 | 3 | 0 | 2 | 1 | 1,2    |
| 10.6 | 23,5   | 0,3832             | 0,3163             | 0        | 3 | 2 | 4 | 3 | 2,4        | 1 | 2 | 3 | 0 | 1 | 1,4    |
| 10.7 | 30     | 0,3363             | 0,3441             | 2        | 2 | 2 | 3 | 2 | 2,2        | 3 | 2 | 3 | 0 | 1 | 1,8    |

Tabel 5.14. Data kerusakan ginjal kelompok kontrol sehat

| Kode | BB (g) | Berat ginjal 1 (g) | Berat ginjal 2 (g) | Nekrosis |   |   |   |   | Degenerasi |   |   |   |   |   |        |
|------|--------|--------------------|--------------------|----------|---|---|---|---|------------|---|---|---|---|---|--------|
|      |        |                    |                    | 1        | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Rerata |
| H1   | 24,5   | 0,2569             | 0,2834             | 1        | 2 | 2 | 1 | 0 | 1,2        | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2      |
| H2   | 25     | 0,2796             | 0,4418             | 2        | 2 | 0 | 0 | 0 | 0,8        | 3 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1,4    |
| H3   | 30     | 0,3831             | 0,3971             | 2        | 2 | 2 | 0 | 2 | 1,6        | 2 | 2 | 2 | 2 | 0 | 1,6    |
| H4   | 25,5   | 0,3003             | 0,2008             | 2        | 2 | 3 | 0 | 3 | 2          | 1 | 2 | 1 | 1 | 1 | 1,2    |
| H5   | 30     | 0,2221             | 0,2136             | 1        | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,2        | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,2    |
| H6   | 30,5   | 0,4171             | 0,3590             | 0        | 3 | 2 | 2 | 2 | 1,8        | 4 | 2 | 2 | 1 | 3 | 2,4    |
| H7   | 28     | 0,2922             | 0,3332             | 3        | 2 | 0 | 1 | 2 | 1,6        | 2 | 3 | 4 | 1 | 1 | 2,2    |

**Gambaran Histopatologi Ginjal**

Pemotongan secara longitudinal memungkinkan evaluasi histologis dari daerah yang relatif besar jaringan yang mencakup kedua kutub ginjal. Hal ini menguntungkan untuk evaluasi lesi fokal. Selain itu, daerah pelvis ginjal dekat dengan kutub yang menarik sehubungan dengan concretions dan perubahan urothelial (Bachmann dan Kriz, 1998).


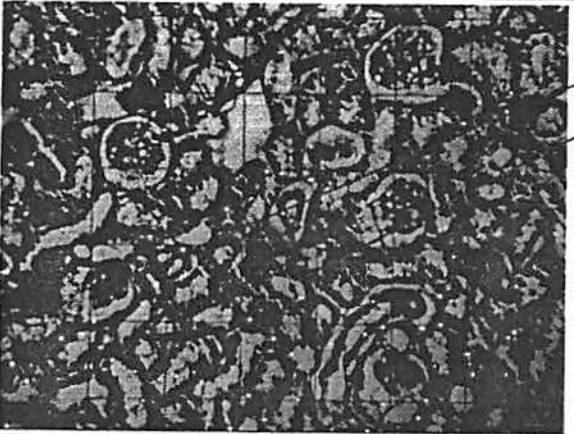
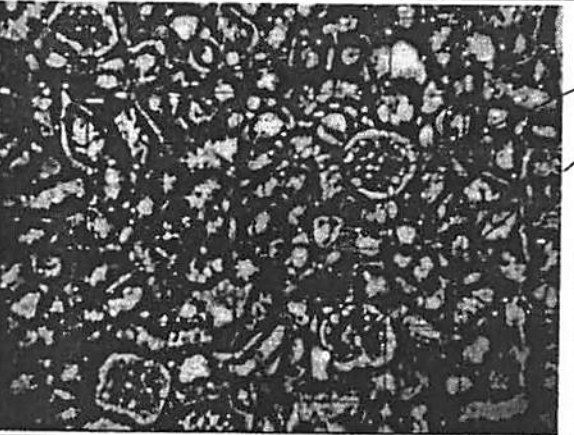
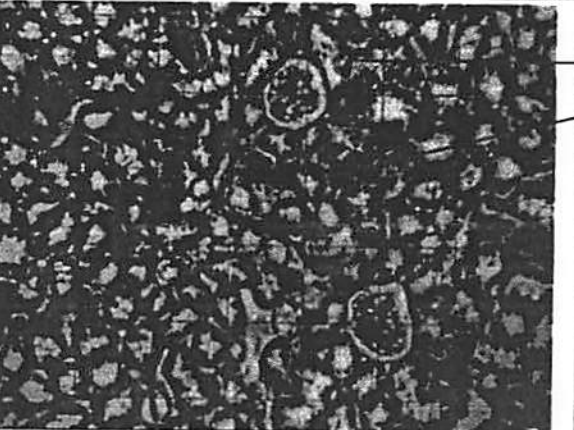


Gambar 5.1. Anatomi dan histologi ginjal mencit penampang longitudinal (Bachmann dan Kriz, 1998).

Preparat histologi ginjal yang sudah dibuat kemudian dicek pada mikroskop dengan perbesaran 100X dilanjutkan dengan perbesaran 400X. Parameter kerusakan ginjal yang diamati yaitu nekrosis dan degenerasi pada 5 lapang pandang seperti berikut:



Tabel 5.15. Hasil pemeriksaan histopatologi ginjal

| GAMBAR (Perbesaran 200x)  | KETERANGAN   |
|---|--|
|    | <p><b>Dosis 1X</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :</p> <p>Kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150mg/kgBB (1x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari</p>   |
|   | <p><b>Dosis 5X</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :</p> <p>Kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150mg/kgBB (5x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari</p>   |
|  | <p><b>Dosis 10X</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :</p> <p>Kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150mg/kgBB (10x) dalam CMC Na 0,5% selama 28 hari</p> |
|  | <p><b>Kontrol Sehat</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>→ Nekrosis</li> <li>→ Degenerasi</li> </ul> <p>Keterangan :</p> <p>Kelompok mencit yang tidak diinfeksi <i>P. berghei</i> dan dikondisikan pada lingkungan yang sama dengan kelompok selama 28 hari</p>                 |

### Analisis Data Histologi Ginjal

Data yang diperoleh dari pengamatan mikroskopis diuji statistik menggunakan program SPSS ver.16. Dilakukan uji statistik berupa uji statistik Kruskal-Wallis untuk mengetahui adanya perbedaan pada seluruh kelompok populasi. Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis dari kerusakan nekrosis ginjal, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok hal ini dapat dilihat dari nilai  $\alpha > 0,05$ . Kemudian dilakukan uji statistik Mann Whitney untuk mengetahui letak perbedaan antar kelompok. Uji Mann Whitney dilakukan dengan cara membandingkan masing-masing kelompok. Kelompok perlakuan I (dosis 1x) dibandingkan dengan kelompok perlakuan II (dosis 5x), kelompok perlakuan I (dosis 1x) dibandingkan dengan kelompok perlakuan III (dosis 10x), kelompok perlakuan I (dosis 1x) dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (KS), kelompok perlakuan II (dosis 5x) dibandingkan dengan kelompok perlakuan III (dosis 10x), kelompok perlakuan II (dosis 5x) dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (KS), dan kelompok perlakuan III (dosis 10x) dibandingkan dengan kelompok kontrol sehat (KS). Berdasarkan hasil uji Mann Whitney pada tingkat kerusakan nekrosis ginjal, diketahui tidak terdapat perbedaan bermakna antar kelompok K1, K3, dan kelompok sehat. Namun, terdapat perbedaan bermakna pada K1 dan K2 dilihat dari nilai  $\alpha < 0,05$ . Begitu juga pada kerusakan degenerasi ginjal. Hasil tersebut dapat dilihat pada tabel berikut:

**Tabel 5.16.** Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis ginjal

| Kelompok Perlakuan | Keterangan             |
|--------------------|------------------------|
| K1 dan K2          | Berbeda bermakna       |
| K1 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K1 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K3 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |

**Tabel 5.17.** Nilai  $\alpha$  pada uji Mann Whitney antar kelompok (kerusakan nekrosis ginjal)

| Kelompok | K1     | K2     | K3    | KS    |
|----------|--------|--------|-------|-------|
| K1       |        | 0,018* | 0,221 | 0,155 |
| K2       | 0,018* |        | 0,096 | 0,072 |
| K3       | 0,221  | 0,096  |       | 0,897 |
| KS       | 0,155  | 0,072  | 0,897 |       |

Keterangan: idem.

Tabel 5.18. Hasil uji Mann Whitney degenerasi ginjal

| Kelompok Perlakuan | Keterangan             |
|--------------------|------------------------|
| K1 dan K2          | Berbeda bermakna       |
| K1 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K1 dan KS          | Berbeda bermakna       |
| K2 dan K3          | Tidak berbeda bermakna |
| K2 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |
| K3 dan KS          | Tidak berbeda bermakna |

Tabel 5.19. Nilai a pada uji Mann Whitney antar kelompok (degenerasi ginjal)

| Kelompok | K1     | K2     | K3    | KS     |
|----------|--------|--------|-------|--------|
| K1       |        | 0,015* | 0,062 | 0,029* |
| K2       | 0,015* |        | 0,896 | 0,516  |
| K3       | 0,062  | 0,896  |       | 0,847  |
| KS       | 0,029* | 0,516  | 0,847 |        |

Keterangan: idem

#### 5.4. Hasil Uji Pengaruh Ekstrak Etanol Terstandard Daun *C. spectabilis* pada Hepar dan Ginjal Mencit Terinfeksi *P. berghei*

##### 5.4.1. Data Kerusakan Hepar Mencit

Berikut hasil uji pengaruh pemberian ekstrak etanol terstandard daun *C. spectabilis* pada hepar mencit terinfeksi *P. berghei*:

#### Perhitungan Persen Parasitemia dan Persen Penghambatan

Tabel 5.20. Persen parasitemia hasil kelompok perlakuan

| No.       | Kelompok | Replikasi | D <sub>0</sub> (%) | D <sub>4</sub> (%) | D <sub>4</sub> -D <sub>0</sub> (%) | % Penghambatan |
|-----------|----------|-----------|--------------------|--------------------|------------------------------------|----------------|
| 1         | K(-)     | 1         | 0,95               | 18,89              | 17,94                              | -              |
|           |          | 2         | 4,63               | 19,30              | 14,67                              |                |
|           |          | 3         | 0,80               | 16,17              | 15,37                              |                |
|           |          | 4         | 2,34               | 18,95              | 16,61                              |                |
| Rata-rata |          |           | 2,18               | 18,33              | 16,15 ± 1,44                       |                |
| 2         | K1       | 1         | 3,72               | 14,66              | 10,94                              | 13,01 ± 19,24  |
|           |          | 2         | 0,43               | 18,23              | 17,80                              |                |
|           |          | 3         | 0,72               | 12,86              | 12,14                              |                |
|           |          | 4         | 0,91               | 16,22              | 15,31                              |                |
| Rata-rata |          |           | 1,45               | 15,49              | 14,05 ± 3,11                       |                |

|   |           |   |      |       |               |               |
|---|-----------|---|------|-------|---------------|---------------|
| 3 | K2        | 1 | 5,44 | 20,45 | 15,01         | 24,57 ± 38,43 |
|   |           | 2 | 4,27 | 23,50 | 19,23         |               |
|   |           | 3 | 2,38 | 11,74 | 9,36          |               |
|   |           | 4 | 0,72 | 5,84  | 5,12          |               |
|   | Rata-rata |   | 3,20 | 15,38 | 12, 18 ± 6,21 |               |
| 4 | K(+)      | 1 | 4,01 | 0,56  | -3,45         | 100           |
|   |           | 2 | 0,98 | 0,00  | -0,98         |               |
|   |           | 3 | 2,97 | 0,00  | -2,97         |               |
|   |           | 4 | 1,24 | 0,00  | -1,24         |               |
|   | Rata-rata |   | 2,30 | 0,14  | -2,16 ± 1,23  |               |

Keterangan:

K1 : kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 150mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari.

K2 : kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 200mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari.

K(-) : kelompok mencit yang diberikan terapi suspensi CMC Na 0,5% selama 4 hari.





K(+): kelompok mencit yang diberikan suspensi klorokuin dosis 100mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari


D<sub>0</sub>-D<sub>4</sub> adalah persenparasitemia mulai dari hari sebelum terapi (hari pertama) sampai hari ke empat.

### Gambaran Morfologi Hepar Mencit

Setelah diterapi selama 4 hari, dilakukan pengambilan organ hepar mencit perlakuan dan diamati morfologinya. Hasil pengamatan terhadap gambaran morfologi hepar mencit pada tabel 5.21 menunjukkan bahwa terdapat perbedaan secara warna dan tekstur permukaan hepar.

Tabel 5.21. Morfologi hepar mencit perlakuan

| Kode | Perlakuan   | Gambar  | Keterangan  |
|------|---|---|---|
| K1   | Diberikan suspensi bahan uji ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari |  | Hepar berwarna coklat, permukaan halus              |
| K2   | Diberikan suspensi bahan uji ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 200mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari |  | Hepar berwarna merah kecoklatan, permukaan halus    |
| K(-) | Diberikan suspensi CMC Na 0,5% selama 4 hari  |  | Hepar berwarna hitam, abnormal, permukaan berbintik |
| K(+) | Diberikan suspensi klorokuin dosis 100mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari   |  | Hepar berwarna merah kecoklatan, permukaan halus    |

|    |   |   |  |
|----|---|---|--|
| KS | Mencit tidak diinfeksi <i>P. berghei</i> dan dikondisikan pada lingkungan yang sama dengan kelompok perlakuan |  | Hepar berwarna merah, permukaan halus, tidak berbintik |
|----|---|---|--|

Keterangan: idem.

Berdasarkan **tabel 5.21** menunjukkan bahwa secara fisik, hepar kelompok I terjadi perbaikan bila dibandingkan kelompok kontrol negatif, meskipun tidak sebaik pada kelompok 2. Kondisi hepar kelompok 2, hampir sama seperti kondisi hepar pada kelompok kontrol positif dan kontrol sehat, yaitu berwarna merah kecoklatan dan tekstur permukaan halus.

### Hasil Pemeriksaan Enzim SGPT dan SGOT

Selain dilakukan pengambilan organ hepar mencit, dilakukan uji enzimatik SGOT-SGPT darah mencit perlakuan. Hasil SGOT-SGPT dapat dilihat pada **tabel 5.22**.

**Tabel 5.22.** Hasil pemeriksaan enzim SGPT dan SGOT

| Kel.  | Rep. | SGOT (U/L) | SGPT (U/L) | Rata-Rata SGOT | Rata-Rata SGPT |
|-------|------|------------|------------|----------------|----------------|
| K1    | 1    | 387        | 75         | 384,75 ± 73,98 | 75,75 ± 35,52  |
|       | 2    | 480        | 120        |                |                |
|       | 3    | 300        | 75         |                |                |
|       | 4    | 372        | 33         |                |                |
| K2    | 1    | 159        | 48         | 216,00 ± 48,80 | 42,00 ± 4,5    |
|       | 2    | 252        | 51         |                |                |
|       | 3    | 261        | 42         |                |                |
|       | 4    | 192        | 42         |                |                |
| K (-) | 1    | 807        | 159        | 658,75 ± 99,52 | 167,75 ± 32,37 |
|       | 2    | 606        | 210        |                |                |
|       | 3    | 625        | 170        |                |                |
|       | 4    | 597        | 132        |                |                |
| K (+) | 1    | 123        | 45         | 175,50 ± 45,59 | 41,25 ± 5,6    |
|       | 2    | 153        | 42         |                |                |
|       | 3    | 204        | 45         |                |                |
|       | 4    | 222        | 33         |                |                |
| KS    | 1    | 225        | 159        | 162,50 ± 59,18 | 97,25 ± 44,70  |
|       | 2    | 115        | 101        |                |                |
|       | 3    | 201        | 68         |                |                |
|       | 4    | 109        | 61         |                |                |

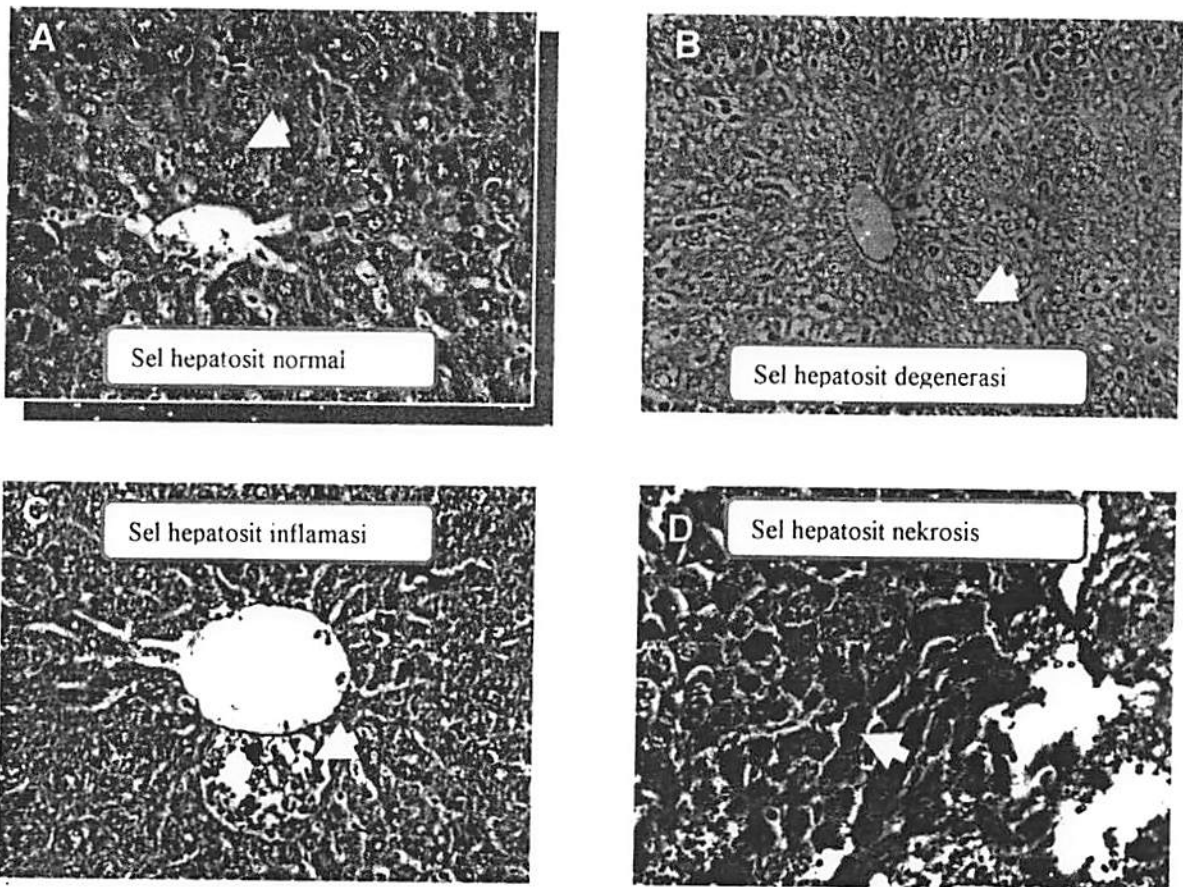
Rentang normal : SGOT = 59-247 U/L; SGPT = 28-132 U/L (Chow *et al.*, 2009)

Keterangan: idem.

Nilai rata-rata SGOT pada kelompok mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB berada di luar rentang normal, tetapi nilai SGPTnya masih dalam rentang normal. Bila dibandingkan dengan kontrol negatif, nilai SGOT-SGPT mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 200 mg/kgBB dan klorokuin 100 mg/kgBB masih dalam rentang normal. Dan hasilnya mendekati dengan nilai SGOT-SGPT mencit kelompok sehat. Adanya kenaikan yang sangat tajam pada nilai SGOT-SGPT pada kelompok kontrol negatif ini, mengindikasikan adanya kerusakan hepar.

### Hasil Pemeriksaan Patologi Hepar

Preparat histologi yang sudah dibuat dicek di mikroskop cahaya dengan perbesaran 100x baru dilanjutkan dengan perbesaran 400x. Parameter kerusakan hepar yang perlu diamati yaitu nekrosis dan degenerasi.



**Gambar 5.2.** Menunjukkan lesi patologis disekitar vena sentralis diantara perlakuan. Slide A sel hepatosit normal di sekitar vena sentralis (panah), slide B sel hepatosit degeneratif, slide C infiltrasi sel radang (panah), slide D sel-sel hepatosit nekrotik (panah) (pewarnaan HE. Pembesaran 400x; mikroskop Nikon H600L; camera DS Fi2 300 megapixel)

Pemberian skoring kerusakan hepar dapat dilihat dari tabel 5.23 dan tabel 5.24 seperti di bawah ini:

Tabel 5.23. Hasil kerusakan nekrosis hepar

| Kelompok | Replikasi | Lapang Pandang |   |   |   |   | Rata-Rata |
|----------|-----------|----------------|---|---|---|---|-----------|
|          |           | 1              | 2 | 3 | 4 | 5 |           |
| K1       | 1         | 2              | 1 | 1 | 1 | 1 | 1,2       |
|          | 2         | 2              | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,8       |
|          | 3         | 1              | 1 | 1 | 0 | 0 | 0,6       |
|          | 4         | 0              | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,4       |
| K2       | 1         | 0              | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,6       |
|          | 2         | 0              | 1 | 1 | 0 | 1 | 0,6       |
|          | 3         | 0              | 0 | 0 | 1 | 1 | 0,4       |
|          | 4         | 0              | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,8       |
| K(-)     | 1         | 1              | 1 | 2 | 1 | 2 | 1,4       |
|          | 2         | 1              | 1 | 1 | 2 | 3 | 1,6       |
|          | 3         | 1              | 1 | 2 | 1 | 1 | 1,2       |
|          | 4         | 1              | 1 | 1 | 1 | 1 | 1,0       |
| K(+)     | 1         | 0              | 1 | 1 | 1 | 0 | 0,6       |
|          | 2         | 1              | 1 | 0 | 1 | 1 | 0,8       |
|          | 3         | 1              | 1 | 0 | 1 | 0 | 0,6       |
|          | 4         | 0              | 1 | 1 | 1 | 0 | 0,6       |
| KS       | 1         | 0              | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,4       |
|          | 2         | 1              | 0 | 1 | 0 | 0 | 0,4       |
|          | 3         | 1              | 0 | 1 | 1 | 0 | 0,6       |
|          | 4         | 0              | 1 | 1 | 1 | 0 | 0,6       |

Tabel 5.24. Hasil kerusakan degenerasi hepar

| Kelompok | Replikasi | Lapang Pandang |   |   |   |   | Rata-Rata |
|----------|-----------|----------------|---|---|---|---|-----------|
|          |           | 1              | 2 | 3 | 4 | 5 |           |
| K1       | 1         | 2              | 1 | 1 | 2 | 2 | 1,6       |
|          | 2         | 2              | 1 | 2 | 1 | 2 | 1,6       |
|          | 3         | 1              | 1 | 2 | 1 | 1 | 1,2       |
|          | 4         | 1              | 1 | 1 | 2 | 2 | 1,4       |
| K2       | 1         | 0              | 1 | 1 | 2 | 1 | 1,0       |
|          | 2         | 2              | 1 | 1 | 2 | 2 | 1,6       |
|          | 3         | 0              | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,8       |
|          | 4         | 1              | 0 | 1 | 1 | 2 | 1,0       |

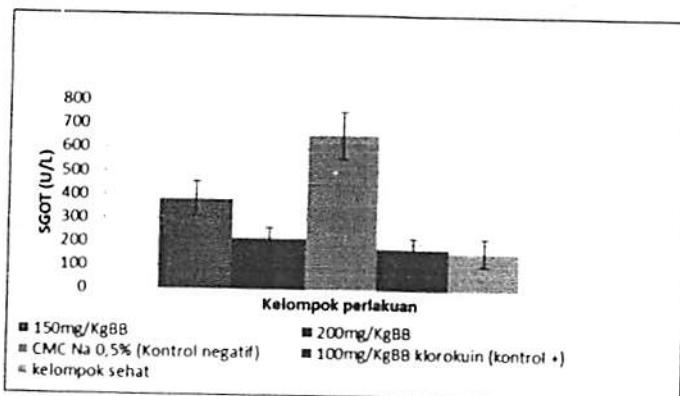
|      |   |   |   |   |   |   |     |
|------|---|---|---|---|---|---|-----|
| K(-) | 1 | 2 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2,4 |
|      | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2,2 |
|      | 3 | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 3,0 |
|      | 4 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2,2 |
| K(+) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0,8 |
|      | 2 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1,4 |
|      | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1,4 |
|      | 4 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 1,2 |
| KS   | 1 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0,8 |
|      | 2 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0,6 |
|      | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0,6 |
|      | 4 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,6 |

Keterangan: idem.

Berdasarkan data tabel 5.23 dan tabel 5.24 tersebut, diketahui bahwa kelompok negatif memiliki skoring yang paling tinggi yang artinya memiliki angka kerusakan paling parah di antara kelompok lainnya. Sedangkan pada kelompok dosis 200mg/kgBB, kontrol positif, dan kelompok sehat menunjukkan skoring angka yang cukup rendah yang menandakan bahwa angka kerusakan dari kelompok tersebut tidak cukup parah.

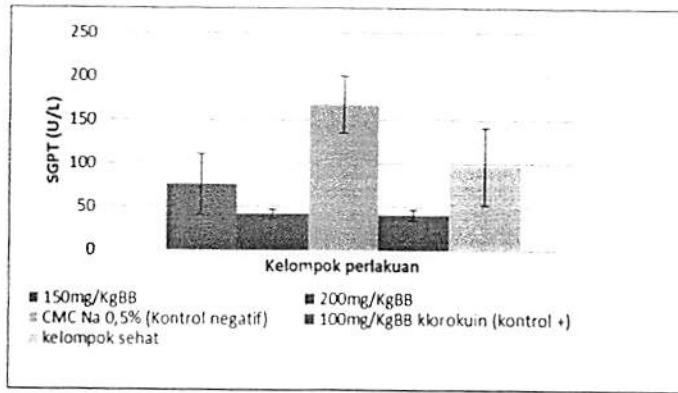
### Analisis Data SGOT dan SGPT

Berdasarkan berbagai perlakuan yang dilakukan terhadap 5 kelompok mencit, maka kelompok dengan dosis 200mg/kgBB dapat memberikan pengaruh lebih baik pada hepar mencit bila dibandingkan dengan kelompok dosis 150mg/kgBB dan kontrol negatif. Hal ini dapat dilihat dari nilai SGOT dan SGPT dosis 200mg/kgBB yang tidak berbeda bermakna dengan nilai SGOT dan SGPT kelompok sehat dan kelompok kontrol positif (klorokuin 100mg/kgBB).



Gambar 5.3. Histogram rata-rata nilai SGOT hepar mencit





Gambar 5.4. Histogram rata-rata nilai SGPT hepar mencit

**SGOT**

Sesuai dengan analisis statistika Anova satu arah (*one way Anova*) terhadap enzimatik SGOT menggunakan program SPSS 16, dapat diketahui bahwa nilai  $\alpha < 0.05$  sehingga dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan bermakna dalam setiap kelompok. Kemudian dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk menentukan urutan terbaik dari semua kelompok perlakuan.

Dari tabel hasil uji Tukey HSD data SGOT (tabel 5.25), diketahui bahwa kelompok dosis 200 mg/kgBB, klorokuin 100mg/kgBB, dan kelompok sehat tidak memiliki perbedaan yang bermakna. Dari rangking kelima kelompok perlakuan, maka kelompok dosis 200mg/kgBB memberikan perbaikan terhadap fungsi hepar mencit bila ditinjau dari hasil SGOT.

Tabel 5.25. Hasil uji Tukey HSD<sup>a</sup> SGOT hepar mencit

| Kelompok    | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|-------------|---|-------------------------|--------|--------|
|             |   | 1                       | 2      | 3      |
| Sehat       | 4 | 162.50                  |        |        |
| Klorokuin   | 4 | 175.50                  |        |        |
| 200 mg/KgBB | 4 | 216.00                  |        |        |
| 150 mg/KgBB | 4 |                         | 384.75 |        |
| CMC Na      | 4 |                         |        | 658.75 |
| Sig.        |   | .800                    | 1.000  | 1.000  |

Keterangan: idem.

**SGPT**

Sesuai dengan analisis statistika Anova satu arah (*one way Anova*) terhadap enzimatik SGPT menggunakan program SPSS 16, dapat diketahui bahwa nilai  $\alpha > 0.05$  yang menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan bermakna pada kelompok perlakuan. Setelah itu,

dilanjutkan dengan uji Tukey HSD untuk menentukan urutan terbaik dari semua kelompok perlakuan.

Dari hasil uji Tukey HSD data SGPT (tabel 5.26), diketahui bahwa kelompok 150mg/kgBB, 200mg/kgBB, kelompok kontrol positif, dan kelompok sehat tidak terdapat perbedaan bermakna. Sedangkan kelompok kontrol negatif berbeda bermakna dengan semua kelompok perlakuan yang menandakan bahwa pada kelompok kontrol negatif terjadi kerusakan hepar.

**Tabel 5.26.** Hasil uji Tukey HSD<sup>a</sup> SGPT hepar mencit

| Kelompok   | N | Subset for alpha = 0.05 |        |
|------------|---|-------------------------|--------|
|            |   | 1                       | 2      |
| Klorokuin  | 4 | 41.25                   |        |
| 200mg/KgBB | 4 | 45.75                   |        |
| 150mg/KgBB | 4 | 75.75                   |        |
| Sehat      | 4 | 97.25                   |        |
| CMC Na     | 4 |                         | 167.75 |
| Sig.       |   | .105                    | 1.000  |

Keterangan: idem.

### **Analisis Data Histologi Hepar**

Data yang diperoleh dari pengamatan secara mikroskopis diuji dengan uji statistik menggunakan program SPSS ver.16. Terdapat 2 uji statistik yang digunakan, yaitu uji statistik Kruskal-Wallis, untuk mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Berdasarkan uji Kruskal-Wallis dari kerusakan nekrosis hepar, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok dilihat dari nilai  $\alpha > 0,05$ . Kemudian dilanjutkan uji statistik MannWhitney untuk mengetahui letak perbedaan antar kelompok. Berdasarkan uji Kruskal-Wallis pada tingkat kerusakan degenerasi hepar, diketahui bahwa terdapat perbedaan secara bermakna antar kelompok dilihat dari nilai  $\alpha < 0,05$ .

Uji Mann Whitney ini dilakukan untuk membandingkan antara kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok perlakuan II (K2), kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok sehat (KS), kelompok perlakuan II (K2) dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan II (K2) dengan kelompok positif (K+) dengan kelompok sehat (KS). Serta kelompok perlakuan III (K-) dengan kelompok positif (K+), perlakuan III (K-) dengan dengan kelompok sehat (KS). Hasil yang diharapkan dalam uji ini adalah diketahui antara kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna untuk

mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok dan didapatkan hasil seperti pada tabel 5.27 dan tabel 5.28.

**Tabel 5.27.** Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis hepar

| Kelompok Perlakuan | Keterangan              |
|--------------------|-------------------------|
| K1 dan K2          | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(-)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(+)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan KS          | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan K(-)        | Berbeda secara bermakna |
| K2 dan K (+)       | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan KS          | Tidak berbeda bermakna  |
| K(-) dan K(+)      | Berbeda secara bermakna |
| K(-) dan KS        | Berbeda secara bermakna |
| K(+) dan KS        | Tidak berbeda bermakna  |

Keterangan: idem.

**Tabel 5.28.** Hasil uji Mann Whitney kerusakan degenerasi hepar

| Kelompok Perlakuan | Keterangan              |
|--------------------|-------------------------|
| K1 dan K2          | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(-)        | Berbeda secara bermakna |
| K1 dan K(+)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan KS          | Berbeda secara bermakna |
| K2 dan K(-)        | Berbeda secara bermakna |
| K2 dan K (+)       | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan KS          | Berbeda secara bermakna |
| K(-) dan K(+)      | Berbeda secara bermakna |
| K(-) dan KS        | Berbeda secara bermakna |
| K(+) dan KS        | Tidak berbeda bermakna  |

Keterangan: idem.

Dari tabel kerusakan degenerasi hepar, dapat dilihat bahwa kelompok kontrol negatif memberikan perbedaan yang bermakna dengan semua kelompok perlakuan. Dan dosis 150mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan kontrol positif tidak menunjukkan perbedaan secara bermakna. Perbedaan yang bermakna dengan kontrol negatif menunjukkan bahwa kelompok dosis 150mg/kgBB dan 200mg/kgBB memberikan efek terapi terhadap perbaikan hepar pada mencit yang terinfeksi *P.berghei*. Dengan tidak adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 150mg/kgBB, 200mg/kgBB, dan klorokuin 100mg/kgBB maka dapat disimpulkan bahwa efek terapi yang diberikan pun tidak jauh berbeda dengan digunakan

sebagai alternatif antimalaria yang dapat mengurangi kerusakan hepar. Dan jika dilihat dari tabel kerusakan nekrosis dan degenerasi, maka dosis 200mg/kgBB menunjukkan aktivitas perbaikan hepar lebih baik daripada dosis 150mg/kgBB.

#### 5.4.2. Data Kerusakan Ginjal Mencit

Berikut hasil uji pengaruh pemberian ekstrak etanol terstandar daun *C. spectabilis* pada ginjal mencit terinfeksi *P. berghei*:

#### Perhitungan Persen Parasitemia dan Persen Penghambatan

Tabel 5.29. Persen parasitemia hasil kelompok perlakuan


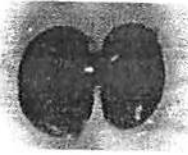


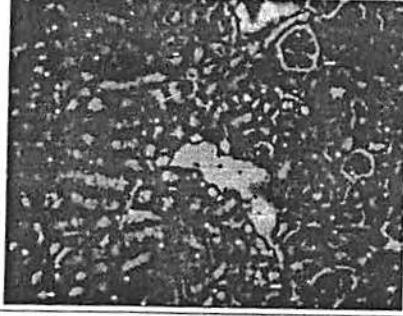

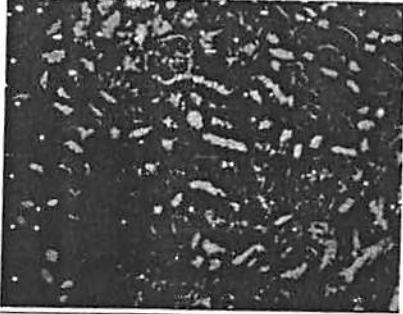


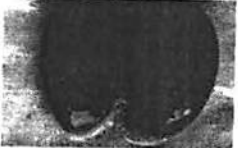
| No.       | Kelompok | Replikasi | D <sub>0</sub> (%) | D <sub>4</sub> (%) | D <sub>4</sub> -D <sub>0</sub> (%) | % Penghambatan |
|-----------|----------|-----------|--------------------|--------------------|------------------------------------|----------------|
| 1         | K(-)     | 1         | 0,95               | 18,89              | 17,94                              | -              |
|           |          | 2         | 4,63               | 19,30              | 14,67                              |                |
|           |          | 3         | 0,80               | 16,17              | 15,37                              |                |
|           |          | 4         | 2,34               | 18,95              | 16,61                              |                |
| Rata-rata |          |           | 2,18               | 18,33              | 16,15 ± 1,44                       |                |
| 2         | K1       | 1         | 3,72               | 14,66              | 10,94                              | 13,01 ± 19,24  |
|           |          | 2         | 0,43               | 18,23              | 17,80                              |                |
|           |          | 3         | 0,72               | 12,86              | 12,14                              |                |
|           |          | 4         | 0,91               | 16,22              | 15,31                              |                |
| Rata-rata |          |           | 1,45               | 15,49              | 14,05 ± 3,11                       |                |
| 3         | K2       | 1         | 5,44               | 20,45              | 15,01                              | 24,57 ± 38,43  |
|           |          | 2         | 4,27               | 23,50              | 19,23                              |                |
|           |          | 3         | 2,38               | 11,74              | 9,36                               |                |
|           |          | 4         | 0,72               | 5,84               | 5,12                               |                |
| Rata-rata |          |           | 3,20               | 15,38              | 12,18 ± 6,21                       |                |
| 4         | K(+)     | 1         | 4,01               | 0,56               | -3,45                              | 100            |
|           |          | 2         | 0,98               | 0,00               | -0,98                              |                |
|           |          | 3         | 2,97               | 0,00               | -2,97                              |                |
|           |          | 4         | 1,24               | 0,00               | -1,24                              |                |
| Rata-rata |          |           | 2,30               | 0,14               | -2,16 ± 1,23                       |                |

Keterangan: idem.

#### Gambaran Morfologi dan Histologi Ginjal Mencit

Setelah diterapi selama 4 hari, dilakukan pengambilan organ ginjal mencit perlakuan dan diamati morfologinya. Hasil pengamatan terhadap gambaran histology untuk mengetahui tingkat keparahan ginjal. Preparat histology yang sudah dibuat kemudian dicek pada mikroskop dengan perbesaran 100X dilanjutkan dengan perbesaran 200X. parameter kerusakan ginjal yang diamati yaitu nekrosis dan degenerasi pada 5 lapang pandang.

Tabel 5.30. Gambaran histologi dan morfologi ginjal mencit perlakuan

| Kode | Perlakuan  | Mikroskopis  | Morfologi   |
|------|--|--|---|
| K1   | Diberikan suspensi bahan uji ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 150 mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari |    |    |
| K2   | Diberikan suspensi bahan uji ekstrak etanol 90% daun <i>C. spectabilis</i> dosis 200 mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari |    |    |
| K(-) | Diberikan suspensi CMC Na 0,5% selama 4 hari   |   |   |
| K(+) | Diberikan suspensi klorokuin dosis 100 mg/kgBB dalam CMC Na 0,5% selama 4 hari   |  |  |
| KS   | Mencit tidak diinfeksi <i>P. berghei</i> dan dikondisikan pada lingkungan yang sama dengan kelompok perlakuan                |   |  |

Pemberian skoring kerusakan ginjal dapat dilihat dari tabel 5.31 dan tabel 5.32 seperti di bawah ini:

Tabel 5.31. Hasil kerusakan nekrosis ginjal

| Kelompok | Replikasi | Lapang Pandang |   |   |   |   | Rata-Rata |
|----------|-----------|----------------|---|---|---|---|-----------|
|          |           | 1              | 2 | 3 | 4 | 5 |           |
| K1       | 1         | 2              | 2 | 2 | 0 | 0 | 1,2       |
|          | 2         | 3              | 2 | 2 | 1 | 1 | 1,8       |
|          | 3         | 0              | 2 | 2 | 1 | 1 | 1,2       |
|          | 4         | 2              | 1 | 3 | 1 | 3 | 2,0       |
| K2       | 1         | 3              | 2 | 0 | 2 | 2 | 1,8       |
|          | 2         | 1              | 1 | 2 | 2 | 2 | 1,6       |
|          | 3         | 3              | 2 | 1 | 1 | 2 | 1,8       |
|          | 4         | 1              | 1 | 1 | 2 | 2 | 1,4       |
| K(-)     | 1         | 2              | 0 | 2 | 2 | 2 | 1,6       |
|          | 2         | 4              | 2 | 3 | 3 | 0 | 2,4       |
|          | 3         | 2              | 2 | 1 | 2 | 2 | 1,8       |
|          | 4         | 2              | 2 | 1 | 1 | 0 | 1,2       |
| K(+)     | 1         | 0              | 1 | 1 | 1 | 2 | 1,0       |
|          | 2         | 1              | 1 | 2 | 2 | 2 | 1,6       |
|          | 3         | 2              | 1 | 2 | 1 | 1 | 1,4       |
|          | 4         | 2              | 2 | 1 | 2 | 1 | 1,6       |
| KS       | 1         | 0              | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,8       |
|          | 2         | 1              | 2 | 2 | 1 | 2 | 1,6       |
|          | 3         | 1              | 2 | 2 | 2 | 0 | 1,4       |
|          | 4         | 1              | 0 | 1 | 1 | 2 | 1,0       |

Keterangan: idem.

Tabel 5.32. Hasil kerusakan degenerasi hepar

| Kelompok | Replikasi | Lapang Pandang |   |   |   |   | Rata-rata |
|----------|-----------|----------------|---|---|---|---|-----------|
|          |           | 1              | 2 | 3 | 4 | 5 |           |
| K1       | 1         | 1              | 0 | 0 | 4 | 2 | 1,4       |
|          | 2         | 1              | 1 | 1 | 0 | 2 | 1,0       |
|          | 3         | 4              | 1 | 1 | 1 | 2 | 1,8       |
|          | 4         | 1              | 1 | 0 | 1 | 0 | 0,6       |
| K2       | 1         | 1              | 2 | 2 | 1 | 1 | 1,4       |
|          | 2         | 1              | 2 | 1 | 0 | 1 | 1,0       |
|          | 3         | 1              | 1 | 2 | 2 | 0 | 1,2       |
|          | 4         | 2              | 1 | 1 | 1 | 1 | 1,2       |

|      |   |   |   |   |   |   |     |
|------|---|---|---|---|---|---|-----|
| K(-) | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0,8 |
|      | 2 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0,6 |
|      | 3 | 1 | 2 | 3 | 1 | 1 | 1,6 |
|      | 4 | 2 | 2 | 1 | 2 | 4 | 2,2 |
| K(+) | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0,8 |
|      | 2 | 2 | 2 | i | 1 | 0 | 1,2 |
|      | 3 | 1 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1,4 |
|      | 4 | 1 | 0 | 1 | 1 | 2 | 1,0 |
| KS   | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0,8 |
|      | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 | 1,4 |
|      | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1,2 |
|      | 4 | 3 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2,4 |

Keterangan: idem.

### Hasil Pemeriksaan Enzim SGPT dan SGOT

Selain dilakukan pengambilan organ ginjal mencit, dilakukan uji enzimatik SGOT-SGPT darah mencit perlakuan. Hasil SGOT-SGPT dapat dilihat pada tabel 5.33.

**Tabel 5.33.** Hasil pemeriksaan enzim SGPT dan SGOT

| Kel. | Rep. | SGOT (U/L) | SGPT (U/L) | Rata-Rata SGOT        | Rata-Rata SGPT        |
|------|------|------------|------------|-----------------------|-----------------------|
| K(-) | 1    | 807        | 159        | <b>658.75 ± 99.52</b> | <b>167.75 ± 32.37</b> |
|      | 2    | 606        | 210        |                       |                       |
|      | 3    | 625        | 170        |                       |                       |
|      | 4    | 597        | 132        |                       |                       |
| K1   | 1    | 387        | 75         | <b>384.75 ± 73.98</b> | <b>75.75 ± 35.52</b>  |
|      | 2    | 480        | 120        |                       |                       |
|      | 3    | 300        | 75         |                       |                       |
|      | 4    | 372        | 33         |                       |                       |
| K2   | 1    | 159        | 48         | <b>216.00 ± 48.80</b> | <b>42.00 ± 4.5</b>    |
|      | 2    | 252        | 51         |                       |                       |
|      | 3    | 261        | 42         |                       |                       |
|      | 4    | 192        | 42         |                       |                       |
| K(+) | 1    | 123        | 45         | <b>175.50 ± 45.59</b> | <b>41.25 ± 5.6</b>    |
|      | 2    | 153        | 42         |                       |                       |
|      | 3    | 204        | 45         |                       |                       |
|      | 4    | 222        | 33         |                       |                       |

Rentang normal : SGOT = 59-247 U/L; SGPT = 28-132 U/L (Chow *et al.*, 2009)

Keterangan: idem.

Nilai rata-rata SGOT pada kelompok mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 150 mg/kgBB berada di luar rentang normal, tetapi nilai SGPTnya masih dalam rentang normal. Bila dibandingkan dengan kontrol negatif, nilai SGOT-SGPT mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 200 mg/kgBB dan klorokuin 100 mg/kgBB masih dalam rentang normal. Adanya kenaikan yang sangat tajam pada nilai SGOT-SGPT pada kelompok kontrol negatif ini, mengindikasikan adanya kerusakan ginjal.

### **Analisis Data Histologi Hepar**

Data yang diperoleh dari pengamatan secara mikroskopis diuji dengan uji statistik menggunakan program SPSS ver.16. Terdapat 2 uji statistik yang digunakan, yaitu uji statistik Kruskal-Wallis, untuk mengetahui adanya perbedaan dalam seluruh kelompok populasi. Berdasarkan uji Kruskal-Wallis dari kerusakan nekrosis ginjal, diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan yang bermakna antar kelompok dilihat dari nilai  $\alpha > 0,05$ . Kemudian dilanjutkan uji statistik Mann Whitney untuk mengetahui letak perbedaan antar kelompok. Berdasarkan uji Kruskal-Wallis pada tingkat kerusakan degenerasi ginjal, diketahui bahwa terdapat perbedaan secara bermakna antar kelompok dilihat dari nilai  $\alpha < 0,05$ .

Uji Mann Whitney ini dilakukan untuk membandingkan antara kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok perlakuan II (K2), kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok kontrol positif (K+), kelompok perlakuan I (K1) dengan kelompok sehat (KS), kelompok perlakuan II (K2) dengan kelompok kontrol negatif (K-), kelompok perlakuan II (K2) dengan kelompok positif (K+) dengan kelompok sehat (KS). Serta kelompok perlakuan III (K-) dengan kelompok positif (K+), perlakuan III (K-) dengan dengan kelompok sehat (KS). Hasil yang diharapkan dalam uji ini adalah diketahui antara kelompok mana yang mempunyai perbedaan bermakna untuk mengetahui perbedaan bermakna antar kelompok dan didapatkan hasil seperti pada tabel 5.34 dan tabel5.35.

**Tabel 5.34. Hasil uji Mann Whitney kerusakan nekrosis ginjal**

| <b>Kelompok Perlakuan</b> | <b>Keterangan</b>       |
|---------------------------|-------------------------|
| K1 dan K2                 | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(-)               | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(+)               | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan KS                 | Berbeda secara bermakna |
| K2 dan K(-)               | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan K (+)              | Berbeda secara bermakna |



|               |                         |
|---------------|-------------------------|
| K2 dan KS     | Berbeda secara bermakna |
| K(-) dan K(+) | Berbeda secara bermakna |
| K(-) dan KS   | Berbeda secara bermakna |
| K(+) dan KS   | Berbeda secara bermakna |

Keterangan: idem.

**Tabel 5.35.** Hasil uji Mann Whitney kerusakan degenerasi ginjal

| Kelompok Perlakuan | Keterangan              |
|--------------------|-------------------------|
| K1 dan K2          | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(-)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan K(+)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K1 dan KS          | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan K(-)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan K(+)        | Tidak berbeda bermakna  |
| K2 dan KS          | Tidak berbeda bermakna  |
| K(-) dan K(+)      | Tidak berbeda bermakna  |
| K(-) dan KS        | Tidak berbeda bermakna  |
| K(+)               | Berbeda secara bermakna |

Keterangan: idem.

Dari tabel kerusakan nekrosis, terdapat perbedaan secara bermakna antara kelompok dosis 150 mg/kgBB dengan kelompok sehat, kelompok dosis 200 mg/kgBB dengan kelompok klorokuin 100 mg/kgBB, kelompok kelompok dosis 200 mg/kgBB dengan kelompok sehat, kelompok kontrol negatif dengan kelompok klorokuin 100 mg/kgBB, kelompok kontrol negatif dengan kelompok sehat, dan kelompok klorokuin 100 mg/kgBB dengan kelompok sehat. Perbedaan yang bermakna dengan kontrol negatif menunjukkan bahwa kelompok yang diobati klorokuin 100 mg/kgBB, memberikan efek terapi terhadap perbaikan ginjal pada mencit yang terinfeksi *P. berghei*. Sedangkan perbedaan yang bermakna dengan kontrol sehat menunjukkan bahwa dosis 150 mg/kgBB dan 200 mg/kgBB memberikan efek terapi terhadap perbaikan ginjal pada mencit yang terinfeksi *P. berghei*.

Dari tabel kerusakan degenerasi ginjal, dapat diketahui bahwa terjadi perbedaan secara bermakna antara kelompok klorokuin 100 mg/kgBB dan kelompok sehat untuk kerusakan degenerasi. Perbedaan yang bermakna tersebut menunjukkan bahwa kelompok klorokuin 100 mg/kgBB memberikan efek terapi terhadap perbaikan ginjal pada mencit yang terinfeksi *P. berghei*.

Dengan tidak adanya perbedaan yang bermakna antara kelompok dosis 150 mg/kgBB, 200 mg/kgBB, dan klorokuin 100 mg/kgBB maka dapat disimpulkan bahwa efek terapi yang

diberikan pun tidak jauh berbeda dengan digunakan sebagai alternatif antimalaria yang dapat mengurangi kerusakan ginjal. Dan jika dilihat dari tabel kerusakan nekrosis dan degenerasi, maka dosis 200 mg/kgBB menunjukkan aktivitas perbaikan hepar lebih baik daripada dosis 150 mg/kgBB.

### 5.5. Hasil Uji Efek Sedatif Ekstrak Etanol 90% Daun *C. spectabilis*

Berikut hasil uji efek sedatif dari ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis*:

Tabel 5.36. Data waktu jatuh mencit sebelum dan sesudah perlakuan dengan menggunakan alat rotarod pada kecepatan 30 rpm

| Kelompok Perlakuan    | Waktu Jatuh Mencit (Detik) |                   | (Sesudah Perlakuan / Sebelum Perlakuan) x 100% | % Penghambatan | % Penghambatan Rata-rata ± SD |
|-----------------------|----------------------------|-------------------|--|----------------|-------------------------------|
|                       | Sebelum Perlakuan          | Sesudah Perlakuan |  |                |                               |
| Kontrol Positif       | 6000                       | 460               | 7,63   | 92,33          | 63,95 ± 18,33                 |
|                       | 6000                       | 3622              | 60,37  | 39,63          |                               |
|                       | 1012                       | 416               | 41,11  | 58,89          |                               |
|                       | 729                        | 190               | 26,06  | 73,94          |                               |
|                       | 362                        | 119               | 32,87  | 67,13          |                               |
|                       | 903                        | 435               | 48,17  | 51,83          |                               |
| Kontrol Negatif       | 915                        | 1260              | 137,70   | 0,00           | 0                             |
|                       | 537                        | 4882              | 909,12   | 0,00           |                               |
|                       | 1957                       | 6000              | 306,60   | 0,00           |                               |
|                       | 6000                       | 6000              | 100,00   | 0,00           |                               |
|                       | 525                        | 535               | 101,90   | 0,00           |                               |
|                       | 924                        | 1842              | 199,35   | 0,00           |                               |
| <i>C. spectabilis</i> | 1842                       | 432               | 23,45  | 76,55          | 66,37 ± 27,92                 |
|                       | 1827                       | 241               | 13,19  | 86,81          |                               |
|                       | 5996                       | 1100              | 18,35  | 81,65          |                               |
|                       | 619                        | 373               | 60,26  | 39,74          |                               |
|                       | 4495                       | 438               | 9,74   | 90,26          |                               |
|                       | 1465                       | 1125              | 76,79  | 23,21          |                               |

Hasil penelitian tentang efek sedasi dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* menunjukkan aktivitas sedasinya lebih tinggi daripada diazepam sebagai kontrol positif. Untuk itu perlu kehati-hatian apabila menggunakan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai obat antimalaria karena akan dapat menimbulkan efek mengantuk.

**BAB 6**

**RENCANA TAHAPAN BERIKUTNYA**

1. Dilakukan penelitian lanjutan formulasi terbaik dari ekstrak etanol daun *Cassia spectabilis* sebagai antimalarial untuk skala lab.

M I L I K  
F E R P U S T A K A A N  
U N I V E R S I T A S A I R L A N G G A  
S U R A B A Y A

## BAB 7

## KESIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian, didapatkan kesimpulan sebagai berikut:

1. Harga  $LD_{50}$  dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sekitar 2,4997-3,5359 g/kgBB.
2. Berdasar hasil uji toksisitas sub kronis selama 28 hari kelompok perlakuan (dosis 1 x 150 mg/kgBB, 5 x dan 10 x ) menunjukkan tidak ada perbedaan yang bermakna yang berarti tidak toksik terhadap organ hepar.
3. Berdasarkan hasil perhitungan kerusakan hepar dan uji enzimatis SGOT-SGPT diperoleh kesimpulan bahwa kelompok mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 200 mg/kgBB memberikan perbaikan fungsi hepar yang lebih baik daripada ekstrak dosis 150mg/kgBB, secara enzimatis (SGOT dan SGPT) maupun secara histopatologis.
4. Kelompok ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 200mg/kgBB memberikan hasil yang tidak berbeda secara bermakna dengan kontrol positif (klorokuin dosis 100mg/kgBB) dan kontrol sehat.
5. Ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* mempunyai efek sedasi yang lebih baik daripada diazepam sebagai kontrol positif.

## DAFTAR PUSTAKA



- Aji, R. 2008. Aktivitas antimalaria ekstrak metanol sembilan tanaman dari genus *Cassia* terhadap *Plasmodium falciparum*. *Skripsi*. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Al Jassabi, S., Azirun, M.S., dan Saad, A. 2011. Biochemical studies on the role of Curcumin in the protection of liver and kidney damage by antimalarial drug, Chloroquine. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences*. 3 (1): 17-22.
- Bjorge, S. 2004. Strategic Plant to Roll Back Malaria in SE Asia Region. *Proceeding Symposium of Malaria Control in Indonesia*, 29-30 November 2004. Surabaya, Indonesia. Hal. 14-30.
- Bozdech, Z., Llinas, M., Pulliam, B.L., Wong, E.D., Zhu, J., dan DeRisi, J.L. 2003. The transcriptom of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biology*. 1 (1): E5.
- Burke, E., Deasy, J., Hasson, R., McCormack, R., Randhawa, V., dan Walsh, P. 2003. Antimalarial Drugs from Nature. *Trinity Student Medical Journal*.
- Ekasari, W., dan A. Widyawaruyanti. 2003. Uji antimalaria ekstrak etanol daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*. Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari, W., Tantular, I.S., dan Wahyuni, T.S. 2012. Potensi daun *C. spectabilis* sebagai antimalaria dari bahan alam. *Penelitian Strategi Nasional*. Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari, W., Wahjo, D., dan Yoes, P.D. 2001. Uji antimalaria *in vitro* dari ekstrak etanol, kloroform daun *Cassia siamea*. *Majalah Kedokteran Tropis Indonesia*. 12 (12).
- Ekasari, W., Wahjo, D., Yoes, P.D., dan Suhintam, P. 2001. In vitro antiplasmodial activity of alkaloid fraction of chloroform extract of *Cassia siamea* leaves. WHO UI, Jakarta.
- Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., dan Suhintam, P. 2002. Daya skizontosida ekstrak etanol, ekstrak kloroform dan fraksi yang positif alkaloid daun *C. siamea* pada biakan *in vitro* *P. falciparum*. *Penelitian Dosen Muda (BBI)*. Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., dan Suhintam, P. 2004. Uji antimalaria senyawa hasil isolasi fraksi positif alkaloid daun *C. siamea* pada biakan *in vitro* *P. falciparum*. *Penelitian Dosen Muda (BBI)*. Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., dan Tantular, I.S. 2005. Uji antimalaria hasil fraksinasi ekstrak kloroform daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Penelitian Dosen Muda (BBI)*. Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Surabaya.

- Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., dan Tantular, I.S. 2006. Uji antimalaria ekstrak air (infusa dan seduhan) daun *C. siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Penelitian DIPA*. Lembaga Penelitian dan Inovasi Universitas Airlangga, Surabaya.
- Ekasari, W., Widyawaruyanti, W., Zaini, N.C., Syafruddin, Honda, T., dan Morita, H. 2009. Antimalarial activity of Cassiarin A from the leaves of *Cassia siamea*. *Heterocycles*. 78 (7): 1831-1836.
- Ekasari, W., Zaini, N.C., Santosa, M.H., Hafid, F., dan Widyawaruyanti, A. 2005. Pengembangan daun Johar (*Cassia siamea*) sebagai fitofarmaka antimalaria. *Penelitian BPOM*. Tahun ke-I.
- Ekasari, W., Zaini, N.C., Santosa, M.H., Hafid, F., Widyawaruyanti, A., Dachlan, Y.P., Setyawan, D., Studiawan, H., dan Khatib, J. 2006. Pengembangan daun Johar (*Cassia siamea*) sebagai fitofarmaka antimalaria. *Penelitian BPOM*. Tahun ke-II.
- Fidock, D.A., Rosenthal, P.J., Croft, S.L., Brun, R., dan Nwaka, S. 2004. Antimalarial drug discovery: Efficacy models for compound screening. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3 (6): 509-520.
- Hempelmann, E., Motta, C., Hughes, R., Ward, S.A., dan Bray, P.G. 2003. *Plasmodium falciparum*: sacrificing membrane to grow crystals?. *Trends in Parasitology*. 19 (1): 23-26.
- Heyne, K. 1987. *Tumbuhan Berguna Indonesia*, Jilid 3. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan. Jakarta-Indonesia. Hal. 926-927.
- Kochar, D.K., Singh, P., Agarwal, P., Kochar, S.K., Pokharna, R., dan Sareen, P.K. 2003. Malaria hepatitis. *Journal of Association of Physicians of India*. 51: 1069-1072.
- Krettli, A.U., Andrade-Neto, V.F., Brandao, M.G., dan Ferrari, W.M. 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plants randomly selected: A review. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96 (8): 1033-1042.
- Mishra, S.K., Mohanty, S., dan Das, B.S. 1992. Hepatic changes in *P. falciparum* malaria. *Indian Journal of Malariology*. 29 (3): 167-171.
- Ngatidjan. 1991. *Petunjuk Laboratorium Metode Laboratorium dalam Toksikologi*. Pusat Antar Universitas Bioteknologi Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- Obi, E., Orisakwe, O.E., Asomugha, L.A., Udemezue, O.O., dan Orish, V.N. 2004. The hepatotoxic effect of halofantrine in Guinea pigs. *Indian Journal of Pharmacology*. 36 (5): 303-305.
- Phillipson, J.D. dan C.W. Wright. 1991. Antiprotozoal agents plant sources. *Planta Medica*. 57 (7 Suppl): S53-59.
- Ridley, R.G. 2002. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*. 415 (6872): 686-693.
- Rosenthal, P.J. 2001. Antimalarial chemotherapy. Mechanisms of action, resistance, and new directions in drug discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz on Line*. 96 (8): 1185-1186.

- Sherman, I.W. 1998. *Malaria: Parasite Biology, Pathogenesis, and Protection*. ASM Press. Washington, D.C.-USA.
- Sjafruddin, D., Siregar, J.E., dan Asih, P.B.S. 2004. Antimalarial drug resistance in Indonesia: A molecular analysis. *Proceeding Symposium of Malaria Control in Indonesia*, 29-30 November 2004. Surabaya, Indonesi.
- World Health Organization. 2003. *WHO report meeting on antimalarial drug development*. <http://www.wpro.who.int/malaria/docs/shanghai>. Diakses tanggal 19 Mei 2016.
- World Health Organization, 2007. *Malaria situation in SEAR countries*. WHO. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization, 2008. *World malaria report 2008*. WHO. Geneva, Switzerland.
- World Health Organization. 2010. *Malaria*. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/>. Diakses 21 Desember 2015.
- Zheng, Z.W., Song, S.Z., Wu, Y.L., Lian, L.H., Wan, Y., dan Nan, J.X. 2011. Betulinic Acid Prevention of D-galactosamine/lipopolysaccharide liver toxicity is triggered by activation of Bcl-2 and antioxidant mechanisms. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 63 (4): 572-578.





Ekasari et al., Afr., J. Infect. Dis. (2018) 12(S): 110-115

<https://doi.org/10.2101/Ajid.12v1S.16>

DETERMINATION OF EFFECTIVE DOSE OF ANTIMALARIAL FROM *CASSIA SPECTABILIS* LEAF  
 ETHANOL EXTRACT IN *PLASMODIUM BERGHEI*-INFECTED MICE

Wiwied Ekasari<sup>1\*</sup>, Tutik Sri Wahyuni<sup>1</sup>, Heny Arwaty<sup>2</sup>, Nindya T. Putri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departement of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Surabaya, Indonesia; <sup>2</sup>Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.

\*Corresponding Author E-mail: [wiwiedeka@hotmail.com](mailto:wiwiedeka@hotmail.com)

**Article History**

Received: March, 16, 2017  
 Revised Received: Oct. 13, 2017  
 Accepted: Oct. 17, 2017.  
 Published Online: March, 07, 2018.

**Abstract**

**Background:** The preliminary study on antimalarial activity of the ethanol extract of *Cassia spectabilis* leaves against *Plasmodium berghei* has been carried out by *in vivo* experiment. It was demonstrated that ethanol extract of *C. spectabilis* leaves could inhibit growth of rodent malaria parasite *P. berghei* by 59.29 % (at a dose of 100 mg/kg bodyweight). However, further investigation is required to determine an effective dose of the administered extract for a higher inhibitory effect and increasing effectiveness of the extract.

**Material and Methods:** To determine the effective dose of ethanol extract of *C. spectabilis* leaves, a "4-day suppressive test" of Peter was performed with some modifications. The extract was administered orally to *P. berghei*-infected mice in multiple doses (twice and thrice daily) and single dose (once daily) with dose ranging from 50 - 250 mg/kg body weight. Antimalarial activities were determined by analyzing suppression of parasitaemia of treated mice.

**Results:** The results showed that oral administration of the ethanol extract of *C. spectabilis* leaves at dose of 150mg/kg bodyweight thrice daily possessed higher inhibition (62.42%) compared to those twice daily (52.58%) and once daily (46.25%).

**Conclusion:** These results suggested that ethanol extract of *C. spectabilis* is promising candidate for development of antimalarial drugs. The effective dose of the ethanol extract is 150 mg/kg bodyweight with thrice administration daily.

**Keywords:** *Cassia spectabilis*, antimalarial, *Plasmodium berghei*, *in vivo*

**Introduction**

Traditional medicines provide for about 80% of health care in world populations, especially in the developing countries (Bodeker and Kronenber, 2002). In addition, plant-derived compounds have played an important key role in drug discovery. Several plants including their isolated compounds have been reported to inhibit malaria parasite (Oliveira, 2009).

Malaria is currently a public health concern in many countries due to factors such as the emerge of resistance, poor hygienic conditions, poorly managed vector control programs and no available approved vaccines (Onguene et al., 2013).

Malaria is a disease that is transmitted through the bite of a female *Anopheles* mosquito, which is infected by protozoa of genus *Plasmodium*. It is still endemic in most parts of Indonesia (WHO, 2015). Elyazar et al., 2011 summarized the distribution of *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, and *P. ovale* among Indonesian population during the year of 1900-2009 was 5.8; 4.9; 0.2 and 0.005 % respectively. Those data showed that *P. falciparum* was the highest cause among the reported infection cases. The morbidity and mortality on malaria cases in Indonesia are routinely under-reported. The WHO estimated that there were 2.5 million cases of malaria in Indonesia in 2006 and over 3000 deaths had occurred in the year of 2006 (Elyazar et al., 2011).

Malaria eradication program has been carried out to suppress the morbidity and mortality caused by malaria, including early diagnosis, prompt treatment, proper surveillance and vector control. However, it also impacted on the increasing of drug resistance cases, (WHO, 2016). A new antimalarial drug to overcome such resistance is absolutely required.

Medicinal plants are potential resources for the search of antimalarial agents. Plants which are belonging to genus of *Cassia* have been reported possess strong inhibition against malaria parasite (Abdulrazak et al., 2015; Ekasari et al., 2009; Morita et al., 2007).

*Cassia* Linn. is a major genus of *Caesalpinaceae* family. It has 600 species and some of which are widely distributed worldwide especially in tropical countries such as India (Dave and Ledwani, 2012; Viegas et al. 2004). They are also widely distributed in tropical and subtropical regions and have been used as traditional folk medicine, particularly for treatment of fever and malaria (Dave and Ledwani, 2012).

Other study reported on the chemical constituents of genus *Cassia*. The secondary metabolites of *C. spectabilis*, *C. siamea*, *C. fistula*, *C. biflora* and *C. hirsute* have been identified including alkaloids, tannins, saponins, flavonoids, carbohydrates, proteins, steroids, terpenoids, cardiac glycosides and phlobatannins (Usha and Bupaiah, 2011)

Our previous study has been reported on one of the plants from the genus *Cassia* in Indonesia, i.e. *C. siamea* that exhibited antimalarial activity. The isolated compound, namely Cassiarin A, revealed to effectively inhibit the growth of malaria parasites with IC<sub>50</sub> value of 0.005 µg / mL and ED<sub>50</sub> value of 12.17 mg/kg body weight (Morita et al. 2007; Ekasari et al., 2009).

Our previous screening on antimalarial activities of different nine plant species from the genus of *Cassia* showed that *C. spectabilis* produced the highest inhibition against malaria parasite (Ekasari et al. 2015). *In vitro* analysis revealed that methanol extract of leaves from *C. spectabilis* showed the strongest antimalarial activity against *P. falciparum* with IC<sub>50</sub> value of 2.66 µg/mL. Moreover, its ethanolic extract also inhibits the growth of the *P. berghei* *in vivo* by 59.29% (at dose of 100 mg/kg bodyweight). Further investigation on possible compounds which contributed to its antimalarial activities, revealed that only leaves of *C. spectabilis* possess an alkaloid compounds (Ekasari et al., 2009). However, other study also reported the isolated compounds from *C. spectabilis* including beta-sitosterol, betulinic acid, caffeine, dihidroksi calamenen, 1,8-dihidroksi-3-metyl-6-metoksi antraquinon, fredelin, oleanolic acid, alkaloid piperidin, spectraline, stigmasterol; 1,3,8-trihidroksi-2-methylantraquinone and ursolic acid (Subramanian et al., 2012).

Determination of an effective dose that causing a higher inhibitory effect is needed before the extract can be used as an antimalarial drug. First step is to define ED<sub>50</sub> value of the ethanolic extract of *C. spectabilis* leaves against *P. berghei* in mice by giving the *P. berghei*-infected mice with the extract based on Munos et al (2000). Further, based on this value the extract will be given in a single and multiple doses. The multiple doses are given to extend the therapeutic activity of the extract. Plasma level of the drug is maintained as therapeutic range to achieve its maximal effectivity, therefore, multiple doses are given in order to maintain its plasma level relatively constant. The rules of drug dosing is to give the ideal plasma level without any fluctuation and excessive accumulation of the drug (Shargel et al., 2005).

## Materials and Methods

### Plant Material

The leaves of *C. spectabilis* were collected from Purwodadi Botanical Garden, East Java, Indonesia and specimen was deposited as the herbarium (Number : 525/PH.3.04/IM/IV/2015)

### Rodent's parasite

The chloroquine sensitive *P. berghei* ANKA strain was obtained from Institute of Biomolecular Eijkmann, Jakarta, Indonesia. Mice were maintained at Malaria Laboratorium, Faculty of Pharmacy, Airlangga University, Indonesia. The percentage of parasitaemia of mice donor was examined through gram staining of mice-infected blood. Blood was collected from the mice with high parasitaemia and deposited for the use of next infection. Trophozoite of erythrocytes infected with *P. berghei* was prepared by determining the percentage parasitaemia of mice donor and diluting the blood with alceivers solutions with predetermined proportion. The mice were infected intraperitoneally with 200µL of 5% parasite-containing blood from frozen deposits. Once the percent of parasitaemia reached 20%, the mice blood was taken intracardially and diluted with PBS up to 1% parasitaemia. The test mice were further infected with 200µL of this parasite-containing blood with 1% parasitaemia (Widyawaruyanti et al., 2014).

### Animals

Adult male Balb-C mice with 20-30 g bodyweight were obtained from Pusat Veterinaria Farma (PUSVETMA) Surabaya. The mice were fed with mice pellet diet and given free access to clean drinking water. The animals allowed to acclimatize for two weeks before treated. The permission and approval for animal studies were obtained from Faculty of Veterinary Medicine, Airlangga University.

### Preparation of Extract

The leaves of *C. spectabilis* were cleaned, shade dried for four days and pulverized to produce powder. One kilogram of the dried leaf powder was extracted with 5 L of 90% ethanol using maceration method.

**Antimalarial Activity**

Antimalarial activities were performed by *in vivo* experiment in mice. In order to determine ED<sub>50</sub>, animals were divided into seven groups of five mice, one was negative control group and six were treated groups. The negative control group was given CMC Na 0.5% once a day orally, and treated groups were fed with suspension of 90% ethanol extract of *C. spectabilis* leaves with the dose of 50, 75, 100, 150, 200 and 250 mg/kg body weight of mice once a day orally.

Further investigation to determine the effective dose of extract was also performed. Two kind of experiments were conducted in parallel. First, the ethanol extract of *C. spectabilis* leaves was administered in multiple doses (twice and thrice daily). Second, it was administered in single dose (once daily) orally at a dose of 150 mg/kg of body weight.

Antimalarial activity of ethanol extract of *C. spectabilis* leaves were conducted by 4-day suppressive test of Peters (Phillipson and Wright, 1991). Each mouse was inoculated intraperitoneally on the first day (day 0/D0) with 0.2 ml of *P. berghei*-infected blood (1%), and followed by treatment of the malarial-infected mouse with ethanol extract of *C. spectabilis* in concentration of 50, 75, 100, 150, 200 or 250 mg/kg bodyweight. The extract was administered orally for four consecutive days.

On the fourth day after treatment (D4), the percentage of parasitaemia in *P. berghei*-infected mouse was evaluated by collecting blood from the tail of mice, and the parasitaemia was examined by gram staining. Parasitaemia level was determined by counting the number of parasite-infected erythrocytes per 3000 erythrocytes, and the ED<sub>50</sub> was calculated by probit analysis.

The ED<sub>50</sub> representing 50% suppression of parasite when it is compared to untreated control. Average percentage of parasite's inhibition was calculated as following :

$$100\% - \left( \frac{X_t}{X_k} \times 100 \right)$$

X<sub>t</sub> = % parasitaemia growth of the treated

X<sub>k</sub> = % parasitaemia growth of negatif control

**Results**

The results of *in vivo* antimalarial activity of ethanol extract of *C. spectabilis* leaves against *P. berghei* is presented in Table 1, Table 2 and Table 3. The percentage of parasitaemia was observed from day 0 to day 4 post treatment (Table 1).

**Table 1:** The percentage parasitaemia value of mice infected-*P. berghei* treated with ethanol extract of *C. spectabilis* leaves perorally

| Sample (mg/kg body weight) | Average parasitemia (%) |                |                |                |                |
|----------------------------|-------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                            | D <sub>0</sub>          | D <sub>1</sub> | D <sub>2</sub> | D <sub>3</sub> | D <sub>4</sub> |
| Neg. control               | 1.22±0.71               | 5.24±2.52      | 5.59±3.56      | 16.54±4.28     | 21.77±4.83     |
| 50                         | 1.57±2.16               | 3.28±2.27      | 6.57±3.23      | 11.15±2.56     | 15.74±3.14     |
| 75                         | 2.11±1.47               | 3.83±2.94      | 6.02±3.54      | 10.93±4.05     | 15.85±4.61     |
| 100                        | 1.88±1.57               | 4.35±3.85      | 7.49±6.32      | 10.48±6.27     | 13.47±6.40     |
| 150                        | 1.30±1.23               | 4.34±2.60      | 5.73±2.69      | 7.11±2.18      | 11.29±3.21     |
| 200                        | 1.36±0.75               | 3.95±1.39      | 4.69±0.99      | 8.16±3.83      | 9.89±2.70      |
| 250                        | 0.51±0.40               | 2.51±0.99      | 4.64±0.96      | 5.92±1.70      | 6.90±1.67      |

Data were obtained from average of 5 replications. D<sub>0</sub>-D<sub>4</sub>: Observation of percentage parasitaemia from day 0 (D0) until Day 4 (D4) post treatment.

The percentage parasitaemia of negative control was dramatically increased after three day (D3) and four day (D4) post treatment with parasitaemia level of 16.54±4.28% and 21.77±4.83%, respectively. A significant reduction of parasitaemia was observed by treatment at dose of 150 mg/kg body weight in D4 which showed percentage inhibitory of 51.38±12.58 % (Table 2). The result indicated that the dose of 150mg/kg bodyweight of extract possess strong inhibition against *P. berghei*.

Table 2: The average percentage of growth and the inhibition of mice infected-*P. Berghei* treated with ethanol extract of *C. spectabilis* leaves perorally.

| Sample (mg/kg body weight) | Average percentage of growth | Average percentage inhibition | ED <sub>50</sub> (mg/kg body weight) |
|----------------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Negative control           | 20.55± 5.01                  | -                             | 131.5                                |
| 50                         | 14.17± 3.25                  | 31.05 ± 15.82                 |                                      |
| 75                         | 13.74± 3.55                  | 33.13 ± 17.26                 |                                      |
| 100                        | 11.59± 6.07                  | 43.60 ± 29.56                 |                                      |
| 150                        | 9.99± 2.59                   | 51.38 ± 12.58                 |                                      |
| 200                        | 8.62± 2.18                   | 58.04 ± 10.59                 |                                      |
| 250                        | 6.39± 1.82                   | 68.91 ± 8.84                  |                                      |

Data were obtained from 5 replications.

Further analysis to determine the effective dose showed that multiple dose administration daily produced higher inhibition with percentage inhibitory of 52.58± 7.18 and 62.42±1.62 %, (twice and thrice daily respectively). Those were higher than the single administration which was 46.25±3.83% (Table 3).

Table 3: *In vivo* inhibition of mice infected-*P. berghei* treated with ethanol extract of *Cassia spectabilis* leaves at single dose (150 mg/kg body weight) and multiple dose (2 x 150 mg/kg body weight and 3 x 150 mg/kg body weight) during 4 days.

| Sample mg/kg bodyweight | Rep | D0   | D4    | Percentage of growth | Average of percentage growth | of percentage inhibition | Average of percentage inhibition |
|-------------------------|-----|------|-------|----------------------|------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Negative control        | 1   | 1.25 | 8.28  | 7.03                 | 7.03± 1.18                   | -                        | -                                |
|                         | 2   | 0.55 | 10.07 | 9.52                 |                              |                          |                                  |
|                         | 3   | 2.48 | 8.84  | 6.36                 |                              |                          |                                  |
|                         | 4   | 1.29 | 8.32  | 7.03                 |                              |                          |                                  |
|                         | 5   | 0.77 | 7.01  | 6.24                 |                              |                          |                                  |
|                         | 6   | 1.28 | 7.28  | 6.00                 |                              |                          |                                  |
| 150                     | 1   | 2.17 | 6.37  | 4.20                 | 3.78± 0.27                   | 40.26                    | 46.25±3.83                       |
|                         | 2   | 1.40 | 5.35  | 3.95                 |                              | 43.81                    |                                  |
|                         | 3   | 1.32 | 5.17  | 3.85                 |                              | 45.23                    |                                  |
|                         | 4   | 2.25 | 5.68  | 3.43                 |                              | 51.21                    |                                  |
|                         | 5   | 1.75 | 5.53  | 3.78                 |                              | 46.23                    |                                  |
|                         | 6   | 1.62 | 5.08  | 3.46                 |                              | 50.78                    |                                  |
| 2x 150                  | 1   | 3.12 | 5.57  | 2.45                 | 3.33± 0.50                   | 65.15                    | 52.58± 7.18                      |
|                         | 2   | 1.54 | 4.81  | 3.27                 |                              | 53.49                    |                                  |
|                         | 3   | 0.94 | 5.13  | 4.19                 |                              | 40.10                    |                                  |
|                         | 4   | 1.91 | 5.22  | 3.31                 |                              | 52.92                    |                                  |
|                         | 5   | 1.61 | 5.04  | 3.43                 |                              | 51.21                    |                                  |
|                         | 6   | 1.83 | 5.16  | 3.33                 |                              | 52.63                    |                                  |
| 3x 150                  | 1   | 1.94 | 5.10  | 3.16                 | 2.64± 0.29                   | 55.05                    | 62.42±1.62                       |
|                         | 2   | 1.66 | 4.50  | 2.66                 |                              | 62.16                    |                                  |
|                         | 3   | 1.73 | 4.36  | 2.63                 |                              | 62.59                    |                                  |
|                         | 4   | 0.99 | 3.58  | 2.59                 |                              | 63.16                    |                                  |
|                         | 5   | 1.62 | 4.42  | 2.62                 |                              | 62.73                    |                                  |
|                         | 6   | 1.89 | 4.08  | 2.19                 |                              | 68.85                    |                                  |

## Discussion

Medicinal plants are potential resources for antimalarial agent. Preliminary study of *C. spectabilis* reported the antimalarial activities of this plant and proved to be a promising candidate for antimalarial agent. Further analysis was conducted in this study to determine the effectiveness of ethanol extract of *C. spectabilis* in the animal test.

*In vivo* analysis to *P. berghei*-infected mice was conducted by adopting method of Munoz et al. (2000) which applied some dose modification. The *P. berghei*-infected mice were treated with *C. spectabilis* extract in dose range of 50-250 mg/kg body weight. The results showed dose dependent mode of inhibition and 50% inhibition was obtained by the dose of ≤150 mg/kg bodyweight (Table 1 and 2). The dose of 250 mg/kg produced the highest inhibitory (68.91%), while those that received 200 and 150 mg/kg body weight exhibited inhibitory of 58.04 ± 10.59% and 51.38 ± 12.58%, respectively (Table 2). These results suggested that ethanol extract of *C. spectabilis* leaves can be categorized as good antimalarial activity, with >50% inhibitory effect achieved at dose of 250 mg/kg (Munoz et al., 2000). Other study

113

1. Abdulrazak N, Azya UI, Uman NS, Uata IM, Farida A. (2015). Anti-plasmodial activity of ethanolic extract of root and stem bark of *Cassia sibiriana* DC on mice. *Journal of Interdisciplinary Ethnopharmacology* Apr-Jun; 4 (2) : 96-101
2. Alade B, Oliveira, Maria Fani Dolabela, Fernaldo C, Braga Rose L, R.P, Jackson, Fernando P, Varuti, Marlene M, Pivua (2009). Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytochemicals. Part I. Alkaloids. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. Vol.81, 4.
3. Barite L, Avila S, Tekhtsimanov T. *Engidawork E* (2014). *In vivo* antimalarial activity of the crude leaf extract and solvent fractions of *Croton murtinensis* Hooker (Euphorbiaceae) against *P. berghei* in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 14:79.
4. Bodeker G, Koenigsberg F. (2002). A public health agenda for traditional, complementary, and alternative medicine. *American Journal of Public Health*. 92:1582-91.
5. Dave H and Ledwani L (2012). A Review on anthelmintics isolated from *Cassia* species and their applications. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. 3: 291-319.
6. Eliazar IM, Hay SL, Baird JK. Malaria distribution, prevalence, drug resistance and control in Indonesia (2011). *Advances in Parasitology* 74:41-175
7. Ekasari W, Widayawatyand W, Zaini NC, Syarifuddin, Hooda T, and Montia H. (2009). Antimalarial activity of cassarinin A from the leaves of *Cassia siamea* Heterocycetes. 78: 1831-1836
8. Ekasari W, Wahyuni TS, Sajo Y RA. (2015). Potential anti-malaria and insecticidal- phytochemical examination of leaves of some plants *Cassia* Genus. *Journal Farma dan Ilmu kesehatan Indonesia* 2:48-52.
9. Montia H, Oubani S, Hirtawa Y, Koyama K, Honda T, Ekasari W, Imrayanu G and Zaini NC. (2007). Cassarinin A and B, novel antiparasitoid alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters*. 9: 3691-3693.
10. Montez V, Savina M, Bourdy G, Callapa J, Rojas I, Vargas L, Tac A, Destro E. (2000). The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mestizos Indians. *Journal Ethnopharmacology*. 69:139-155
11. Ougene PA, Mue-Kang F, Lefongo LL, Ndom JC, Sippi W, Kibate LM. (2013). The potential of anti-malaria compounds derived from African medicinal plants. Part I: A pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. *Malaria Journal* 12:449
12. Phalipoon JD and Wright CW. (1991). Antiprotozoal agents plant sources. *Phanta Medica*. 57: 53 - 59
13. Shargil L, Wu-Poong S, Yu AB. (2005). Applied biopharmaceutics and pharmacokinetics. 5<sup>th</sup> Ed. Boston:Mc Graw Hill.
14. Subramaniam L, Jolly, Torcy A, Darah I, Choong Y S, Saravanan D, Chen Yeng, Latha L, Y, Deivanai S, Sasubaran S. (2012). *Cassia sperabilis* (DC) Irwin et Barn: A promising traditional herb in health improvement. *Molecules* 17: 10292-10305
15. Uda Veerabari, Bopiah A.K. (2011). Preliminary phyto-chemical evaluation of the leaf extract of five *Cassia* species. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 3: 574-583
16. Vargas, J.R.C.; Bokari, V.S.; Furlan, M; Barreira, E.J.; Young, M.C.M.; Tomazela D.M.; Eberlin, M.N. (2004). Further bioactive prenylne alkaloids from the flowers and green fruits of *Cassia sperabilis*. *Journal of Natural Products*. 67: 908-910
17. WHO: World malaria report (2015). Geneva: World Health Organization, available from <http://www.who.int/malaria/publications/quick-reference-toolkit/profile/cqtr/cqtr15.pdf> (accessed on September 27, 2016).

114

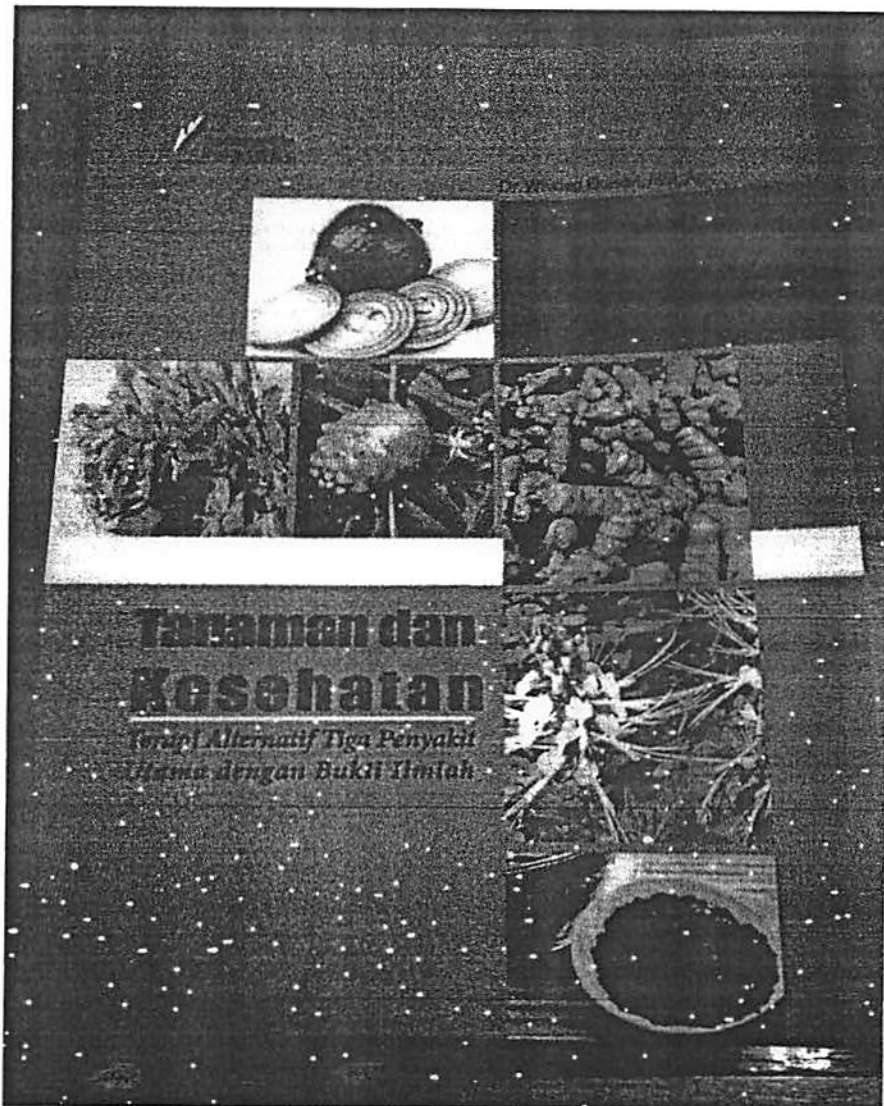
## References

- Acknowledgements: This research was funded by Directorate of Higher Education Indonesia (DIKTI), 2016.
- Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.
- Conclusion
- C. sibiriana* is potential candidate for antimalarial agent. The antimalarial effective dose of ethanolic extract of *C. sibiriana* leaves in *P. berghei*-infected mice is 150 mg/kg body weight with three daily administration.
- According to above classification, the activity of ethanolic extract of *C. sibiriana* leaves can be classified as good antimalarial activity. The ED<sub>50</sub> of ethanolic extract of *C. sibiriana* was 131.5 mg/kg body weight (Table 2). Therefore, the dose of 150 mg/kg body weight was used to determine the effectiveness as antimalarial agent. The study was continued by investigating the administration of ethanolic extract of *C. sibiriana* in multiple-dose and single dose with dose of 150 mg/kg body weight. The result showed that the growth percentage of *P. berghei* for multiple doses (2 or 3 times a day) were lower than single dose. The lower growth shown for three daily. This means that the extract administered in multiple doses is more effective inhibiting the growth of the parasite compared to single dose. Multiple doses administration could maintain the optimal or therapeutic concentration in blood and inhibit parasite in the various stage of parasite's life cycle. This provides availability of drugs in blood longer so that the therapeutic effect can be maintained.
- (Barite et al., 2014), classified extracts which have more than 50% percentage inhibitory value in *in vivo* antimalarial test with doses of 500, 250 and 100 mg/kg of body weight as moderate, good and excellent activity, respectively).

18. WHO. Malaria Case Management: Operation manual, available from [http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria\\_case\\_management\\_operation\\_manual.pdf](http://www.who.int/malaria/publications/atoz/malaria_case_management_operation_manual.pdf) (accessed on September 27, 2016).
19. Widyawaruyanti A, Asury M, Ekasari W, Setiawan D, Radjaram A, Tunewu L, Hafid A.F. (2014). *In vivo* antimalarial activity of *Andrographis paniculata* tablet. *Procedia Chemistry*,13:101-104.

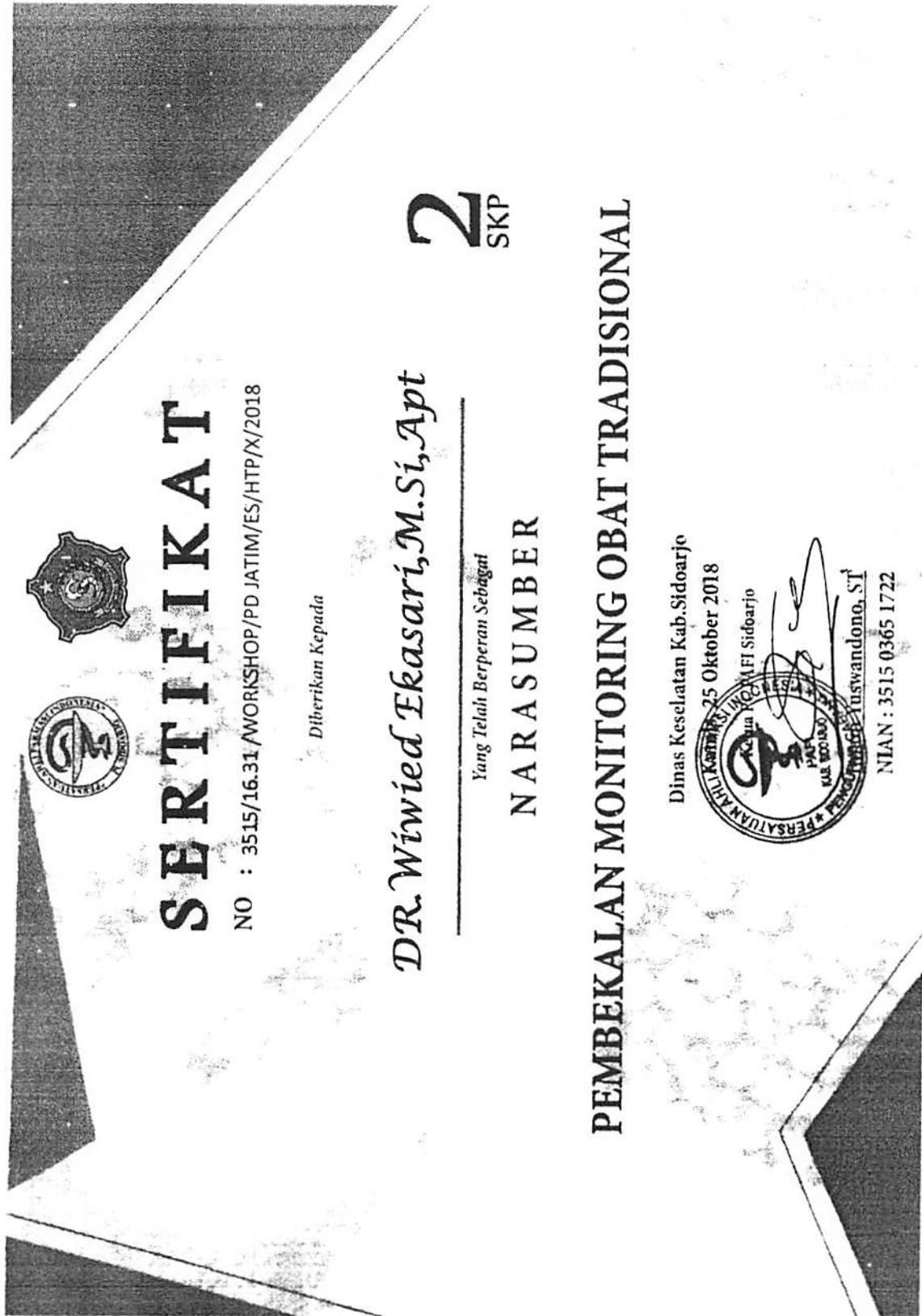
LAMPIRAN 2.

Buku Ajar



LAMPIRAN 3.

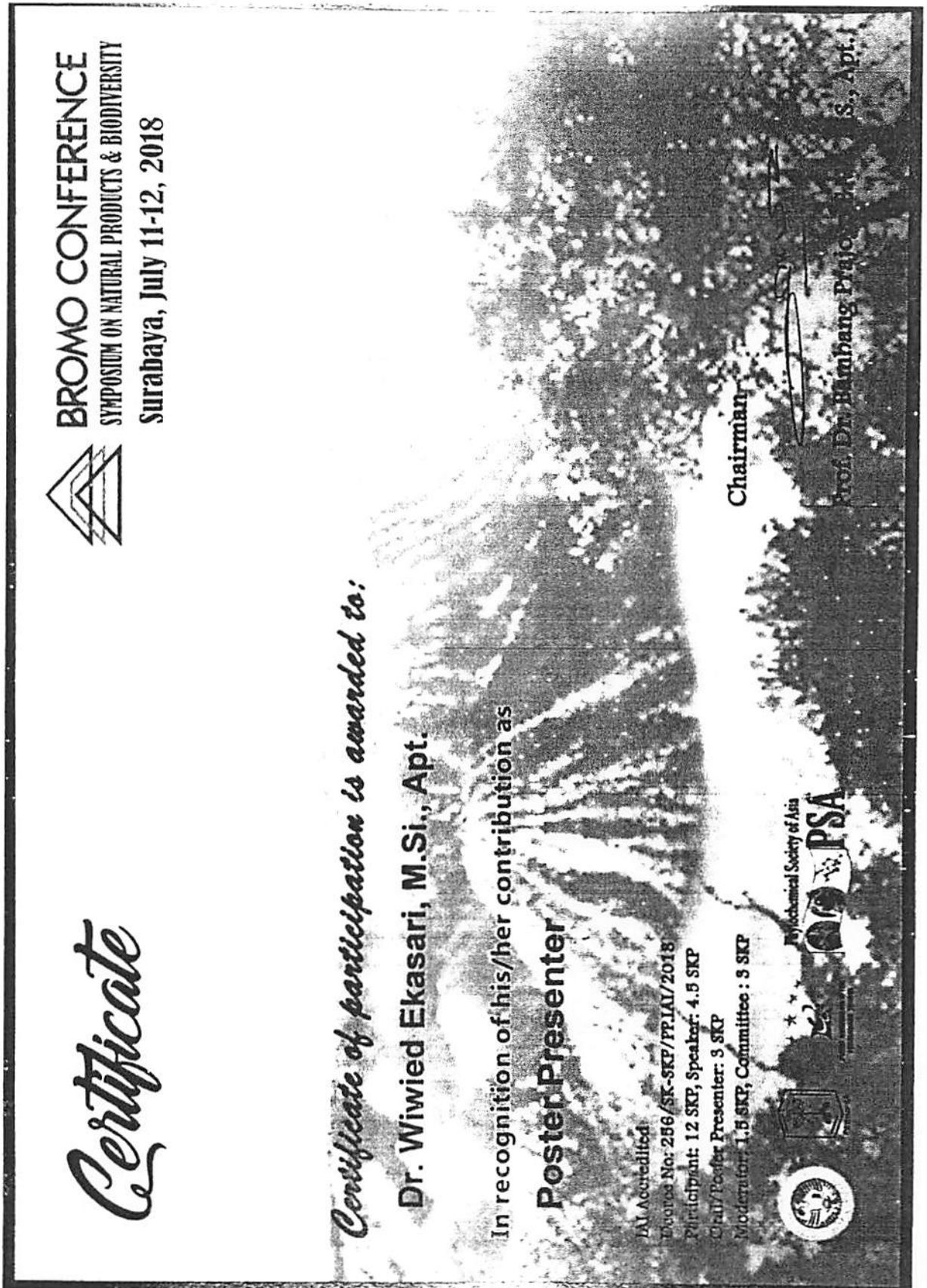
Sertifikat sebagai Pembicara





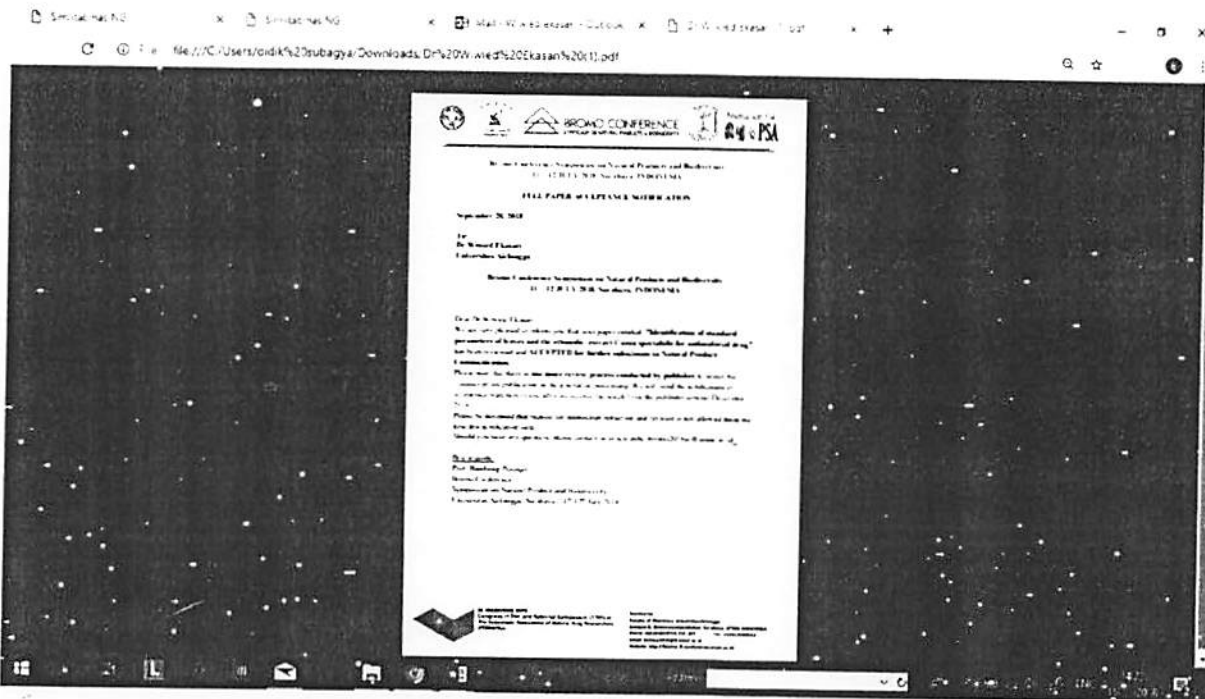
LAMPIRAN 4.

Sertifikat sebagai Pembicara



### Lampiran 5.

### Bukti submitt Jurnal Internasional



IDENTIFICATION OF STANDARD PARAMETERS OF  
*CASSIA SPECTABILIS* LEAVES AND THE ETHANOLIC EXTRACT  
AS RAW MATERIAL FOR ANTIMALARIAL MEDICAMENT

Wiwied Ekasari<sup>1\*</sup>, Tutik Sri Wahyuni<sup>1</sup>, Heny Arwaty<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departement of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy, Airlangga  
University, Surabaya, Indonesia

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia

\*[wiwied-e@ff.unair.ac.id](mailto:wiwied-e@ff.unair.ac.id)

Received: January XX, 2018; Accepted: XX, 2018

*Cassia spectabilis* is one of Indonesian medicinal plants, traditionally used to treat different diseases, including malaria. Ethanolic extract of *Cassia spectabilis* leaves has proven to have antimalarial activity both *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* against *P. berghei*. This result showed that *C. spectabilis* leaves can be potentially developed into antimalarial agents from natural source. Quality of drugs derived from plants is also influenced by the quality of its raw material. A lot of factors can affect the quality of raw materials. Thus, in order to assure the quality of products which come from plants, it is necessary to do standardization of the raw materials. The aim of this study is to identify the specific and non-specific standard parameters of the dried leaves and ethanolic extract of *C. spectabilis* leaves for antimalarial medicament. The research methods used was experimental. Preparation of extract with maceration method used ethanol solvent. Based on the result of this study, value of specific and non-specific parameters standard was obtained and it can be conclude that the dried leaves and ethanolic extract of *C. spectabilis* leaves mainly meet the quality requirement to be used as traditional medicine raw material, except the Cd content of ethanol extract of *C. spectabilis* leaves which still did not meet the requirement.

**Keywords:** *Cassia spectabilis*, Leaves, Standardization, raw material

One of the plants in Indonesia which has been recognized traditionally can treat malaria is *Cassia spectabilis* species of the family *Caesalpinaceae*. Plants from this species which has proven to be active as antimalaria are *C. siamea*

with Cassiarin A as the active compound [8, 5]. Researchers have conducted a series of research on antimalarial activity of *C. spectabilis* with a good result [6]. *C. spectabilis* showed an *in vitro* antimalarial activity against *P.*

*falciparum* with  $IC_{50}$  value of 2.66  $\mu\text{g/ml}$  and in vivo antimalarial activity against *P. berghei*-infected mice with  $ED_{50}$  values 131.5 mg/kg body weight [7]. Based on this result, it is proved that *C. spectabilis* leaves can be potentially developed to the further research as an antimalarial plants.

Medicinal plants play an important role in promoting health. They are widely spread all over the world, but mostly grow in tropical countries. Until now, it is reported that 25% of modern medicines, directly or indirectly, are derived from plants [9].

The quality of herbal drugs is highly affected by the quality of its raw materials. And the quality of the raw material can be influenced by some factors, including cultivation, harvesting, and production. Quality assurance can not be achieved unless meet the specified standard. Standardization of raw material holds the main key in obtaining a qualified drug because raw material with poor quality can affect pharmacological activity of the product [12]. Therefore, standardization is an essential step to obtain a safe, effective, and qualified pharmaceutical product [10].

In this research, the specific and non-specific standard parameters of *C. spectabilis* leaves was determined and the result can be improved as one of Indonesian plant which can be used as the material for traditional medicine, especially for antimalarial medicament.

Determined specific standard parameters of *C. spectabilis* includes macroscopic and microscopic observation, organoleptic test, water soluble essence, ethanol soluble essence, volatile oil, as well as total flavonoids level. Macroscopic observation result was shown in Figure 1 and Table 1.



Figure 1: *C. spectabilis* leaves and flowers

Table 1: Morphological observation of *C. spectabilis* leaves

| No | Characteristic | Result  |
|----|----------------|---|
| 1  | Leaf           |   |
|    | Shape          | Oval-oblong   |
|    | Leaf tip       | Blunt with a shallow notch at the tip                             |
|    | Leaf base      | Blunt or quite rounded  |
|    | Surface        | Upper surface: glabrous, quite glossy<br>Lower surface: Pubescent |
|    | Edge           | Even  |
|    | Leaf vein      | Pinnate   |
| 2  | Size           |   |
|    | Length         | 3 – 7.5 cm  |
|    | Width          | 1 – 2.5 cm  |
| 3  | Color          | Green to brownish-green   |
| 4  | Stipule        | Long  |

Microscopic observation including fragments of mesophyll, crystal fibers, mesophyll with calcium oxalate crystal, and trichoma were shown in Figure 2, 3, 4, and 5 below.

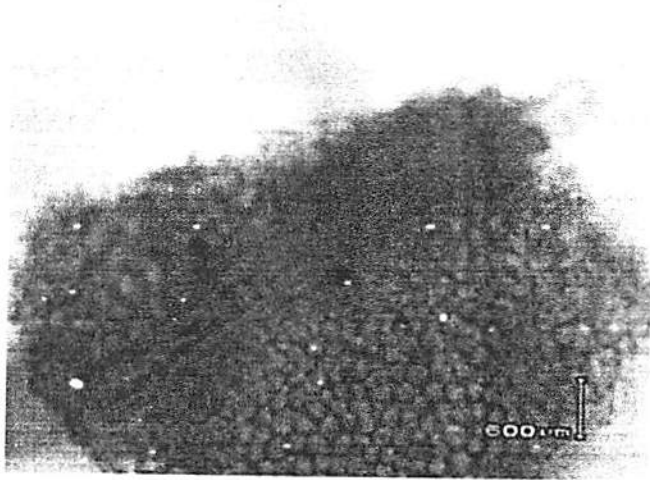


Figure 2: Fragments of mesophyll

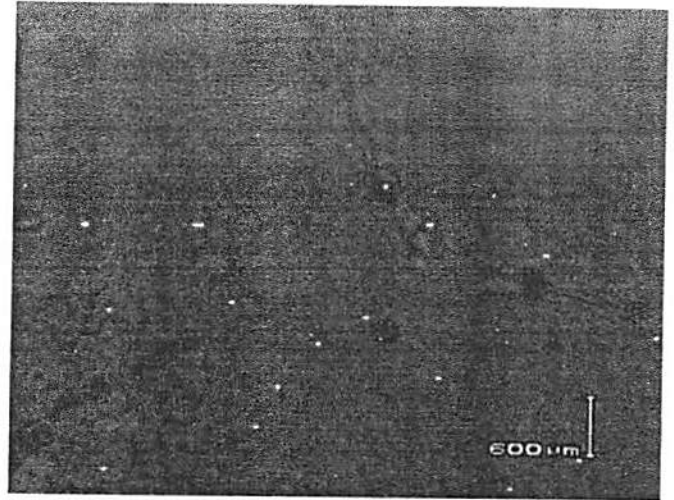


Figure 4: Fragment of mesophyll with calcium oxalate crystal

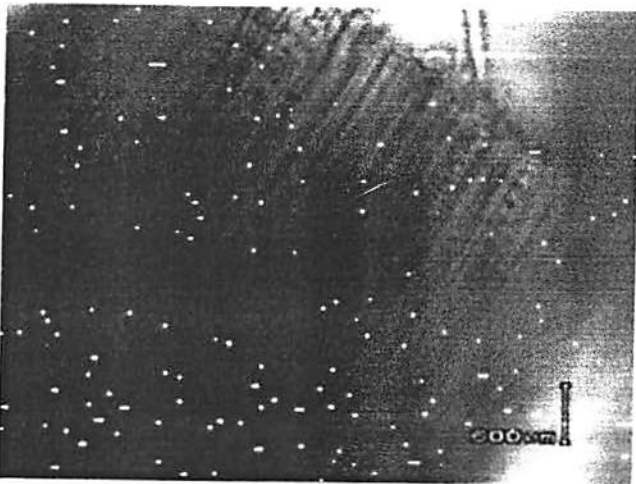


Figure 3: Fragment of crystal fibers (prism shape)

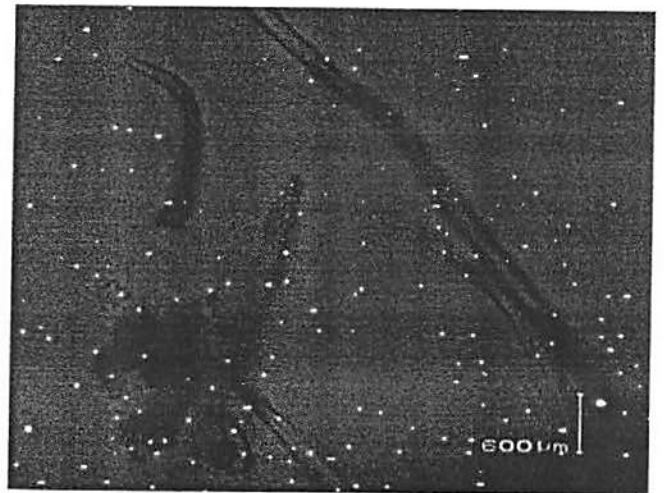


Figure 5: Fragments of trichoma

Other results of the specific parameters are summarized in Table 2.

Table 2: Summary of the results of specific determination of crude drugs and ethanolic extract of *C. spectabilis* leaves.

| No | Parameter               | Result              |                     |
|----|-------------------------|---------------------|---------------------|
|    |                         | Dried leaves powder | Ethanol 90% extract |
| 1  | Yield                   | -                   | 10.2 %              |
| 2  | Organoleptic            |                     |                     |
|    | Appearance              | -                   | Viscous liquid      |
|    | Color                   | Slightly brownish   | Dark brown          |
|    | Taste                   | Fresh               | Typical aromatic    |
|    | Smell                   | Weak                | Bitter              |
| 3  | Water soluble essence   | 3.72 ± 0.11 % b/b   | 30.26 ± 2.84 % b/b  |
| 4  | Ethanol soluble essence | 1.61 ± 0.09 % b/b   | 76.95 ± 0.35 % b/b  |
| 5  | Volatile oil            | 0.17 % v/b          | 0.29 % v/b          |
| 6  | Total flavonoid content | 2.22 ± 0.20 % b/b   | 24.26 ± 1.91 % b/b  |

In determination of microbes, both the dried leaves and ethanolic extract of *C. spectabilis* already met the requirements regulated by WHO or BPOM RI as shown in Table 3, as well as the determination of residue of pesticide (Table 4). Pesticide is a chemical substance which still used in agriculture, whereas it can cause damages to health because of its carcinogenic, mutagenic, and teratogenic effect [4].

Table 3: Summary of the results of residue of pesticide

| Sample              | Group          | Result   | Information                    |
|---------------------|----------------|----------|--------------------------------|
| Dried leaves powder | Organochlorine | Negative | Fulfilled quality requirements |
|                     | Carbamate      | Negative | Fulfilled quality requirements |
| Ethanol 90% extract | Organochlorine | Negative | Fulfilled quality requirements |
|                     | Carbamate      | Negative | Fulfilled quality requirements |

Table 4: Summary of the results of microbial contamination

| Sample              | Microbial contamination | Result (colonies/g) | Method                     | Requirements (*)  | Information                    |
|---------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------|-------------------|--------------------------------|
| Dried leaves powder | Mould                   | 60                  | Pour Agar                  | $\leq 10^4$ col/g | Fulfilled quality requirements |
|                     | Yeast                   | < 10                | Pour Agar                  | $\leq 10^4$ col/g | Fulfilled quality requirements |
|                     | APM Coliform            | 7,4                 | Double Tube                | $\leq 10^4$ col/g | Fulfilled quality requirements |
|                     | <i>E. coli</i>          | negative            | Isolation & Identification | negative/g        | Fulfilled quality requirements |
|                     | <i>Salmonella sp.</i>   | negative            | Isolation & Identification | negative/g        | Fulfilled quality requirements |

|                       |                      |                            |                            |                                |                                |
|-----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <i>S. aureus</i>      | negative             | Isolation & Identification | negative/g                 | Fulfilled quality requirements |                                |
|                       | <i>P. aeruginosa</i> | negative                   | Isolation & Identification | negative/g                     | Fulfilled quality requirements |
| Mould                 | < 10                 | Pour Agar                  | $\leq 10^4$ col/g          | Fulfilled quality requirements |                                |
|                       | Yeast                | < 10                       | Pour Agar                  | $\leq 10^4$ col/g              | Fulfilled quality requirements |
| Ethanol               | APM Coliform         | 3,6                        | Double Tube                | $10^4$ col/g                   | Fulfilled quality requirements |
|                       | <i>E. coli</i>       | negative                   | Isolation & Identification | negative/g                     | Fulfilled quality requirements |
| <i>Salmonella sp.</i> | negative             | Isolation & Identification | negative/g                 | Fulfilled quality requirements |                                |
|                       | <i>S. aureus</i>     | negative                   | Isolation & Identification | negative/g                     | Fulfilled quality requirements |
| <i>P. aeruginosa</i>  | negative             | Isolation & Identification | negative/g                 | Fulfilled quality requirements |                                |

(\*) Based on the Head of BPOM RI no. 12 of 2014 on Traditional Medicinal Quality Requirements

For the other determination, such as loss on drying, water level, total ash, and acid-insoluble ash of either dried leaves or ethanolic extract of *C. spectabilis* meets the quality

Fresh leaves sections of *C. spectabilis* including transverse section of the costa, transverse section of the mesophyll, longitudinal section of upper epidermis, and longitudinal section of lower epidermis, along with the dried leaves powder were treated with a drop of water in a slide and observed under microscope. The next observation was continued in similar way by replacing water with chloral

**Macroscopic test**  
Macroscopic test was undertaken by morphological observation of fresh leaves with or without magnifying glass.

**Microscopic test**  
Fresh leaves sections of *C. spectabilis* including transverse section of the costa, transverse section of the mesophyll, longitudinal section of upper epidermis, and longitudinal section of lower epidermis, along with the dried leaves powder were treated with a drop of water in a slide and observed under microscope. The next observation was continued in similar way by replacing water with chloral

**Determination of Specific Parameter**  
Identity  
Description of the botanical nomenclature, including the extract name, scientific name of the plant, part of the plant used, and local name of the plant.

**Experimental**  
**Sample Extraction**  
The sample of *C. spectabilis* leaves was obtained and determined in LIPi Botanical Garden, Purwodadi, East Java, Indonesia. Voucher specimen was deposited. The dried leaves were produced using a standard guideline [2]. The ethanol extract was made by maceration of the dried leaves with ethanol 90% for three times. The extract was then evaporated on a rotary evaporator.

Based on the result, it can be concluded that the dried leaves and ethanol extract of *C. spectabilis* leaves mainly meet the quality requirement to be used as raw material of traditional medicine, except the Cd content of ethanol extract of *C. spectabilis* leaves which did not meet the requirements.

<sup>1</sup> Based on the Head of BPOM RI no. 12 of 2014 on Traditional Medicinal Quality requirements

However, in determination of heavy metal contamination (Table 6) the Cd content in ethanol extract is 2.660 mg/kg which exceeded the maximum level (≤ 0.3 mg/kg). Heavy metal is a chemical element with high molecular weight. It is in solid form at room temperature. Heavy metal is essential for living creatures in little amounts, but in large amounts it can become dangerous. Therefore, further research about cause of the high Cd content in ethanol extract of *C. spectabilis* so that it exceeded the limit, otherwise the Cd content in the dried leaves fulfilled the requirement (0.199 mg/kg).

| No | Parameter          | Dried leaves powder | Ethanol 90% extract |
|----|--------------------|---------------------|---------------------|
| 1  | Loss on drying     | 7.81 ± 0.11 % b/b   | 29.78 ± 0.84 % b/b  |
| 2  | Water level        | 7.54 ± 0.38 % b/b   | 15.31 ± 0.44 % b/b  |
| 3  | Total ash          | 8.56 ± 0.09 % b/b   | 3.54 ± 0.06 % b/b   |
| 4  | Acid-insoluble ash | 2.26 ± 1.14 % b/b   | 0.064 ± 0.01 % b/b  |

Table 5: Summary of the results of non-specific determination of crude drugs and ethanol extract of *C. spectabilis* leaves

requirement to be used as raw material of traditional medicine, as shown in Table 5.

| Sample              | Heavy metal  | Result (mg/kg) | Requirement (%) | Information                |
|---------------------|--------------|----------------|-----------------|----------------------------|
| Dried leaves powder | Lead (Pb)    | 0.250          | ≤ 10 mg/kg      | fulfilled requirements     |
|                     | Cadmium (Cd) | 0.199          | ≤ 0.3 mg/kg     | fulfilled requirements     |
|                     | Zinc (Zn)    | 4.679          |                 | fulfilled requirements     |
|                     | Copper (Cu)  | 0.346          |                 | fulfilled requirements     |
| Ethanol 90% extract | Lead (Pb)    | 1.883          | 10 mg/kg        | Not fulfilled requirements |
|                     | Cadmium (Cd) | 2.660          | 0.3 mg/kg       | Not fulfilled requirements |
|                     | Zinc (Zn)    | 1.290          |                 | fulfilled requirements     |
|                     | Copper (Cu)  | 1.560          |                 | fulfilled requirements     |

hydrate (heated) and stained with phloroglucinol-HCl reagent.

experiment is to detect whether there is evaporation of xylol or not. The result can be used as reduction factor.

#### Organoleptic

Organoleptic test of the powdered crude drug and extract was undertaken by sensory observation including appearance, color, smell, and taste of the extract.

#### Determination of total flavonoids level

In this method, rutin was used to make the standard calibration curve. 25 mg of rutin was dissolved in ethanol P and then diluted to 125, 250, 500, and 1000 ppm.

#### Stock solution of simplicial powder and extract

1 gram of powder and 0.1 gram of extract were transferred to a flask and added by 25 mL ethanol P and centrifuged at 200 rpm for an hour (for simplicia powder) and 30 minutes (for extract). Samples were then filtered to 25 mL volumetric flask and the volume was made up with ethanol P.

#### Test solution

0.5 ml of simplicia and extract stock solutions and rutin solution were separately added to 1.5 ml ethanol P, 0.1 ml aluminium chloride P 10%, 0.1 ml potassium acetate 1 M and 2.8 ml distilled water. Each of the solutions were then mixed well and allowed to stand a while for 30 minutes in room temperature. Sample blank was prepared in similar way by replacing aluminium chloride with distilled water. Their absorbance was then measured.

#### Determination of Non-Specific Parameter

##### Determination of loss on drying

1 gram of powder and extract were weighed and put into a weighing bottle heated in 105°C for 30 minutes. The powder and extract were put into the weighing bottle evenly and dried to the constant weight in 105°C.

##### Determination of water level

A quantity of *C. spectabilis* leaves powder and extract expected to give 1-4 ml water were weighed respectively, transfer to a dried flask and then added with a few pieces of boiling stones. 200 ml of water-saturated toluene was added into the flask and the apparatus was assembled. Toluene was filled through the condenser to the receiving tube, following by heating the flask gently for 15 minutes. Once the toluene began to boiling, the temperature was

#### Determination of water soluble essence

5 grams of air dried powder and extract were macerated in 100 ml water-chloroform in a plugged flask for 24 hours while occasionally shaken for the first 6 hours. Let it stand for 18 hours then filtered. 20 ml of the filtrate was evaporated to dryness in a heated porcelain cup and the remained filtered was heated in 105°C until it reach the constant weight. Water soluble essence was obtained by calculation of the air dried materials.

#### Determination of ethanol soluble essence

5 grams of air dried powder and extract were macerated in 100 ml 95% ethanol in a plugged flask for 24 hours while occasionally shaken for the first 6 hours. Let it stand for 18 hours then filtered. 20 ml of the filtrate was evaporated to dryness in a heated porcelain cup and the remained filtered was heated in 105°C until it reach the constant weight. Ethanol soluble essence was obtained by calculation of the air dried materials.

#### Determination of volatile oil

10-50 grams of powder and 1-5 grams of extract were put into a dried flask and added with boiling stones and 450 ml of water. The flask was set in the distillation apparatus and biuret was filled with water. 0.2 ml of xylol was added in the biuret. Flask was heated in the waterbath, therefore the distillation was streamed slowly yet systematically. Distillation was stopped about 1-6 hours. The volume of volatile oil and xylol was achieved in this step.

Blank experiment of xylol was undertaken with the same method above without using extract. The aim of this blank



adjusted to allow the distillation continued at a rate of 2 drops per second. After the water has been completely distilled, the inside of the condenser was rinsed with water-saturated toluene. The distillation was continued for 5 minutes. The receiving tube was allowed to cool to room temperature. The water and toluene were let to stand a while until completely separated before the volume of water was recorded.

#### **Determination of total ash level**

2 grams of grinded powder and extract were respectively weighed and put evenly into preheated porcelain crucible. The porcelain crucibles were heated slowly in 600°C for an hour, then cooled and weighed to the constant weight. Ash level was obtained by calculation of the air dried material.

#### **Determination of acid-insoluble ash level**

2 grams of grinded powder and extract were respectively weighed and put evenly into preheated porcelain crucible. The porcelain crucibles were heated slowly in 600°C for an hour and then cooled. The collected ash was boiled with 25 ml chloride acid for 5 minutes. The acid-insoluble part was filtered using ash-free filter paper, heated slowly in 600°C for an hour, then cooled and weighed to the constant weight. Ash level was obtained by calculation of the air dried material.

#### **Determination of residue of pesticide, contamination of heavy metal, and contamination of microbes**

Residue of pesticide, heavy metal contamination and microbial contamination were undertaken using the standard methodology in Indonesia and the extract common standard parameters of herbal drug [3].

**Acknowledgement** - This research was funded by Directorate of Higher Education Indonesia (DIKTI-HIKOM), 2018.

## References

- [1] Ahmad AR, Dahlia AA, Kosman R (2014) Standardization of Simplisia and methanolic extract of Cemba (*Acacia rugata* (lam.) fawc. Rendle) leaves endemic plant from Massenrenpulu regency of Enrekang. *World Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2(12), 1808-1812
- [2] Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI) (1985) *Cara Pembuatan Simplisia*. Depkes RI, Jakarta.
- [3] Departemen Kesehatan Republik Indonesia (Depkes RI) (2000) *Parameter Standard Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Depkes RI, Jakarta.
- [4] El-Nahhal Y, Radwan AA (2013) Human Health Risks: Impact of Pesticide Application. *Journal of Environment and Earth Science*, Vol. 3, No.7.
- [5] Ekasari W, Widyawaruyanti W, Zaini NC, Syafruddin, Honda T, Morita H. (2009). Antimalarial activity of cassiarin a from the leaves of *Cassia siamea*. *Heterocycles*.78, 1831-1836.
- [6] Ekasari W, Wahyuni TS, Satyo Y RA. (2015) Potential anti-malaria and microscopic-phytochemical examination of leaves of some plants Cassia Genus. *Journal Farmasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*, 2, 48-52
- [7] Ekasari W, Wahyuni TS, Arwaty H (2018) The effective dosage of ethanol extract from *Cassia spectabilis* leaves as an Antimalarial in Mice Infected-*Plasmodium berghei*. *African Journal of Infectious Diseases*, 12 (S), 110-115.
- [8] Morita H, Oshimi S, Hirasawa Y, Koyama K, Honda T, Ekasari W, Indrayanto G and Zaini NC. (2007). Cassiarin A and B, novel antiplasmodial alkaloids from *Cassia siamea*. *Organic Letters*. 9: 3691-3693
- [9] Patwekar SL, Arvind SB, Manoj GS, Snehal PR, Ashiwini PP (2015) Standardization of herbal drugs : An overview. *The Pharma Innovation Journal*, 4(9), 100-104
- [10] Purwatiningsih, Purwatini I, Santoso D (2011) Identification of Standard Parameters of Kepel Leaves (*Stelechocarpus burahol* (BL.) Hook. f & TH.) and The Extract as Raw Material For Anti-Hyperuricemic Medicament. *Asian J. Pharm Clin Res*, Vol 4, Suppl 1, 149-153
- [11] Torey A, Sasiharan S, Yeng C and Latha LY (2010) Standardization of *Cassia spectabilis* with Respect to Authenticity, Assay and Chemical Constituent Analysis. *Molecules*, 15, 3411-3420
- [12] Yadav P, Prajapati PK (2011) Quality Control Parameters for Medicinal Plant, an Overview. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1(5), 12-16.
- [13] World Health Organization (1998) *Quality control methods for medicinal plant materials*. World Health Organization, Geneva. <http://www.who.int/iris/handle/10665/41986>
- [14] World Health Organization (1998) *Quality control methods for herbal materials*. World Health Organization, Geneva. <http://www.who.int/iris/handle/10665/41986>

## ANTIMALARIAL ACTIVITY OF EXTRACT, FRACTIONS AND ISOLATE COMPOUNDS FROM *CASSIA SPECTABILIS* DC LEAVES

, Wiwied Ekasari<sup>1\*</sup>, Tutik Sri Wahyuni<sup>1</sup>, Heny Arwaty<sup>2</sup>, Dewy Resty Basuki<sup>1</sup>, Mulja Hadi Santosa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept of Pharmacognosy and Phytochemistry, Faculty of Pharmacy,  
Airlangga University, Surabaya, Indonesia.

<sup>2</sup>Faculty of Medicine, Airlangga University, Surabaya, Indonesia.

\*Corresponding author E-mail: [wiwiedeka@hotmail.com](mailto:wiwiedeka@hotmail.com)

**Abstract.** The *in vitro* antimalarial activities against *Plasmodium falciparum* strain 3D7 of four extracts from *Cassia spectabilis* DC leaves; ie hexane, methanol, ethyl acetate and chloroform fraction were studied. It was found that the hexane, methanol, ethyl acetate and chloroform extract showed *in vitro* antimalarial activity with IC<sub>50</sub> of 0 µg/ml; 0.1-1 µg/ml; 0.041 µg/ml; and 0.055 µg/ml, respectively. The chloroform extract was further fractionated using column chromatography, resulting in nine fractions. The fractions C.4; C.6; C.7; C.8 and C.9 showed *in vitro* antimalarial activity with IC<sub>50</sub> of 0.384 µg/ml; 0.060 µg/ml; 0.011 µg/ml; 0.002 µg/ml and 0.012 µg/ml, respectively. Fraction C.8 was the most effective against *P. falciparum* 3D7 with IC<sub>50</sub> of 0.02 µg/ml. The further fractionation of these two active fractions could lead to promising candidates as antimalarial agents.

## INTRODUCTION

Malaria is still one of 10 deadly parasitic disease in the world, infecting people in 106 country and there are 665 million people deaths<sup>3</sup>. Human malaria is caused by five species of parasitic protozoa (i) *Plasmodium falciparum*, (ii) *P. vivax*, (iii) *P. ovale*, (iv) *P. malariae* and (v) *P. knowlesi*<sup>4</sup>. Species *P. falciparum* is responsible for the most severe and deadly malaria. However, there are only a few antimalarials, available for the treatment of *P. falciparum* infection. In addition, the resistance of *P. falciparum* to the classical antimalarials, such as quinine; chloroquine and mefloquine, has rapidly. These have triggered off a massive screening of new compounds from either synthesis, or natural products, for potential antimalarials. One of Genus *Cassia* (Caesalpiniaceae) has been isolated cassiarin, an alkaloid compound from *Cassia siamea* leaves which have antimalarial activities with IC<sub>50</sub> of 0.005 µg/ml and ED<sub>50</sub> of 0.15 mg/kg<sup>6,7</sup>.

Taxonomy based system showed that plants at the same Genus have same compounds and same activity. Previous study have compared qualitatively many genus of *Cassia* metabolites secunder such as *C.spectabilis*, *C.siamea*, *C.fistula*, *C.biflora* and *C.hirsuta*, that identified as alkaloid, tannin, saponin, flavonoid, kharbohidrat, protein, steroid, terpenoid, glicoside and plobatanis<sup>15</sup>.

*C.spectabilis* DC is used in this study, have been reported used for medicinal plant in Brazil as laksatif, prugatif<sup>10</sup>, antifungi, antibacterial and antioxidant<sup>13</sup>. The phytochemistry of this species showed 2 piperidine alkaloid such as spectralin and iso-6-spectraline<sup>14</sup>. Extract metanol *C.spectabilis* leaves were showed have antimalarial activity with IC<sub>50</sub> value 2.67 µg/ml<sup>1</sup>. Therefore, *C.spectabilis* DC can be used for a new

antimalarial drug compounds. These study to reinvestigate the antimalarial activities of *C.spectabilis* DC extract , fractions and isolate compounds. Here is, the results of fractionation, isolation and *in vitro* antimalarial activity of the chloroform fraction from *C.spectabilis* DC leaves are reported.

## MATERIALS AND METHODS

### Plants Materials

Leaves of *C.spectabilis* DC was collected from Purwodadi Botanical Garden, Malang, East Java, Indonesia in March 2012, and was identified at Purwodadi Botanical Garden, Malang, East Java.

### Preparation of crude extract from *C.spectabilis* DC leaves

About 1000 g of dried powdered *C.spectabilis* DC leaves were separately macerated in 10 litres Hexane for three days. Then, they were filtered and evaporated to dryness under reduces presurre, which resulted in hexane crude extract of 118.34 g. The residue plants materials were extracted again using 4.5 litres methanol, which resulted in methanol extract of 141.68 g. The extract methanol diluted with 700 ml methanol and extracted with 7.1 litres ethyl acetate and 6.4 litres 3% tartate acid, which resulted in ethyl acetate extract fraction of 100.21 g. The water phase diluted with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> to obtained alkali solution (ph 9-10). Then, they were extracted again with 7.1 litres chloroform, which resulted in chloroform fraction of 4.06 g.

### Fractionation of chloroform fraction

4.06 g of chloroform fraction separated using coloumn chromatography. It was mixed with silica gel (25 g) and chromatographed on a silica gel 60 (230-400 mesh, 300 g) using eluents 100% chloroform 200 ml; chloroform-ethyl acetate (2:1) 200 ml; chloroform-ethyl acetate-methanol (2:1:2) 200 ml and 100% methanol 200 ml. Nine fractions were collected, based on their chromatogram on silica gel 60 GF<sub>254</sub> TLC using chloroform : methanol (3:2) as the solvent system. These were designated as fraction C.1; C.2; C.3; C.4; ..., C.9.

### Preparation of Culture medium

Culture medium was prepared by dissolving 10.43 g RPMI 1640 powder (Gibco), 6 g of HEPES, 2 g of NaHCO<sub>3</sub> (Sigma Aldrich) in 1 liter of distilled-deionised water. The medium was filtered using 0.22 µm membrane filter and 0.5 ml gentamycin (from 50 mg/ml stock) was added and stored at 4 °C in aliquots of 45ml. Before cultivation, every aliquot was supplemented with 5 ml of 5 % serum<sup>16</sup>.

### *In vitro* cultivation of *P. falciparum* 3D7 and activity assay :

The antimalarial activities of the extract and fraction were determined by the procedure described by Budimulja *et al.* Stock solution of the samples were prepared in DMSO and were diluted to the required concentration with complete medium (RPMI 1640 supplemented with 10% human plasma, 25 mM HEPES and 25 mM NaHCO<sub>3</sub>) until the final concentration of samples at well culture plate were : 10; 1; 0.1; 0.01; 0.001 µg/mL. The assay was performed in duplicate. The plates were incubated in CO<sub>2</sub> condition at 37°C in candle jar for 48 hours (Trager *et al.*, 1976). After incubation, contents of the wells were harvested and the red cells transferred to a clean microscopic slide to form a series of thick films. The films were stained for 10 minutes in 10 % Giemsa solution (pH 7.3).

The inhibitory percentage per concentration was calculated using the formula:

$$\text{Inhibitory percentage} = 100\% - \left( \frac{\text{tested parasitemia}}{\text{control parasitemia}} \times 100\% \right)$$

IC<sub>50</sub> value determined using probit analysis

**Extraction, isolation and *in vitro* antimalarial activity**

The extractions of dried powdered of *C.spectabilis* DC leaves provided 118.34 g of hexane crude extracts, as shown in Table 1. This extract was not effective against *P. falciparum* 3D7. The extraction of residues from maceration with hexane, extracted again with methanol, provided 141.68 g. This extract was effective against *P.falciparum* 3D7 with IC50 of 0,1-1 µg/ml. Scale-up of the extraction provided about 100.21 g ethyl acetate extract fraction and 4.06 g chloroform extract fraction, with IC50 of 0.041 µg/ml and 0.055 µg/ml, respectively. The crude extracts and fractions were tested on trophozoites, mainly ring forms. At each of the 5 concentrations of all the sample (Table 1), there was a significant reduction in the number of parasitized cells relative to control ( $P \geq 0.05$ ). The basic measurement of antimalarial activity used in this study was the reduction in number of parasitized cells in the test cultures compared to control at 48 hours of incubation+ The *in vitro* antimalarial activity of the extracts and fractions *C.spectabilis* DC leaves were based on the classification according to Gessler *et al.*, (1994) where, extract with IC<sub>50</sub> less than 10 µg/ml is considered very good; 10 to 50 µg/ml considered moderate and over 50 µg/ml considered to have low activity. Further isolation of 4.06 g of chloroform extract obtained nine fractions. The *in vitro* antimalarial activity test of these fractions showed that fraction C.8 was the most active, with IC50 of 0.02 µg/ml, as shown in Table 2. Purification of fraction C.8 (366.1 mg) provided four sub-fractions and their antimalarial activities are shown in Table 3. Sub-fractions SF C.8.1 and SF.C.8.3 showed antimalarial activities against *P.falciparum* 3D7 with IC50 of 0.012 and 0.015 µg/ml, respectively. Purification of sub-fraction SF C.8.3 provided two isolate and their antimalarial activity are shown in Table 4. Isolate CS-1 and isolate CS-2 showed antimalarial activities against *P.falciparum* 3D7 with IC50 of 0.016 and 0.070 µg/ml, respectively.

Table 1.  
Crude extracts obtained from *C.spectabilis* DC and their antimalarial activities against *P. falciparum* 3D7.

| Crude extract/fraction | Weight (g) | IC50 againts <i>P.falciparum</i> 3D7 (µg/ml) |
|------------------------|------------|--|
| Hexane extract         | 118.34     | 0  |
| Methanol extract       | 141.68     | 0.1-1.0                                      |
| Ethyl acetate fraction | 100.21     | 0.041  |
| Chloroform fraction    | 4.06       | 0.055  |

Table 2.  
Isolated fractions obtained from chloform fraction of *C.spectabilis* DC leaves and their antimalarial activities against *P. falciparum* 3D7.

| Isolated fraction | Weight (mg) | IC50 againts <i>P.falciparum</i> 3D7 (µg/ml) |
|-------------------|-------------|--|
| C.1               | 20.00       | 0  |
| C.2               | 4.10        | 0  |
| C.3               | 13.90       | >10  |
| C.4               | 17.90       | 0.384  |
| C.5               | 7.70        | >10  |
| C.6               | 104.40      | 0.060  |
| C.7               | 94.20       | 0.011  |

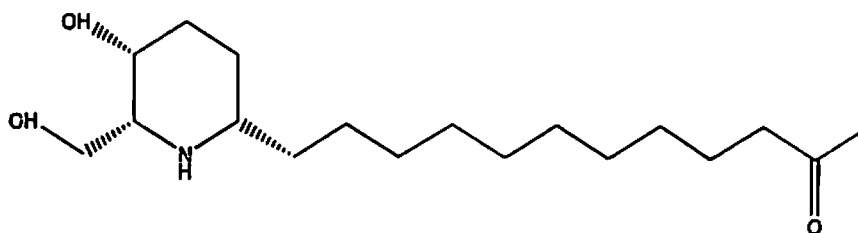
|     |   |       |
|-----|---|-------|
| C.8 | IR - PERPUSTAKAAN UNIVERSITAS AIRLANGGA<br>366.10 | 0.002 |
| C.9 | 36.50   | 0.012 |

Table 3.  
Isolated fractions obtained from fraction C.8 and their antimalarial activities against *P. falciparum* 3D7.

| Isolated sub-fraction | Weight (mg) | IC50 againts<br><i>P.falciparum</i> 3D7<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------------------|-------------|---|
| SFC.8.1               | 8.65        | 0.012   |
| SFC.8.2               | 11.25       | 0   |
| SF C.8.3              | 32.50       | 0.015   |
| SF C.8.4              | 20.50       | 1.347   |

Table 4.  
Isolated fractions obtained from sub-fraction SF C.8.3 and their antimalarial activities against *P. falciparum* 3D7.

| Isolated sub-fraction | Weight (mg) | IC50 againts<br><i>P.falciparum</i> 3D7<br>( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|-----------------------|-------------|---|
| Isolate SF C.8.3-1    | 4.30        | 0.016   |
| Isolate SF C.8.3-2    | 2.60        | 0.070   |



Picture 1. (-)-7-hydroxyspectaline

#### Identification isolate CS-1

The identification of the  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra suggested that isolate SFC.8.3-1 had structural pattern identically to other previously isolated, particularly with the (-)-7-hydroxyspectaline (picture 1), a natural homologue previously isolated from flowers and fruit *C.spectabilis* DC (Junior *et al.*, 2013).  $^1\text{H-NMR}$  spectra, it was possible to observe a broad singlet at  $\delta$  3.60 ppm (1H,s); and  $\delta$  3.69 ppm (1H,s) which were the signals of hidroxil, two singlet at  $\delta$  1.91 ppm (2H,s,C-4) and  $\delta$  1.68 ppm (2H,s,H-5) were the signals of ethyl of a benzene compound, and a few singlet at  $\delta$  1.38 ppm (2H,s,H-1);  $\delta$  1.22 ppm (2H,s,H-2-8');  $\delta$  1.51 ppm (2H,s,H-9), and one triplet at  $\delta$  2.35 ppm (2H,t,H-10'). The  $^{13}\text{C-NMR}$  spectrum showed the signals of 1 ketone at  $\delta$  179.0 ppm, 5 carbon of benzene compound at  $\delta$  56.96 ppm;  $\delta$  67.13 ppm;  $\delta$  29.23 ppm;  $\delta$  25.77 ppm; and  $\delta$  48.29 ppm, 6 aliphatic carbon at  $\delta$  34.32 ppm;  $\delta$  25.87 ppm;  $\delta$  29.23 ppm;  $\delta$  29.33 ppm;  $\delta$  22.89 ppm; and  $\delta$  38.87 ppm, 1 methyl at  $\delta$  30.23 ppm, and 1 hidroxil carbon at  $\delta$  65.27 ppm.

#### CONCLUSION

The result showed that the chloroform extract from *C. spectabilis* DC showed the highest level of *in vitro* antimalarial activity against *P. falciparum* 3D7. Further fractionation provided fraction C.8, that still showed high level *in vitro* antimalarial activity against *P. falciparum* 3D7. Further isolation of fraction C.8 provided four sub-fractions, then were isolated again provided 2 isolated compound (isolate SFC.8.3-1 and isolate SFC.8.3-2), that still showed *in vitro* activity against *P. falciparum* 3D7. According to <sup>1</sup>H- and <sup>13</sup>C-NMR spectra, it could be concluded that the major compound in isolate SFC.8.3-1 was an alkaloid which have similarity with (-)-7-hydroxycassine.

### COMPLITING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests

### ACKNOWLEDGEMENT

This research was funded by Directorate of Higher Education Indonesia (DIKTI), 2017.

### REFERENCES

1. Aji R, 2008. **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Methanol Sembilan Tanaman dari Genus *Cassia* Terhadap *Plasmodium Falciparum***, Universitas Airlangga, Surabaya.
2. World Health Organization, 2011. **World malaria report 2011**. Geneva, Switzerland.
3. WHO, 2010. **World Malaria Report 2010**.
4. Cox-Singh J, Davis TM, Lee KS, Shamsul SS, Matusop A, Ratnam S, Rahman HA, Conway DJ, Singh B. ***Plasmodium knowlesi* malaria in humans is widely distributed and potentially life threatening**. *Clin Infect Dis* 2008;46:165-71.
5. Daneshvar C, Davis C, Cox-Singh J, Rafa'ee M, Zakaria S, Divis P, Singh B: **Clinical and laboratory features of human *Plasmodium falciparum* infections**. *Clin Infect Dis* 2009, 49:852-860.
6. Ekasari W, Widyawaruyanti A, Tantular I, 2005. **Uji antimalaria hasil fraksinasi ekstrak kloroform daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei***. Penelitian Dosen Muda /BBI. Lemlit Unair Surabaya.
7. Ekasari W, Zaini NC, Santosa MH, Hafid F, Widyawaruyanti A, Dachlan YP, Setyawan D, Studiawan H, Khatib J, 2006. **Pengembangan daun johar (*Cassia siamea*) sebagai fitofarmaka antimalaria**. Penelitian BPOM. Tahun ke-II.
8. Ekasari W, Widyawaruyanti W, Zaini NC, Syafruddin, Honda T, and Morita H, 2009. **Antimalarial activity of cassiarin a from the leaves of *Cassia siamea***. *Heterocycles*. Vol.78 No.7 pp. 1831-1836.
9. Junior,CV. 2013. **(-)-7-Hydroxycassine : a New 2,6-Dialkylpiperidin-3-ol Alkaloid and other Constituents Isolated from Flowers and Fruits of *Senna spectabilis* (Fabaceae)**. *J.Braz.Chem.Soc*.Vol.24,No.2 :230-235.
10. Lorenzi, H.; de Abreu Matos, F.J. 2002. **Plants Medicinails no Brazil : Nativas e Exoticas**. Instituto Plantarum : Nova Odessa, Brazil, p. 291.
11. Sangetha, S.; Zuraini, Z.; Sasidharan, S.; Suryani, S. 2008. **Antibacterial, Antifungal and Cytotoxic Activities of *Cassia spectabilis***. *Asian J. Pharm.Clin. Res*, 1, 17-20.
12. Sangetha, S.; Zuraini, Z.; Sasidharan, S.; Suryani, S. 2008. **Fungicidal Effect and Oral Acute Toxicity of *Cassia spectabilis* Leaf Extract**. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 49, 299-304.
13. Sangetha, S.; Zuraini, Z.; Sasidharan, S.; Suryani, S. 2008. **Free Radical Scavenging Actvity of *Cassia spectabilis* and *Cassia fistula***. *Int. J. Nat. Eng. Sci*, 2, 111-114.
14. Subramanian L. Jothy, Torey A, Darah I, Choong Y.S, Saravanan D, Chen Yeng. Latha L.Y, Deivanai S, Sasidharan S. 2012. ***Cassia spectabilis* (DC) Irwin et Barn : A Promising Traditional Herb in Health Improvement**. *Molecules* (17) : 10292-10305.

15. Usha Veerachari, Bopaiah A.K, 2011. **Preliminary Phyto-chemical Evaluation of the Leaf Extract of Five *Cassia Species***. *J. Chem. Pharm. Res.*, 3 (5) : 574-583.
16. Fidock, D.A; Philip, J.R; Simon, L.C; Reto, B; Solomon, N. 2004. Antimalarial Drug Discovery : Efficacy Model for Compound Screening. *Nature Riview : Drug Discovery*, vol. 3 ; 509-520.
17. Trager W and Jensen JB, 1976. **Human Malaria Parasites in Continous Culture Science**. 193. P. 673-675



Lampiran 7.  
Draft HAKI

dibuat rangkap 4



KEMENTERIAN HUKUM DAN HAK ASASI MANUSIA R.I  
DIREKTORAT JENDERAL HAK KEKAYAAN INTELEKTUAL

**Formulir Permohonan Paten**

|   |     |
|---|-----|
| <p><u>Diisi oleh petugas</u><br/>Tanggal Pengajuan :<br/>Nomor permohonan :</p>   |     |
| <p>Dengan ini saya/kami <sup>1)</sup> :</p> <p>(71) Nama : LPI Universitas Airlangga<br/>                 Alamat <sup>2)</sup> : Kampus C Mulyorejo, Surabaya 60115</p>   |     |
| <p>Mengajukan permohonan paten/<del>paten sederhana</del></p>   | [ ] |
| <p>Yang merupakan permohonan paten Internasional/PCT dengan nomor :</p>   |     |
| <p>(74) <del>melalui</del>/tidak melalui *) Konsultan Paten<br/>                 Nama Badan Hukum <sup>3)</sup> : = =<br/>                 Alamat Badan Hukum <sup>2)</sup> : = =<br/><br/>                 Nama Konsultan Paten : =<br/>                 Alamat <sup>2)</sup> :<br/><br/>                 Nomor Konsultan Paten : =<br/>                 Telepon / fax :</p> | [ ] |
| <p>(54) dengan judul invensi :<br/> <b>DAUN CASSIA SPECTABILIS SEBAGAI PROFILAKSIS ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM</b></p>  | [ ] |

|   |  |                            |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
|---|--|----------------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| <p>Permohonan Paten ini merupakan pecahan dari permohonan paten nomor :</p>   | <p>[ ]</p>   |                            |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| <p>(72) Nama dan kewarganegaraan para inventor :</p> <p>.....Dr. Wiwied Ekasari MSi., Apt...warga negara.....Indonesia.....<br/>                 ..... Dra. Heny Arwaty, MSc., Ph.D..warga negara.....Indonesia .....<br/>                 .....Tutik Sri Wahyuni SSI., MSi., Apt.. warga negara.....Indonesia.....<br/>                 .....warga negara.....</p>   | <p>Diisi oleh petugas</p> <p>[ ]</p>                               |                            |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| <p>(30) Permohonan paten ini diajukan dengan/tidak dengan *)<br/>                 Hak prioritas <sup>4)</sup></p> <table border="0"> <tr> <td>Negara :</td> <td>Tgl. Penerimaan permohonan</td> <td>Nomor prioritas</td> </tr> <tr> <td>.....</td> <td>.....</td> <td>.....</td> </tr> <tr> <td>.....</td> <td>.....</td> <td>.....</td> </tr> <tr> <td>.....</td> <td>.....</td> <td>.....</td> </tr> </table>   | Negara :   | Tgl. Penerimaan permohonan | Nomor prioritas | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | ..... | <p>[ ]</p> |
| Negara :  | Tgl. Penerimaan permohonan   | Nomor prioritas            |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| .....   | .....  | .....                      |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| .....   | .....  | .....                      |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| .....   | .....  | .....                      |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| <p>Bersama ini saya lampirkan <sup>5)</sup> :</p> <p>1 (satu) rangkap :</p> <p>[ ] surat kuasa [ ]<br/>                 [ X ] surat pengalihan hak atas penemuan [ X ]<br/>                 [ ] bukti pemilikan hak atas penemuan [ ]<br/>                 [ ] bukti penunjukan negara tujuan (DO/EO) [ ]<br/>                 [ ] dokumen prioritas dan terjemahannya [ ]<br/>                 [ ] dokumen permohonan paten internasional/PCT [ ]<br/>                 [ ] sertifikat penyimpanan jasad renik dan terjemahannya [ ]<br/>                 [ ] dokumen lain (sebutkan) : [ ]</p> <p>Dan 3 (tiga) rangkap invensi yang terdiri dari :</p> <p>[ X ] uraian ..... halaman<br/>                 [ X ] klaim ..... buah<br/>                 [ X ] abstrak<br/>                 [ ] gambar ..... buah</p> | <p>[ ]<br/>[ ]<br/>[ ]<br/>[ ]<br/>[ ]<br/>[ ]<br/>[ ]<br/>[ ]</p> |                            |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |
| <p>Saya/kami usulkan, gambar nomor ..... dapat Menyertai abstrak pada saat dilakukan pengumuman atas Permohonan paten (UU No. 14 Tahun 2001)</p>  | <p>[ ]</p>   |                            |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |            |

Demikian permohonan paten ini saya/kami ajukan  
Untuk dapat diproses lebih lanjut

Pemohon,  
LPI Universitas Airlangga

(Prof. Hery Purnobasuki Drs., MSi., PhD<sup>6</sup>)

---

**Keterangan :**

1. Jika lebih dari satu orang maka cukup satu saja yang dicantumkan dalam formulir ini sedangkan lainnya harap ditulis pada lampiran tambahan.
2. Adalah alamat kedinasan/surat-menyurat
3. Jika konsultan Paten yang ditunjuk bekerja pada Badan Hukum tertentu yang bergerak dibidang konsultan paten maka sebutkan nama Badan Hukum yang bersangkutan.
4. Jika lebih dari ruang yang disediakan agar ditulis pada lampiran tambahan
5. Berilah tanda silang pada jenis dokumen yang saudara lampirkan
6. Jika permohonan paten diajukan oleh :
  - Lebih dari satu orang, maka setiap orang ditunjuk oleh kelompok /group
  - Konsultan Paten maka berhak menandatangani adalah konsultan yang terdaftar di Kantor Paten.

**\*) Coret yang tidak sesuai.**

**Form No. 001/P/HKI/2000**

Tidak boleh diperbanyak dengan foto copy.

## Deskripsi

### **DAUN *CASSIA SPECTABILIS* SEBAGAI PROFILAKSIS ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM**

#### **Bidang Teknik Invensi**

Invensi ini berkaitan dengan pembuatan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dan penentuan dosis efektif ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalarial. Lebih khusus lagi invensi ini berhubungan dengan inovasi cara ekstraksi ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* serta model pemberian sebagai profilaksis antimalarial.

#### **Latar Belakang Invensi**

Malaria adalah penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit malaria *Plasmodium sp.* bentuk aseksual yang masuk ke dalam tubuh manusia yang ditularkan oleh nyamuk betina *Anopheles sp.* yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, anak balita, ibu hamil, selain itu malaria secara langsung menyebabkan anemia dan dapat menurunkan produktivitas kerja (Departemen Kesehatan RI, 2008). *World Malaria Report* tahun 2011 menyebutkan bahwa malaria terjadi di 106 Negara bahkan 3,3 milyar penduduk dunia tinggal di daerah beresiko tertular malaria. Jumlah kasus malaria di dunia sebanyak 216 juta kasus, dimana 28 juta kasus terjadi di ASEAN. Setiap tahunnya sebanyak 660 ribu orang meninggal dunia karena malaria terutama anak balita (86%), 320 ribu diantaranya berada di Asia Tenggara termasuk Indonesia (Kementerian Kesehatan RI, 2011). API dari tahun 2005-2014 menurun dari 4,10 per 1000 penduduk menjadi 0,99 per 1000 penduduk. API tahun 2012 adalah 1,69 per 1000 penduduk dan terjadi penurunan pada tahun 2014 menjadi 0,99 per 1000 penduduk. Hal ini menunjukkan bahwa Indonesia berada dalam wilayah dengan tingkat endemis rendah (API <1 per 1000 populasi) (Kementerian Kesehatan RI, 2011)

Upaya penanggulangan terhadap penyakit ini memang telah banyak dilakukan, namun angka kesakitan dan kematian malaria di beberapa negara masih tinggi. Tumbuh dan menyebarnya resistensi terhadap semua obat antimalaria lapis pertama (*front-line antimalarial compound*) yang dipakai pada pengobatan dan pencegahan malaria telah menimbulkan banyak masalah pada program penanggulangan malaria. Seiring dengan belum berhasilnya upaya untuk menemukan vaksin malaria yang ideal, maka aktivitas riset yang bertujuan untuk penemuan obat baru dan mengidentifikasi target intervensi kemoterapi tetap menjadi tujuan utama dalam upaya penanggulangan malaria. Obat baru yang terjangkau bagi masyarakat di daerah penularan malaria sangat mutlak diperlukan bila dampak malaria ingin dikurangi atau bahkan diatasi (Burke, 2003; Sjafruddin, 2004).

Penelitian untuk mendapatkan obat antimalaria baru, baik obat sintesis maupun yang berasal dari bahan alam, khususnya dari tumbuhan masih terus berlanjut. Penelitian terhadap bahan alam dalam usaha menemukan senyawa baru antimalaria dilakukan secara intensif oleh para peneliti di dunia pada dasawarsa terakhir ini.

Berbagai hal tersebut di atas telah mendorong eksplorasi dan isolasi tanaman obat lainnya begitu pula yang berasal dari Indonesia, yang diduga mengandung senyawa aktif antimalaria. Sampai saat ini telah diketahui beberapa senyawa baru hasil isolasi tanaman obat dari golongan alkaloid, terpenoid, flavonoid, kumarin, lignan, kalkon dan santon yang memiliki aktivitas antimalaria secara *in vitro* dan *in vivo* (Saxena, 2003; Wright, 2005).

Salah satu tumbuhan di Indonesia yang potensial dapat digunakan sebagai antimalaria adalah *C. spectabilis*. Peneliti telah melakukan serangkaian penelitian mengenai aktivitas tanaman ini sebagai antimalaria. Uji aktivitas antimalaria ekstrak dan fraksi alkaloid daun *C. spectabilis* Lamk dilakukan secara *in vitro* pada *P. falciparum* menunjukkan bahwa dari ekstrak heksana daun *C. spectabilis* didapatkan harga  $IC_{50}$  sebesar  $> 100 \mu\text{g/ml}$ . Sedang ekstrak metanol daun *C. spectabilis* sebesar  $2,66 \mu\text{g/ml}$ , dari fraksi etil asetat daun *C. spectabilis* sebesar  $1,18 \mu\text{g/ml}$  dan dari fraksi kloroform daun *C. spectabilis* sebesar  $0,64 \mu\text{g/ml}$ . Hasil diatas menunjukkan bahwa fraksi kloroform mempunyai aktivitas antimalaria yang paling baik yaitu sebesar  $0,64 \mu\text{g/ml}$ , dengan hasil profil KLT fraksi kloroform yang menunjukkan kandungan alkaloid terbesar dibanding ekstrak dan fraksi lainnya (Ekasari *et al*, 2012).

Seperti diketahui upaya pencegahan penularan penyakit malaria telah banyak dilakukan seperti “gebrak malaria” sebagai gerakan nasional memberantas malaria di Indonesia. Gerakan ini belum mampu menanggulangi penyakit malaria, terutama di daerah endemis. Kasus kesakitan juga masih selalu ada karena masalah pencegahan (preventif) penularan belum cukup efektif mengeliminasi permasalahan secara tuntas (Cecilia, dkk., 2015). Pengetahuan masyarakat yang terbatas merupakan determinan penting bagi munculnya penyakit malaria, dan berpengaruh terhadap partisipasi masyarakat dalam program pencegahan penyakit malaria (Arsin, 2012). Berdasar hal ini maka pemberian obat-obatan sebagai terapi profilaksis malaria telah dilakukan di daerah-daerah yang menjadi endemis malaria, dengan tujuan dapat menekan angka penularan penyakit malaria (Novia, dkk., 2013). Obat-obatan antimalarial sebagai profilaksis yang beredar saat ini masih mempunyai banyak kelemahan, diantaranya adalah timbulnya efek samping yang tidak diinginkan. Berdasarkan hal ini, maka akan dilakukan pengujian aktivitas antimalarial (profilaksis) dari fraksi etil asetat daun *C. spectabilis* pada mencit terinfeksi *P. berghei* dengan harapan ditemukannya obat profilaksis antimalarial baru yang berasal dari alam.

### Ringkasan Invensi

Invensi yang diajukan ini mengemukakan tentang pembuatan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dan metode terbaik pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalaria.

Untuk pembuatan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dibuat dari simplisia daun *C. spectabilis* diekstraksi dengan cara maserasi dengan etanol 90% sebanyak 3 kali dengan volume pelarut sebanyak 5 x berat simplisia, kemudian maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak yang pekat

Sedang pengujian ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalarial dilakukan dengan metode berikut. Ada 6 macam dosis yang diberikan yaitu :

- Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 100 mg/kg BB
- Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 200 mg/kg BB
- Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 400 mg/kg BB
- Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 800 mg/kg BB
- Pemberian obat standard Doksisisiklin sebagai kontrol positif
- Pemberian CMC Na sebagai kontrol negatif

Pemberian setiap kelompok diberikan bahan uji secara peroral sesuai dengan dosis masing-masing selama 4 hari. Pada hari ke empat masing-masing mencit diinfeksi dengan *P. berghei*. Dilakukan pengamatan parasitemia dengan membuat preparat hapusan darah setiap hari setelah hari penginfeksi. Kemudian dihitung  $ED_{50}$  pada hari ke-4 setelah infeksi.

Dari pemberian dengan berbagai dosis diatas, didapatkan hasil ED50 *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalaria sebesar 161,20 mg/kgBB

### Uraian Lengkap Invensi

Pemerintah telah melakukan berbagai macam usaha dalam mengendalikan penyakit malaria, antara lain dengan upaya pencegahan dan pengobatan penderita yang terserang malaria. Salah satu usaha pencegahan penyakit malaria yang sudah cukup lama dilakukan adalah dengan penggunaan kemoprofilaksis antimalaria. Penggunaan profilaksis antimalaria dianjurkan untuk orang atau kelompok yang menetap atau tidak menetap di daerah endemis tinggi, ibu hamil atau untuk kelompok atau orang yang menetap di daerah yang ditemukan resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin. Obat-obat kemoprofilaksis yang sering digunakan antara lain, atovaquone, proguanil, klorokuin, meflokuin dan doksisisiklin. (Iaksono, 2011). Akan tetapi obat-obat tersebut masih mempunyai beberapa kelemahan. Seperti doksisisiklin yang mempunyai efek samping diantaranya psoriasis, iritasi gastrointestinal. Selain itu penggunaan lama juga dapat mempengaruhi flora normal usus.

Untuk itu guna meningkatkan upaya pencegahan penyakit malaria perlu dicari obat yang untuk mencegah penyakit malaria yang aman dan dapat dipakai oleh semua kalangan baik dari sintesa maupun bahan alam.

Berdasar hal tersebut diatas, maka invensi ini mengemukakan tentang pemberian ekstrak etanol daun *C. spectabilis* pada berbagai dosis guna menentukan dosis yang efektif sebagai profilaksis antimalaria.

Ada 6 macam larutan uji yang diberikan yaitu : kelompok I dengan Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 100 mg/kg BB, kelompok II dengan Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 200 mg/kg BB, kelompok III dengan Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 400 mg/kg BB, kelompok IV dengan Pemberian ekstrak etanol 90% *C. spectabilis* dengan dosis 800 mg/kg BB, kelompok V dengan Pemberian obat standard Doksisisiklin sebagai kontrol positif dan terakhir kelompok VI dengan Pemberian CMC Na sebagai kontrol negatif

Pemberian setiap kelompok diberikan bahan uji secara peroral sesuai dengan dosis masing-masing selama 4 hari. Pada hari ke empat masing-masing mencit diinfeksi dengan *P. berghei*. Dilakukan pengamatan parasitemia dengan membuat preparat hapusan darah setiap hari setelah hari penginfeksian. Kemudian dihitung ED<sub>50</sub> pada hari ke-4 setelah infeksi.

Pengujian antimalaria dimulai dengan penginfeksian mencit donor menggunakan simpanan beku yang telah terinfeksi *P. berghei* dalam medium alceiver (1:3). Simpanan beku darah mula-mula diturunkan suhunya sesuai dengan suhu tubuh mencit dengan cara dihangatkan dalam telapak tangan sambil diputar-putar (dithawing). Setelah suhunya telah sesuai dengan suhu tubuh mencit, sediaan tersebut diinjeksikan pada mencit sebanyak 200 µl. Kemudian ditunggu sampai tingkat parasitemia dalam mencit tersebut mencapai 20%. Bila prosen parasitemia telah mencukupi kemudian dilakukan pengambilan darah untuk penginfeksian pada mencit coba. Pada pengujian, masing-masing kelompok akan mendapatkan larutan uji sesuai dengan dosis yang ditentukan. Pemberian larutan uji secara peroral dilakukan pada hari ke-1 sampai hari ke-4. Lalu kemudian dihentikan pemberian larutan uji dan mencit diinfeksi. Pada penelitian yang dilakukan oleh Khan et al. (2015) dan Otegbade et al. (2017), aktivitas profilaksis diamati dengan cara mengambil hapusan darah 72 jam setelah mencit diinfeksi dan diamati persen parasitemia untuk seluruh kelompok uji.

Aktivitas antimalaria pada ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalaria ditampilkan pada Tabel 1.

**Tabel 5.4** Hasil profilaksis ekstrak etanol daun *C. spectabilis*

Pada ekstrak etanol daun *C. spectabilis* ini dilakukan uji aktivitas penghambatannya sebagai profilaksis secara *in vivo* pada *P. berghei*. Pemilihan dosis berdasarkan pada penelitian yang dilakukan Munoz *et al.* (2000) dimana peneliti menggunakan dosis hingga 1000 mg/kgBB mencit. Karena itu pada pengujian antimalaria kali ini dipilih dosis dengan rentang 100-800 mg/kgBB mencit. Dari hasil penelitian terlihat rata-rata persen penghambatan terhadap *P. berghei* dari kelompok kontrol dan kelompok uji, dimana semakin besar dosis uji yang diberikan, maka

Dari hasil perhitungan menggunakan analisa probit didapatkan harga  $ED_{50}$  : 161,20 mg/kgBB.

| Sampel                  | Rep | % parasitemia | Rerata % parasitemia | % penghambatan |
|-------------------------|-----|---------------|----------------------|----------------|
| CMC Na                  | 1   | 7,06          | 9,94                 | -              |
|                         | 2   | 9,10          |                      |                |
|                         | 3   | 10,00         |                      |                |
|                         | 4   | 12,03         |                      |                |
|                         | 5   | 11,67         |                      |                |
|                         | 6   | 9,74          |                      |                |
| 100 mg/kgBB             | 1   | 4,75          | 5,95                 | 40,14          |
|                         | 2   | 4,56          |                      |                |
|                         | 3   | 6,09          |                      |                |
|                         | 4   | 6,29          |                      |                |
|                         | 5   | 6,13          |                      |                |
|                         | 6   | 7,89          |                      |                |
| 200 mg/kgBB             | 1   | 4,04          | 4,06                 | 59,16          |
|                         | 2   | 5,20          |                      |                |
|                         | 3   | 3,66          |                      |                |
|                         | 4   | 2,37          |                      |                |
|                         | 5   | 4,91          |                      |                |
|                         | 6   | 4,16          |                      |                |
| 400 mg/kgBB             | 1   | 4,76          | 3,97                 | 60,06          |
|                         | 2   | 2,94          |                      |                |
|                         | 3   | 5,14          |                      |                |
|                         | 4   | 3,05          |                      |                |
|                         | 5   | 3,80          |                      |                |
|                         | 6   | 4,14          |                      |                |
| 800 mg/kgBB             | 1   | 2,96          | 3,12                 | 68,61          |
|                         | 2   | 3,68          |                      |                |
|                         | 3   | 3,41          |                      |                |
|                         | 4   | 3,36          |                      |                |
|                         | 5   | 2,83          |                      |                |
|                         | 6   | 2,50          |                      |                |
| Doksisislin 100 mg/kgBB | 1   | 2,44          | 2,63                 | 73,54          |
|                         | 2   | 2,88          |                      |                |
|                         | 3   | 3,80          |                      |                |
|                         | 4   | 3,13          |                      |                |
|                         | 5   | 1,18          |                      |                |
|                         | 6   | 2,35          |                      |                |

Tabel 5.4 Hasil profilaksis ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap *P. berghei* pada mencit

semakin kecil persen penghambatan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap pertumbuhan *P. berghei*. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar pula persen penghambatan ekstrak etanol daun *C. spectabilis* terhadap pertumbuhan *P. berghei*. Dosis uji 800 mg/kg memberikan efek penghambatan terbesar (68,61%) dibandingkan dengan kelompok dosis uji lainnya. Sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak etanol daun *C. spectabilis* memiliki aktivitas antimalaria yang baik karena pada dosis 250 mg/kg/hari menunjukkan persen penghambatan parasit lebih besar dari 50% (Munoz *et al.*, 2000). Pustaka lainnya (Bantie *et al.*, 2014), menyebutkan bahwa ekstrak yang menghasilkan persentase penghambatan  $\geq 50\%$  dengan uji *in vivo* pada dosis 500, 250 dan 100 mg/kgBB diklasifikasikan mempunyai aktivitas antiplasmodium sedang, baik dan sangat baik. Berdasarkan klasifikasi Bantie *et al.* (2014) maka aktivitas ekstrak etanol daun *C. spectabilis* secara *in vivo* dapat digolongkan baik karena pada dosis 200 mg/kgBB sudah dapat menghambat pertumbuhan *P. berghei*  $\geq 50\%$ . Sedangkan dengan perhitungan analisis probit didapat harga ED<sub>50</sub> dari ekstrak etanol daun *C. spectabilis* sebesar 161,20 mg/kg.

#### **Klaim**

1. Proses Ekstraksi daun *C. spectabilis* dengan cara simplisia daun *C. spectabilis* diekstraksi menggunakan metode maserasi dengan etanol 90% sebanyak 3 kali dengan volume pelarut sebanyak 5 x berat simplisia, kemudian maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak yang pekat
2. Sesuai klaim 1, ekstrak yang didapat selanjutnya disebut ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis*
3. Ekstrak seperti pada klaim 2 memiliki aktivitas sebagai profilaksis antimalaria secara *in vivo* dengan hewan coba mencit terinfeksi *P. berghei* dengan ED<sub>50</sub> sebesar sebesar 161,20 mg/kgBB.
4. Pemberian ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* pada dosis 800 mg/kg BB mempunyai aktivitas sebagai profilaksis antimalarial tidak berbeda secara bermakna dengan Doksisisiklin dosis 100 mg/kg BB sebagai kontrol positif.



Abstrak**DAUN *CASSIA SPECTABILIS* SEBAGAI PROFILAKSIS ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM**

Invensi ini mengemukakan tentang terapi menggunakan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* sebagai profilaksis antimalaria. Penggunaan obat kemoprofilaksis malaria umum digunakan untuk orang atau kelompok yang mentap di daerah endemis tinggi. Akan tetapi obat kemoprofilaksis antimalaria saat ini masih mempunyai beberapa kekurangan serta efek samping. Proses pembuatan ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* menggunakan cara maserasi dengan etanol 90% sebanyak 3 kali dengan volume pelarut sebanyak 5 x berat simplisia, kemudian maserat yang diperoleh diuapkan dengan rotavapor sampai diperoleh ekstrak yang pekat.

Pengujian profilaksis antimalaria ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* secara *in vivo* menggunakan empat macam dosis yaitu dosis 100 mg/kg BB, 200 mg/Kg BB, 400 mg/kgBB dan 800 mg/kg BB, didapatkan harga ED50 sebagai profilaksis antimalarial sebesar 161, 20 mg/KgBB.

Pada pemberian ekstrak etanol 90% daun *C. spectabilis* dosis 800 mg mempunyai aktivitas sebagai profilaksis antimalarial tidak berbeda secara bermakna dengan Doksisisiklin dosis 100 mg/kg BB sebagai kontrol positif.

## SURAT PERNYATAAN PENGALIHAN HAK ATAS INVENSI

Yang bertanda tangan di bawah ini:

1. Nama : Dr. Wiwied Ekasari, Msi., Apt  
Pekerjaan : Dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga  
Alamat : Jl. Darmawangsa Dalam Selatan Surabaya
2. Nama : Dra. Heny Arwaty, MSc., Ph.D  
Pekerjaan : Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga  
Alamat : Jl. Darmawangsa Dalam Selatan Surabaya
3. Nama : Tutik Sri Wahyuni, SSI.,MSi., Apt.  
Pekerjaan : Dosen Fakultas Farmasi Universitas Airlangga  
Alamat : Jl. Darmawangsa Dalam Selatan Surabaya

dalam hal ini bertindak untuk dan atas nama para inventor yang bertanda tangan di bawah ini, selaku para inventor dari invensi berjudul :

### **DAUN *CASSIA SPECTABILIS* SEBAGAI PROFILAKSIS ANTIMALARIA DARI BAHAN ALAM**

dan untuk selanjutnya disebut sebagai **PARA INVENTOR**,

bersama ini menyatakan mengalihkan hak sebagai pemohon pengajuan paten atas invensi tersebut diatas kepada :

Nama : LPI Universitas Airlangga  
Alamat : Kampus C Mulyorejo Surabaya 60115

dalam hal ini, sesuai dengan kewenangan diwakili oleh Prof. Hery Purnobasuki Drs., MSi., PhD selaku Ketua LPI Universitas Airlangga.

Demikian Surat Pernyataan ini kami buat secara sadar dan tanpa paksaan dari pihak manapun untuk dimanfaatkan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 3 Nopember 2018  
UNTUK DAN ATAS NAMA  
Ketua LPI Universitas Airlangga,

INVENTOR,

Prof. Hery Purnobasuki Drs., MSi., PhD  
NIP : 19590805 198701 1 001

1. Dr. Wiwied Ekasari, MSi., Apt.
2. Dra. Heny Arwaty, MSc., Ph.D
3. Tutik Sri Wahyuni SSI., MSi., Apt.

