

- CASSIA (GENUS)
- ANTIMALARIALS



LAPORAN PENELITIAN  
DIK SUPLEMEN UNIVERSITAS AIRLANGGA  
TAHUN ANGGARAN 2003

KK  
KKB  
615.323 749  
Eka  
U

**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK ETANOL  
DAUN CASSIA SIAMEA PADA MENCIT TERINFEKSI  
PLASMODIUM BERGHEI**



\*013004141\*

Peneliti:

Dra. Wiwied Ekasari, M.Si. Apt.  
Dra. Aty Widyawaruyanti, M.Si. Apt



013004141

**LEMBAGA PENELITIAN UNIVERSITAS AIRLANGGA**

Dibiayai Oleh Dana DIK Suplemen Universitas Airlangga Tahun 2003  
SK Rektor Universitas Airlangga Nomor 4624/J03/PG/2003  
Tanggal 13 Juni 2003  
Nomor Urut 24

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS AIRLANGGA**

**Nopember, 2003**



# LEMBAGA PENELITIAN

- |  |                                       |  |
|--|---------------------------------------|--|
| 1. Puslit Pembangunan Regional         | 5. Puslit Pengembangan Gizi (5995720) | 9. Puslit Kependudukan dan Pembangunan (5995719) |
| 2. Puslit Obat Tradisional             | 6. Puslit/Studi Wanita (5995722)      | 10. Puslit/ Kesehatan Reproduksi                 |
| 3. Puslit Pengembangan Hukum (5923584) | 7. Puslit Olah Raga                   |  |
| 4. Puslit Lingkungan Hidup (5995718)   | 8. Puslit Bioenergi                   |  |

Kampus C Unair, Jl. Mulyorejo Surabaya 60115 Telp. (031) 5995246, 5995248, 5995247 Fax. (031) 5962066  
E-mail : lpunair@rad.net.id - http://www.geocities.com/Athens/Olympus/6223

## IDENTITAS DAN PENGESAHAN LAPORAN AKHIR HASIL PENELITIAN

1. Judul Penelitian	: Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol Daun <i>Cassia siamea</i> pada Mencit Terinfeksi
a. Macam Penelitian	: <input type="checkbox"/> Fundamental <input type="checkbox"/> Terapan <input type="checkbox"/> Pengembangan
b. Kategori Penelitian	: <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> II <input type="checkbox"/> III
2. Kepala Poyek Penelitian	
a. Nama lengkap dan Gelar	: Dra. Wiwied Ekasari, Apt.,M.Si.
b. Jenis kelamin	: Perempuan
c. Pangkat/Golongan dan NIP	: Penata Muda Tk. I (Gol. III/b) 132 087 863
d. Jabatan Sekarang	: Staf Pengajar
e. Fakultas/Puslit/Jurusan	: Fakultas Farmasi
f. Univ/Ins./Akademi	: Universitas Airlangga
g. Bidang Ilmu yang diteliti	: Farmakognosi
3. Jumlah Tim Peneliti	: 2 (dua) orang
4. Lokasi Penelitian	: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
5. Kerjasama dengan Instansi lain	
a. Nama Instansi	: -
b. Alamat	: -
6. Jangka waktu penelitian	: 5 (lima) bulan
7. Biaya yang diperlukan	: Rp. 4.000.000,00
8. Seminar Hasil Penelitian	
Dilaksanakan Tanggal	14 Oktober 2003
Hasil Penelitian	( ) Baik Sekali (V) Baik ( ) Sedang ( ) Kurang

Surabaya, 14 Oktober 2003



Mengetahui/Mengesahkan  
a.n. Rektor  
Ketua Lembaga Penelitian,  
Prof. Dr. H. Sarmanu, M.S.  
NIP 130 701 125

## RINGKASAN

**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK ETANOL DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA MENCIT TERINFEKSI *PLASMODIUM BERGHEI***

(Wiwied Ekasari dan Aty Widyawaruyanti, 2004, 23 halaman)

Bangkitnya kembali penyakit malaria menyebabkan pencarian senyawa baru sebagai obat antimalaria baik dari bahan alam maupun hasil sintesis terus dilakukan. Pemakaian bahan alam untuk mengatasi berbagai penyakit telah lama dilakukan. Tanaman sebagai sumber potensial obat antimalaria dimulai dengan ditemukannya kina, alkaloid yang berasal dari kulit batang *Cinchona* sp. yang dilanjutkan dengan artemisinin dari tumbuhan *Artemisia annua*.

Di Indonesia, salah satu tanaman yang banyak digunakan secara tradisional untuk antimalaria adalah daun *Cassia siamea*. Beberapa penelitian tentang aktivitas antimalaria dari tanaman ini secara *in vitro* menggunakan *Plasmodium falciparum* telah dilakukan dengan hasil memuaskan. Oleh karenanya penelitian ini perlu dilanjutkan dengan melakukan pengujian aktivitas antimalaria secara *in vivo* dengan harapan hasil yang didapat nantinya bisa lebih menggambarkan kondisi parasit sesungguhnya dalam tubuh inang dibandingkan uji aktivitas secara *in vitro*. Adapun bahan yang digunakan sebagai uji adalah ekstrak etanol dari daun *Cassia siamea*.

Serbuk kering daun *Cassia siamea* sebanyak 100 g dimaserasi dengan pelarut etanol sampai diperoleh ekstrak etanol seberat 17 g. Terhadap ekstrak ini kemudian dilakukan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan menggunakan metode Peter test. Mencit betina yang diinokulasi dengan eritrosit terinfeksi *P. berghei* dibiarkan hingga parasitemianya mencapai 1-5%. Ekstrak etanol daun *Cassia siamea* kemudian diberikan peroral selama 4 hari berturut-turut dengan dosis 50, 100, 250, dan 500 mg/kg BB mencit. Dihitung parasitemia dan % penghambatan selama 5 hari dan selanjutnya dianalisa dengan analisa probit untuk mendapatkan harga ED<sub>50</sub>.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *Cassia siamea* mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei in vivo* pada mencit dengan harga ED<sub>50</sub> sebesar 8,43 mg/kg BB.

---

\* IFakultas Farmasi Universitas Airlangga

Dibiayai : DIK Suplemen Unair, SK Rektor : 4624/JO3/PG/2003

## SUMMARY

**ANTIMALARIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACT OF CASSIA SIAMEA LEAVES ON MICE INFECTED *PLASMODIUM BERGHEI***

The returning of malaria causes the search of new drug as antimalarial agent either from natural product or chemical synthetic must be carried out. The use of plants as a potential source of antimalarial compound was started since the finding of quinine, an alkaloid compound isolated from the bark of *Cinchona sp.* and continue to the finding of artemisinin from *Artemisia annua*.

In Indonesia one of plants mostly use traditionally to cure malaria is *Cassia siamea*. Some studies concerning antimalarial activity of this plant using *Plasmodium falciparum* in vitro has been done with good result. Hence this research must be continued by performing the antimalarial activity by in vivo methode, so the result can illustrate the real condition of the parasite in side the host body compared to in vitro methode.

Material use in this research is ethanolic extract of leaves of *Cassia siamea*. 100 g of powdered dried leaves of *Cassia siamea* was maserated with ethanol. The ethanolic extract obtained was use for antimalarial activity in vivo using infected mice with *Plasmodium berghei* by Peter's test methode. Female mice was inoculated by erythrocyte that have been infected by *P. berghei* and the treatmen was started at the parasitaemia has reach 1-5%. The ethanolic extract then given orrally for 4 consecutive days in the dose 50, 100, 250, and 500 mg/kg BW. The parasitaemia and % growth inhibition were calculated on the 5<sup>th</sup> day and the data was analyzed by Probit Analysis to obtained ED<sub>50</sub>.

The result showed that ethanolic extract of possesses in vivo antimalarial activity againts *P. berghei* in mice with ED<sub>50</sub> = 8.43 mg/kg BW.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat dan hidayahnya sehingga kami dapat menyelesaikan penelitian ini dengan judul **UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK ETANOL DAUN *CASSIA SIAMEA* PADA MENCIT TERINFEKSI *PLASMODIUM BERGHEI***

Pada kesempatan ini TIM PENELITI menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat REKTOR UNIVERSITAS AIRLANGGA yang mendukung penelitian ini.

Tak lupa kami mengucapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada :

- 1 Ketua Lembaga Penelitian Unair yang mendukung dan membantu penelitian ini.
- 2 Kepala Bagian Proyek Peningkatan Kualitas Sumber daya Manusia, Ditjen Dikti, Depdiknas
- 3 Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah membantu menyediakan fasilitas dan sarana penelitian
- 4 Seluruh Staf Pengajar dan karyawan di Bagian Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, serta semua pihak yang telah membantu terlaksananya penelitian ini
- 5 Para mahasiswa yang membantu jalannya penelitian

Semoga amal ibadah Bapak-bapak, Ibu-ibu dan rekan-rekan diterima Allah SWT.

Kami menyadari bahwa dalam penulisan laporan ini kurang sempurna, oleh sebab itu tim peneliti mengharapkan kritik dan saran agar karya ilmiah ini menjadi lebih sempurna.

Surabaya, Januari 2003

Tim Peneliti

## DAFTAR ISI

	Hal
LEMBAR IDENTITAS DAN PENGESAHAN .....	ii
RINGKASAN .....	iii
SUMMARY .....	iv
KATA PENGANTAR .....	v
DAFTAR ISI .....	vi
DAFTAR TABEL .....	viii
DAFTAR GAMBAR .....	ix
DAFTAR LAMPIRAN .....	ix
BAB I PENDAHULUAN .....	1
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Masalah Penelitian .....	3
1.3 Hipotesa Penelitian .....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA .....	4
2.1 Tinjauan Tentang Tanaman <i>Cassia Siamea</i> .....	4
2.1.1. Klasifikasi tanaman .....	4
2.1.2. Kandungan kimia <i>Cassia siamea</i> .....	4
2.1.3. Kegunaan <i>Cassia siamea</i> .....	4
2.1.4. Penelitian yang telah dilakukan terhadap <i>C. siamea</i> .....	4
2.2 Tinjauan tentang <i>Plasmodium berghei</i> .....	6
2.2.1. Morfologi <i>Plasmodium berghei</i> .....	6
2.3 Tinjauan Tentang Mencit ( <i>Mus musculus</i> ) .....	7
2.4 Tinjauan Tentang Uji Antimalaria <i>in vivo</i> .....	7
BAB III TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN .....	9
3.1 Tujuan Penelitian .....	9
3.2 Manfaat Penelitian .....	9
BAB IV METODE PENELITIAN .....	10
4.1. Bahan Penelitian .....	10
4.1.1. Bahan Uji .....	10
4.1.2. Parasit Uji .....	10
4.1.3. Hewan Coba .....	10

4.1.4. Lokasi dan Waktu Penelitian .....	10
4.2. Prosedur Penelitian .....	10
4.2.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Cassia Siameae .....	10
4.2.2. Penyiapan uji aktivitas antimalaria .....	
4.2.2.1. Penyiapan <i>Plasmodium berghei</i> untuk penginfeksian mencit coba .....	10 11
4.2.2.2. Pembuatan preparat hapusan darah tipis .....	11
4.2.3. Pembuatan larutan uji .....	11
4.2.4. Pengujian aktivitas antimalaria .....	12
4.2.5. Evaluasi hasil uji antimalaria .....	12
4.2.6. Analisis Data .....	13
<b>BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>14</b>
5.1. Hasil Ekstraksi Daun Cassia siamea .....	14
5.2. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria in vivo pada mencit .....	14
<b>BAB VI KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>21</b>
6.1. Kesimpulan .....	21
6.2. Saran .....	21
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>22</b>

## DAFTAR TABEL

	Hal
Tabel 5.1 Persen Parasitemia Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol <i>Cassia siamea</i> .....	14
Tabel 5.2 Persen Parasitemia Rata-rata Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun <i>Cassia siamea</i> .....	15
Tabel 5.3 Persen Pertumbuhan Parasit Rata-rata Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun <i>Cassia siamea</i> .....	16
Tabel 5.4 Persen Penghambatan Rata-rata Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun <i>Cassia siamea</i> .....	16



## DAFTAR GAMBAR

Gambar 5.1 Grafik persen parasitemia ekstrak etanol daun <i>Cassia siamea</i> pada mencit terinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> .....	15
---	----

## DAFTAR LAMPIRAN

	Hal
Lampiran 1 Hasil Analisa Probit Akktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol daun <i>Cassia siamea</i> pada Mencit Terinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> .....	24

## BAB I

### PENDAHULUAN

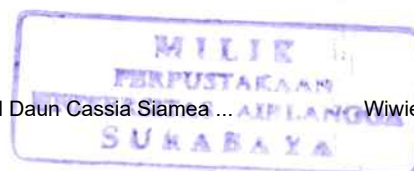
#### 1.1. Latar Belakang

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang tersebar di seluruh dunia. Sekitar 300-500 juta penduduk menderita penyakit ini; dengan angka kematian lebih dari 1,5-2,7 juta pertahun (Mishra dkk, 1999). Di Indonesia sendiri sampai saat ini penyakit malaria masih merupakan masalah kesehatan masyarakat karena angka kesakitan penyakit ini masih cukup tinggi. Di daerah-daerah terutama di daerah luar Jawa dan Bali masih sering terjadi letusan wabah malaria yang menimbulkan banyak kematian.

Usaha penanggulangan terhadap penyakit ini telah banyak dilakukan, baik dengan obat antimalaria sintesis maupun bahan alam. Tetapi bahaya resistensi dan efek samping yang di timbulkan oleh obat-obatan tersebut tidak dapat dihindarkan. Oleh karena itu penelitian dan perencanaan obat baru khususnya yang berasal dari tumbuhan perlu ditingkatkan. Tanaman sebagai sumber potensial obat antimalaria dimulai dengan ditemukannya kinina, alkaloid yang berhasil diisolasi dari kulit batang *Cinchona* sp.

Di Indonesia, salah satu tanaman yang banyak digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria adalah daun *Cassia siamea* ( Johar ) dari suku Caesalpiniaceae. Beberapa penelitian pendahuluan tentang aktivitas *C. siamea* sebagai antimalaria telah dilakukan, diantaranya oleh Gbeassor (1989) yang menguji secara *in vitro* ekstrak air daun *C. siamea*. Purwanto (1997) menguji aktivitas antimalaria ekstrak daun *C. siamea* dan Hadi (1997) menguji aktivitas antimalaria ekstrak kulit batangnya dengan menggunakan pelarut n-heksana, kloroform dan metanol. Didapatkan hasil bahwa ekstrak metanol daun mempunyai daya hambat terbesar. Disayangkan para peneliti tersebut diatas belum mengarahkan penelitiannya pada senyawa yang mempunyai aktivitas antimalaria.

Berdasarkan hal tersebut dan dari hasil penelitian tentang antimalaria secara keseluruhan dimana senyawa alkaloid masih merupakan golongan senyawa yang potensial dipakai sebagai antimalaria, maka peneliti telah memfokuskan penelitian aktivitas antimalaria dari senyawa golongan alkaloid daun *C. siamea* dengan mengikuti tahapan isolasi untuk alkaloid, yang mana setiap tahapan isolasi ini dilakukan uji aktivitas antimalariannya. Peneliti telah melakukan pendahuluan uji



aktivitas antimalaria daun *C. siamea* dengan mengikuti tahapan isolasi alkaloid, yang dimulai dengan melakukan ekstraksi memakai etanol, kemudian ekstrak etanol ini diekstraksi lagi dengan kloroform. Dari fraksi kloroform ini kemudian dilakukan fraksinasi kolom cepat dan didapat hasil  $IC_{50}$  pada masa inkubasi 48 jam sebagai berikut: Ekstrak etanol: 7,06310  $\mu\text{g/ml}$ , fraksi kloroform: 2,40565  $\mu\text{g/ml}$ , Fraksi positif alkaloid daun *C. siamea*: 1,70144  $\mu\text{g/ml}$ , sedangkan harga  $IC_{50}$  klorokuin difosfat sebagai obat antimalaria standar adalah 1,03319  $\mu\text{g/ml}$  (Wiwied, 2001; Wiwied 2002).

Hasil diatas memperlihatkan bahwa daun tanaman ini amat potensial dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum*. Oleh karenanya penelitian ini perlu dilanjutkan dengan melakukan pengujian secara *in vivo* dengan harapan hasil yang didapat nantinya bisa lebih menggambarkan kondisi parasit sesungguhnya dalam tubuh inang dibandingkan uji aktivitas secara *in vitro*.

Pengujian aktivitas antimalaria secara *in vivo* ini menggunakan jenis *Plasmodium berghei*. *Plasmodium* ini merupakan model yang sempurna untuk penelitian dan pengembangan parasit secara *in vivo* karena *P. bergnei* mempunyai kemiripan dengan *P. falciparum* yang menginfeksi manusia. Disamping itu *P. berghei* pada mencit memiliki rangkaian genom yang sama dengan *P. falciparum* pada manusia dan *P. berghei* ini sesuai untuk digunakan sebagai penelitian *short acting* anti malaria, seperti yang akan dilakukan pada penelitian kali ini (Phillipson, 1991). Pengujian aktivitas antimalaria secara *in vivo* untuk menentukan harga ED 50 (Efektif Dose) yaitu dosis terkecil yang dapat menghambat 50% pertumbuhan *P. berghei* ini dilakukan dengan menggunakan metode Peter test dan sebagai kontrol positifnya adalah klorokuin difosfat. Adapun bahan yang digunakan sebagai awal uji *in vivo* dari tanaman ini adalah ekstrak etanol daun *C. siamea*.

Pada tehnik uji secara *in vitro*, dapat dimungkinkan terjadinya perbedaan kondisi parasit didalam dan diluar tubuh induk. Sedang pada uji secara *in vivo*, parasit akan berada dalam tubuh induk sehingga akan mengalami kondisi dan metabolisme yang sesuai dengan parasit yang terdapat pada tubuh manusia. Dengan begitu tentunya hasil uji aktivitas antimalaria secara *in vivo* akan lebih menggambarkan kondisi parasit sesungguhnya dalam tubuh induk.

## 1.2 Masalah Penelitian

Apakah ekstrak etanol daun *Cassia siameae* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit?

## 1.3 Hipotesa Penelitian

Ekstrak etanol daun *Cassia siameae* dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. TINJAUAN TENTANG TANAMAN *CASSIA SIAMEA*

##### 2.1.1. Klasifikasi tanaman

Divisi	: Spermatophyta
Anak Divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Anak Kelas	: Dialypetalae
Bangsa	: Leguminosae
Suku	: Caesalpiniaceae
Marga	: <i>Cassia</i>
Jenis	: <i>Cassia siamea</i>

Nama daerah : Johar. Juwar (Heyne, 1987)

##### 2.1.2. Kandungan kimia *Cassia siamea*

Kandungan senyawa kimia yang terdapat pada tanaman *Cassia siamea* antara lain : (Harboune, 1971; El-Sayyed, 1984; Biswas, 1986)

- \* Daun : triterpenoid, alkaloid inti isokuinolin ( siaminin ), senyawa golongan antrakuinon (dioxapenalen, krisofanolantron)
- \* Kayu/batang : tanin, antraknon, lignin, pentosa hidrosianat
- \* Bunga : senyawa alkaloid inti kromon, yaitu cassia denindihidroisokumarin, asam kumarat, sterol

##### 2.1.3. Kegunaan *Cassia siamea*

Daun dari tanaman ini telah lama digunakan secara tradisional sebagai obat antimalaria, menghilangkan gatal-gatal dan penyakit kulit. Rebusan dari akar pohonnya dapat digunakan sebagai obat cacing serta bunga dan buahnya sering dipakai sebagai tonikum (Heyne, 1987)

##### 2.1.4. Penelitian yang telah dilakukan terhadap *Cassia siamea*

- Dari daun tanaman ini El-Sayyed (1984) berhasil mengisolasi senyawa alkaloid isokuinolin yaitu senyawa siaminin

- Gbeassor (1989) telah menguji efek antimalaria ekstrak air 8 tanaman dari Afrika, diantaranya adalah *C. siamea* dan dinyatakan bahwa tanaman ini dapat menghambat 100% *P. falciparum*
- Efek ekstrak kering dalam metanol dari daun *C. siamea* pada strain *P. falciparum* F-2382 dan I-2300 telah diuji oleh Joke (1993) dan didapatkan hasil bahwa ekstrak ini mempunyai IC 50 untuk F-2382 = 28,07  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  dan untuk I-2300 = 10  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$
- Selanjutnya Purwanto (1997) mengekstraksi daun *C. siamea* menggunakan tiga macam pelarut yaitu heksan, khloroform, dan metanol. Dari uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* tersebut, diketahui ekstrak metanol tanaman ini mempunyai daya hambat yang terbesar. Ini ditunjukkan dengan harga IC 50 ekstrak heksan = 461,9553  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ekstrak khloroform = 260,9156  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dan untuk ekstrak metanol = 1,8433  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Dan dari skrining kandungan kimia untuk ekstrak metanol didapatkan hasil yang positif untuk golongan alkaloid.
- Hadi (1997) meneliti aktivitas ekstrak heksan, khloroform dan metanol dari tanaman ini terhadap *P. falciparum* dari kulit batangnya. Dan didapatkan hasil bahwa ekstrak metanolnya juga menunjukkan daya hambat yang terbesar, namun dengan harga IC 50 yang lebih kecil daripada daun yaitu untuk heksan IC 50 = 1893,75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , ekstrak khloroform IC 50 = 959,83  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dan ekstrak metanol = 36,14  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Sedang skrining kandungan kimia ekstrak metanolnya ternyata positif untuk golongan alkaloid, antrakuinon dan terpenoid.
- Wiwied E, Wahjo D, Yoes PD (2001). telah melakukan uji antimalaria *in vitro* dari ekstrak etanol, dan ekstrak kloroform daun *Cassia siamea* dan didapatkan hasil bahwa harga IC 50 dari ekstrak etanol adalah 7,06  $\mu\text{g}/\text{ml}$  dan ekstrak kloroform = 2,41  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Wiwied E., Wahjo D., Yoes PD., and Suhintam P. (2001), telah menguji efek antiplasmodium fraksi dari kloroform secara *in vitro* dan didapatkan hasil bahwa harga IC 50 fraksi tersebut adalah 1,70  $\mu\text{g}/\text{ml}$
- Wiwied E, Aty W, Suhintam P, (2002), menguji dan membandingkan daya skinzontosida ekstrak etanol, ekstrak kloroform dan fraksi alkaloid total daun *Cassia siamea* yang didapat dengan mengikuti tahapan isolasi untuk senyawa alkaloid, pada biakan *in vitro Plasmodium falciparum* dengan klorokuin disulfat



sebagai obat antimalaria standard. Didapatkan hasil bahwa harga IC50 semakin menurun seiring dengan makin murninya bahan.

## 2.2 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei*

Diantara empat macam plasmodium yang menyerang hewan pengerat (rodensia) yaitu *P. berghei*, *P. vinckei*, *P. chabaudi* dan *P. yoelli*, maka *P. berghei* merupakan model yang sempurna untuk penelitian dan pengembangan parasit manusia secara *in vivo*. Hal ini disebabkan karena *P. berghei* memiliki banyak kemiripan dengan *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi manusia. Kemiripan tersebut meliputi: sebagian struktur gen DNA, tahapan siklus hidup dan morfologi. Selain itu, *P. berghei* memiliki kemampuan dikembangkan secara *in vitro* untuk produksi skala besar, pemurnian dari tahap-tahap siklus hidupnya, serta sudah diketahui struktur gennya sehingga dapat dibuat modifikasi jalur mutasi gen (Carter and Diggs, 1977).

### 2.2.1 Morfologi *Plasmodium berghei*

*Plasmodium berghei* merupakan salah satu *Plasmodium* yang menyebabkan penyakit malaria pada hewan pengerat yang dapat menyebabkan kematian. Pada pewarnaan Giemsa dijumpai 3 tahapan bentuk yaitu: bentuk tropozoit, bentuk skizon, dan bentuk gametosit.

#### 1. Bentuk tropozoit

Tropozoit muda berbentuk cincin halus dengan diameter 1/6 diameter eritrosit. Pada cincin terdapat butir-butir kromatin berwarna merah yang berkelompok maupun terpisah satu sama lain. Sitoplasma tampak berwarna biru. Tropozoit dewasa mempunyai bentuk yang kompak, sitoplasma melebar dan mempunyai pigmen berupa titik-titik kasar berwarna ungu yang tampak jelas.

#### 2. Bentuk skizon

Skizon berbentuk bulat atau lonjong dengan ukuran 30µm. Skizon muda dikenali dengan adanya 1 sampai 2 butir pigmen granula yang menggumpal dengan titik-titik kasar yang tampak jelas. Dalam perkembangannya, skizon berwarna biru dengan kromatin merah-ungu. Skizon dalam eritrosit dewasa menampilkan segmen-segmen yang membentuk 8-12 buah merozoit. Sedangkan pada retikulosit terdapat 12-18 buah merozoit dengan ukuran 1.6µm.

### 3. Gametosit

Gametosit pada *Plasmodium berghei* berbentuk bulat atau oval. Pada pengecatan Giemsa, plasma berwarna biru, inti berwarna merah, sel berwarna merah muda dan pigmen berwarna kuning sampai hitam.

Ada dua macam bentuk gametosit pada *Plasmodium berghei*, yaitu makrogamet dan mikrogamet. Makrogamet biasanya lebih langsing dan lebih panjang daripada mikrogamet, dengan sitoplasma lebih biru pada pewarnaan Giemsa. Intinya lebih kecil dan padat, berwarna merah tua dan butir-butir pigmen yang berkelompok disekitarnya. Mikrogamet berbentuk lebih besar dengan ukuran 1,5 $\mu$ m, dengan sitoplasma biru pucat atau agak kemerahan. Intinya berwarna merah muda, besar dan tidak padat. Butir-butir pigmen tersebar pada sitoplasma sekitar inti. (Sinden, 1978)

### 2.3 Tinjauan Tentang Mencit (*Mus musculus*)

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

Lama hidup mencit adalah 2 tahun, bahkan ada yang mencapai 3 tahun. Mencit dewasa berumur 35 hari. Berat dewasa mencit jantan 20-40 g, sedangkan berat dewasa mencit betina 18-35 g.

### 2.4. Tinjauan Tentang Uji Antimalaria *in vivo*

Ada dua tes yang berbeda untuk pengujian menggunakan *Plasmodium berghei* yang bisa digunakan untuk skrining ekstrak tanaman yaitu; tes Peter dan tes Rane (Phillipson, 1991)

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

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat  $20 \pm 2$  gram 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% eritrosit yang terinfeksi) dilarutkan dalam medium kultur sampai tiap 0.2 ml mengandung  $10^7$  eritrosit yang terinfeksi. Tiap mencit diberi 0.2 ml secara



intravena di ekor pada hari 0. Ekstrak tanaman bisa dilarutkan atau dibuat suspensi dengan triturasi atau sonifikasi setelah penambahan 0.2% larutan Tween atau 0.5% larutan CMC atau 0.5%DMSO. Larutan ekstrak dalam air diberikan perhari dengan rentang dosis 1 - 100 mg/kgBBmencit dimulai semenjak hari mulainya penginfeksian 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  $ED_{50}$  (dalam hal ini berarti adanya penekanan parasit sebanyak 50% bila dibandingkan dengan kontrol) bisa dihitung dengan log dosis/aktivitas probit.

### B. Tes Rane

Dasar dari tes ini adalah membandingkan efek dari perlakuan standar pemberian *P. berghei* yang membunuh mencit dalam 6 hari dengan perpanjangan waktu bertahan hidup sampai 12 hari, dengan perlakuan pemberian sebuah dosis tunggal senyawa yang diujicobakan. Kelompok standar diberikan  $10^6$  sel donor yang terinfeksi secara intraperitoneal pada hari 1 dan larutan ekstrak tanaman atau suspensi dalam oleum arachidis yang telah tersonifikasi diberikan secara subkutan dengan dosis 640, 320, 160 dan 80 mg/kg berat badan pada hari ke empat.

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

## BAB III

### TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN

#### 3.1. Tujuan Penelitian

1. Penelitian ini bertujuan melakukan uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun *Cassia siameae* terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit.
2. Untuk menentukan harga ED 50 dari ekstrak etanol daun *C. siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei*

#### 3.2. Manfaat Penelitian

Merupakan hasil lanjutan pembuktian tumbuhan obat secara ilmiah dari penelitian yang sebelumnya dilakukan secara *in vitro*, sehingga dengan hasil penelitian *in vivo* ini dapat merupakan data preklinik yang merupakan data awal untuk menuju uji manfaat (klinik) pada manusia. Dengan demikian diharapkan dapat ditemukan senyawa bioaktif yang dapat menggantikan obat-obat antimalaria yang tidak kurang efektif dalam menanggulangi penyakit malaria.

## BAB IV

### METODE PENELITIAN

#### 4.1. Bahan Penelitian

##### 4.1.1. Bahan Uji :

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak etanol dari daun *Cassia siamea*. Daun ini diperoleh dari Surabaya (di lingkungan kampus B Unair), Jawa Timur dan telah dideterminasi di Laboratorium Botani Farmasi-Farmakognosi Fakultas Farmasi Unair. Daun diambil secara acak, dicuci dan dikeringkan dengan diangin-anginkan di udara terbuka. Setelah kering daun diserbuk sampai halus.

##### 4.1.2. Parasit Uji

Parasit yang digunakan adalah biakan *Plasmodium berghei* dalam suspensi sel darah merah mencit. Biakan *Plasmodium berghei* diperoleh dari laboratorium Malaria, Lembaga Biomoleuler Eijkman, Jakarta

##### 4.1.3. Hewan Coba

Mencit (*Mus musculus*) strain *Balb C* berumur 2-3 bulan dengan berat 20-30 gram, jenis kelamin betina diperoleh dari Laboratorium Hewan Universitas Airlangga Surabaya

##### 4.1.4. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Bagian Ilmu Bahan Alam FFUA dan Laboratorium Hewan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya

#### 4.2. Prosedur Penelitian

##### 4.2.1. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Cassia siamea*

Daun *Cassia siamea* dibersihkan dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan, kemudian diserbuk. Serbuk daun tersebut kemudian dimaserasi dengan etanol berulang kali sampai filtrat tidak berwarna. Filtrat etanol dikumpulkan dan diuapkan dengan rotavapour sampai didapatkan ekstrak etanol kental/kering dari daun *Cassia siamea* yang selanjutnya dipakai untuk uji antimalaria.

#### 4.2.2 Penyiapan uji aktivitas antimalaria

Untuk menentukan aktivitas daya hambat ekstrak etanol terhadap *Plasmodium berghei* dengan metode Peter test, diperlukan berbagai tahapan persiapan yaitu :

##### 4.2.2.1 Penginfeksian mencit coba dengan biakan *Plasmodium Berghei*

Simpanan beku darah terinfeksi *Plasmodium berghei* dithawing dengan cara dihangatkan dalam telapak tangan sambil diputar-putar sampai mencair dan suhunya mencapai 37 °C. Selanjutnya diinjeksikan sebanyak 200 µl ke mencit donor.

Setelah parasitemia mencapai 20%, mencit donor diambil darahnya dari bagian jantung, kemudian dimasukkan ke dalam tabung berisi medium Alceiver (1:3) yang selanjutnya diencerkan dengan PBS (*Phosphat Buffered Saline*) untuk menginfeksi mencit coba. Sel darah merah yang terinfeksi parasit ini kemudian diinjeksikan ke seluruh mencit coba sebanyak 200 µl/mencit. Ditunggu sampai parasitemia mencapai 1-5% baru kemudian diberi perlakuan (bahan uji).

##### 4.2.2.2 Pembuatan preparat hapusan darah tipis

Untuk menghitung parasitemia, dilakukan dengan membuat preparat hapusan darah tipis. Diusapkan tissue yang telah dibasahi alkohol 70% pada ujung ekor mencit. Digunting sedikit ujung ekor mencit, diurut secara perlahan ekor mencit sampai keluar darah sebanyak 1 tetes, ditetaskan darah pada gelas objek mikroskop kemudian diratakan dan dibiarkan sampai mengering di udara terbuka. Kemudian lapisan tipis tersebut difiksasi dengan metanol absolut sekitar satu detik. Lapisan tipis dikeringkan di udara terbuka, ditambahkan pewarna giemsa sehingga menutupi seluruh lapisan darah. Sediaan dibiarkan selama 20 – 25 menit, kemudian larutan giemsa dibilas dengan aquadest, selanjutnya preparat dikeringkan di udara terbuka. Sediaan hapusan darah tipis diperiksa dengan mikroskop cahaya dengan perbesaran 10 × 100.

#### 4.2.3 Pembuatan larutan uji

Larutan uji aktivitas antimalaria terdiri dari larutan uji, kontrol positif Klorokuin difosfat, larutan uji kontrol negatif dan larutan uji ekstrak etanol daun *Cassia siamea*.

**Larutan uji :**

Bahan uji sebanyak 5 g dilarutkan dalam 0,5% DMSO kemudian ditambah dengan larutan CMC Na 0,5% sampai 25 ml . Larutan induk ini kemudian diencerkan dengan larutan CMC Na 0,5% sampai didapat rangkaian dosis masing-masing 500, 250 , 100 dan 50 mg/kg BB mencit.

**Larutan kontrol positif :**

Sebagai pembanding atau kontrol positif digunakan klorokuin difosfat dengan konsentrasi 10,0 mg/kg BB mencit. Ditimbang 12,50 mg klorokuin difosfat, kemudian dilarutkan dengan aquabidest sampai volume 25,0 ml (larutan baku induk 500,0 µg/ml). 0,40 ml larutan ini dimasukkan dalam tubuh mencit seberat 20 gram secara per oral. Larutan ini disebut K<sup>+</sup> (10 mg / kgBB mencit). (Black,1986 ; Markinde,et.al., 1987)

**Larutan kontrol negatif :**

Sebagai kontrol negatif digunakan larutan yang terdiri dari 0,5% DMSO dan 0,5% CMC Na . Larutan ini disebut K<sup>-</sup> (CMC Na 0,5%).

**4.2.4. Pengujian aktivitas antimalaria**

Uji aktivitas antimalaria pada percobaan ini menggunakan metode Peter test. Mencit dibagi atas 6 kelompok yaitu : 4 kelompok mencit uji, 1 kelompok kontrol negatif , dan 1 kelompok kontrol positif. Tiap kelompok terdiri atas 3 ekor mencit jantan. Saat parasitemia mencapai 1-5% (hari ke-0) kelompok mencit uji diberikan 0,40 ml/20g BB mencit, larutan ekstrak uji secara peroral selama 4 hari berturut-turut (sampai hari ke-3). Adapun kriteria aktivitas antimalaria dari bahan uji adalah membandingkan persentase pertumbuhan parasit pada larutan uji dengan persentase pertumbuhan parasit pada kontrol negatif.

**4.2.5 Evaluasi hasil uji antimalaria**

Setiap hari dengan waktu yang sama selama 5 hari, darah dari tiap mencit dengan berbagai konsentrasi, dibuat hapusan darah tipis yang dicat dengan pewarna giemsa. Selanjutnya dihitung prosen penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* dengan menghitung jumlah sel terinfeksi parasit yang terhadap 5000 eritrosit.



\* **Rumus penghitungan parasitemia**

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

\* **Rumus prosentase penghambatan**

$$\% \text{ Penghambatan} = \left( 100\% - \frac{X_p}{X_o} \right) \times 100\%$$

Keterangan:  $X_p$  ➤ % Pertumbuhan rata-rata parasit pada larutan uji  
 $X_k$  ➤ % Pertumbuhan rata-rata parasit pada kontrol negatif

\* **Rumus pertumbuhan parasit**

$$\text{Pertumbuhan rata-rata} = \frac{(D_1 - D_0) + (D_2 - D_1) + (D_3 - D_2) + (D_4 - D_3)}{4}$$

Keterangan:  $D_0$  = Parasitemia pada awal pengujian  
 $D_1 - D_4$  = Parasitemia pada hari ke-1 sampai Hari ke-4

**4.2.6 Analisis Data**

$ED_{50}$  adalah dosis efektif yang mampu menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*. Untuk menentukan nilai  $ED_{50}$  digunakan analisis probit dengan membuat kurva hubungan antara probit (*Probability unit*) persen penghambatan dengan logaritma kadar menggunakan persamaan garis regresi linear. (Phillipson, 1991)

## BAB V

### HASIL DAN PEMBAHASAN

#### 5.1. Hasil Ekstraksi Daun *Cassia siamea*

Dari 100 g serbuk kering daun *Cassia siamea* yang dimaserasi dengan pelarut etanol masing-masing 400 ml sebanyak 15 kali, diperoleh ekstrak etanol seberat 17 g.

#### 5.2. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria *in vivo* Pada Mencit

Hasil uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dapat dilihat pada tabel 5.1. dibawah ini.

**Tabel 5.1. Persen Parasitemia Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol *Cassia siamea***

Hari	Rep.	% Parasitemia					
		Ekstrak Etanol Daun <i>Cassia siamea</i> (mg/kg BB mencit)				K-	K+
		50	100	250	500		
D <sub>0</sub>	1	7,53	6,50	2,0	4,20	10,04	4,14
	2	4,35	5,56	3,28	9,84	6,86	4,42
	3	5,94	6,94	4,55	3,35	13,23	3,88
D <sub>1</sub>	1	9,55	5,55	5,06	2,96	12,85	1,84
	2	3,84	4,84	5,95	8,69	11,78	1,82
	3	6,69	4,96	6,84	4,10	13,92	1,66
D <sub>2</sub>	1	11,08	7,38	4,17	3,26	12,79	1,20
	2	6,48	5,9	5,34	9,16	9,91	1,28
	3	8,78	3,91	6,50	5,30	15,67	1,18
D <sub>3</sub>	1	10,76	8,73	3,93	6,23	16,72	0,46
	2	7,07	6,89	5,71	10,50	12,50	0,48
	3	8,92	7,5	7,49	6,02	20,95	0,44
D <sub>4</sub>	1	11,39	8,83	3,10	4,13	22,68	0,36
	2	9,54	6,8	4,53	9,11	16,04	0,40
	3	10,47	6,15	5,95	6,73	29,31	0,32

Keterangan

D<sub>0</sub> – D<sub>4</sub> : Pengamatan Hari ke-0 sampai hari ke-4

Rep : Replikasi

K- : Kontrol Negatif

K+ : Kontrol Positif

Hasil rata-rata persen pertumbuhan parasit (parasitemia) dapat dilihat pada tabel dibawah ini

**Tabel 5.2. Persen Parasitemia Rata-rata Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun *Cassia siamea***

Dosis (mg/kgBB mencit )	D <sub>0</sub>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>
50	5,94	6,69	8,78	8,92	10,47
100	6,50	5,55	7,38	8,73	8,83
250	3,28	5,95	5,34	5,71	4,53
500	5,80	5,25	5,91	7,58	6,66
K. Negatif	10,04	12,85	12,79	16,72	22,68
K. Positif	4,15	1,77	1,22	0,46	0,36

Keterangan :

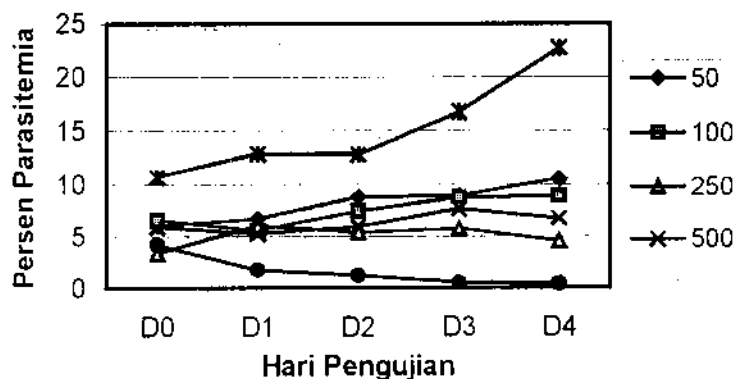
D<sub>0</sub> - D<sub>4</sub> : Pengamatan Hari ke-0 sampai hari ke-4

K<sub>-</sub> : Kontrol Negatif

K<sub>+</sub> : Kontrol Positif

Dari data tersebut diatas dibuat grafik hubungan persen parasitemia vs hari pengujian seperti pada gambar 5.1.

**Persen Parastemia Rata-rata mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun *Cassia siamea***



**Gambar 5.1. Grafik persen parasitemia ekstrak etanol daun *Cassia siamea* pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei***



Kemudian dari data diatas diperoleh rata-rata persen pertumbuhan parasit pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* yang telah diberi ekstrak etanol daun *Cassia siamea* seperti pada tabel 5.3. berikut.

**Tabel 5.3. Persen Pertumbuhan Parasit Rata-rata Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun *Cassia siamea***

Dosis (mg/kg BB)	Persen Pertumbuhan Parasit Rata-rata (%)
50	1,13
100	0,82
250	0,76
500	0,58
Kontrol Negatif	3,18

Selanjutnya dihitung persen penghambatan rata-rata dari mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* yang telah diberi ekstrak etanol daun *Cassia siamea* yang hasilnya dapat dilihat pada tabel 5.4.

**Tabel 5.4. Persen Penghambatan Rata-rata Mencit yang Diberi Ekstrak Etanol Daun *Cassia siamea***

Dosis (mg/kg BB)	Persen Penghambatan Rata-rata (%)
50	63,96
100	67,77
250	74,20
500	78,82

Dari data persen penghambatan diatas kemudian dianalisa dengan *Probit Analysis*. Hasil analisis probit menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun *Cassia siamea* dapat menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* pada mencit dengan nilai ED 50 sebesar 8.43 mg/kg BB . Grafik analisa probit dapat dilihat pada gambar dibawah ini

## PEMBAHASAN

Pada penelitian terdahulu telah dilakukan uji aktivitas antimalaria dari daun *Cassia siamea* secara *in vitro* menggunakan *Plasmodium falciparum* dan didapatkan hasil bahwa tanaman ini amat potensial dalam menghambat pertumbuhan *P. falciparum*. Oleh karenanya peneliti melanjutkan melakukan pengujian secara *in vivo* dengan harapan hasil yang didapat nantinya bisa lebih menggambarkan kondisi parasit sesungguhnya dalam tubuh inang dibandingkan uji aktivitas secara *in vitro*. Sebagai bahan uji awal yang dipakai adalah ekstrak etanol daun *Cassia siamea*.

Pada pengujian secara *in vivo*, digunakan metode Peter dan bukan metode Rane karena dengan metode Peter bisa didapatkan harga ED<sub>50</sub> dimana harga ini sebagai salah satu parameter yang penting untuk memutuskan apakah suatu ekstrak tanaman cukup prospektif sebagai antimalaria.

*Plasmodium* yang menginfeksi hewan pengerat seperti tikus, mencit, hamster, sebenarnya ada beberapa spesies, yaitu *Plasmodium berghei*, *Plasmodium vinckei*, *Plasmodium chabaudi*, dan *Plasmodium yoelli*. Diantara keempat jenis *Plasmodium* tersebut, dipilih *Plasmodium berghei*, karena *Plasmodium berghei* merupakan model yang sempurna untuk penelitian dan pengembangan parasit malaria secara *in vivo*. Hal ini dikarenakan *Plasmodium berghei* memiliki banyak kemiripan dengan *Plasmodium falciparum* yang menginfeksi manusia. Kemiripan tersebut meliputi: sebagian struktur gen DNA, tahapan siklus hidup, dan morfologi. Selain itu, *Plasmodium berghei* memiliki kemampuan dikembangkan secara *in vitro* untuk produksi skala besar, pemurnian dari tahap-tahap siklus hidupnya, serta sudah diketahui struktur gennya sehingga dapat dibuat modifikasi jalur mutasi gen. Keuntungan lainnya adalah sifat infeksi yang lebih cepat dan lebih ganas dibandingkan spesies lain yang menyerang rodensia, sehingga apabila ada efek penghambatan, selama 5 hari percobaan perubahan % parasitemia pada tiap harinya akan terlihat lebih jelas dibandingkan spesies yang perkembangannya lambat. (Carter and Diggs, 1977).

Pemilihan mencit sebagai hewan coba disebabkan kemiripan struktur anatomi fisiologi, fungsi metabolisme, karakteristik kesensitivan dan keresistenan terhadap senyawa obat dibandingkan dengan manusia. Selain itu, usia hidup mencit yang relatif

singkat, pemeliharaannya yang mudah, serta harganya yang relatif lebih ekonomis dibandingkan hewan coba lain menyebabkan mencit sangat sesuai digunakan sebagai hewan percobaan. (Carter and Diggs, 1977)

Pada percobaan ini mencit coba diinokulasi dengan parasit dari darah mencit donor bukan langsung dari simpanan beku parasit yang *dithawing*, hal ini dikarenakan pada simpanan beku, banyak parasit yang mati dan jumlahnya pun bervariasi sehingga menyulitkan penghitungan jumlah parasit yang diinjeksikan ke mencit coba

Jumlah parasit ini dibuat sama pada setiap mencit. Hal ini dimaksudkan agar mencit coba mempunyai persen parasitemia yang sama, sehingga kondisi mencit pada awal pengujian dapat diasumsikan sama. Kadar parasitemia awal uji aktivitas antimalaria dibuat antara 1% - 5%. Kadar parasitemia ini dimaksudkan agar tidak terjadi kematian hewan coba yang disebabkan oleh jumlah parasit yang terlalu tinggi. Selain itu, menurut Pusarawati (2000), infeksi *Plasmodium falciparum* pada sel darah manusia sebesar 5% atau lebih, sudah menunjukkan infeksi malaria yang serius. Dalam hal ini, *Plasmodium berghei* pada mencit diasumsikan mempunyai kondisi yang sama dengan *Plasmodium falciparum*, sehingga *Plasmodium berghei* dengan parasitemia 5% pada mencit dianggap sudah menunjukkan infeksi yang serius.

Melihat data % parasitemia pada hari pertama terlihat variasi yang cukup besar antar mencit walaupun jumlah eritrosit yang diinjeksikan dan volume penginjeksian sama. Hal ini menandakan adanya perbedaan fisiologis antar mencit yang cukup berpengaruh, kemungkinan adalah sistem imun dan luas tempat absorpsi di peritoniumnya. Faktor teknis yang mungkin terjadi adalah kurang bagusnya penginjeksian yang berupa kurang masuknya jarum sehingga bila hal ini terjadi kemungkinan akan mempengaruhi jumlah parasit yang masuk ke peredaran sistemik. Karenanya untuk meminimalisasi kesalahan teknis tersebut suspensi diinjeksikan dengan kadar yang encer dan volume yang cukup besar (200  $\mu$ l) karena apabila suspensi darah yang keluar lagi pekat, maka dalam volume yang sedikit tadi bisa mengandung parasit dalam jumlah yang besar.

Digunakannya klorokuin difosfat sebagai kontrol positif karena klorokuin adalah obat standar dalam pengobatan malaria di Indonesia (*drug of choice*), sedangkan dipilih dosis 10 mg/kg BB karena menurut penelitian Phillipson (1991) pada dosis ini sudah



terjadi penghambatan 100% terhadap *P. berghei* strain ANKA. Uji kontrol negatif dilakukan untuk menghindari positif palsu yang ditimbulkan pelarut, dan untuk mengetahui pertumbuhan parasit dalam tubuh mencit tanpa dipengaruhi faktor penghambatan pertumbuhan oleh senyawa yang diduga mempunyai aktivitas antimalaria. Kontrol negatif ini selanjutnya digunakan sebagai pembanding dalam perhitungan pertumbuhan parasit pada kontrol positif dan ekstrak etanol. Sedangkan sebagai bahan uji digunakan ekstrak etanol daun *Cassia siamea* dengan dosis sebesar 50, 100, 250, dan 500 mg/kg BB mencit

Berdasarkan data % parasitemia bisa diketahui bahwa semakin tinggi dosis ekstrak *Cassia siamea* yang diberikan maka semakin rendah pula pertumbuhan parasit, dengan puncak pada dosis 500 mg/kg BB persen penghambatan rata-rata mencapai 78,82%.

Selanjutnya dari pertumbuhan rata-rata parasit dilakukan penghitungan persen penghambatan pertumbuhan parasit dibandingkan dengan kontrol negatif. Dari hasil penghitungan diketahui bahwa ekstrak etanol daun *Cassia siamea* dosis 50, 100, 250, dan 500 mg/kg BB mencit memiliki persen penghambatan pertumbuhan parasit masing-masing sebesar 63,96% ; 67,77% ; 74,20 % dan 78, 82%. Menurut Krettli (2001) suatu ekstrak dikatakan aktif sebagai antimalaria secara *in vivo* bila mampu menghambat pertumbuhan parasit > 30 % . Jadi dari sini diketahui bahwa ekstrak etanol daun *Cassia siamea* sampai dosis terkecil percobaan, yaitu 50 mg/kg BB masih dikatakan aktif secara *in vivo* sebagai antimalaria.

Hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya aktivitas antimalaria diketahui dengan membuat grafik antara dosis dengan persen penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Selanjutnya dilakukan analisis probit sehingga diperoleh harga ED<sub>50</sub> dari ekstrak etanol daun *Cassia siamea* yang menunjukkan dosis efektif yang menghambat 50% pertumbuhan *Plasmodium berghei* dibandingkan kontrol negatif. Semakin kecil nilai ED<sub>50</sub>, maka semakin besar efektivitas ekstrak uji terhadap *Plasmodium berghei* secara *invivo*. Dari hasil analisa didapatkan bahwa harga ED<sub>50</sub> dari daun *Cassia siamea* adalah sebesar 8, 43 mg/kg BB.

Berdasarkan hasil diatas disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun *Cassia siamea* cukup potensial dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vivo*.

Karenanya perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui lebih jauh potensi dari daun *Cassia siamea* dengan melakukan fraksinasi dan isolasi serta mengujinya secara *m vivo* sehingga dapat diketahui kandungan zat aktif yang berkhasiat sebagai antimalaria.

## BAB VI

### KESIMPULAN DAN SARAN

#### 6.1. Kesimpulan

Ekstrak etanol daun *Cassia siamea* (Johar) mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei* secara *in vivo* pada mencit dengan harga ED<sub>50</sub> sebesar 8.43 mg/kg BB

#### 6.2. Saran

Perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui lebih jauh potensi dari daun *Cassia siamea* dengan melakukan fraksinasi dan isolasi serta mengujinya secara *in vivo* sehingga dapat diketahui kandungan zat aktifnya yang berkhasiat sebagai antimalaria.

### DAFTAR PUSTAKA

- Biswas KM. 1986. Cassiadinina Chromon Alkaloid and (+) - 6 - Hidroxymeleni A Dihydroisocoumarin from *Cassia siamea* Lamk. **Phytochemistry**. Vol. 25 : 1727 – 1730
- Carter and Diggs 1977. **Parasitic Protozoa** Vol. III Academic Press, New York. Hal. 359 - 465
- Dey P.M. and Harborne J.B (Ed.) 1991. Assays for Bioactivity **Methods in Plant Biochemistry** vol 6 Academic Press London. p 135 – 152
- El-Sayyad SM, Ross SA and Sayed HM, 1984. New isoquinolone alkaloids from the leaves of *Cassia siamea*. **J. of Natural Products**. Vol. 47 (4): 708 – 710
- Gbeassor et al. 1989. Antimalarial Effect of Eight African Medicinal Plants. **J. Ethnopharmacology** 25 (1) 115 - 118
- Hadi. 1997. Pengaruh ekstrak heksan, kloroform dan metanol kulit batang *Cassia siamea* Lamk terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum in vitro*. **Skripsi**. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya
- Harborne JB, Bouter D, Turner B, 1971. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London Academic Press. pp. 262 – 263
- Heyne K. 1987 **Tumbuhan Berguna Indonesia** Jilid 3. Terjemahan Badan Litbang Kehutanan. Jakarta hal. 926 - 927
- Kretthi Antonia U dkk 17 Desember 2002 **The Search for New Antimalarial Drugs from Plants Used to Treat Fever and Malaria for Plants Randomly Selected a Review**. [http://www.mcmomas.roe.fiac.it/~mcm/08\\_4336.html](http://www.mcmomas.roe.fiac.it/~mcm/08_4336.html)
- Mishra, SK., Satpathy, SK and Mohanty S 1999. Survey of Malaria Treatment and Death. **Bulletin of World Health Organization**.
- Phillipson JD and Wright CW. 1991. Antiprotozoal agents plant sources. **Planta Medica** 57 (1) 53 - 59
- Purwantoro E. 1997. Pengaruh fraksi heksan, kloroform dan metanol daun *Cassia siamea* Lamk terhadap pertumbuhan *Plasmodium falciparum in-vitro*. **Skripsi**, Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya.

- Sinden, RE. 1978 **Rodent Malaria**. Academic Press. London
- Wiwied E., Wahjo D., Yoes PD., and Subintam P., 2001. In Vitro antiplasmodial activity of alkaloid fraction of chloroform extract of *Cassia siamea* leaves. WHO UI. Jakarta
- Wiwied E., Wahjo D., Yoes PD., Uji Antimalaria In Vitro Dari Ekstrak Etanol, Kloroform Daun Cassia Siamea. Majalah Kedokteran Tropis Indonesia. Vol 12 No 12 September 2001
- Wiwied E., Aty W., Subintam P., 2002. Daya Skinzontosida Ekstrak Etanol, Ekstrak Kloroform dan Fraksi yang Positif Alkaloid daun Cassia Siamea Pada brakan in Vitro Plasmodium falciparum. Penelitian Dosen Muda (BBI). Lemlit Unair. Surabaya



Lampiran 1. Hasil Analisa Probit Akktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol daun  
*Cassia siamea* pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

DATA Information

4 unweighted cases accepted.  
1 cases rejected because of missing data.  
0 cases are in the control group.  
0 cases rejected because LOG-transform can't be done.

MODEL Information

ONLY Normal Sigmoid is requested.

\*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

Parameter estimates converged after 7 iterations.  
Optimal solution found.

Parameter Estimates (PROBIT model: (PROBIT(p)) = Intercept + BX):

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.44539	.17635	2.52558

	Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.
	-.41246	.38880	-1.06084

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = .035 DF = 2 P = .983

Since Goodness-of-Fit Chi square is NOT significant, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

## Observed and Expected Frequencies

	Number of	Observed	Expected		
DOSIS	Subjects	Responses	Responses	Residual	Prob
2.70	100.0	78.8	78.513	.307	.78513
2.40	100.0	74.2	74.395	-.195	.74395
2.00	100.0	67.8	68.379	-.609	.68379
1.70	100.0	64.0	63.467	.493	.63467

## \*\*\*\*\* PROBIT ANALYSIS \*\*\*\*\*

## Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00005	1.887399E-27	.03453
.02	.00021	1.018695E-24	.07650
.03	.00050	5.513417E-23	.12676
.04	.00099	1.109957E-21	.18537
.05	.00171	1.276046E-20	.25255
.06	.00272	1.019833E-19	.32863
.07	.00410	6.308888E-19	.41400
.08	.00591	3.225130E-18	.50915
.09	.00824	1.422188E-17	.61458
.10	.01119	5.573283E-17	.73087
.15	.03972	1.590726E-14	1.49893
.20	.10875	1.421085E-12	2.65593
.25	.25803	6.697028E-11	4.34406
.30	.56061	2.127621E-09	6.76731
.35	1.15060	.00000	10.22352
.40	2.27633	.00000	15.15960
.45	4.40472	.00002	22.27215
.50	8.43444	.00037	32.70946
.55	16.15082	.00648	48.54385
.60	31.25202	.11716	74.20360
.65	61.82845	2.17633	123.44739
.70	126.89799	32.74725	304.97813
.75	275.70158	139.96628	3531.44124
.80	654.16529	282.38206	134921.08450
.85	1790.95694	536.88085	11233104.8186
.90	6359.62136	1139.35617	3098433227.51
.91	8636.87283	1361.54363	12083335536.0
.92	12043.75110	1650.78903	53048221871.4
.93	17359.73451	2038.47240	270079624901
.94	26114.21192	2577.83978	1664434493433
.95	41603.23547	3366.37337	1.325496E+13
.96	71902.67391	4602.02531	1.518648E+14
.97	140885.43121	6752.22472	3.047155E+15
.98	344500.70865	11226.28194	1.643610E+17
.99	1410057.62103	24967.72592	8.837762E+19

21 Agu 2005

AMEI VN

MIIE  
PERPUSTAKAAN  
UNIVERSITAS AIRLANGGA  
SUABAYA