

SKRIPSI

RULLY YULIANDHARI

**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA *IN VIVO*
EKSTRAK DIKLOROMETANA DAN METANOL
BIJI *KOPSIA ARBOREA* BL TERHADAP
PLASMODIUM BERGHEI PADA MENCIT**



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
BAGIAN ILMU BAHAN ALAM
SURABAYA
2004**

LEMBAR PENGESAHAN

**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA *IN VIVO*
EKSTRAK DIKLOROMETANA DAN METANOL
BIJI *KOPSIA ARBOREA* BL TERHADAP
PLASMODIUM BERGHEI PADA MENCIT**

SKRIPSI

**Dibuat untuk Memenuhi Syarat
Mencapai Gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2004**

Oleh :

RULLY YULIANDHARI

NIM : 050012301

Skripsi ini telah Disetujui

Oleh :

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta

Dra. Aty Widyawaruyanti, Apt, MSi.

NIP. 131 877 884

Drs. H. Achmad Fuad, Apt, MS.

NIP. 130 937 972

KATA PENGANTAR

Dengan mengucapkan syukur kehadirat Allah SWT yang telah memberikan rahmat serta petunjukNya kepada penulis sehingga berhasil menyelesaikan skripsi yang berjudul Uji Aktivitas Antimalaria *In vivo* Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji *Kopsia arborea* Bl terhadap *Plasmodium berghei* pada Mencit. Atas perkenan-Nya lah penulisan skripsi ini dapat disusun.

Keberhasilan dalam penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Atas saran, dukungan, bimbingan, dan motivasi dari pihak-pihak tersebut maka pada kesempatan ini saya ingin menyampaikan terima kasih dan penghargaan yang setinggi-tingginya kepada :

1. Bapak Prof.Dr.Med.dr.H.Purohito selaku Rektor Universitas Airlangga
2. Bapak Prof.Dr.Noor Cholies Zaini, Apt selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
3. Ibu Dra. Aty Widyawaruyanti, Apt, MS selaku pembimbing utama yang selalu memberikan arahan dan motivasi kepada penulis serta membantu dalam pengadaan literatur-literatur dan informasi yang mendukung penelitian ini
4. Bapak Drs. H. Achmad Fuad, Apt, MS selaku pembimbing serta yang selalu memberikan arahan dan motivasi kepada penulis serta membimbing dalam penguasaan materi
5. Dirjen DIKTI atas bantuan dana penelitian melalui penelitian DP3M/HB11/2003-2004
6. Ibu Dr. Hj. Mangestuti Agil, Apt, MS dan Ibu drh. Suhintam Pusarawati, M.Kes yang telah bersedia meluangkan waktu untuk menguji dan memberikan masukan untuk kesempurnaan skripsi ini
7. Ayah Suhari dan Ibu Choirul Rofiah yang tidak pernah berhenti berdoa untuk kelancaran studi dan kesuksesan putrinya serta adik saya tersayang Chory Febrian Shari yang turut mendukung kelancaran penyelesaian skripsi ini
8. Kepala Bagian Laboratorium Bahan Alam dan Laboratorium Hewan atas fasilitas yang disediakan
9. Kepala Laboratorium Malaria Tropical Disease Center Kampus C Universitas Airlangga atas fasilitas yang diberikan

10. Teman-teman satu proyek "malaria" dalam pengerjaan skripsi meliputi Agriana, Diana, Dina, Endah, Fitri F, Fitri Y dan Umi
11. Cha-cha, Emil, Elli, Emi, Ezra, Ika, Kusnul, Mbak Lusi, Mbak Dian, Mbak Esti, Mas Elvin, Variati atas dukungan dan doanya
12. Seluruh pihak-pihak yang terkait dalam penyelesaian skripsi ini yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu yang turut membantu keberhasilan skripsi ini Hanya Allah SWT yang dapat membalas kebaikan pihak-pihak tersebut di atas.

Akhirnya dengan segala kerendahan hati, saya berharap semoga skripsi ini dapat bermanfaat bagi masyarakat pada umumnya dan dunia kefarmasian pada khususnya. Semoga skripsi ini dapat memberikan kontribusi bagi perkembangan dan kemajuan dalam bidang pengobatan di masa yang akan datang.

Surabaya, Agustus 2004

Penulis

RINGKASAN

Penyakit malaria sampai saat ini masih merupakan problem kesehatan di dunia, termasuk di Indonesia. WHO memperkirakan sekitar 300-500 juta penduduk di dunia terserang penyakit ini setiap tahunnya (WHO, 1997). Di Indonesia malaria tergolong problem kesehatan masyarakat dengan tingkat mortalitas tinggi, terutama di luar Pulau Jawa dan Bali yaitu daerah-daerah endemis tinggi. Hal ini disebabkan terjadinya resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap beberapa obat malaria khususnya klorokuin.

Kopsia arborea Bl atau dikenal dengan nama pronojiwo merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai macam penyakit dan bila ditinjau dari kandungan kimianya atau pendekatan secara kemotaksonomi yaitu tanaman satu suku Apocynaceae bahwa *Kopsia arborea* Bl mengandung alkaloid, flavonoid, saponin serta terpenoid dan penelitian lain menyebutkan bahwa kandungan tersebut mempunyai aktivitas sebagai antimalaria (Sutaryo, 1994).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak DCM dan metanol dari biji pronojiwo pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan cara menentukan harga ED₅₀. Uji aktivitas antimalaria ini dilakukan secara *in vivo* dengan menggunakan modifikasi metode Peter (1977), *The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*.

Bahan yang digunakan adalah ekstrak DCM dan metanol biji *Kopsia arborea* Bl. Untuk mendapatkan bahan tersebut dilakukan ekstraksi dengan cara maserasi yaitu dengan menggunakan pelarut DCM dan metanol secara berkesinambungan. Ekstrak kental kemudian dibuat suspensi dengan dosis 0,5-200 mg/kg BB mencit. Untuk ekstrak DCM dengan rentang dosis 0,8-160 mg/kg BB mencit sedangkan untuk ekstrak metanol dengan rentang dosis 1-75 mg/kg BB mencit. Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin difosfat dosis 10 mg/kg BB mencit. Dan sebagai kontrol negatifnya digunakan larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 %. Masing-masing bahan diatas diberikan perhari secara oral selama 4 hari berturut-turut.

Hasil uji diamati dengan cara membuat preparat hapusan darah tipis dari hari ke-0 sampai hari ke-6 (D₀-D₆) dengan pewarnaan Giemsa pada gelas objek dan dihitung jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit dalam minimal 5.000 eritrosit dengan mikroskop perbesaran 1.000 kali. Data yang didapat kemudian dianalisis dengan komputer program SPSS for windows 10.0 untuk menentukan harga ED₅₀.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa persen penghambatan larutan klorokuin difosfat sampai hari ke-6 sebesar 100 %. Untuk ekstrak DCM pada dosis 0,8016 mg/kg BB mencit; 1,6032 mg/kg BB mencit; 8,0160 mg/kg BB mencit; 48,0960 mg/kg BB mencit; 80,1600 mg/kg BB mencit dan 160,3200 mg/kg BB mencit menunjukkan persen penghambatan terhadap *Plasmodium berghei* masing-masing sebesar 14,09 %; 19,24 %; 37,28 %; 44,24 %; 53,94 % dan 60,00 %. Dosis 160,3200 mg/kg BB mencit menunjukkan persen penghambatan terbesar. Sedangkan untuk ekstrak metanol pada dosis 1,0012 mg/kg BB mencit; 5,0060 mg/kg BB mencit; 10,0120 mg/kg BB mencit; 25,0300 mg/kg BB mencit; 50,0600 mg/kg BB mencit dan 75,0900 mg/kg BB mencit menunjukkan persen penghambatan terhadap *Plasmodium berghei* masing-masing sebesar 9,76 %; 26,22 %; 35,37 %; 48,17 %; 66,87 % dan 80,49 %. Dosis 75,0900

mg/kg BB mencit menunjukkan persen penghambatan terbesar. Hasil analisis probit menunjukkan harga ED_{50} ekstrak DCM biji pronojiwo sebesar 57,06942 mg/kg BB mencit dan ekstrak metanol sebesar 19,38764 mg/kg BB mencit. Dari hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak DCM maupun ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vivo*.

Dari penelitian ini disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut terhadap ekstrak DCM dan ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vitro* pada mencit serta melakukan isolasi senyawa aktif yang berfungsi sebagai antimalaria.

ABSTRACT

Kopsia arborea Bl is empirically used as tradisional drug in some cities in Indonesia. *Kopsia arborea* Bl is Apocynaceae's family. Based on chemotaxonomy *Kopsia arborea* Bl contain alkaloid, flavonoid and terpenoid. Thus substances has antimalarial activity which had proved in some experiments, so can be noted that *Kopsia arborea* Bl has antimalarial. Dichloromethane and Methanol extract of *Kopsia arborea* Bl were used to study antimalarial effect using *in vivo* model, Peter's test (*The 4-Day Suppressive Test of Blood Schizontocidal Action*).

Female mice weighing 18-35 g were used in this experiment. Blood from donor mice with parasitemia $\geq 20\%$ were diluted in alcheivers medium (1: 3) and buffer phosphat were added and waiting approximately three days or get infected red blood cells 5 % and after that each mice receive 0,2 ml parasit suspension intraperitoneally.

The plant extract were suspended with 0,5 % CMC Na and DMSO 0,8 %. The doses ranging for dichloromethane extract between 0,8 – 160 mg/kg body weight and for methanol extract between 1 – 75 mg/kg body weight. The extract were administrated daily from initial day after infection for four days by oral route. In the $D_0 - D_6$ blood were taken from tail and then stained with Giemsa and parasitised red cells were counted.

Treated animals showed a lower parasitemia compared with untreated animals. This extract was active againts *Plasmodium berghei*, it showed inhibition for dichlorometane extract up to 60,00 % and for methanol extract up to 80,49 %. ED_{50} value was calculated from log dose/probit activity. ED_{50} of DCM extract of *Kopsia arborea* Bl was 57,06942 mg/kg body weight and from methanol extract was 19,38764 mg/kg body weight.

Key words : *Kopsia arborea* Bl., Apocynaceae, *Plasmodium berghei*, antimalarial

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
KATA PENGANTAR.....	iii
RINGKASAN.....	v
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
DAFTAR SINGKATAN.....	xiv
 BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Manfaat Penelitian.....	5
 BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan tentang <i>Kopsia arborea</i> Bl (Apocynaceae).....	6
2.1.1 Klasifikasi <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	6
2.1.2 Penyebaran <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	6
2.1.3 Morfologi <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	7
2.1.4 Kandungan <i>Kopsia arborea</i> Bl.	7
2.1.5 Khasiat <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	7
2.2 Tinjauan Beberapa Senyawa Antimalaria dari Tanaman.....	8
2.3 Tinjauan tentang Malaria.....	10
2.4 Tinjauan tentang <i>Plasmodium berghei</i>	11
2.4.1 Klasifikasi <i>Plasmodium berghei</i>	11
2.4.2 Siklus Hidup <i>Plasmodium berghei</i>	11

2.4.3 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	15
2.4.4 Pembiakan <i>in vivo Plasmodium berghei</i>	16
2.5 Tinjauan tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman secara <i>in vivo</i>	18
2.6 Tinjauan Tentang Mencit.....	18
2.7 Klasifikasi Antimalaria.....	19
2.8 Tujuan Pengobatan.....	20
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL	
3.1 Landasan Teoritik.....	22
3.2 Bagan Kerangka Konseptual.....	24
BAB IV BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN	
4.1 Bahan Penelitian.....	25
4.1.1 Bahan Tanaman.....	25
4.1.2 Bahan Pembanding.....	25
4.1.3 Binatang Percobaan.....	25
4.1.4 Suspensi Parasit.....	25
4.1.5 Bahan Lain untuk Uji Antimalaria <i>in vivo</i>	25
4.1.6 Pelarut.....	26
4.2 Alat – alat	26
4.2.1 Alat untuk Ekstraksi.....	26
4.2.2 Alat Untuk Uji Antimalaria <i>in vivo</i>	26
4.3 Metode Penelitian.....	26
4.3.1 Pembuatan Ekstrak DCM dan Metanol <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	26
4.3.2 Perlakuan Terhadap Binatang Percobaan.....	27
4.3.3 Penginfeksian Mencit Donor dan Mencit Perlakuan dengan <i>Plasmodium berghei</i>	29
4.3.4 Skrining Fitokimia.....	29
4.3.4.1 Identifikasi senyawa golongan alkaloid.....	29
4.3.4.2 Identifikasi senyawa golongan glikosida saponin.....	30
4.3.4.3 Identifikasi senyawa golongan steroid dan terpenoid.....	30
4.3.2.4 Identifikasi senyawa flavonoid.....	31

4.3.5 Penyiapan Suspensi Ekstrak Uji.....	32
4.3.6 Penyiapan Larutan Kontrol Positif.....	33
4.3.7 Penyiapan Larutan Kontrol Negatif.....	34
4.3.8 Pengujian Aktivitas Antimalaria <i>In vivo</i>	34
4.4 Evaluasi.....	34
4.4.1 Pembuatan Sediaan Pewarna Giemsa.....	34
4.4.2 Pembuatan Preparat Darah Tipis.....	35
4.4.3 Penghitungan Persen Parasitemia.....	35
4.5 Analisis Data.....	35
4.6 Skema Pembuatan Suspensi Uji Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	36
4.7. Skema Penyiapan Parasit dan Uji Aktivitas Antimalaria.....	37
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Pembuatan Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji <i>Kopsia</i> <i>arborea</i> Bl.....	38
5.2 Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji.....	38
5.3 Hasil Penimbangan Mencit.....	39
5.4 Hasil Uji Antimalaria.....	40
5.5 Hasil Skrining Fitokimia.....	41
5.6 Analisis Data.....	50
BAB VI PEMBAHASAN	52
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN	
7.1 Kesimpulan.....	55
7.2 Saran.....	55
DAFTAR PUSTAKA	56
LAMPIRAN	60

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
V.1 Pembuatan Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	38
V.2 Hasil Pembuatan Suspensi Ekstrak Diklorometana dan Ekstrak Metanol Biji <i>Kopsia arborea</i> Bl dan kontrol.....	39
V.3 Berat Mencit (gram) dan Volume Suspensi Ekstrak DCM (ml)	39
V.4 Berat Mencit (gram) dan Volume Suspensi Ekstrak Metanol (ml)	40
V.5 Persen Parasitemia dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan Kontrol.....	45
V.6 Persen Parasitemia dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo dan Kontrol.....	46
V.7 Persen Parasitemia Rata-rata dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan Kontrol.....	47
V.8 Persen Parasitemia Rata-rata dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo dan Kontrol.....	48
V.9 Persen Pertumbuhan Parasit dan Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan Kontrol.....	49
V.10 Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo	49
V.11 Persen Pertumbuhan Parasit dan Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan Kontrol.....	50
V.12 Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo	50
V.13 Harga ED ₅₀ dari Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji Pronojiwo dan Klorokuin difosfat.....	51

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
3.1 Bagan Kerangka Konseptual.....	24
4.1 Skema Perlakuan terhadap Binatang Percobaan.....	27
4.2 Skema Pembuatan Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	36
4.3 Skema Persiapan Parasit dan Uji Aktivitas Antimalaria.....	37
5.1 Kromatogram Hasil KLT Ekstrak Diklorometana.....	42
5.2 Kromatogram Hasil KLT Ekstrak Metanol.....	44
5.3 Grafik Persen Parasitemia vs Hari Pengamatan untuk Ekstrak DCM.....	47
5.4 Grafik Persen Parasitemia vs Hari Pengamatan untuk Ekstrak Metanol..	48
5.5 Kurva Hubungan Probit Persen Penghambatan dengan Logaritma Dosis	51

DAFTAR LAMPIRAN

	halaman
Lampiran 1 Gambar tanaman <i>Kopsia arborea</i> Bl (Apocynaceae).....	60
Lampiran 2 Surat Keterangan Identifikasi <i>Kopsia arborea</i> Bl.....	61
Lampiran 3 Morfologi <i>Plasmodium berghei</i>	62
Lampiran 4 Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji.....	63
Lampiran 5 Pembuatan Kontrol Positif.....	65
Lampiran 6 Volume Suspensi Ekstrak Uji.....	66
Lampiran 7 Persen Parasitemia.....	67
Lampiran 8 Persen Pertumbuhan Parasit Rata rata.....	70
Lampiran 9 Persen Penghambatan.....	71
Lampiran 10 Hasil Analisis Probit.....	72

DAFTAR SINGKATAN

CMC Na	: Carboxy Methyl Cellulose Natrium
DCM	: Dichloromethane
DMSO	: Dimethyl Sulfoxide
ED ₅₀	: Effective Dose 50
LUMC	: Leiden University Medical Center
PUSVETMA	: Pusat Veterinaria Farma
WHO	: World Health Organization

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit malaria sampai saat ini masih merupakan problem kesehatan di dunia, termasuk di Indonesia. Pada tahun 1994, sekitar 2,3 milyar penduduk (41 % dari total penduduk dunia) tinggal di daerah dengan resiko terkena malaria. WHO memperkirakan sekitar 300-500 juta penduduk di dunia terserang penyakit ini pada setiap tahunnya (WHO, 1997). Menurut Depkes RI, diperkirakan 30 juta penderita dan 120.000 kematian dilaporkan setiap tahunnya di Indonesia (Soejoeti.Z, 1995).

Malaria merupakan penyakit infeksi parasit utama di dunia yang mengenai hampir 170 juta orang tiap tahunnya. Penyakit ini juga berjangkit di hampir 103 negara, terutama negara-negara di daerah tropik dan subtropik. Di Indonesia, malaria tergolong problem kesehatan masyarakat dengan tingkat mortalitas tinggi. Penyakit ini berjangkit di semua pulau di Indonesia, mulai dari dataran rendah sampai dataran tinggi, baik di desa maupun di kota. Sebagian penduduk di 20 provinsi di Indonesia terjangkit malaria. Lebih dari 40 juta penduduk Indonesia bermukim di daerah endemik malaria. (Mursito, 2002)

Di Indonesia, malaria masih merupakan problem kesehatan masyarakat terutama di luar pulau Jawa dan Bali yaitu daerah-daerah endemis tinggi seperti Sulawesi Selatan, Irian Jaya, Maluku, Timor-Timur, Nusa Tenggara Timur, Sulawesi Tengah dan Riau yaitu provinsi-provinsi yang mempunyai “parasit rate”(Depkes, 1990). Data lain yaitu telah terjadi kejadian luar biasa (KLB) di kecamatan Batang Angola Tapanuli Selatan pada bulan Mei 1992 terkena wabah malaria dan tercatat 38 orang meninggal dunia dari 3.000 orang yang terserang malaria. Tapanuli Selatan merupakan daerah rawan malaria dan menduduki urutan ke-3 setelah Irian Jaya dan Kalimantan Timur. Selain Tapanuli Selatan Asahan dan Sibolga juga merupakan daerah endemik malaria (Sudomo, 1994).

Malaria adalah penyakit infeksi parasit yang dapat menular kepada manusia sehat melalui gigitan nyamuk *Anopheles* yang mengandung parasit. Sehingga selain faktor parasit, penularan penyakit malaria dipengaruhi juga oleh faktor manusia (host) dan nyamuk *Anopheles* (vektor) beserta lingkungan, baik lingkungan sosial ekonomi, lingkungan biologik, dan lingkungan fisik (Soejoeti, 1995).

Sejak tahun 1973, di Indonesia telah dilaporkan adanya kasus-kasus malaria yang resisten terhadap klorokoin di luar pulau Jawa dan Bali. Semakin hari semakin banyak dilaporkan kasus-kasus malaria yang resisten terhadap klorokuin, antara lain Kalimantan Timur, Irian Jaya, Lampung, Sumatera Selatan, kabupaten Jepara, Jawa Tengah. Akhir-akhir ini telah dilaporkan pula adanya kasus-kasus malaria yang resisten terhadap klorokuin di daerah Bali, Jawa Timur, Jawa Barat, DKI Jakarta, Sulawesi, Nusa Tenggara Timur dan juga daerah Timor Timur (Lestadi, 1983).

Penelitian mengenai penyakit *malaria falciparum* yang resisten terhadap klorokuin telah banyak dilakukan di Indonesia, tetapi penelitian mengenai pengobatan dan pencegahan terhadap penyakit malaria di daerah endemis malaria yang telah resisten terhadap klorokuin masih perlu pengembangan dan perlu lebih digiatkan lagi (Lestadi, 1983).

Malaria adalah suatu penyakit parasitik yang disebabkan oleh sejenis protozoa dari kelas sporozoa yang termasuk dalam genus *Plasmodium*. Ada empat jenis *Plasmodium* yang menginfeksi manusia yaitu *Plasmodium falciparum* yang menyebabkan malaria tropika (malaria yang paling berat), *Plasmodium vivax* yang menyebabkan malaria tertiana (demam berkala setiap hari ke-3), *Plasmodium malariae* yang menyebabkan malaria kuartana (demam berkala setiap hari ke-4) yang biasanya disertai sindrom nefrotik dan *Plasmodium ovale* (jarang ditemukan). Dari keempat *Plasmodium* tersebut *Plasmodium falciparum* adalah spesies yang paling umum menginfeksi manusia di daerah tropis dan subtropis dan merupakan penyebab malaria terberat dan menyebabkan kematian. Gejala klinis serta patogenitas yang dapat timbul adalah demam yang tinggi, berkeringat, konvulsi, anemia, pembesaran limpa, gagal ginjal, pembesaran hati, edema

pulmoner akut serta koma pada malaria serebral berupa metabolik atau anestetik encephalopati. (Sherman W.I, 1998; Merlin, 2000; Sudomo.M., 1994).

Obat malaria yang tertua adalah kuinin dari kulit pohon kina (*Chincona sp.*) yang dikenal sejak abad ke-17. Kemajuan di bidang kimia sintetik menyebabkan kuinin digantikan oleh klorokuin. Selain itu telah dilaporkan kasus *Plasmodium falciparum* yang resisten *in vitro* terhadap kina yang ditemukan di 5 provinsi di Indonesia (Jawa Barat, Jawa Tengah, NTT, Irian Jaya dan Kalimantan Timur). Kasus *Plasmodium vivax* resisten *in vivo* terhadap kina pada penderita paska transfusi juga telah ditemukan di sebuah Rumah Sakit di DKI Jakarta. Penggunaannya yang selektif, kurang disukai karena memerlukan waktu yang agak lama (7 hari) dan efek samping yang ditimbulkan (Tjitra, 1994). Tidak jauh berbeda dengan kina, ternyata resistensi terhadap klorokuin secara simultan juga terjadi pada awal tahun 1960 di daerah hiperendemik malaria pada perbatasan Thailand-Kamboja serta perbatasan Kolombia dan Venezuela (Harinasuta, 1961; Young & Moore, 1961). Sedangkan di Indonesia resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin ditemukan di luar pulau Jawa dan Bali yaitu pada tahun 1973 (Pribadi, 1977).

Kopsia arborea Bl atau dikenal sebagai pronojiwo merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk pengobatan berbagai macam penyakit, diantaranya adalah sebagai obat TBC, sakit kepala sebelah/migrain, mual, lemah syahwat (afrodisiak), liver, asma, diabetes, mengatasi badan lemah dan kencing kurang lancar serta antikanker (Mardisworo.S, 1985; Anonim, 1992; Intaningrum, 1994;Widyawati, 1996). *Kopsia arborea* Bl mengandung senyawa dari golongan alkaloid yaitu alkaloid indol, golongan terpenoid dan flavonoid (Depkes RI, 1995; Syeni, 1992).

Berdasarkan pendekatan kemotaksonomi, tanaman satu suku, Apocynaceae yaitu tanaman *Plumeria rubra* (kemboja) yang mengandung saponin yang mempunyai aktivitas antimalaria, selain itu dari tanaman *Alstonia scholaris* yang mengandung porfirin dan triterpen, *Alstonia macrophylla* dengan kandungan indol alkaloid yang juga mempunyai aktivitas antimalaria (Nahrstedt, 1999) serta *Vinca rosea* (tapak dara) dengan kandungan zat aktif saponin, alkaloid indol dan flavonoid yang berkhasiat sebagai antimalaria (Boesri, 1994) *Rauvolfia*

heterophylla dan *Allamanda cathartica* dengan kandungan alkaloid indol (Seigler, 2003) dan ditunjang oleh adanya penelitian yang menunjukkan bahwa senyawa-senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antimalaria (Sutaryo, 1994) maka dianggap perlu untuk mencari alternatif antimalaria yang lain yaitu *Kopsia arborea* Bl yang juga merupakan tanaman suku Apocynaceae.

Pada penelitian ini akan dilakukan uji aktivitas antimalaria dari ekstrak diklorometana biji *Kopsia arborea* Bl. Akan diamati daya hambatnya terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* strain ANKA *in vivo* pada mencit.

Penelitian aspek parasitologi, kemoterapi dan imunologi atau pengembangan vaksin penyakit malaria banyak menggunakan malaria pada rodent sebagai model ; rodent merupakan binatang percobaan yang mudah ditangani, banyak keturunannya dan mudah dalam pemeliharaan. Hal ini diperkuat dengan adanya analisa molekuler yang menemukan persamaan antara malaria pada rodent tersebut dengan *Plasmodium falciparum* (Tuti.S., 1991).

Plasmodium berghei adalah suatu hemoprotektozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodentia, terutama rodentia kecil misalnya mencit. Penelitian mengenai imunologi dan aktivitas antimalaria banyak menggunakan *Plasmodium berghei* dan mencit sebagai induk semangnya (Dewi.RM, Sulaksono.E, 1994). Selain itu, telah tersedia kultivasi *in vitro* dalam skala besar, data pengaturan gen dan struktur gen, metode untuk memodifikasi parasit secara genetis dan klon-klon yang khas serta galur-galur mutan yang dimodifikasi secara genetis (Anonim, 2003).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak diklorometana dan metanol biji pronojiwo (*Kopsia arborea* Bl) mempunyai aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium berghei in vivo* pada mencit.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk :

1. Tujuan Umum

Menguji aktivitas antimalaria ekstrak diklorometana dan ekstrak metanol biji pronojiwo (*Kopsia arborea* Bl) terhadap *Plasmodium berghei* *in vivo* pada mencit.

2. Tujuan Khusus

Menentukan harga ED₅₀ dari ekstrak diklorometana dan metanol biji pronojiwo (*Kopsia arborea* Bl) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vivo* pada mencit.

1.4 Hipotesis

Ekstrak diklorometana dan metanol biji pronojiwo (*Kopsia arborea* Bl) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vivo* pada mencit.

1.5 Manfaat Penelitian

1. Memberikan informasi ilmiah tentang tanaman *Kopsia arborea* Bl sebagai dasar pengembangan obat malaria, khususnya dari bahan alami nabati yang merupakan tanaman asli Indonesia.
2. Meningkatkan daya guna *Kopsia arborea* Bl sebagai bahan baku obat alami khususnya sebagai antimalaria.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan tentang *Kopsia arborea* Bl (Apocynaceae)

2.1.1 Klasifikasi *Kopsia arborea* Bl adalah sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Class	: Dycotyledoneae
Sub class	: Sympetalae
Ordo	: Apocynales
Family	: Apocynaceae
Sub family	: Plumerioideae
Genus	: <i>Kopsia</i>
Spesies	: <i>Kopsia arborea</i> Bl (Backer, 1965)

2.1.2 Penyebaran *Kopsia arborea* Bl

Kopsia arborea Bl atau juga dikenal sebagai pronojiwo terdapat di hutan bagian negara Amerika Serikat, hutan Montana, Bhutan/Shikkim Himalaya, sungai Guangdong, S.E Guangxi, Hainan, sungai Yunan (Indonesia, Filipina, Malaysia, Thailand, Vietnam, Australia) serta kawasan India dan Farnosa.(Peter.S.A, 2003; Sastrapadja, 1984; Anonim, 2003).

Pohon ini tumbuh liar di lereng-lereng gunung di Jawa serta tempat-tempat lain dengan ketinggian antara 1.300-2.000 meter di atas permukaan laut. Selain tumbuh liar di hutan-hutan di Jawa, pohon pronojiwo juga tumbuh di hutan Sumatera dan lebih banyak ditemukan di pulau Bali. Tumbuhan ini di Jawa lebih dikenal dengan nama pronojiwo, purwojiwo atau palakiya sedangkan di Bali lebih dikenal dengan nama purnajiwa (Sastrapadja, 1984).

2.1.3 Morfologi *Kopsia arborea* Bl

Tanaman *Kopsia arborea* Bl ini dapat tumbuh di hutan pada ketinggian 50 – 1.500 meter di atas permukaan air laut. Merupakan tanaman berkayu berupa pohon dengan tinggi 8,00 - 10,00 meter, bergetah putih. Daunnya berupa daun tunggal berhadapan, jorong memanjang, berbentuk lancet 2 dan bertepi rata, berbentuk ellips dengan ujung meruncing (*acuminatus*), panjang daun 10 - 21,5 cm dan lebar daun 3,5 - 7 cm. Pangkal daun runcing, tulang daun letaknya agak jauh dari tepi daun dan pada kedua sisinya mempunyai 8 - 12 tulang. Panjang tangkai daun 0,75 - 1,5 cm. Bunga tersusun dalam malai rata hampir duduk dengan tangkai bunga sangat pendek. Kelopak kecil tanpa kelenjar. Mahkota berbentuk terompet dengan panjang tabung 1,5 - 2 cm dan lebarnya 1,25 - 1,5 mm. Warna mahkota putih atau pink terang dengan segmen memanjang dengan taji 1 - 1,5 cm. Benang sari dalam pelebaran tabung mahkota, tangkai sari kecil, bakal buah licin, bakal buah dua. Buah batu 1 - 2 berbentuk ellips berwarna hitam. Daging buah lekat. Panjang tangkai bunga adalah 3 - 7 mm. (Backer, 1965)

2.1.4 Kandungan *Kopsia arborea* Bl

Biji *Kopsia arborea* Bl mengandung senyawa dari golongan alkaloid indol, flavonoid serta golongan terpenoid (Varea, 1993; Sastrapadja, 1984; Depkes RI, 1995; Hegnauer, 1966). Zat kandungan utama dari *Kopsia arborea* Bl adalah alkaloid yang berstruktur dasar indolalkaloid dengan tipe Aspidospermin (Kopsin, Vallesin, Apidospermin, Polosin, Pirifolin, Pirifolidin, Refraktidin, Refraktin, Aspidofraktin, Kopsinin, Kopsinilalkohol) (Chatterjee, A, 1979; Saha, 1975).

2.1.5 Khasiat *Kopsia arborea* Bl

Biji-biji *Kopsia arborea* Bl digunakan untuk jamu yang berkhasiat menyembuhkan TBC, sakit kepala, mual-mual, kencing kurang lancar, lemah syahwat (afrodisiak), antikanker, diabetes, liver dan asma. (Mardisiswojo, S, 1985; Widyawati, 1996; Intaningrum, 1994; Anonim, 1992). Sedangkan akarnya yang telah ditumbuk halus dipakai sebagai obat tapal luka bila terkena gigitan ular (Afriastini, 1984). Dekokta dari kulit kayunya digunakan sebagai enema,

sedangkan daun dan buahnya digunakan untuk mengobati tonsilitis dan sakit tenggorokan (Anonim, 2003)

2.2 Beberapa Senyawa Antimalaria dari Tumbuhan

Dari beberapa tumbuhan telah berhasil diisolasi senyawa yang berkhasiat sebagai antimalaria, senyawa-senyawa tersebut ialah :

- A. Golongan alkaloid
- B. Golongan terpenoid
- C. Golongan flavonoid dan khalkon

A. Golongan alkaloid

1. Alkaloid dengan inti kuinolin

Kulit batang *Cinchona* sp. suku Rubiaceae telah dikenal dengan sebagai antimalaria sejak abad ke-17 dan pada tahun 1820 berhasil diisolasi zat yang aktif sebagai antimalaria adalah alkaloid dengan inti kuinolina, yaitu kinina, kinidina, sinkonina, sinkonidina. Beberapa jenis *Cinchona* yang sampai sekarang digunakan sebagai antimalaria adalah : *Cinchona succirubra* *Cinchona calisaya*, dan *Cinchona micrantha* (Sutaryo, 1994).

2. Alkaloid dengan inti isokinolina

Alkaloid bisbensilisokuinolina, yaitu feantina, piknamina, aromalina, yang terdapat dalam *Triclisia patens* suku Menispermaceae yang digunakan sebagai antimalaria di Sierra Leone.

Alkaloid bisbensilisokuinolina lain adalah tiliakorina, tiliakorinina, nortiliakorinina A, yang diisolasi dari tumbuhan antimalaria di Thailand, yaitu *Tiliacora triandra* suku Menispermaceae (Sutaryo, 1994).

3. Alkaloid dengan inti indol

Usambarensina dari derivat 3-4-dhidro-usamberina dan derivat 18-19-dihidronya yang diisolasi dari *Strichnos usambarensis* suku Loganiaceae. Vinblastina yang terdapat dalam *Vinca rosea* suku Apocynaceae (Sutaryo, 1994).

4. Alkaloid akridona dan senyawa alkaloid lainnya

Kulit akar *Margaritaria discoidea* (Baill.) Webster suku Euphorbiaceae yang tumbuh di Tanzania mengandung alkaloid yang bersifat antimalaria yaitu sekurinina.

Suatu alkaloid pirolisidiana yang terdapat dalam *Gynura segetum* suku Asteraceae (Tang, 1980) mempunyai sifat antimalaria (Sutaryo, 1994).

B. Golongan Terpenoid

1. Senyawa seskuiterpen

Dari tanaman *Artemisia annua* suku Asteraceae, tahun 1972 berhasil diisolasi artemisin (qinghaosu) suatu seskuiterpen lakton yang sangat potensial sebagai antimalaria.

Lima (5) senyawa seskuiterpen berhasil diisolasi dari umbi *Cyperus rotundus* suku Cyperaceae yang tumbuh di Tanzania, dua diantaranya yaitu : α -rotundus suku sipreon dan β -selinen yang juga mempunyai aktivitas antimalaria (Sutaryo, 1994).

2. Senyawa kuasinoid

Senyawa triterpenoid, yaitu kuasinoid atau simarubolid, zat pahit yang terdapat dalam tumbuhan suku Simarubaceae bersifat sebagai antimalaria. Senyawa – senyawa tersebut adalah bruseantin, bruseantinol dan brusatol yang terdapat dalam buah *Brucea javanica* (L) Merr suku Simarubaceae.

Eurikomanon, eurikomalakton dan eurikomanol yang diisolasi dari akar *Eurycoma longifolia* suku Simarubaceae yang tumbuh di Malaysia mempunyai aktivitas antimalaria (Sutaryo, 1994).

3. Senyawa limonoid

Senyawa limonoid yang mempunyai aktivitas antimalaria adalah : nimbolid, suatu senyawa triterpen yang terdapat dalam daun dan biji *Azadirachta indica* yang digunakan sebagai antimalaria di berbagai negara di Asia (Sutaryo, 1994).

C. Golongan flavonoid dan Khalkon

Kuersetin, suatu senyawa flavon yang diisolasi dari *Diosma pilosa* ternyata menunjukkan aktivitas antimalaria yang kuat. Dilaporkan oleh Divo dkk. (1985) bahwa kuersetin mempunyai efek antimitokondria pada *Plasmodium* (Sutaryo, 1994).

Flavonoid turunan flavanon (2', 6'-dihidroksi-4'-metoksi-3'-p-mentena dihidrokalkon (metil linderatin) dan 2', 6'-dihidroksi-4,4'-dimetoksi-3'-p-mentena yang diisolasi dari batang kayu *Melodorum kentii* Hook.f dan Thomas (kapulasan pandan) suku Annonaceae yang telah terbukti sebagai antimalaria dan antitumor secara *in vitro* oleh Pertemuan Simanjuntak, Puslitbang Biotek, Lembaga Pengetahuan Indonesia (Sitepu, 1996).

Dari batang dan kulit akar *Uvaria lucida* ssp. *Lucida* dan kulit akar *Uvaria schefferi* suku Annonaceae berhasil diisolasi senyawa dihidrokalkon yaitu uvaretin dan diuvaretin serta (8,9-dihidroksi)-3-farnesilindol yang terbukti sebagai antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum in vitro* (Sutaryo, 1994).

D. Tanaman Lain yang Berkhasiat sebagai Antimalaria

Tanaman satu suku, Euphorbiaceae, yaitu tanaman *Margaritaria discoidea* (Baill). Webster yang banyak tumbuh di Tanzania mengandung alkaloid yaitu sekuirinina yang mempunyai aktivitas antimalaria.

Ekstrak kulit batang dan ekstrak daun *Morinda lucida* suku Rubiaceae yang tumbuh di Nigeria menunjukkan aktivitas terhadap *Plasmodium falciparum in vitro*. *Eucalyptus globulus* Lahll. suku Myrtaceae, *Nyctanthes arbortristis* suku Oleaceae di India digunakan sebagai obat malaria. *Piper nigrum* suku Piperaceae yang ada di India digunakan sebagai obat penurun panas menunjukkan aktivitas antimalaria pada mencit. Ekstrak daun *Cassia siamea*, ekstrak kulit batang *Alstonia scholaris*, ekstrak herba *Elephantopus scaber* dan ekstrak buah *Morinda citrifolia* (Sutaryo, 1994).

2.3 Tinjauan tentang Malaria

Malaria adalah penyakit infeksi dengan demam berkala yang disebabkan oleh parasit bersel tunggal yaitu protozoa yang termasuk dalam genus *Plasmodium* dan ditularkan oleh sejenis nyamuk *Anopheles*. Macam malaria tergantung dari spesies penyebabnya yaitu :

1. Malaria falciparum (malaria tertiana maligna, malaria tropika)

Malaria ini disebabkan oleh *Plasmodium falciparum* dan merupakan parasit yang paling ganas dan berbahaya sebab mematikan dalam beberapa hari. Hal ini disebabkan oleh relatif banyaknya eritrosit yang rusak sehingga

menyumbat kapiler-kapiler otak, maka dengan pengobatan yang cepat dan tepat akan mendapat hasil yang baik. Demam 40,5 - 41°C.

2. Malaria tertiana benigna

Malaria ini disebabkan oleh *Plasmodium vivax* yang mempunyai ciri demam berkala tiga (3) hari sekali, puncak setelah 48 jam. Demam sampai 40°C.

3. Malaria kuartana

Malaria ini disebabkan oleh *Plasmodium malariae* dan menyebabkan demam berkala empat (4) hari sekali, setiap 72 jam terdapat puncak demam.

4. Malaria ovale

Malaria ini disebabkan oleh *Plasmodium ovale* yaitu jenis yang paling jarang menginfeksi manusia.

Gejala yang timbul antara lain demam didahului menggigil. Gejala lainnya yaitu pusing, mual, muntah, diare, nadi dan nafas menjadi cepat, pembesaran limpa dan anemia. Bila pada stadium dini penyakit dapat didiagnosis dan diobati dengan baik, maka infeksi dapat segera diatasi. Diagnosis malaria dibuat dengan menemukan parasit dalam sel darah (Brown, 1979; Gandahusada, 1998).

2.4 Tinjauan tentang *Plasmodium berghei*

2.4.1 Klasifikasi *Plasmodium berghei*

Phylum	: Protozoa
Sub Phylum	: Sporozoa
Class	: Telosporea
Sub Class	: Coccidea
Family	: Plasmodiidae
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Species	: <i>Plasmodium berghei</i>

2.4.2 Siklus Hidup

Siklus hidup *Plasmodium berghei* terdiri dari :

1) Siklus aseksual (skisogoni)

- Fase skisogoni intra-hepatik

- Fase skisogoni intra-eritrositik

2) Siklus seksual (sporogoni)

- Fase gametogoni
- Fase sporogoni

Fase skisogoni intra-hepatik, fase skisogoni intra-eritrositik dan fase gametogoni terjadi di dalam tubuh hospes, sedangkan fase sporogoni terjadi di dalam tubuh nyamuk.

1. Siklus aseksual

Fase skisogoni intra-hepatik

Infeksi dimulai oleh gigitan nyamuk yang terinfeksi yang akan memasukkan sporosoit haploid ke aliran darah inang. Setelah memasuki aliran darah, sporosoit dari *Plasmodium berghei* akan menuju hepar dan menginfeksi sel-sel hati. Sporosoit yang melekat pada hepatosit bisa ditemukan setelah beberapa menit atau beberapa jam setelah inokulasi. Proses invasi ini diperantarai oleh invaginasi membran plasma hepatosit membentuk vakuola yang akan ditempati sporosoit. Sporosoit bisa berpindah-pindah antar sel sebelum menyerang hepatosit lewat pembentukan vakuola ini. Di dalam hepatosit, sporosoit berkembang menjadi troposoit dan kemudian sampai skison hepar dewasa dalam waktu 47 – 52 jam, tiap skison mengandung 1500-8000 merosoit yang berinti tunggal. Pembelahan inti untuk menjadi merosoit dimulai 24 jam setelah sporosoit memasuki sel hepar dan dalam 26 jam setelahnya terjadi setidaknya 13 kali pembelahan. Setelah sel hepar pecah, merosoit-merosoit tersebut akan terlepas ke sirkulasi sistemik dan menyerang eritrosit. Pada *Plasmodium berghei* tidak ditemukan adanya bentukan hipnosoit (bentuk dormans) seperti pada *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale*, namun skison hepar berkembang dengan lambat tetapi tidak dormans (LUMC, 2002).

Fase skisogoni intra-eritrositik

Setelah lepas dari sel hepar, merosoit akan menginvasi eritrosit. Di dalam eritrosit, merosoit berkembang menjadi troposoit yang ditandai dengan peningkatan ukuran sel dan sitoplasma. Hemoglobin dimetabolisme oleh troposoit dan menghasilkan suatu hemosoin yang merupakan pigmen kecoklatan yang tersebar di sitoplasma dan merupakan penanda khas fase ini.

Perkembangan merozoit menjadi trophozoit dewasa memerlukan waktu sekitar 16 jam. Begitu fase trophozoit selesai, parasit akan menggandakan DNANYA kemudian mengalami pembelahan inti menghasilkan parasit berinti 2 yang disebut skison, pada proses skisogoni yang memakan waktu 6-8 jam parasit mengalami pembelahan inti berkali-kali membentuk sel yang berinti 8-24. Setelah proses skisogoni selesai, parasit akan menghasilkan merozoit (LUMC, 2002).

Fase pembentukan merozoit ini memerlukan waktu 22-24 jam, skison dewasa dalam eritrosit dewasa biasanya mengandung merozoit yang lebih sedikit (8-12) dibandingkan skison dalam retikulosit (16-18). Kemudian, skison yang telah dewasa maupun yang belum, akan menghilang dari sirkulasi perifer dan menuju ke pembuluh kapiler pada organ dalam, misalnya paru-paru, limpa, hepar, dan otak (LUMC, 2002).

Setelah skison pecah, merozoit akan menyerang eritrosit yang baru lagi dan akan meningkatkan parasitemia. Bentuk-bentuk cincin, trophozoit dan skison biasanya ditemukan secara simultan dalam darah saat perjalanan infeksi (Mons, 1986).

2. Siklus seksual

Fase gametogoni

Dalam siklus aseksual, sejumlah kecil parasit berhenti membelah secara aseksual dan berdeferensiasi menjadi bentuk seksualnya yang disebut gametosit. Gametosit sendiri dibagi dua, yaitu mikrogametosit (jantan) dan makrogametosit (betina). Pada *Plasmodium berghei* di tiap siklus aseksualnya 5-25 % parasit mengalami diferensiasi seksual. Merozoit dari skison hepar *Plasmodium berghei* mampu berdiferensiasi secara langsung menjadi gametosit setelah menginvasi eritrosit, dan waktu yang dibutuhkan sekitar 26 – 30 jam (LUMC, 2002).

Pada 16-18 jam pertama perkembangan, gametosit sulit dibedakan dengan trophozoit pada mikroskop. Setelah 18-22 jam penanda khas berkembang, seperti inti sel tunggal yang besar, distribusi granula pigmen pada sitoplasma, dan ukuran sel, tetapi makrogametosit dan mikrogametosit belum bisa dibedakan. Baru setelah 24 jam keduanya bisa dibedakan. Mikrogametosit memiliki inti yang lebih besar sedangkan granula pigmen dan badan osmiofiliknya lebih sedikit dibandingkan makrogametosit. Waktu yang dibutuhkan (26-30 jam) terbilang

pendek bila dibandingkan gametosit pada *Plasmodium falciparum* yang memakan waktu 8-11 hari, secara morfologi gametosit *Plasmodium berghei* berbentuk oval sedangkan gametosit *Plasmodium falciparum* berbentuk seperti pisang. Morfologi, waktu perkembangan, dan produksi gametosit dari *Plasmodium berghei* lebih mirip dengan *Plasmodium vivax*, *malariae* dan *ovale* daripada *Plasmodium falciparum*. Inisiasi deferensiasi seksual pada *Plasmodium berghei* dimulai 12-16 jam setelah invasi, berbeda juga dengan *Plasmodium falciparum* yang inisiasinya telah dimulai sebelum pematangan skison, sehingga merozoit dengan sendirinya berubah menjadi gametosit sebelum menginvasi sel darah merah baru (LUMC, 2002).

Fase sporogoni

Saat nyamuk menghisap darah inang yang terinfeksi, hanya gametosit dewasa yang terus bisa berkembang dalam perut nyamuk. Gametosit kemudian berkembang lebih lanjut menjadi gamet, makrogametosit berkembang menjadi 1 makrogamet sedangkan mikrogametosit berkembang menjadi 8 mikrogamet yang berbentuk seperti sperma (LUMC, 2002).

Fertilisasi dimulai dengan penetrasi mikrogamet ke dalam makrogamet menghasilkan zigot diploid antara 10 menit – 1 jam setelah terbentuknya gamet, kemudian fertilisasi dan fusi inti antara kedua gamet dan dilanjutkan dengan pembelahan miosis. Miosis tidak langsung diikuti pembelahan inti tetapi didahului pembentukan zigot berinti (ookinet) dengan DNA haploid 2-4 kali lebih banyak. Zigot yang awalnya bulat berubah menjadi ookinet seperti pisang yang lebih bisa bergerak bebas dalam 18-24 jam. Granula pigmen yang tersebar dalam sitoplasma zigot terkumpul menjadi beberapa kelompok di ookinet (LUMC, 2002).

Ookinet dewasa yang bergerak aktif menembus epitel lambung dan tinggal di dalam membran sel terbawah dan basal lamina dinding lambung. Di sini ookinet berubah menjadi ookista dan mengalami replikasi mitosis sampai mengandung ribuan sporosoit. Ookista mengalami pembesaran diameter dari 2 – 3 μm menjadi 40 μm dalam 10-13 hari. Jumlah ookista dan sporozoit berbeda untuk tiap spesies nyamuk *Anopheles*. Pada *Anopheles stephensi* yang terinfeksi *Plasmodium berghei* strain ANKA tiap ookistanya mengandung sekitar 8000 sporosoit. Ookista kemudian pecah dan sporosoit terlepas lalu memasuki kelenjar

ludah, hanya 2% dari total sporosoit yang berhasil masuk ke sana. Sporosoit kemudian bermigrasi keluar dari kelenjar ludah dan memasuki ruang sekretori ekstraselular dimana akan tinggal di sana sampai diinjeksikan ke inang baru. Dari tiap gigitan nyamuk hanya sekitar 20-50 sporosoit yang masuk ke tubuh inang (LUMC, 2002; Sinden, 1997).

2.4.3 Morfologi

Plasmodium berghei merupakan parasit penyebab malaria pada rodensia. Dalam darah rodensia ada beberapa bentuk parasit yang bisa ditemukan, yaitu bentuk cincin, trophozoit, skison dan gametosit.

1. Bentuk cincin

Tampak sebagai cincin dengan sitoplasma berwarna biru dan inti berwarna merah seperti titik, terlihat dengan pengecatan Giemsa dari pulasan darah perifer.

2. Bentuk trophozoit

Bentuknya amuboid atau seperti pita, inti trophozoit membelah dan dengan pembelahan inti, stadium skison terjadi.

3. Bentuk skison

Ukuran kira-kira 27 μm pada hari ke empat setelah infeksi dan pada eritrosit tampak titik-titik kasar berwarna merah gelap yang tampak jelas, kemungkinan diakibatkan sitoplasma yang rusak karena parasit dan tersebar pada dua pertiga bagian eritrosit. Skison dewasa biasanya mengandung 8-12 merozoit.

4. Bentuk gametosit

Macam gametosit ada dua yaitu mikrogametosit dan makrogametosit. Gametosit berbentuk oval atau bulat. Makrogametosit mempunyai sitoplasma berwarna biru lemah dengan inti lebih kecil dan tersebar di sekitarnya, sedangkan mikrogametosit mempunyai sitoplasma berwarna biru dengan inti lebih besar dan mengumpul. Dengan pengecatan pewarna Giemsa, tampak inti berwarna merah, sitoplasma berwarna biru, sel darah berwarna merah muda (Carter and Diggs, 1977).

2.4.4 Pembiakan *In vivo Plasmodium berghei*

Rodensia yang sering digunakan untuk percobaan (mencit, tikus hamster) umumnya sensitif terhadap infeksi *Plasmodium berghei* baik lewat gigitan nyamuk maupun injeksi dengan darah yang terinfeksi. Penginfeksian dengan menggunakan gigitan nyamuk *Anopheles stephensi* pada mencit bisa dilakukan semenjak hari ke-14 setelah nyamuk tersebut menggigit inang yang terinfeksi, sampai beberapa minggu sesudahnya. Seperti telah dikemukakan di atas bahwa pada kelenjar ludah nyamuk terdapat sekitar 8000 sporosoit dan hanya 20-50 saja yang masuk dalam tubuh inang lewat gigitan nyamuk. Pada strain rodensia yang berbeda kepekaan terhadap infeksi memiliki perbedaan yang cukup besar, sehingga jumlah nyamuk yang dibutuhkan untuk penginfeksian berbeda-beda pula untuk tiap strain. Sporosoit bisa ditemukan dalam hepatosit mulai beberapa menit sampai beberapa jam setelah inokulasi, sedangkan laju pembelahan aseksual dalam darah untuk *Plasmodium berghei* berdasarkan penelitian relatif stabil, yaitu kira-kira 10 kali pembelahan tiap 24 jam saat fase pertama siklus eritrositik.

Penginfeksian secara buatan dilakukan secara intravena atau intraperitoneal dengan menginjeksikan eritrosit yang mengandung bentukan fase aseksual eritrositiknya (cincin, trophozoit, skison). Prosedur rutin yang banyak digunakan para peneliti adalah dengan mengambil darah dari ekor hewan yang terinfeksi dengan parasitemia antara 1-10 % dan menyuntikkan 10^5 - 10^8 eritrosit terinfeksi pada hewan coba secara intraperitoneal. Berdasarkan pengalaman, sekitar 10% dari parasit yang disuntikkan berhasil hidup dan memasuki peredaran darah. Dengan melihat laju pembelahan *Plasmodium berghei* (strain ANKA) pada mencit yang berkisar 10 kali tiap 24 jam dalam fase pertama siklus eritrositiknya, maka bisa diperkirakan parasitemia yang didapatkan setelah penginjeksian eritrosit terinfeksi (Sinden, 1997).

2.5 Tinjauan tentang Uji Aktivitas Antimalaria Ekstrak Tanaman *in vivo*

Dua tes utama untuk skrining antimalaria telah dipergunakan selama 50 tahun terakhir. *Plasmodium gallinaceum* merupakan spesies yang pertama kali digunakan untuk pengujian selama Perang Dunia II, tetapi kemudian yang lebih disukai adalah parasit rodensia *Plasmodium berghei*. Mencit yang digunakan

untuk pengujian memerlukan standarisasi yang ketat untuk menghindari variabel-variabel yang bisa mempengaruhi hasil, misalnya strain induk semang dan cara pemberian obat. Strain N (normal) dari *Plasmodium berghei* dapat berkembang dengan baik pada banyak strain mencit tapi ada yang sukar untuk ditempati sebagai semang.

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

Ada dua tipe berbeda untuk pengujian dengan *Plasmodium berghei* yang bisa digunakan untuk skrining ekstrak tanaman yaitu tes Peter dan tes Rane.

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

Mencit jantan (misal Swiss albino) dengan berat 20 ± 2 gram ditempatkan dalam ruang bersuhu 22°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 (TC 199) sampai tiap 0,2 ml mengandung 10^7 eritrosit yang terinfeksi. Tiap mencit diberi 0,2 ml suspensi parasit secara intravena di ekor. 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 melalui subkutan atau oral. Pada hari ke lima, diambil sampel darah dari ekor dan dilakukan pewarnaan dengan pewarna Giemsa dan dihitung persentase eritrosit yang terinfeksi. Harga ED_{50} (dalam hal ini berarti adanya penekanan parasit sebanyak 50% bila dibandingkan dengan kontrol) bisa dihitung dengan log dosis/aktivitas probit. Standar deviasi dihitung menggunakan program komputer yang sesuai.

2. Tes Rane (Phillipson, 1991)

Dasar dari tes ini adalah membandingkan efek dari perlakuan standar pemberian *Plasmodium berghei* yang membunuh mencit dalam 6 hari dengan perpanjangan waktu bertahan hidup 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 pertama 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 1/5 jumlah mencit mati karena efek toksik. Dosis yang lebih rendah mungkin dibutuhkan untuk mendapatkan harga MED. Walaupun tes ini terbilang masih kasar bila dibandingkan dengan tes Peter, tetapi tes ini terbukti lebih baik dalam mengetahui profil obat baru karena menyertakan ukuran perbandingan antara efikasi melawan toksisitasnya.

Kedua tes ini tidak bisa digunakan untuk identifikasi senyawa yang bersifat long acting dan bila informasi mengenai hal ini dibutuhkan maka bisa digunakan tes dengan *Plasmodium yoelli* atau *Plasmodium vinckey* pada mencit. Tes malaria pada rodensia juga bisa digunakan untuk pengujian senyawa yang memiliki aktivitas skisontosida dan gametosida jaringan.

2.6 Tinjauan tentang Mencit

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

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

2.7 Klasifikasi Antimalaria

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

- 1) Skisontosida jaringan (eksoeritrositik skisontisida), yang digunakan pencegahan kausal

Obat kelompok ini menghancurkan bentuk jaringan primer plasmodia dan merozoit di hati dimulai dari tahap infeksi eritrositik, kemudian mencegah invasi eritrosit dan lain-lain penyebaran infeksi ke nyamuk *Anopheles*.

Contoh : kloroguanid, pirimetamin dan primakuin.

- 2) Skisontosida jaringan, yang digunakan mencegah kekambuhan

Obat kelompok ini bekerja pada bentuk skison di jaringan laten, jaringan sekunder atau hipnozoit dari *Plasmodium vivax* dan *Plasmodium ovale* di sel hati.

Contoh : primakuin dan pirimetamin.

- 3) Skisontosida darah (skisontisida eritrositik), yang digunakan untuk pengobatan klinik dan supresif

Obat kelompok ini bekerja terhadap merozoit pada fasa eritrositik aseksual dari parasit malaria dan mengganggu skisogoni eritrositik. Berdasarkan masa kerjanya kelompok ini dibagi menjadi dua, yaitu :

- a) Skisontosida yang bekerja secara cepat, contoh : amodiakuin, artemisin, klorokuin, kuinin dan tetrasiklin.
- b) Skisontosida yang bekerja secara lambat, contoh : pirimetamin, kloroguanid, sikloguanilpamoat, sulfonamida dan sulfon.

- 4) Gametositosida

Obat kelompok ini menghancurkan bentuk eritrositik seksual (gametosit) dari parasit malaria sehingga mencegah penyebaran plasmodium ke nyamuk *Anopheles*.

Contoh : klorokuin, primakuin dan kuinin.

- 5) Sporositosida

Obat kelompok ini mampu membunuh sporozoit segera setelah masuk dalam darah sesudah gigitan nyamuk . Waktu untuk bekerja obat sangat singkat oleh

karena sporosoit secara cepat masuk ke dalam sel hati sehingga banyak obat antimalaria kurang efektif terhadap bentuk sporosoit tersebut.

Contoh : klorguanid, pirimetamin dan primakuin.

6) Sporontosida

Obat kelompok ini bekerja pada tubuh nyamuk malaria yang menginfeksi tuan rumah yaitu dengan mencegah pembentukan oosit dan sporosoit.

Contoh : klorguanid, pirimetamin dan primakuin.

(Siswandono dan Soekardjo, B., 2000)

2.8 Tujuan Pengobatan

Dengan adanya klasifikasi antimalaria seperti tersebut di atas, maka pemilihan obat malaria harus disesuaikan dengan tujuan pengobatannya. Untuk itu, ada beberapa tujuan pengobatan malaria, antara lain :

1. Pengendalian serangan klinik

Untuk tujuan ini digunakan skizontosida darah yang bekerja terhadap merozoit dalam eritrosit (fase eritrosit) sehingga tidak terbentuk skison baru dan tidak terjadi penghancuran eritrosit yang menimbulkan gejala klinik.

Contoh obat ini adalah kuinin, klorokuin, dan meflokuin.

2. Pengobatan supresi

Pengobatan ini digunakan untuk menyingkirkan semua parasit dari tubuh penderita dengan memberi golongan skizontosida darah dalam waktu yang lebih lama dari masa hidup parasit.

Contoh obat ini adalah klorokuin dan amodiakuin.

3. Pencegahan kausal

Penggunaan skizontosida jaringan yang bekerja pada skison yang baru memasuki jaringan hati dapat mencegah tahap infeksi eritrosit dan menghambat transmisi lebih lanjut.

Contoh obat ini adalah primakuin dan pirimetamin.

4. Pengobatan radikal

Pengobatan ini dimaksudkan untuk memusnahkan parasit dalam fase eritrosit dan ekso-eritrosit, karena itu digunakan kombinasi skizontosida darah dan jaringan.

5. Gametositosida

Pengobatan ini ditujukan untuk membunuh gametosit yang berada dalam eritrosit sehingga dapat menghambat transmisi ke dalam tubuh nyamuk.

Contoh obat ini adalah primakuin.

6. Sporontosida

Pengobatan ini ditujukan untuk menghambat perkembangan gametosit lebih lanjut di tubuh nyamuk yang menghisap darah penderita, dengan demikian rantai penularan terputus.

Contoh obat ini adalah kloroguanid dan primakuin (Ganiswara, 1995).

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL

3.1 Landasan Teoritik

Penyakit malaria merupakan masalah kesehatan yang besar di dunia terutama di negara-negara berkembang, termasuk di Indonesia. Hal ini disebabkan adanya resistensi terhadap obat malaria yang ada, khususnya klorokuin. Untuk itu perlu dilakukan pencarian obat baru yang lebih efektif dengan efek samping seminimal mungkin, baik secara sintesis maupun secara alami atau berasal dari bahan alam.

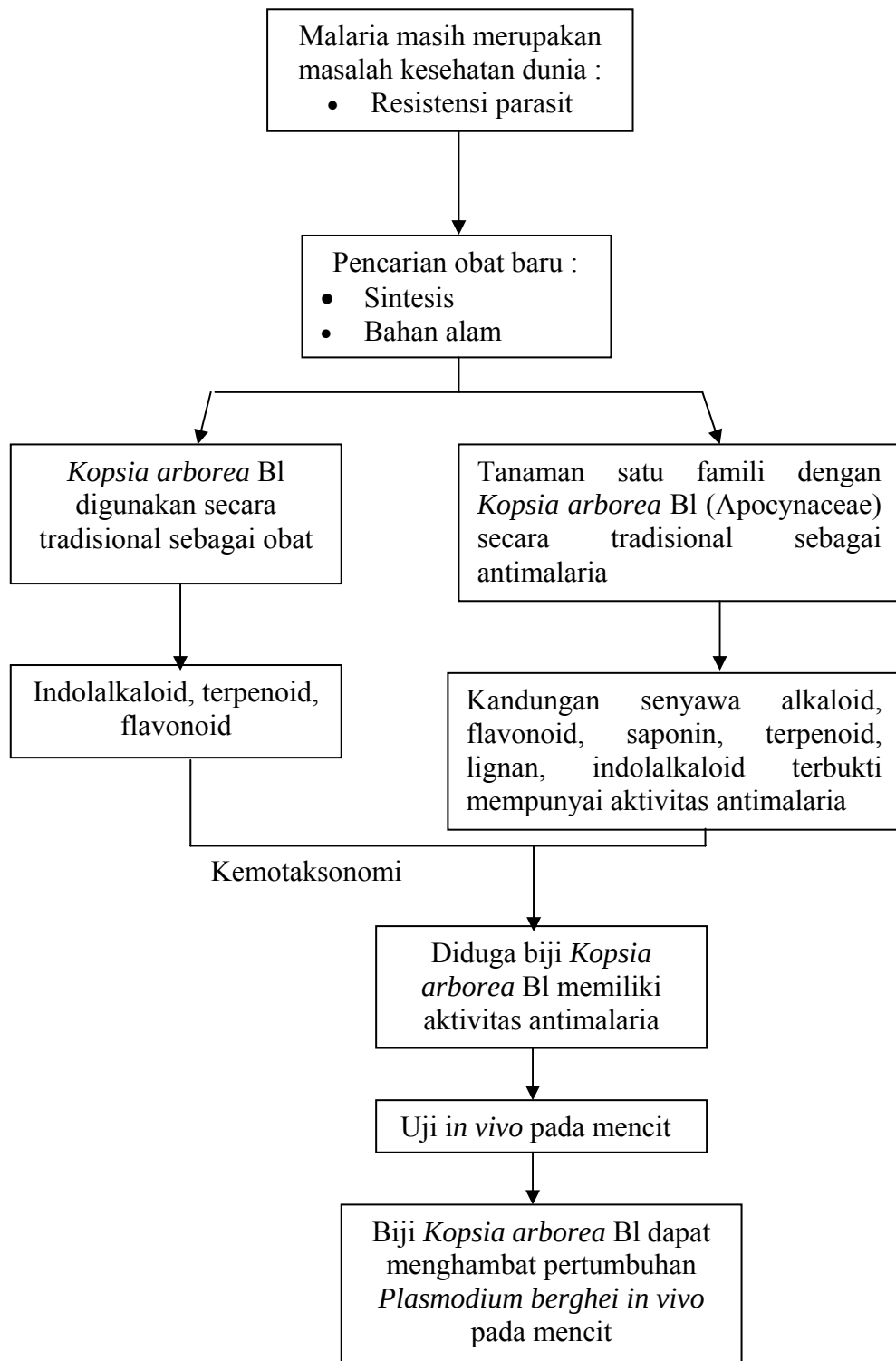
Dari data etnofarmakologi diketahui bahwa *Kopsia arborea* Bl merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat di Indonesia (Afriastini, 1984; Mardisiswojo.S, 1985). Sedangkan tanaman lain yang termasuk satu famili dengan *Kopsia arborea* Bl yaitu *Plumeria rubra* sudah digunakan secara tradisional oleh masyarakat asli Amerika Selatan sebagai antimalaria dengan kandungan aktif saponin serta *Alstonia macrophylla* dan *Alstonia scholaris* dengan kandungan indolalkaloid dan triterpen (Nahrstedt, A., 1999; Anonim, 2002), serta *Vinca rosea* dengan kandungan aktif flavonoid, indolalkaloid dan saponin (Boesri, H., 1994; Seigler, 2003) yang juga sudah digunakan secara tradisional sebagai antimalaria di Indonesia (Mardisiswojo.S, 1985).

Kopsia arborea Bl mengandung senyawa golongan alkaloid yaitu indolalkaloid (Chatterjee.A, 1979; Saha.B.P, 1975; Seigler D.S, 2003) , golongan terpenoid serta flavonoid (Hegnauer, 1966). Beberapa penelitian menunjukkan senyawa-senyawa tersebut mempunyai aktivitas sebagai antimalaria (Sutaryo, 1994).

Dengan demikian biji *Kopsia arborea* Bl diduga mempunyai aktivitas antimalaria. Untuk itu dilakukan uji aktivitas antimalaria pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan menggunakan modifikasi metode Peter (1977).

Plasmodium berghei merupakan model untuk penelitian mengenai parasit malaria pada manusia, karena parasit ini analog dengan malaria manusia dari struktur, fisiologi dan siklus hidup (Anonim, 2003).

3.2 Bagan Kerangka Konseptual



Gambar 3.1 Bagan Kerangka Konseptual

BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Bahan Penelitian

4.1.1 Bahan Tanaman

Pada penelitian yang digunakan adalah bagian biji dari tanaman *Kopsia arborea* Bl yang didapat dari desa Sukasada, kecamatan Sukasada, kabupaten Buleleng, provinsi Bali. Determinasi bahan ini dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Bahan ini dikeringkan dengan jalan diangin-anginkan, setelah kering diblender dan diayak dengan ayakan tepung terigu.

4.1.2 Bahan pembanding

Bahan pembanding yang digunakan adalah klorokuin difosfat yang berfungsi sebagai kontrol positif (Sigma C-6628, 25 gram, Lot 7740650).

4.1.3 Suspensi Parasit

Suspensi sel parasit yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Plasmodium berghei* strain ANKA yang didapat dari Lembaga Biomolekuler Eijkman.

4.1.4 Binatang percobaan

Binatang yang digunakan dalam percobaan adalah mencit betina Balb-C yang didapat dari Pusat Veterinaria Farma (Pusvetma) dengan berat badan 18-35 g sebanyak 64 ekor.

4.1.5 Bahan lain yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria

Bahan lain yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria adalah :

- pewarna Giemsa
- metanol
- alcheiver

- dapar fosfat
- aqua bidestilata
- oleum imersi
- CMC Na 0,5 %
- DMSO 0,8 %

4.1.6 Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi

Pelarut yang digunakan untuk ekstraksi adalah diklorometana (DCM) dan metanol.

4.2 Alat-alat

4.2.1 Alat untuk Ekstraksi

Alat-alat yang dipakai untuk ekstraksi biji pronojiwo adalah gelas beker, erlenmeyer, timbangan, toples, gelas ukur, rotavapor, batang pengaduk, maserator dan penyaring buchner.

4.2.2 Alat untuk Uji Antimalaria secara *In vivo*

Alat-alat yang digunakan untuk uji malaria *in vivo* antara lain mikroskop dengan gelas objek, tally counter, alat suntik 1 ml, gelas ukur, labu ukur, neraca analitik.

4.3 Metode Penelitian

4.3.1 Pembuatan Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji *Kopsia arborea* Bl

Biji *Kopsia arborea* Bl kering digiling menjadi serbuk. Serbuk kering sebanyak 200 gram diekstraksi berulang dengan 300 ml diklorometana dengan cara maserasi selama 24 jam. Proses maserasi diulang sebanyak 6 kali. Maserat yang diperoleh disaring dengan penyaring buchner dan dipekatkan dengan cara diuapkan dengan rotavapor kemudian diuapkan dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak kental. Sedangkan serbuknya diangin – anginkan hingga kering. Setelah kering, serbuk diekstraksi lagi dengan pelarut metanol dengan cara maserasi selama 24 jam pula. Maserat yang diperoleh disaring dengan penyaring

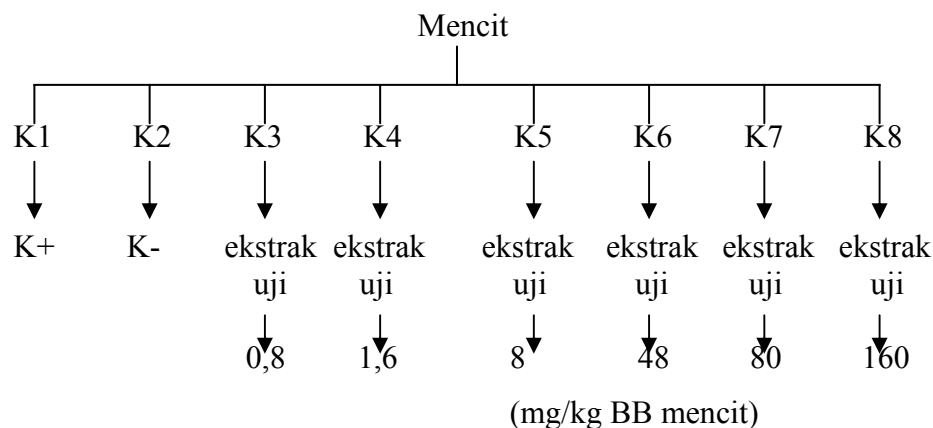
buchner dan dipekatkan dengan cara diuapkan dengan rotavapor kemudian diuapkan dalam lemari asam sampai diperoleh ekstrak yang kental.

4.3.2 Perlakuan terhadap Binatang Percobaan

Dipersiapkan 32 ekor mencit untuk masing-masing ekstrak yang dibagi secara random menjadi 8 kelompok, masing-masing terdiri dari 3 ekor.

Untuk bahan uji ekstrak diklorometana, perlakuannya sebagai berikut

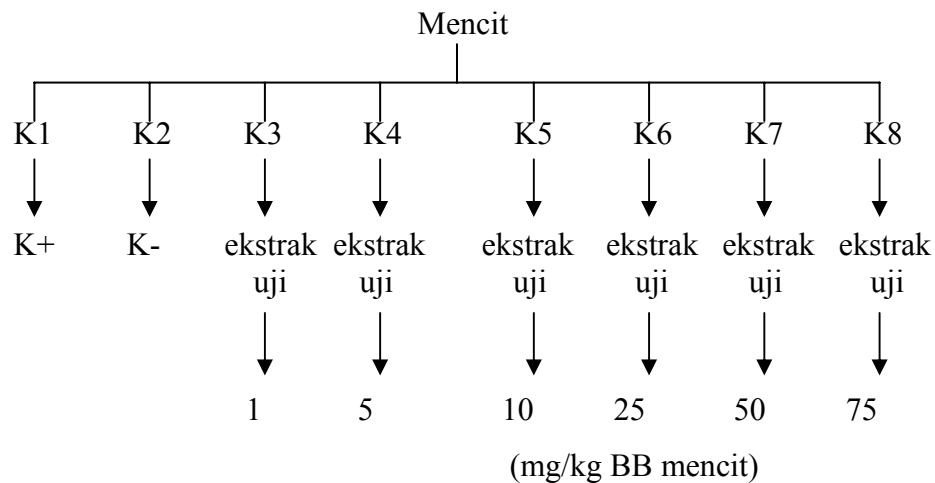
- Kelompok 1 : sebagai kelompok kontrol positif, yaitu kelompok dengan pemberian klorokuin difosfat dosis 10 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 2 : sebagai kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok dengan pemberian larutan CMC Na 0.5 % dan DMSO 0.8 %.
- Kelompok 3 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 0,8 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 4 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 1,6 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 5 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 8 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 6 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 48 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 7 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 80 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 8 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 160 mg/kg BB mencit.



Gambar 4.1 Skema Perlakuan terhadap Binatang Percobaan

Untuk bahan uji ekstrak metanol, perlakuannya sebagai berikut :

- Kelompok 1 : sebagai kelompok kontrol positif, yaitu kelompok dengan pemberian klorokuin difosfat dosis 10 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 2 : sebagai kelompok kontrol negatif, yaitu kelompok dengan pemberian larutan CMC Na 0.5 % dan DMSO 0.8 %.
- Kelompok 3 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 1 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 4 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 5 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 5 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 10 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 6 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 25 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 7 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 50 mg/kg BB mencit.
- Kelompok 8 : sebagai kelompok dengan pemberian ekstrak uji dosis 75 mg/kg BB mencit.



Gambar 4.1 Skema Perlakuan terhadap Binatang Percobaan

4.3.3 Penginfeksian Mencit Donor dan mencit perlakuan dengan *Plasmodium berghei*

1. Simpanan beku darah terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam medium alcheiver (1 : 3) di *thawing*.
2. Injeksikan ke mencit donor secara intraperitoneal masing-masing sebanyak 100 μ l - 200 μ l.
3. Amati persen parasitemia dengan cara mengambil satu tetes darah dari ekor dan dibuat hapusan darah tipis dengan pewarna Giemsa.
4. Setelah persen parasitemia sudah mencapai ≥ 20 %, mencit dibedah dan diambil darah dari jantung untuk kemudian diinjeksikan ke mencit perlakuan secara intraperitoneal masing-masing sebanyak 100 μ l – 200 μ l darah yang sebelumnya telah diencerkan dengan alcheiver (1 : 3) dan di *thawing*.
5. Periksa setiap hari persen parasitemia dari mencit perlakuan sampai dipastikan parasitemia tumbuh yaitu sebanyak 2 – 5 % dan untuk selanjutnya dilakukan treatment.

4.3.4 Skrining Fitokimia

4.3.4.1 Identifikasi Senyawa Golongan Alkaloid

Ekstrak setara dengan 50 gram serbuk simplisia ditambah 10 ml HCl 2 N, dipanaskan di atas penangas air selama 2-3 menit sambil diaduk. Setelah dingin ditambah 0,5 mg NaCl, diaduk rata kemudian disaring. Filtrat ditambah HCl 2 N, lalu dibagi menjadi tiga bagian dan disebut sebagai larutan 1 A, 1 B dan 1 C.

Identifikasi dengan Reaksi pengendapan

Larutan 1 A ditambah pereaksi Meyer, larutan 1 B ditambah dengan pereaksi Wagner dan larutan 1 C dipakai sebagai kontrol. Adanya kekeruhan atau endapan menunjukkan adanya alkaloid.

Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Larutan 1 C ditambah NH_4OH 28 % sampai larutan menjadi basa, kemudian diekstraksi dengan 10 ml kloroform bebas air, lalu disaring. Filtrat diuapkan

sampai kering, kemudian dilarutkan dalam metanol dan siap untuk pemeriksaan dengan KLT.

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : Etil asetat-metanol-air (100 : 16,5 : 13,5)

Penampak noda : Pereaksi Dragendorf

Timbulnya warna oranye menunjukkan adanya alkaloid dalam sampel.

4.3.4.2 Identifikasi Senyawa Golongan Glikosida Saponin

Uji buih

Ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah air suling 10 ml, dikocok kuat-kuat selama kira-kira 30 detik. Sebagai pembanding digunakan larutan dari sedikit buah *Sapindus rarak* (klerak). Tes buih positif mengandung saponin bila terjadi buih stabil selama lebih dari 30 menit dan tinggi 3 cm di atas permukaan cairan.

4.3.4.3 Identifikasi Senyawa Golongan Steroid dan Terpenoid

Identifikasi dengan Reaksi Warna

Ekstrak dibagi menjadi tiga bagian yang disebut II A, II B dan II C

Uji Lieberman-Burchard

Larutan II A digunakan sebagai blanko, larutan II B sebanyak 5 ml ditambah 3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H_2SO_4 pekat, lalu dikocok perlahan dan diamati terjadinya perubahan warna. Terjadinya warna hijau biru menunjukkan adanya steroid, warna ungu menunjukkan adanya triterpen steroid dan warna kuning muda menunjukkan adanya sapogenin jenuh.

Uji salkowski

Larutan II A digunakan sebagai blanko, larutan II C sebanyak 5 ml ditambah 1-2 ml H_2SO_4 pekat melalui dinding tabung reaksi. Adanya steroid tak jenuh ditandai dengan timbulnya cincin warna merah.

Identifikasi dengan Komatografi Lapis Tipis

Ekstrak yang setara dengan 10 gram serbuk simplisia ditambah dengan 2 ml HCl 2 N, dididihkan dan ditutup dengan corong berisi kapas basah selama 2 jam

untuk menghidrolisa saponin. Setelah dingin dinetralkan dengan amonia, residu diekstraksi dengan n-heksana 3 ml beberapa kali, kemudian diuapkan. Residu dilarutkan dalam 5 tetes kloroform, lalu dilakukan pemeriksaan dengan KLT.

Fase diam : Kiesel gel GF 254

Fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)

Penampak noda : Antimon klorida

Timbulnya warna merah muda menunjukkan adanya sapogenin.

4.3.4.4 Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid

Ekstrak dibagi menjadi 4 bagian, masing-masing 10 ml disebut sebagai larutan IV A, IV B, IV C dan IV D.

Identifikasi dengan Reaksi Warna

Uji Bate-Smith dan Metcalf

Larutan IV A sebagai blanko, larutan IV B ditambah 0,5 ml HCl pekat dan diamati perubahan warna yang terjadi, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan diamati lagi perubahan warna yang terjadi. Bila perlahan-lahan menjadi warna merah terang atau ungu menunjukkan adanya leukoantosianin (dibandingkan dengan blanko).

Uji Wilstater

Larutan IV A sebagai blanko, larutan IV C ditambah 0,5 ml HCl pekat dan 4 potong magnesium. Diamati warna yang terjadi, diencerkan dengan air suling, kemudian ditambah 1 ml butanol. Diamati warna yang terjadi di setiap lapisan. Perubahan warna merah jingga menunjukkan adanya flavon, merah pucat menunjukkan flavonoid, merah tua menunjukkan adanya flavanon.

Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis

Larutan IV D ditotolkan pada fase diam. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan :

Fase diam : lapisan tipis selulose

Fase gerak : butanol-asam asetat glasial-air (4 : 1 : 5)

Penampak noda : pereaksi sitrat borat atau uap amonia

Adanya flavonoid ditunjukkan dengan timbulnya noda berwarna kuning.

4.3.5 Penyiapan Suspensi Ekstrak Uji

Sebagai bahan uji adalah ekstrak diklorometana kental biji pronojiwo yang dibuat dengan dosis 0,8; 1,6; 8; 48; 80 dan 160 mg/kgBB mencit. Adapun cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang 0,4 gram ekstrak kental biji pronojiwo, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 25 ml (16.000 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 160 mg/kgBB mencit.
2. Suspensi 16.000 µg/ml dipipet sebanyak 5 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (8000 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 80 mg/kgBB mencit.
3. Suspensi 16.000 µg/ml dipipet sebanyak 3 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (4800 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 48 mg/kgBB mencit.
4. Suspensi 8000 µg/ml dipipet sebanyak 1 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (800 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 8 mg/kgBB mencit.
5. Suspensi 800 µg/ml dipipet sebanyak 2 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (160 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 1,6 mg/kgBB mencit.
6. Suspensi 800 µg/ml dipipet sebanyak 1 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (80 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 0,8 mg/kgBB mencit.

Sedangkan bahan uji dari ekstrak metanol biji pronojiwo dibuat dengan dosis 1; 5; 10; 25; 50 dan 75 mg/kg BB mencit. Adapun cara pembuatannya adalah sebagai berikut :

1. Ditimbang 0,25 gram ekstrak kental biji pronojiwo, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 25 ml (10.000 µg/ml). Ini digunakan sebagai larutan induk.

2. Suspensi 10.000 µg/ml dipipet sebanyak 7,5 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (7500 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 75 mg/kgBB mencit.
3. Suspensi 10.000 µg/ml dipipet sebanyak 5 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (5000 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 50 mg/kgBB mencit.
4. Suspensi 10.000 µg/ml dipipet sebanyak 2,5 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (2500 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 25 mg/kgBB mencit.
5. Suspensi 10.000 µg/ml dipipet sebanyak 1 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (1000 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 10 mg/kgBB mencit.
6. Suspensi 2.500 µg/ml dipipet sebanyak 2 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (500 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 5 mg/kgBB mencit.
7. Suspensi 1.000 µg/ml dipipet sebanyak 1 ml, kemudian ditambah larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dalam labu ukur sampai tepat 10 ml (100 µg/ml). Untuk 0,25 ml mengandung ekstrak uji 1 mg/kgBB mencit

4.3.6 Penyiapan Larutan Kontrol Positif

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

Cara pembuatannya adalah sebagai berikut : klorokuin difosfat 10 mg dilarutkan dengan aquadest dalam labu ukur sampai tepat 10 ml, dihasilkan larutan dengan konsentrasi 1.000 µg/ml. Untuk 0,25 ml larutan mengandung klorokuin difosfat 0,25 mg/25 g BB mencit (10 mg/kg BB mencit).

4.3.7 Penyiapan Larutan Kontrol Negatif

Sebagai kontrol negatif digunakan larutan CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 %. Cara pembuatannya adalah sebagai berikut : ditimbang 0,5 gram CMC Na ditaburkan sedikit demi sedikit di atas 10 ml aquadest panas pada mortir, didiamkan selama 10 – 15 menit, dicampur sampai homogen, ditambah aquadest sedikit demi sedikit sambil diaduk, kemudian ditambahkan DMSO sebanyak 0,8 ml, setelah homogen dimasukkan ke dalam labu ukur dan ditambah aquadest sampai tepat 100 ml, kemudian dikocok sampai homogen.

4.3.8 Pengujian Aktivitas Antimalaria *In vivo*

Pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* dilakukan dengan menggunakan metode Peter (1977), *The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action* (Phillipson, 1991).

- 1) Mencit terinfeksi parasit dibagi menjadi 8 kelompok, tiap kelompok terdiri dari 3 mencit, masing-masing kelompok diberi perlakuan :
 - 1 kelompok kontrol positif
 - 1 kelompok kontrol negatif
 - 6 kelompok uji (ekstrak dalam CMC Na 0,5 % dan DMSO 0,8 % dengan 6 macam dosis)
- 2) Pemberian bahan uji selama 4 hari ($D_0 - D_3$)
- 3) Setiap hari diamati persen parasitemianya selama 7 hari ($D_0 - D_6$) dengan cara membuat hapusan tipis darah dari ekor mencit dengan pewarna Giemsa.

4.4 Evaluasi

4.4.1 Pembuatan Sediaan Pewarna Giemsa

Sediaan pewarna Giemsa terdiri dari :

1. Larutan Giemsa stok (Giemsa 100 %)
2. Dapar fosfat

Untuk larutan Giemsa siap pakai yaitu larutan Giemsa 10 % dibuat dengan cara 1 bagian larutan Giemsa stok ditambah dengan 9 bagian dapar fosfat pH 7,2.

4.4.2 Pembuatan Preparat Darah Tipis

Diteteskan ± 1 tetes suspensi sel parasit ke atas gelas objek mikroskop, dengan bantuan satu sisi gelas objek yang lain, ratakan suspensi sel parasit tersebut. Lalu dibiarkan sampai kering di atas udara terbuka. Fiksasi lapisan tipis tersebut dengan metanol absolut. Kemudian setelah kering ditambahkan pewarna Giemsa 10 % sampai menutupi seluruh lapisan darah. Sediaan dibiarkan selama 35 – 45 menit, kemudian larutan Giemsa dibilas dengan air kran, selanjutnya preparat dikeringkan di udara terbuka. Sediaan hapusan darah tipis dengan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali.

4.4.3 Penghitungan Persen Parasitemia

Persen parasitemia adalah perbandingan sel darah merah yang terinfeksi parasit malaria tiap 5000 eritrosit.

Penghitungan persen parasitemia :

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

4.5 Analisis Data

Aktivitas antimalaria ekstrak uji dihitung berdasarkan hambatan pertumbuhan rata-rata dari kelompok uji (mencit yang diobati) yang dibandingkan dengan kontrol negatif. Harga ED_{50} ditentukan dengan membuat kurva hitungan antara probit persen penghambatan pertumbuhan dengan logaritma dosis.

Persen pertumbuhan parasit rata-rata (kontrol maupun uji) mulai D_0 - D_6 dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ pertumbuhan parasit rata-rata} = \frac{(D_1-D_0)+(D_2-D_1)+\dots \dots + (D_5-D_4)+(D_6-D_5)}{6}$$

Keterangan

$D_0 - D_6$: persen parasitemia hari ke-0 sampai hari ke-6

Persen penghambatan dari ekstrak uji dihitung dengan rumus :

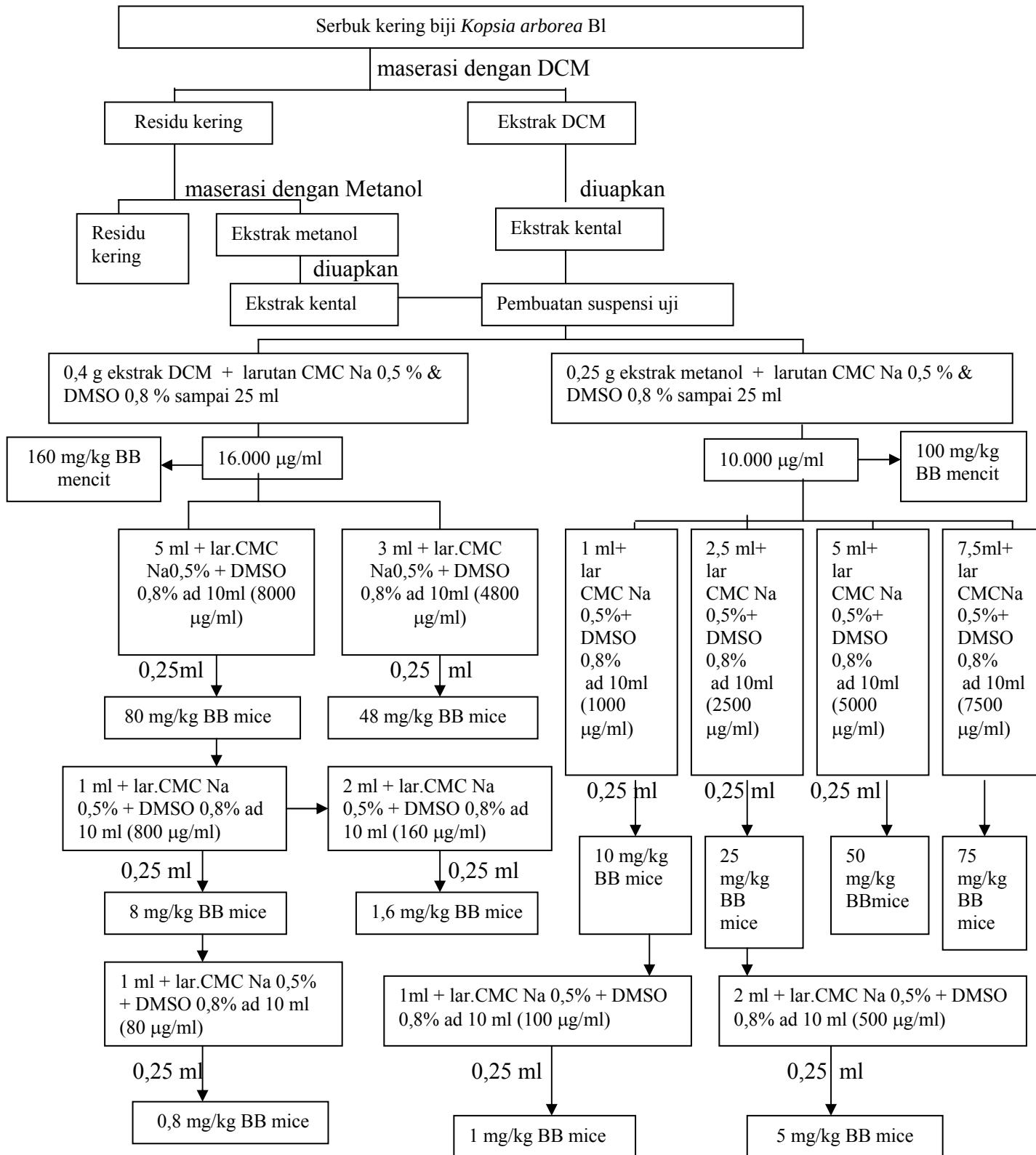
$$\% \text{ penghambatan} = 100 \% - [(X_e / X_k) \times 100 \%]$$

Keterangan :

X_e : % pertumbuhan parasit rata-rata dari ekstrak uji

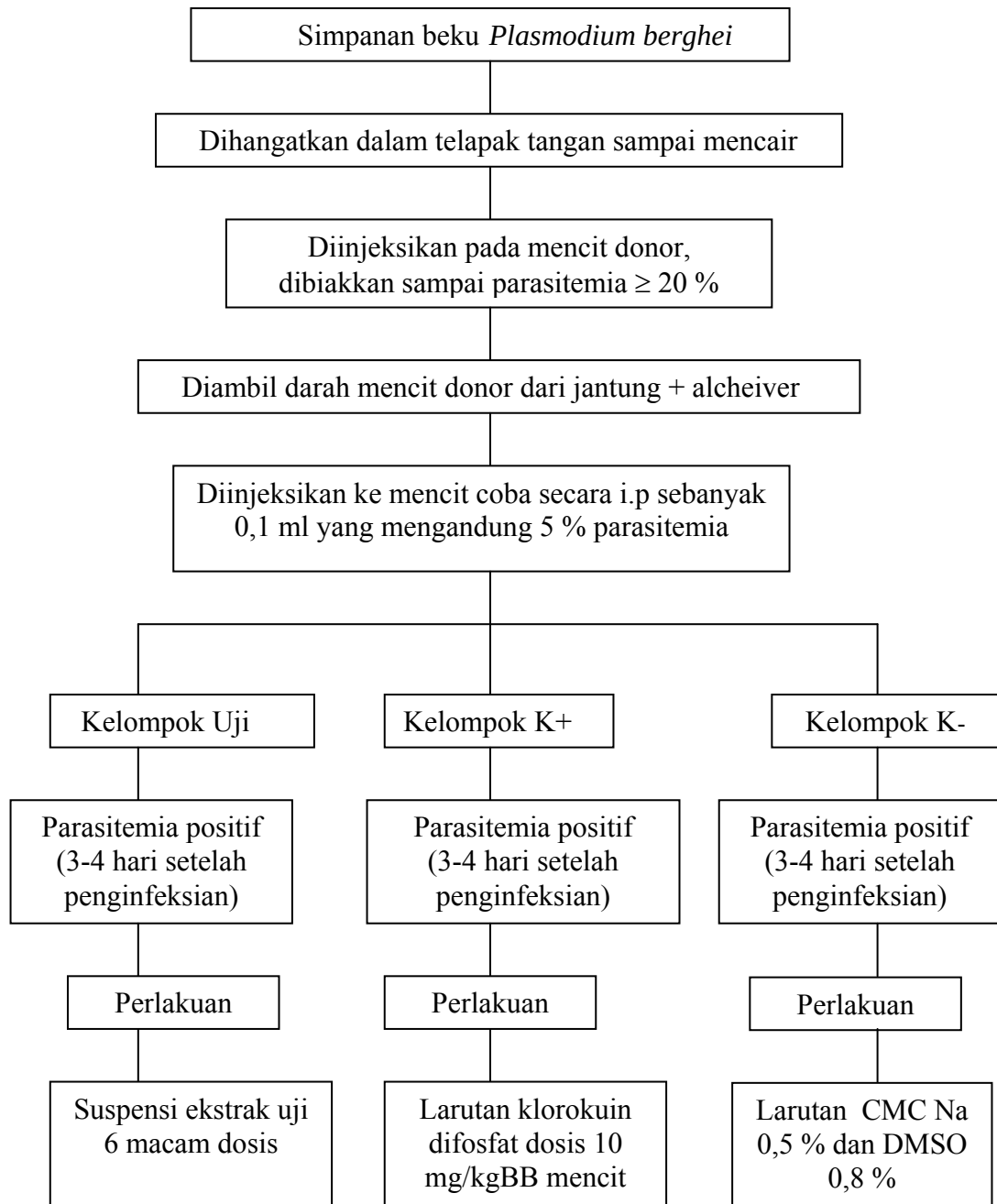
X_k : % pertumbuhan parasit rata-rata dari kontrol negatif

4.6 Skema Pembuatan Suspensi Ekstrak DCM & Metanol Biji Pronojiwo



Gambar 4.2 Skema Pembuatan Suspensi Ekstrak DCM & Metanol Biji Pronojiwo

4.7 Skema Penyiapan Parasit dan Uji Aktivitas Antimalaria



Gambar 4.3 Skema Penyiapan Parasit dan Uji Aktivitas Antimalaria

BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISA DATA

5.1 Pembuatan Ekstrak Diklorometana dan Metanol Biji *Kopsia arborea* Bl.

Ekstrak diklorometana didapat dengan proses destilasi sebanyak 6 kali dengan 1,7 liter diklorometana dengan teknik redestilasi sedangkan untuk ekstrak metanol, proses destilasinya sebanyak 6 kali dengan 2,35 liter teknik redestilasi. Hasil maserasi ditunjukkan dalam tabel V.1.

Tabel V.1 Hasil Pembuatan Ekstrak Diklorometana dan Metanol biji *Kopsia arborea* Bl

Berat serbuk yang ditimbang (g)	Berat ekstrak kental yang diperoleh (g)
200	DCM : 9,9964
200	Metanol : 35,7550

5.2 Pembuatan Suspensi Ekstrak Uji

Dibuat suspensi ekstrak diklorometana biji *Kopsia arborea* Bl dengan konsentrasi 16.000 µg/ml, yang diperoleh dengan cara : ditimbang 0,40 g ekstrak kental kemudian ditambahkan DMSO 0,8 % dan CMC Na 0,5 % dalam labu ukur sampai tepat 25 ml. Kemudian dibuat 6 macam dosis, sedangkan pembuatan untuk suspensi ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl dengan konsentrasi 10.000 µg/ml, yang diperoleh dengan cara : ditimbang 0,25 g ekstrak kental kemudian ditambahkan DMSO 0,8 % dan CMC Na 0,5 % dalam labu ukur sampai tepat 25 ml seperti yang tertera pada tabel V.2.

Tabel V.2 Hasil Pembuatan Suspensi Ekstrak Diklorometana dan Ekstrak Metanol Biji *Kopsia arborea* Bl dan kontrol

Nama Bahan	Penimbangan (g)	Konsentrasi induk ($\mu\text{g/ml}$)	Dosis suspensi uji (mg/25 g BB mencit)	Dosis suspensi uji (mg/kg BB mencit)
Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo	0,4008	16.032	4,0080	160,3200
			2,0040	80,1600
			1,2024	48,0960
			0,2004	8,0160
			0,0401	1,6032
			0,0200	0,8016
Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo	0,2503	10.012	1,8773	75,0900
			1,2515	50,0600
			0,6258	25,0300
			0,2503	10,0120
			0,1252	5,0060
			0,0250	1,0012
Kontrol Positif	0,1000	1.000	0,2500	10,0000
Kontrol Negatif	-	DMSO 0,8 % dan CMC Na 0,5 %	-	-

5.3 Hasil Penimbangan Mencit

Masing-masing mencit ditimbang beratnya, kemudian dari data tersebut dihitung volume suspensi ekstrak uji, tiap 25 g mencit diberi suspensi ekstrak uji 0,25 ml. Hasil penimbangan mencit dan volume suspensi yang diberikan pada mencit seperti yang tertera pada tabel V.3.

Tabel V.3 Berat Mencit (gram) dan Volume Suspensi Ekstrak DCM (ml)

Rep	Ket	Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo						K -	K +
		0,8016 mg/kg	1,6032 mg/kg	8,0160 mg/kg	48,0960 mg/kg	80,1600 mg/kg	160,3200 mg/kg		
1	Berat	23	27,5	25	25	22	22,5	22	32
	Vol	0,23	0,275	0,25	0,25	0,22	0,225	0,22	0,32
2	Berat	24,5	27	23	27	28	21,5	24	25
	Vol	0,245	0,27	0,23	0,27	0,28	0,215	0,24	0,25
3	Berat	23	24	22	31	22	19,5	21	27
	Vol	0,23	0,24	0,22	0,31	0,22	0,195	0,21	0,27

Tabel V.4 Berat Mencit (gram) dan Volume Suspensi Ekstrak Metanol (ml)

Rep	Ket	Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo						K –	K +
		1,0012 mg/kg	5,0060 mg/kg	10,0120 mg/kg	25,0300 mg/kg	50,0600 mg/kg	75,0900 mg/kg		
1	Berat	23	25	22	27	22,5	24	23,5	32
	Vol	0,23	0,25	0,22	0,27	0,225	0,24	0,235	0,32
2	Berat	25	24	26	21	21,5	23	22,5	25
	Vol	0,25	0,24	0,26	0,21	0,215	0,23	0,225	0,25
3	Berat	18	25	22	24	23,5	24	26	27
	Vol	0,18	0,25	0,22	0,24	0,235	0,24	0,260	0,27

Keterangan :

Rep : Replikasi

Vol : Volume suspensi ekstrak uji

K- : Kontrol negatif

K+ : Kontrol positif

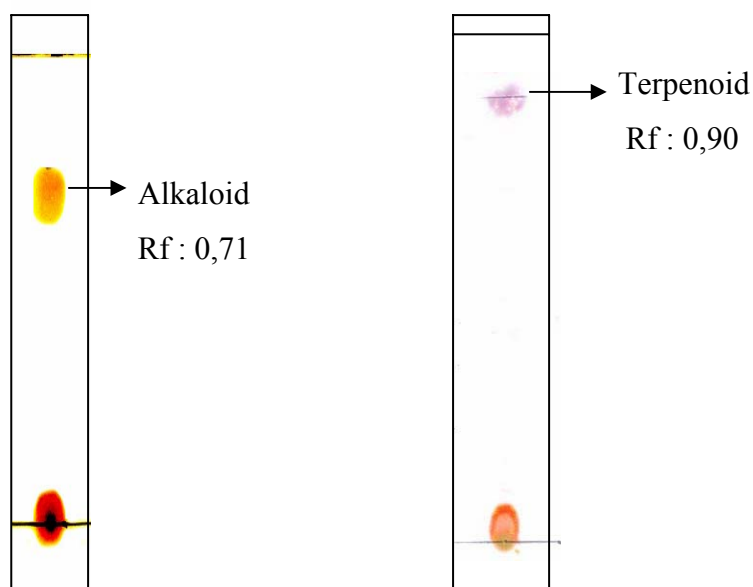
5.4 Hasil Uji Antimalaria

Hasil uji antimalaria dari ekstrak diklorometana dan ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl dan klorokuin difosfat dapat dilihat pada tabel V.5 - V.13. Contoh perhitungan terdapat pada lampiran 7-9.

5.5 Hasil Skrining Fitokimia

Ekstrak Diklorometana

Skrining	Metode deteksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Reaksi pengendapan : Pereaksi Mayer Pereaksi Wagner	(+) (+)	timbul kekeruhan / ada endapan timbul kekeruhan / ada endapan
	KLT fase diam : Kiesel gel GF fase gerak : etil asetat : metanol : air (100:16,5:13,5) penampak noda : Dragendorf	(+)	timbul noda warna oranye dengan pereaksi Dragendorf
Flavonoid	Reaksi Warna Uji Bate-Smith & Metcalf Uji Wilstater	(-) (-)	tidak terjadi perubahan warna tidak terjadi perubahan warna
	KLT fase diam : selulose fase gerak : butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) penampak noda : uap amoniak	(-)	tidak timbul noda warna kuning
Glikosida- Saponin	Uji buih	(-)	tidak terjadi buih
Steroid- Triterpen	Reaksi Warna Uji Liebermann-Burchard Uji Salkowski	(-) (-)	tidak terjadi perubahan warna tidak terbentuk cincin merah
	KLT fase diam : kiesel gel GF 254 fase gerak : n-heksana : etil asetat (4:1) penampak noda : anisaldehyd, kemudian dipanaskan	(+)	timbul noda warna merah-ungu dengan penampak noda anisaldehid yang kemudian dipanaskan



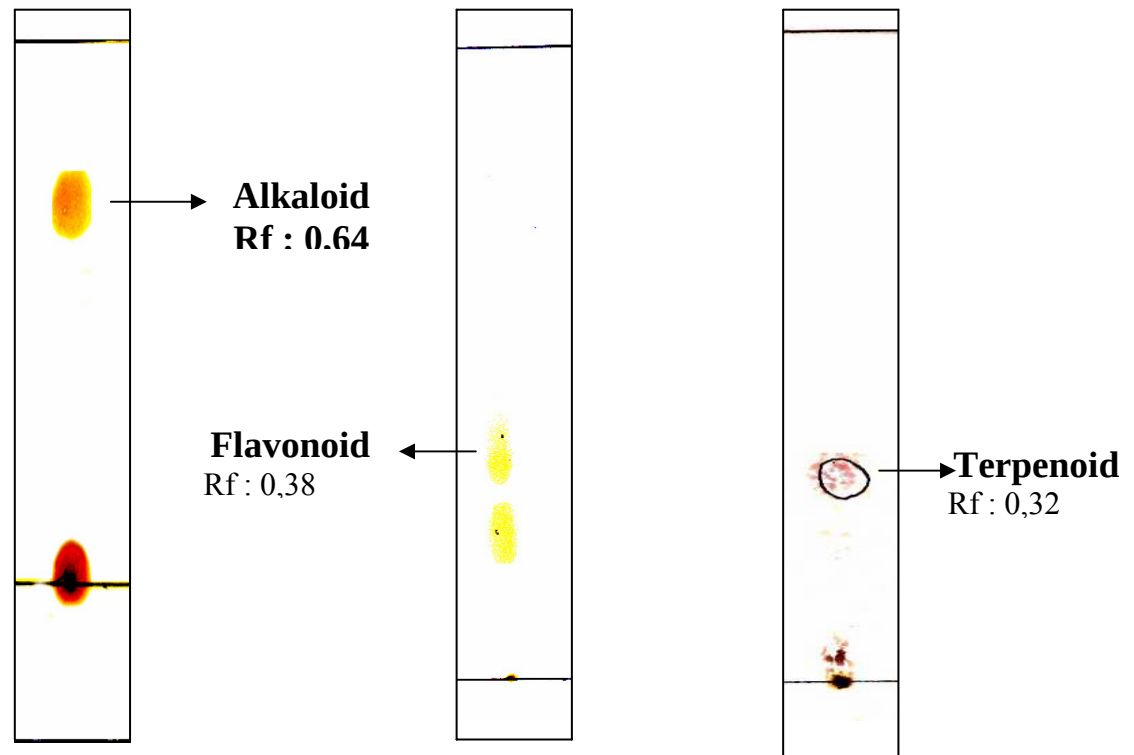
Gambar 5.1 Kromatogram Hasil KLT Ekstrak Diklorometana

Keterangan :

- (a) : Kromatogram hasil identifikasi senyawa alkaloid
 - fase diam : kiesel gel GF 254
 - fase gerak : etil asetat-metanol-air (100 : 16,5 : 13,5)
 - penampak noda : pereaksi Dragendorff
- (b) : Kromatogram hasil identifikasi senyawa terpenoid
 - fase diam : kiesel gel GF 254
 - fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)
 - penampak noda : anisaldehyd, kemudian dipanaskan

Ekstrak Metanol

Skrining	Metode deteksi	Hasil	Keterangan
Alkaloid	Reaksi pengendapan : Pereaksi Mayer Pereaksi Wagner	(+) (+)	timbul kekeruhan / ada endapan timbul kekeruhan / ada endapan
	KLT fase diam : Kiesel gel GF 254 fase gerak : etil asetat : metanol : air (100:16,5:13,5) penampak noda : Dragendorff	(+)	timbul noda warna oranye dengan pereaksi Dragendorff
Flavonoid	Reaksi Warna Uji Bate-Smith & Metcalf	(+)	terjadi perubahan warna merah terang-ungu
	Uji Wilstater KLT fase diam : kiesel gel GF 254 fase gerak : butanol : asam asetat glasial : air (4:1:5) penampak noda : uap amoniak	(+)	terjadi warna merah-jingga timbul noda warna kuning dengan uap amoniak
Glikosida- Saponin	Uji buih	(+)	terjadi buih yang stabil selama 30 menit
Steroid- Triterpen	Reaksi Warna Uji Liebermann-Burchard Uji Salkowski	(+) (-)	terjadi warna merah-ungu tidak terbentuk cincin merah
	KLT fase diam : kiesel gel GF 254 fase gerak : n-heksana : etil asetat (4:1) penampak noda : anisaldehyd yang kemudian dipanaskan	(+)	Timbul noda warna merah-ungu dengan penampak noda anisaldehid yang kemudian dipanaskan



Gambar 5.2 Kromatogram Hasil KLT Ekstrak Metanol

Keterangan :

- (a) : Kromatogram hasil identifikasi senyawa alkaloid
 - fase diam : kiesel gel GF 254
 - fase gerak : etil asetat-metanol-air (100 : 16,5 : 13,5)
 - penampak noda : pereaksi Dragendorf
- (b) : Kromatogram hasil identifikasi senyawa flavonoid
 - fase diam : kiesel gel GF 254
 - fase gerak : butanol-asam asetat glasial-air (4 : 1 : 5)
 - penampak noda : uap amoniak
- (c) : Kromatogram hasil identifikasi senyawa terpenoid
 - fase diam : kiesel gel GF 254
 - fase gerak : n-heksana : etil asetat (4 : 1)
 - penampak noda : anisaldehyd, kemudian dipanaskan

Tabel V.5 Persen Parasitemia dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan Kontrol

Dosis	Rep	Persen Parasitemia						
		Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo						
		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
K-	1	2,71	3,97	4,58	6,22	10,18	12,97	20,73
	2	4,72	8,32	11,19	13,37	15,31	25,30	29,01
	3	4,53	6,83	8,44	10,74	◆	◆	◆
0,8016 mg/kgBB mencit	1	7,75	8,46	8,80	13,11	14,77	16,55	21,66
	2	3,33	4,42	6,04	7,00	10,53	14,80	28,81
	3	4,30	5,58	8,94	10,33	12,72	17,38	22,32
1,6032 mg/kgBB mencit	1	3,21	4,33	5,99	9,90	10,36	13,65	26,39
	2	4,83	5,44	6,20	8,12	10,26	12,18	27,66
	3	3,15	5,73	7,70	9,77	11,86	14,93	24,22
8,0160 mg/kgBB mencit	1	2,30	2,84	2,89	3,21	4,17	6,98	12,93
	2	7,09	7,72	13,29	10,82	10,69	16,68	19,25
	3	5,82	6,41	13,30	14,91	13,08	21,76	27,33
48,0960 mg/kgBB mencit	1	1,29	2,67	4,46	2,51	2,01	6,45	18,45
	2	3,87	4,18	6,92	7,93	7,91	12,65	20,02
	3	2,12	2,98	4,52	7,01	9,61	11,28	25,81
80,1600 mg/kgBB mencit	1	4,41	4,29	4,36	5,86	8,99	13,33	30,54
	2	4,24	4,66	6,22	6,73	7,26	13,74	36,63
	3	9,61	9,62	13,79	13,74	13,96	21,60	38,35
160,3200 mg/kg BB mencit	1	3,01	4,12	5,64	6,34	4,02	11,38	14,04
	2	5,47	8,45	8,81	9,70	◆	◆	◆
	3	3,64	5,37	6,07	4,44	3,84	6,48	9,84
K+	1	2,54	4,65	1,61	0,42	1,60	0,14	0,00
	2	2,71	3,79	1,59	0,08	0,00	0,00	0,00
	3	2,36	3,10	1,24	0,53	0,10	1,02	0,45

Tabel V.6 Persen Parasitemia dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo dan Kontrol

Dosis	Rep	Persen Parasitemia						
		Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo						
		D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
K-	1	4,38	8,26	8,61	10,23	10,73	17,70	◆
	2	5,04	7,45	8,52	11,39	13,29	13,74	26,66
	3	1,72	3,40	4,29	5,46	6,84	8,30	13,92
1,0012 mg/kgBB mencit	1	3,10	4,26	4,80	5,27	8,12	12,56	20,89
	2	2,58	5,52	5,81	6,21	8,99	11,89	14,48
	3	3,44	5,16	5,66	7,73	9,75	12,36	13,65
5,0060 mg/kgBB mencit	1	3,49	4,74	6,11	6,64	9,66	18,43	23,04
	2	1,00	1,64	1,74	3,34	3,45	3,66	3,84
	3	3,27	4,41	4,79	5,07	9,18	10,32	11,78
10,0120 mg/kgBB mencit	1	5,56	7,61	9,05	11,31	11,95	20,96	28,69
	2	3,48	4,60	4,84	4,99	7,17	10,03	12,59
	3	3,14	4,49	4,88	5,14	5,79	13,18	19,70
25,0300 mg/kgBB mencit	1	3,18	3,84	3,95	4,13	6,04	15,44	16,56
	2	3,51	5,28	6,58	7,27	7,52	19,90	26,79
	3	4,37	4,83	4,89	4,93	7,69	12,03	12,83
50,0600 mg/kgBB mencit	1	2,17	3,18	4,23	3,62	3,43	12,96	21,37
	2	2,55	4,36	4,44	4,58	4,93	9,40	12,17
	3	5,85	6,70	7,39	6,86	◆	◆	◆
75,0900 mg/kgBB mencit	1	3,82	4,71	4,64	4,57	4,62	6,59	11,07
	2	4,71	5,64	6,18	5,90	6,16	11,96	12,43
	3	6,60	5,78	5,75	6,01	6,91	15,41	19,02
K+	1	2,54	4,65	1,61	0,42	1,60	0,14	0,00
	2	2,71	3,79	1,59	0,08	0,00	0,00	0,00
	3	2,36	3,10	1,24	0,53	0,10	1,02	0,45

Keterangan :

D₀-D₆ : Hari ke-0 sampai hari ke-6

◆ : Mencit mati

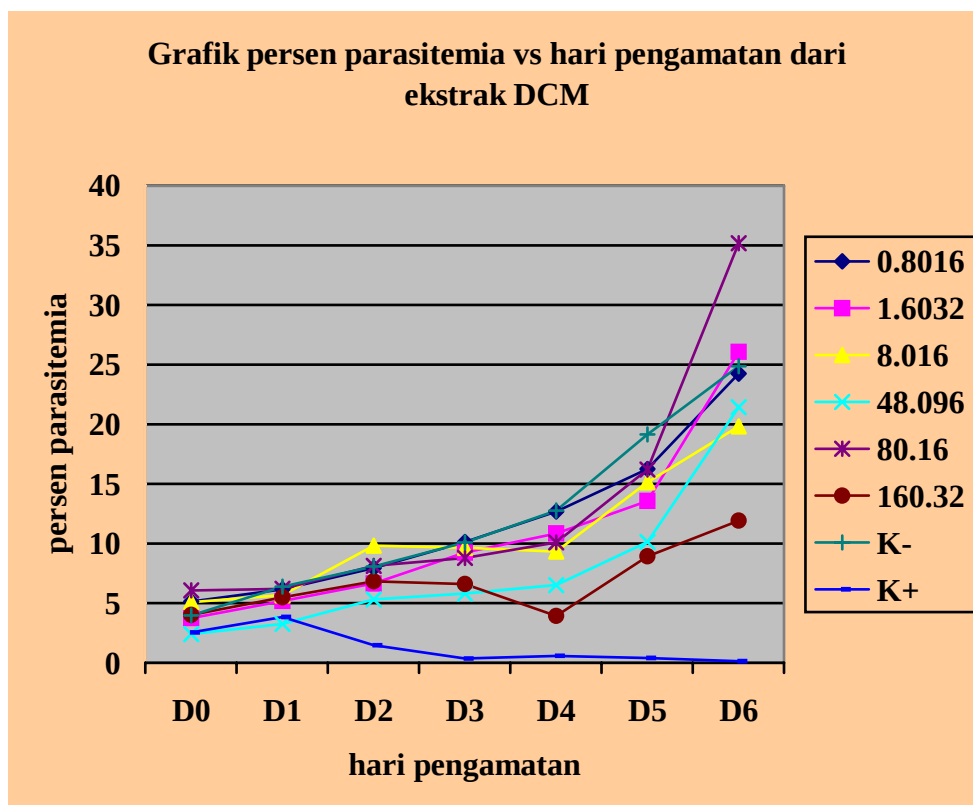
Rep : Replikasi

K- : Kontrol negatif

K+ : Kontrol positif

Tabel V.7 Persen Parasitemia Rata-rata dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan kontrol

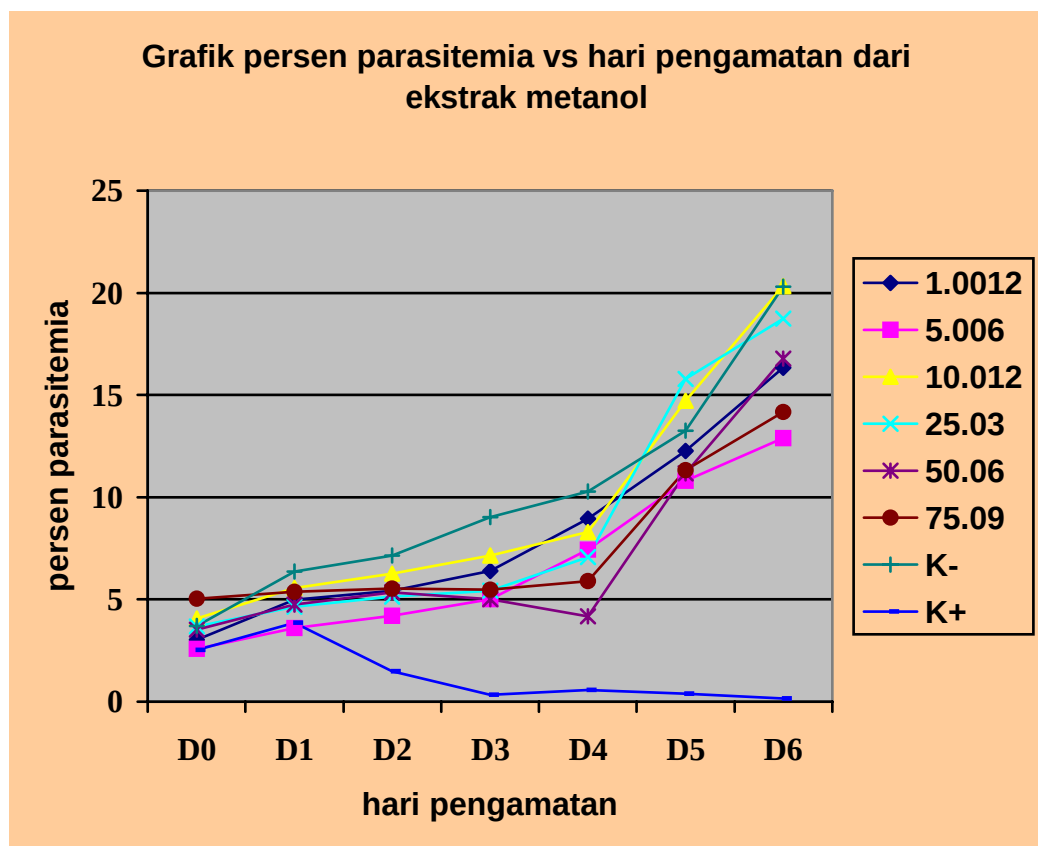
Dosis	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
K-	3,99	6,37	8,07	10,11	12,75	19,14	24,87
0,8016 mg/kg BB mencit	5,12	6,15	7,93	10,15	12,67	16,24	24,26
1,6032 mg/kgBB mencit	3,73	5,17	6,63	9,26	10,85	13,59	26,09
8,0160 mg/kgBB mencit	5,07	5,66	9,83	9,65	9,31	15,14	19,84
48,0960 mg/kgBB mencit	2,43	3,28	5,30	5,82	6,51	10,13	21,43
80,1600 mg/kgBB mencit	6,09	6,19	8,12	8,78	10,07	16,22	35,17
160,3200 mg/kg BB mencit	4,04	5,47	6,84	6,62	3,93	8,93	11,94
K+	2,54	3,85	1,48	0,34	0,57	0,39	0,15



Gambar 5.3 Grafik Persen Parasitemia vs Hari Pengamatan

Tabel V.8 Persen Parasitemia Rata-rata dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo dan Kontrol

Dosis	D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
K-	3,71	6,37	7,14	9,03	10,29	13,25	20,29
1,0012 mg/kg BB mencit	3,04	4,98	5,42	6,40	8,95	12,27	16,34
5,0060 mg/kgBB mencit	2,59	3,60	4,21	5,02	7,43	10,80	12,89
10,0120 mg/kgBB mencit	4,06	5,57	6,26	7,15	8,30	14,72	20,33
25,0300 mg/kgBB mencit	3,69	4,65	5,14	5,44	7,08	15,79	18,73
50,0600 mg/kgBB mencit	3,52	4,75	5,35	5,02	4,18	11,18	16,77
75,0900 mg/kg BB mencit	5,04	5,38	5,52	5,49	5,90	11,32	14,17
K+	2,54	3,85	1,48	0,34	0,57	0,39	0,15



Gambar 5.4 Grafik Persen Parasitemia vs Hari Pengamatan

Tabel V.9 Persen Pertumbuhan Parasit dan Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo dan Kontrol

Dosis	Rep	% pertumbuhan	% penghambatan	% penghambatan rata-rata
Kontrol Negatif	1	1,87		—
	2	2,65		
	3	2,07		
	% rata-rata	2,20		
0,8016 mg/kg BB mencit	1	1,76	20,00	14,09
	2	1,80	18,18	
	3	2,11	4,09	
1,6032 mg/kg BB mencit	1	1,79	18,64	19,24
	2	1,36	38,18	
	3	2,18	0,91	
8,0160 mg/kg BB mencit	1	0,47	78,64	37,28
	2	1,55	29,55	
	3	2,12	3,64	
48,0960 mg/kg BB mencit	1	0,79	64,09	44,24
	2	1,02	53,64	
	3	1,87	15,00	
80,1600 mg/kg BB mencit	1	1,18	46,36	53,94
	2	0,76	65,45	
	3	1,10	50,00	
160,3200 mg/kg BB mencit	1	0,83	62,27	60,00
	2	1,20	45,45	
	3	0,61	72,27	

Tabel V.10 Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo

Dosis	Persen Penghambatan Rata-rata
0,8016 mg/kg BB mencit	14,09
1,6032 mg/kg BB mencit	19,24
8,0160 mg/kg BB mencit	37,28
48,0960 mg/kg BB mencit	44,24
80,1600 mg/kg BB mencit	53,94
160,3200 mg/kg BB mencit	60,00

Tabel V.11 Persen Pertumbuhan Parasit dan Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo dan Kontrol

Dosis	Rep	% pertumbuhan	% penghambatan	% penghambatan rata-rata
Kontrol Negatif	1	1,59		–
	2	2,06		
	3	1,28		
	% rata-rata	1,64		
1,0012 mg/kg BB mencit	1	1,26	21,74	9,76
	2	1,60	0,62	
	3	1,58	1,86	
5,0060 mg/kg BB mencit	1	1,54	4,35	26,22
	2	0,61	62,11	
	3	1,48	8,07	
10,0120 mg/kg BB mencit	1	1,60	0,62	35,37
	2	0,92	42,86	
	3	0,66	59,00	
25,0300 mg/kg BB mencit	1	0,72	55,28	48,17
	2	1,00	37,89	
	3	0,83	49,39	
50,0600 mg/kg BB mencit	1	0,52	67,70	66,87
	2	0,60	62,73	
	3	0,51	68,32	
75,0900 mg/kg BB mencit	1	0,24	85,37	80,49
	2	0,43	73,29	
	3	0,29	81,99	

Tabel V.12 Persen Penghambatan Rata-rata dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo

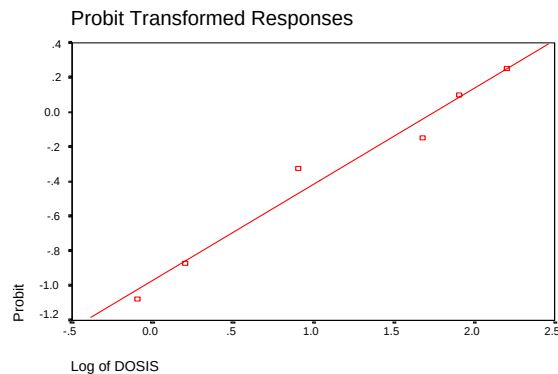
Dosis	Persen Penghambatan Rata-rata
1,0012 mg/kg BB mencit	9,76
5,0060 mg/kg BB mencit	26,22
10,0120 mg/kg BB mencit	35,37
25,0300 mg/kg BB mencit	48,17
50,0600 mg/kg BB mencit	66,87
75,0900 mg/kg BB mencit	80,49

5.5 Analisis Data

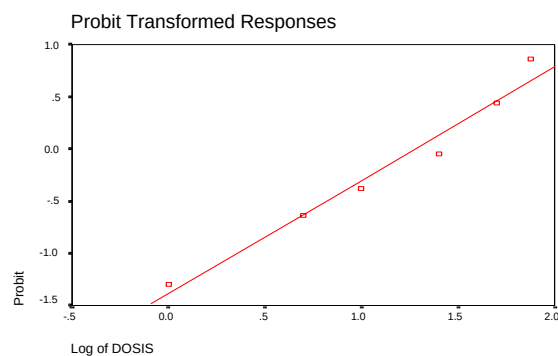
Dari hasil analisa probit tersebut diperoleh informasi mengenai dosis efektif 50 (Effective Dose 50 = ED₅₀) dari ekstrak diklorometana dan metanol biji *Kopsia arborea* Bl terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit. Harga ED₅₀ ini menunjukkan besarnya dosis ekstrak yang dapat menghambat 50%

pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Semakin kecil harga ED_{50} maka semakin besar efektivitas penghambatan ekstrak terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Hasil analisis probit dapat dilihat pada lampiran 10.

Profil Probit Persen Penghambatan dengan Dosis dari Ekstrak DCM
Biji *Kopsia arborea* Bl



Profil Probit Persen Penghambatan dengan Dosis dari Ekstrak Metanol
Biji *Kopsia arborea* Bl



Gambar 5.5 Kurva Hubungan Probit Persen Penghambatan dengan Dosis

Tabel V.13 Harga ED_{50} dari Ekstrak Diklorometana dan Metanol
Biji Pronojiwo serta Klorokuin difosfat

Nama Bahan	Harga ED_{50}
Ekstrak Diklorometana Biji Pronojiwo	57,06942
Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo	19,38764
Klorokuin difosfat	0,16083

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian yang dilakukan adalah tentang uji aktivitas antimalaria pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dengan menggunakan ekstrak diklorometana dan metanol. Uji aktivitas antimalaria ini, menggunakan dua bahan uji yaitu ekstrak diklorometana dan ekstrak metanol. Hal ini dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui harga ED_{50} dari masing-masing ekstrak dari tanaman pronojiwo (*Kopsia arborea* Bl). Karena kandungan aktif dari tanaman pronojiwo sebagai antimalaria belum diketahui, maka dilakukan ekstraksi dengan pelarut yang tingkat kepolarannya berbeda, dengan tujuan agar diperoleh bahan-bahan yang larut di bagian polar maupun di bagian semipolar.

Pronojiwo dipilih pada penelitian aktivitas antimalaria ini karena banyak tanaman yang satu suku dengan tanaman ini telah digunakan secara tradisional sebagai obat malaria baik di Indonesia maupun di Amerika Selatan. Dan masyarakat banyak menggunakan bagian biji dari pronojiwo untuk mengobati berbagai macam penyakit sehingga pada penelitian ini yang dimanfaatkan adalah bagian biji dari tanaman pronojiwo. Pada beberapa penelitian pendahuluan untuk aktivitas yang lain juga digunakan bagian biji dari pronojiwo.

Penelitian ini menggunakan serbuk pronojiwo dengan berat 200 gram yang diekstraksi dengan pelarut DCM dan metanol. Dan berat ekstrak kental yang diperoleh untuk ekstrak DCM adalah sebesar 10 gram sedangkan untuk ekstrak metanol sebesar 35,75 gram. Ekstrak metanol yang diperoleh banyak dibandingkan ekstrak DCM, hal ini karena banyak senyawa yang tertarik dalam pelarut polar sehingga jumlah ekstrak yang dihasilkan juga bertambah besar.

Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak DCM pronojiwo mengandung senyawa golongan alkaloid dan terpenoid sedangkan ekstrak metanol mengandung alkaloid, flavonoid, terpenoid dan saponin. Pada ekstrak DCM tidak ditemukan senyawa golongan flavonoid, hal ini karena flavonoid banyak larut atau tertarik pada senyawa polar dan ini ditunjukkan oleh hasil skrining ekstrak metanol yaitu dengan ditemukannya senyawa flavonoid. Pada

beberapa penelitian ternyata golongan-golongan senyawa pada pronojiwo telah terbukti mempunyai aktivitas antimalaria.

Pada uji aktivitas antimalaria ini suspensi uji diberikan secara oral sehari sekali selama empat hari berturut-turut (D_0 - D_3). Penggunaan obat dengan rute peroral karena ekstrak uji berbentuk suspensi. Sedangkan pemberian sehari sekali selama empat hari berturut-turut dengan alasan diinginkan obat malaria yang pemberiannya cukup sehari sekali dan dalam waktu empat hari sudah dapat menghambat pertumbuhan parasit secara efektif.

Kenaikan pertumbuhan parasit setiap dosis terlihat cukup besar variasinya antar mencit, hal ini disebabkan perbedaan kondisi tubuh tiap-tiap mencit berbeda atau adanya perbedaan fisiologis antar mencit yang cukup berpengaruh yang diakibatkan sistem imun yang dimiliki oleh setiap mencit berbeda-beda serta luas tempat absorpsi di peritoniumnya selain disebabkan juga oleh kesalahan atau faktor teknis. Dibandingkan dengan klorokuin yang memiliki waktu paruh eliminasi yang cukup panjang yaitu sekitar 127 jam atau 5 hari, ekstrak uji dieliminasi oleh tubuh dengan cepat sehingga dapat disimpulkan bahwa penggunaan ekstrak uji tidak memberikan efek sisa atau dengan kata lain waktu paruh ekstrak uji tidak panjang atau cepat diekskresi oleh tubuh mencit. Berkurangnya senyawa aktif dari ekstrak uji atau cepatnya proses eliminasi ekstrak uji menyebabkan populasi parasit tidak terhambat lagi pertumbuhannya dan dapat dengan cepat bermultiplikasi.

Pada dosis yang samapun antara replikasi satu dengan yang lain ada kondisi yang menunjukkan perbedaan yang cukup besar dalam laju pertumbuhan parasitnya, hal ini dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain faktor fisiologis dan kondisi patologis. Faktor fisiologis antar mencit yang cukup berpengaruh adalah sistem imun yang dimiliki oleh setiap mencit berbeda-beda sedangkan kondisi patologis yang terjadi setelah terinfeksi parasit juga berbeda antar mencit.

Hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya aktivitas antimalaria diketahui dengan membuat grafik antara dosis dengan persen penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Selanjutnya dilakukan analisis probit menggunakan program SPSS windows 10.0 sehingga diperoleh harga ED_{50} dari ekstrak uji yang mempunyai arti dosis efektif yang dapat menghambat 50%

pertumbuhan *Plasmodium berghei* dibandingkan dengan kontrol negatif. Semakin kecil harga ED₅₀ maka semakin efektif atau semakin besar efektivitas ekstrak uji terhadap *Plasmodium berghei in vivo*. Hasil analisis probit menunjukkan bahwa ekstrak diklorometana biji *Kopsia arborea* Bl mempunyai harga ED₅₀ sebesar 57,06942 mg/kg BB mencit sedangkan ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl mempunyai harga ED₅₀ sebesar 19,38764 mg/kg BB mencit. Dengan demikian dapat dikatakan bahwa ekstrak metanol lebih efektif sebagai antimalaria daripada ekstrak DCM.

Berdasarkan literatur, ekstrak uji dikatakan mempunyai aktivitas antimalaria jika mampu menghambat pertumbuhan parasit ≥ 30 %. Penelitian tersebut menunjukkan bahwa ekstrak diklorometana dan metanol biji *Kopsia arborea* Bl mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei in vivo* pada mencit, karena ekstrak uji mempunyai daya hambat terhadap *Plasmodium berghei* mencapai 60,00 % dan 80,49 %. Baik ekstrak DCM maupun ekstrak metanol menunjukkan peningkatan persen penghambatan terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* sebanding dengan peningkatan dosis. Hal ini ditunjukkan oleh data untuk ekstrak DCM biji pronojiwo pada dosis 0,8016 mg/kg BB mencit, 1,6032 mg/kg BB mencit, 8,0160 mg/kg BB mencit, 48,0960 mg/kg BB mencit, 80,1600 mg/kg BB mencit dan 160,3200 mg/kg BB mencit masing-masing menunjukkan persen penghambatan terhadap *Plasmodium berghei* sebesar 14,09 %; 19,24 %; 37,28 %; 44,24 %; 53,94 % dan 60,00 % sedangkan untuk ekstrak metanol pada dosis 1,0012 mg/kg BB mencit; 5,0060 mg/kg BB mencit; 10,0120 mg/kg BB mencit; 25,0300 mg/kg BB mencit; 50,0600 mg/kg BB mencit dan 75,0900 mg/kg BB mencit menunjukkan persen penghambatan terhadap *Plasmodium berghei* masing-masing sebesar 9,76 %; 26,22 %; 35,37 %; 48,17 %; 66,87 % dan 80,49 %.

Dari hasil penelitian ini belum dapat ditentukan kandungan mana dari pronojiwo yang mempunyai aktivitas antimalaria, sehingga perlu dilakukan fraksinasi terhadap ekstrak uji terutama dari kandungan kimia yang terdapat dalam tanaman pronojiwo yaitu alkaloid, flavonoid dan terpenoid serta isolasi terhadap senyawa aktif yang diduga mempunyai aktivitas antimalaria.

BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. Kesimpulan

Dari penelitian uji aktivitas antimalaria ekstrak DCM dan metanol biji *Kopsia arborea* Bl terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vivo* pada mencit dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak DCM dan metanol biji *Kopsia arborea* Bl mempunyai aktivitas antimalaria yaitu dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* *in vivo* pada mencit.
2. Harga ED₅₀ dari ekstrak DCM biji *Kopsia arborea* Bl adalah 57,06942 mg/kg BB mencit sedangkan ED₅₀ dari ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl adalah 19,38764 mg/kg BB mencit.

7.2 Saran

Untuk menunjang hasil penelitian yang lebih sempurna dan pengembangan metode yang lebih tepat maka perlu dilakukan :

1. Penelitian lebih lanjut terhadap ekstrak diklorometana dan ekstrak metanol biji *Kopsia arborea* Bl terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* secara *in vitro*.
2. Isolasi senyawa aktif antimalaria yang terdapat dalam tanaman pronojiwo.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajaiyeoba, E.O., 1999. *In vivo* antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 67, No. 3, Amsterdam : Elsevier, p. 323
- Anthony.J.,M., Li Ping-tao and David.J., **Apocynaceae**, <http://flora.huh.harvard.edu/china/mss/volume16/Apocynaceae.published.pdf>, p. 162
- Ashton, P.S., 2003. Floristic zonation of tree communities on wet tropical mountains revisited. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**. <http://www.urbanfishcer.de/journals/ppees>. 5 Januari 2004
- Backer, C.A., and Bachuizen van den brink, J.R., 1965. **Flora of Java**. 2, N.V.P. Noordhoff-Groningen-the Netherland, p. 232
- Boesri, H., 1994. Pemanfaatan tanaman dalam penanggulangan malaria. **Media Litbangkes**, Volume 4 No. 01, ISSN 0853-9987, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hal. 20-21
- Bourdy, G., Callapa, J., 2000. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plant use by Mosetene indians. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol.69. No. 2, August-May, Amsterdam : Elsevier, p.139-141
- Carter, R., and Diggs, C.L., 1977. **Plasmodia of Rodent**. In : Parasitic Protozoa, Vol. 3, page 359-465
- Carvalho, L.H., Brandao, M.G.L., Santos-Filho D., Lopes, J.L.C., Krettli, A.U., 1991. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied *in vivo* in *Plasmodium berghei* infected mice and *in vitro* against *Plasmodium falciparum* in culture. **Brazilian Journal Medical Biology Resistance**. 24 : 1113-1123
- Chatterjee, A., Deb.A., Chemistry of Kopsine, an indol in Alkaloid of *Kopsia arborea* and its biogenesis, **Chemical abstract**, vol. 64, 3622 C
- Depkes, 1995. **Materia Medika Indonesia**, Jilid V, Jakarta : Departemen Kesehatan Republik Indonesia, hal. 97-100
- Depkes RI, 1992. **Pedoman Rasionalisasi Komposisi Obat Tradisional**, Jakarta : Depkes RI, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, hal. 51

- Gandahusada, S., 1998. **Parasitologi Kedokteran**, Edisi ke tiga, Jakarta : Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 192-209
- Ganiswara, S., 1995. **Farmakologi dan Terapi**, Edisi IV, Jakarta : Bagian Farmakologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, hal. 545-547
- Harborne, J.B., 1987. **Metode Fitokimia**, Bandung : Institut Teknologi Bandung
- Harborne, J.B., & Dey, P.M., 1991. **Methods in Plant Biochemistry**, Vol. 6, Assay for Bioactivity, London, San Diego, New York, Academic Press, page 138-140
- Hegnauer, R., 1966. **Chemotaxonomie der Pflanzen**, Band III, Birkhauser Verlag Basel Und Stuttgart, 124-128; 136; 140
- [Http://www.qsb.org/plants_th.asp](http://www.qsb.org/plants_th.asp)
- Intaningrum, L.R., 1994. Isolasi dan identifikasi senyawa golongan alkaloida biji *Kopsia arborea* Bl. **Skripsi**, Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Kudo, R.R., 1966. **Protozoology**, Illinois, USA : Charles C., Thomas Publizer, Springfield, page 71737
- Leiden University Medical Center, 2002. **The Plasmodium berghei Research Model of Malaria**.
<http://www.lumc.nl/1040/research/malaria/model01.html>. last update 19 Juli 2002
- Lestadi, J., Haryanto, T., 1983. Perbandingan efektivitas antara chloroquine dan fansidar terhadap malaria di daerah Timor Timur, **Medika** No 11 Tahun 9, Jakarta : Gabungan perusahaan farmasi Indonesia & PT Grafiti Medika Pers, hal 927-928
- Lopes, N.P., 1999. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surumanensis* (Rol.) Warb. By Waiapi Amazone Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 67, No. 3, Amsterdam : Elsevier, p. 315
- Mardisiswojo, S., Radjakmangunsudarso, H., 1985. **Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang**. Jilid I, Jakarta : PN Balai Pustaka, hal. 165
- Mons, B., 1986. Acta Leiden.54, 1-124. <http://www.lumc.nl>, 5 Januari 2004
- Munoz, V., Sauvain, M., 1999. Antimalarial Activity and Cytotoxicity of (-)-Roemrefidine Isolated from the Stem Bark of *Sparattanthelium amazonum*. **Planta Medica** Journal of Medicinal Plant Research, Vol. 65 No. 4, page 448-449, Newyork : Thieme

- Mursito, B., 2002. **Ramuan tradisional untuk penyakit malaria**, Jakarta : Swadaya
- Phillipson, J.D., 1991. Assay for antimalarial and amoebicidal activities. **Methods in Plant Biochemistry**, Vol. 6, London : Academic Press Harcourt Brace Jovanovich Publisher, page 140
- Plumeria rubra. <http://www.prn2.usm.my/mainsite/plant/plumeria.html>, 16 Desember 2003
- Rahman, N.N.N.A., 1999. Antimalarial activity of extract of Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 64, No. 3, Amsterdam : Elsevier, p. 250-253
- Ritschel, W.A., 1986. **Handbook of Basic Pharmacokinetics**, third edition, USA : Drug intelligence publications, INC, Hamilton IL 62341
- Safitri, I., Pusarawati, S., 2000. Variasi genetik gen MSA 1 blok 2 *Plasmodium falciparum* di daerah endemis malaria provinsi Nusa Tenggara Timur. **Jurnal Penelitian Unair**, Surabaya, hal. 3
- Sastrapradja, S., Afriastini, J.J., 1984. **Polong-polongan Perdu**, Bogor : Lembaga Biologi Nasional LIPI, hal 63
- Seigler, D.S., **Plant Biology 363, Plant Secondary Metabolism**, 1. <http://www.life.uiuc.edu/plantbio/363/indolealkaoides.html>, 19 Juni 2003
- Sherman, W.I., 1998. **Malaria Parasite Biology, Pathogenesis and Protection**, Chapter 2, Washington D.C, ASM Press, page 17
- Sinden, R.E., 1997. **Infection of Mosquitoes with Rodent Malaria**. In : Molecular Biology of Insect Disease Vectors : A Methods Manual (Crampton. J.M., Beard, C.B. and Louis, C., eds) Chapman and Hall. London, p. 67-91
- Siswandono dan Soekardjo, B., 2000. **Kimia Medisinal** Jilid 2, Surabaya : Airlangga University Press, hal. 84-86
- Sitepu, D., 1996. **Prosiding Simposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII**, ISSN 979-95152-03, Bogor : Perhimpunan Bahan Obat Alami kerjasama dengan Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat
- Soejoeti, S.Z., 1995. Persepsi masyarakat mengenai penyakit malaria hubungannya dengan kebudayaan dan perubahan lingkungan, **Media Litbangkes** Vol. 5 No. 02, ISSN 0853-9987, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hal 12-13

- Soejitno, Sudomo, M., Idris, N.S., 1997. Prevalensi malaria di desa Sihepang dan Aek Badak Jae, Kabupaten Tapanuli Selatan, Sumatera Utara, **Media Litbangkes**, Volume 7 No. 03 & 04, ISSN 0853-9987, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hal. 12
- Sudomo, M., 1994. Penelitian epidemiologi malaria di daerah kejadian luar biasa di Tapanuli Selatan, Sumatera Utara Tahap II, **Media Litbangkes**, Volume 4 No 02, ISSN 0853-9987, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hal. 11
- Sudomo, M., 1994. Perusakan hutan mangrove dan penularan malaria, **Media Litbangkes**, Volume 4 No. 04, ISSN 0853-9987, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan, hal. 17
- Sulaksono, E., Dewi, R.M., 1994. Pengaruh pasase *Plasmodium berghei* pada mencit strain Swiss. **Cermin Dunia Kedokteran** No. 94, Jakarta : Depkes RI, hal. 61
- Sutaryo, B., 1994. Tumbuhan sebagai sumber obat antimalaria, **Buletin ISFI, Jawa Timur**, Volume 22, No. 1, Jakarta : Fakultas Farmasi Universitas Pancasila, hal. 8-17
- Suwarni, Tuti, S., Dewi, R.M., Marwoto, H.A., 1994. Pengaruh klorokuin terhadap jumlah parasit pada mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. **Cermin Dunia Kedokteran** No. 94, Jakarta : Depkes RI, hal. 58
- Syeni, 1992. Pengaruh pemberian suspensi biji *Kopsia arborea* Bl secara oral terhadap kadar glukosa darah kelinci dengan cara uji toleransi glukosa. **Skripsi**, Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Tjitra, E., 1994. Obat-obat baru antimalaria. **Cermin Dunia Kedokteran** No. 94, ISSN 0125-913X, Jakarta : Grup PT Kalbe Farma, hal. 18
- Varea, T., 1993. Indol Alkaloid from *Kopsia teoi*, **Journal Nat**, Prod. Cincinnati American Society of Pharmacognocny and the Lloyid Library and Museum, Vol. 56, No. 12, page 2166-2169
- Widyawati, W., 1996. Praskrining aktivitas antikanker ekstrak buah *Kopsia arborea* Bl metode brine shrimp. **Skripsi**, Surabaya : Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

Lampiran 1

Gambar Biji *Kopsia arborea* Bl (Apocynaceae)



Sumber : http://www.qsbg.org/plants_th.asp

Lampiran 2

Surat Keterangan Identifikasi *Kopsia arborea* Bl



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

Jl. Dharmawangsa Dalam, Surabaya - 60286 Telpn. (031) 5033710

SURAT KETERANGAN

No. : 07/J03.1.20.2/DT/2004

Telah dilakukan Identifikasi/determinasi :

Dari tumbuhan : Pronojiwo
a.n. Saudara/I / No.Mhs. : **RULLY YULIANDHARI / 050012301**
Untuk keperluan : Skripsi

Hasil Identifikasi/determinasi dari tumbuhan tersebut diatas :

nama ilmiah (species) : ***Kopsia arborea* Bl.**
suku (familia) : **Apocynaceae**

Demikian surat keterangan ini untuk dapat dipergunakan seperlunya.

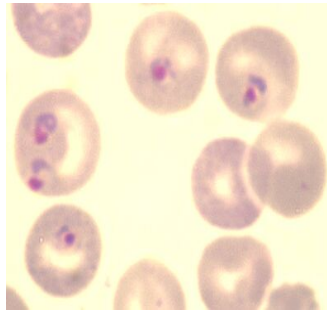


Surabaya, 15 April 2004
Dosen Taksonomi Tumbuhan,

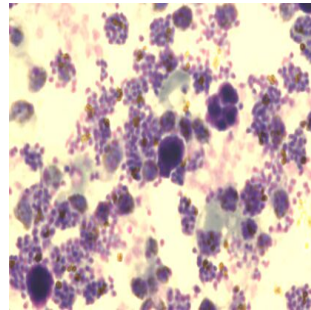
Dr. Bambang Prajogo EW., Apt., MS.
NIP. 131 470 993

Lampiran 3

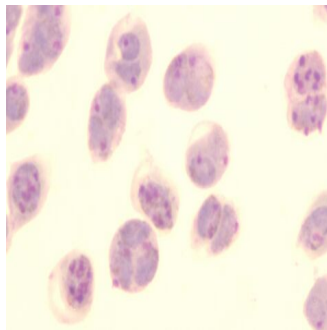
Morfologi *Plasmodium berghei*



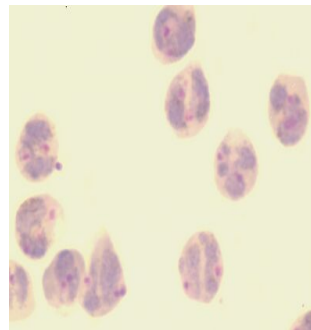
(a)



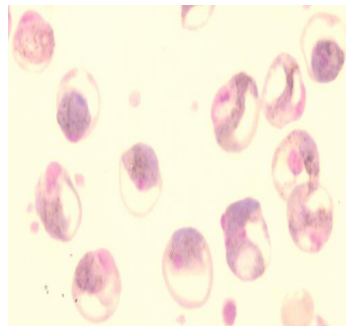
(b)



(c)



(d)



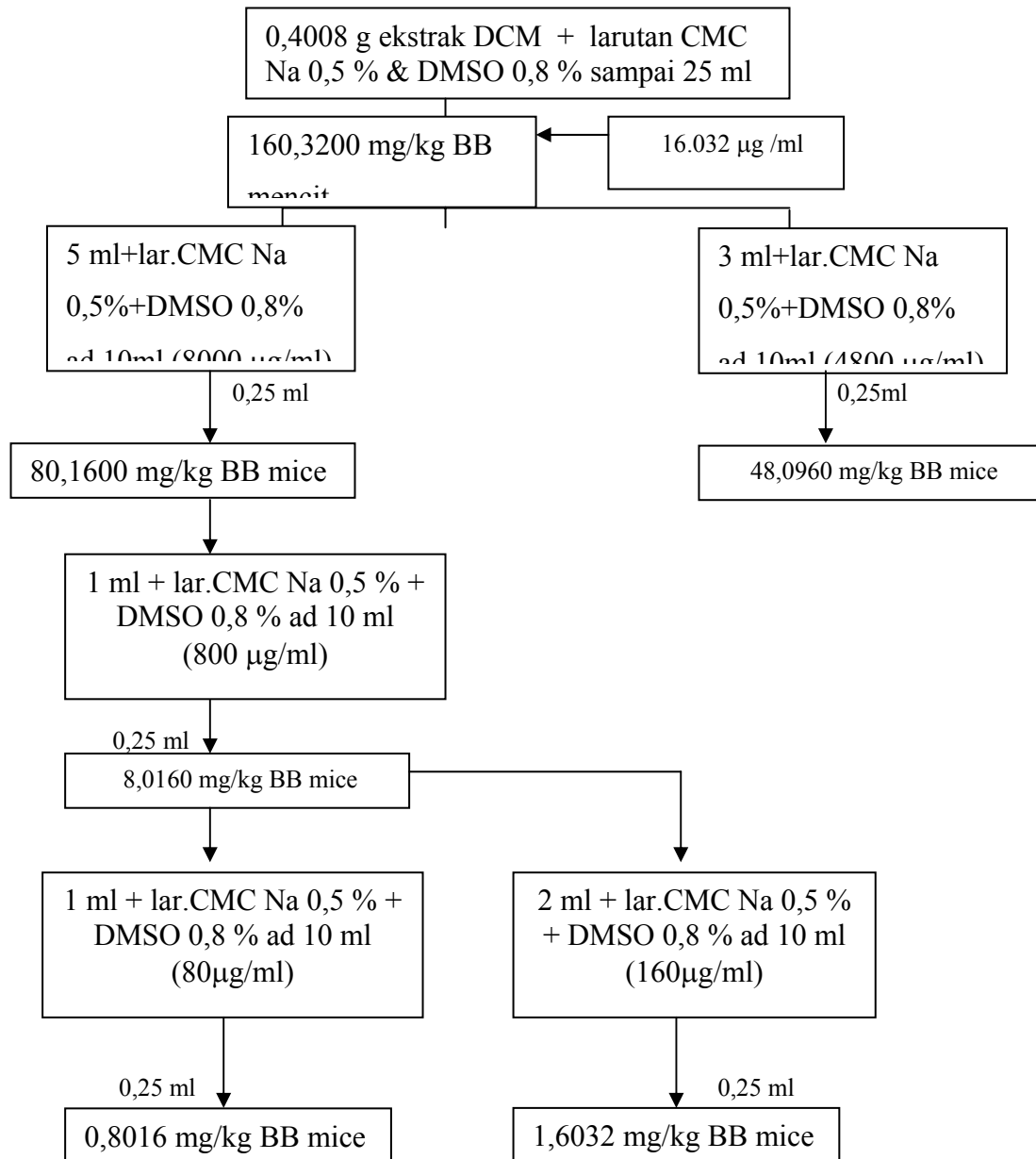
(e)

Keterangan :

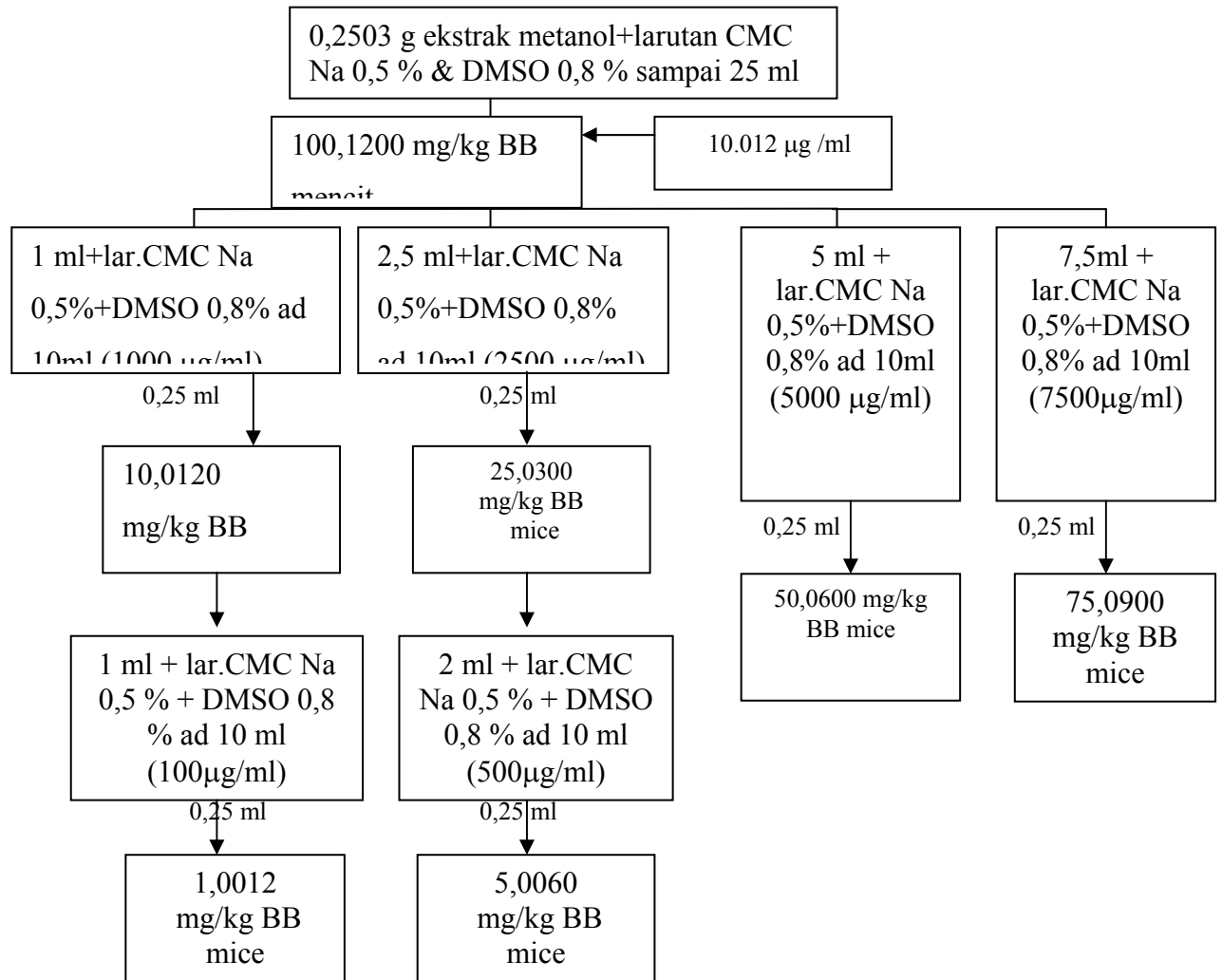
- (a) Bentuk cincin (Ring form)
- (b) Skison
- (c) Troposoid muda
- (d) Troposoid dewasa
- (e) Gametosit

Sumber : Mons, B., 1986. Acta Leiden 54

Lampiran 4

Pembuatan suspensi ekstrak uji

Pembuatan suspensi ekstrak uji



Lampiran 5

Pembuatan kontrol positif

0,0100 g klorokuin difosfat + 1ml DMSO + CMC Na 0,5% sampai 10 ml sehingga didapatkan konsentrasi = $\frac{0,0100 \times 1000000 \text{ } \mu\text{g}}{10 \text{ ml}} = 1000 \text{ } \mu\text{g} / \text{ml}$



untuk 0,25 ml = $0,25 \times 1000 \text{ } \mu\text{g} / \text{ml} = 250 \text{ } \mu\text{g}$
 = 0,25 mg/25 g mencit = 10 mg / kg BB mencit

Lampiran 6

Volume suspensi ekstrak uji

Berdasarkan berat badan mencit, dihitung volume larutan uji yang diberikan pada mencit. Contoh perhitungannya sebagai berikut :

Larutan ekstrak uji dosis 75,0900 mg/kg BB :

$$\text{➤ Replikasi 1 : } \frac{24 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,24 \text{ ml}$$

$$\text{➤ Replikasi 2 : } \frac{23 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,23 \text{ ml}$$

$$\text{➤ Replikasi 3 : } \frac{24 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,24 \text{ ml}$$

Kontrol positif :

$$\text{➤ Replikasi 1 : } \frac{32 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,32 \text{ ml}$$

$$\text{➤ Replikasi 2 : } \frac{25 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,25 \text{ ml}$$

$$\text{➤ Replikasi 3 : } \frac{27 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,27 \text{ ml}$$

Kontrol negatif :

$$\text{➤ Replikasi 1 : } \frac{23,5 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,235 \text{ ml}$$

$$\text{➤ Replikasi 2 : } \frac{22,5 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,225 \text{ ml}$$

$$\text{➤ Replikasi 3 : } \frac{26 \text{ g}}{25 \text{ g}} \times 0,25 \text{ ml} = 0,260 \text{ ml}$$

Lampiran 7

Persen parasitemia

Untuk menghitung persen parasitemia, digunakan rumus sebagai berikut :

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

Contoh perhitungan persen parasitemia :

Untuk Ekstrak DCM dosis 160,32 mg/kg BB mencit replikasi ke-1

➤ Jumlah eritrosit yang terinfeksi tiap $\pm$ 5000 eritrosit = 151

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{151}{5017} \times 100 \% = 3,01 \%$$

Untuk Ekstrak Metanol dosis 75,09 mg/kg BB mencit replikasi ke-1

➤ Jumlah eritrosit yang terinfeksi tiap $\pm$ 5000 eritrosit = 198

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{198}{5188} \times 100 \% = 3,82 \%$$

Jumlah Parasit dan Persen Parasitemia dari Ekstrak DCM Biji Pronojiwo

Dosis	Rep	Ket	Hari						
			D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
0,8016 mg/kg BB mencit	1	Σ P	411/5305	453/5353	467/5306	657/5012	752/5092	835/5044	1086/5014
		%P	7,75	8,46	8,80	13,11	14,77	16,55	21,66
	2	Σ P	167/5017	221/5005	314/5201	351/5011	527/5004	748/5055	1449/5030
		%P	3,33	4,42	6,04	7,00	10,53	14,80	28,81
	3	Σ P	231/5367	282/5056	473/5291	550/5325	672/5285	876/5039	1135/5085
		%P	4,30	5,58	8,94	10,33	12,72	17,38	22,32
1,6032 mg/kg BB mencit	1	Σ P	165/5147	219/5059	301/5024	504/5089	524/5056	695/5092	1329/5036
		%P	3,21	4,33	5,99	9,9	10,36	13,65	26,39
	2	Σ P	243/5026	273/5015	315/5084	408/5022	514/5009	613/5034	1407/5087
		%P	4,83	5,44	6,20	8,12	10,26	12,18	27,66
	3	Σ P	160/5077	292/5096	390/5063	512/5241	600/5061	766/5130	1235/5100
		%P	3,15	5,73	7,70	9,77	11,86	14,93	24,22
8,0160 mg/kg BB mencit	1	Σ P	118/5140	145/5108	149/5160	161/5021	214/5131	352/5043	653/5050
		%P	2,30	2,84	2,89	3,21	4,17	6,98	12,93
	2	Σ P	373/5262	392/5077	667/5020	546/5048	541/5061	838/5023	965/5013
		%P	7,09	7,72	13,29	10,82	10,69	16,68	19,25
	3	Σ P	295/5065	326/5088	720/5414	748/5017	659/5040	1093/5023	1407/5148
		%P	5,82	6,41	13,30	14,91	13,08	21,76	27,33
48,0960 mg/kg BB mencit	1	Σ P	67/5199	137/5139	225/5145	134/5333	102/5082	324/5022	928/5029
		%P	1,29	2,67	4,46	2,51	2,01	6,45	18,45
	2	Σ P	198/5114	219/5233	346/5001	399/5134	403/5096	640/5060	1007/5031
		%P	3,87	4,18	6,92	7,93	7,91	12,65	20,02
	3	Σ P	114/5378	153/5130	228/5044	354/5053	492/5118	576/5106	1300/5137
		%P	2,12	2,98	4,52	7,01	9,61	11,28	25,81
80,1600 mg/kg BB mencit	1	Σ P	221/5016	219/5108	221/5061	297/5072	456/5070	669/5020	1577/5163
		%P	4,41	4,29	4,36	5,86	8,99	13,33	30,54
	2	Σ P	214/5052	245/5258	328/5271	338/5024	367/5052	687/5000	1854/5062
		%P	4,24	4,66	6,22	6,73	7,26	13,74	36,63
	3	Σ P	485/5049	481/5002	692/5018	693/5042	700/5015	1083/5015	1925/5020
		%P	9,61	9,62	13,79	13,74	13,96	21,60	38,85
160,3200 mg/kg BB mencit	1	Σ P	151/5017	207/5019	285/5054	321/5027	201/5003	569/5001	713/5077
		%P	3,01	4,12	5,64	6,34	4,02	11,38	14,04
	2	Σ P	277/5068	358/5181	445/5049	458/5052	♦	♦	♦
		%P	5,17	6,91	8,81	9,07	♦	♦	♦
	3	Σ P	182/5004	269/5008	305/5026	223/5026	193/5031	326/5034	495/5033
		%P	3,64	5,37	6,07	4,44	3,84	6,48	9,84

Keterangan :

Σ P : Jumlah parasit / jumlah eritrosit

%P : Persen parasitemia

♦ : Mencit mati

Jumlah Parasit dan Persen Parasitemia dari Ekstrak Metanol Biji Pronojiwo

Dosis	Rep	Ket	Hari						
			D ₀	D ₁	D ₂	D ₃	D ₄	D ₅	D ₆
1,0012 mg/kg BB mencit	1	Σ P	158/5096	213/5000	244/5082	265/5026	413/5084	631/5024	1046/5008
		%P	3,10	4,26	4,80	5,27	8,12	12,56	20,89
	2	Σ P	132/5115	286/5179	292/5026	313/5040	453/5038	604/5080	735/5076
		%P	2,58	5,52	5,81	6,21	8,99	11,89	14,48
	3	Σ P	173/5024	259/5023	290/5121	390/5045	489/5013	618/5000	684/5011
		%P	3,44	5,16	5,66	7,73	9,75	12,36	13,65
5,0060 mg/kg BB mencit	1	Σ P	184/5266	240/5063	312/5103	338/5087	497/5141	934/5068	1153/5004
		%P	3,49	4,74	6,11	6,64	9,66	18,43	23,04
	2	Σ P	50/5004	83/5073	87/5013	169/5063	174/5046	183/5006	194/5054
		%P	1,00	1,64	1,74	3,34	3,45	3,66	3,84
	3	Σ P	167/5105	223/5060	243/5070	254/5006	460/5013	523/5067	595/5052
		%P	3,27	4,41	4,79	5,07	9,18	10,32	11,78
10,0120 mg/kg BB mencit	1	Σ P	281/5056	403/5295	458/5063	587/5192	635/5316	1061/5061	1441/5023
		%P	5,56	7,61	9,05	11,31	11,95	20,96	28,69
	2	Σ P	176/5058	230/5000	244/5041	252/5052	360/5023	511/5097	637/5060
		%P	3,48	4,60	4,84	4,99	7,17	10,03	12,59
	3	Σ P	160/5091	228/5074	256/5241	265/5152	348/5024	662/5024	997/5061
		%P	3,14	4,49	4,88	5,14	5,79	13,18	19,70
25,0300 mg/kg BB mencit	1	Σ P	164/5150	193/5027	200/5059	207/5012	315/5215	781/5058	830/5011
		%P	3,18	3,84	3,95	4,13	6,04	15,44	16,56
	2	Σ P	177/5044	280/5303	338/5133	373/5134	400/5322	1002/5034	1350/5039
		%P	3,51	5,28	6,58	7,27	7,52	19,90	26,79
	3	Σ P	223/5103	250/5173	246/5032	250/5069	386/5039	607/5045	649/5059
		%P	4,37	4,83	4,89	4,93	7,66	12,03	12,83
50,0600 mg/kg BB mencit	1	Σ P	109/5033	164/5153	220/5207	181/5002	173/5035	665/5131	1073/5022
		%P	2,17	3,18	4,23	3,62	3,43	12,96	21,37
	2	Σ P	131/5146	221/5073	233/5247	230/5023	252/5115	486/5168	620/5095
		%P	2,55	4,36	4,44	4,58	4,93	9,40	12,17
	3	Σ P	300/5131	338/5044	394/5332	348/5071	◆	◆	◆
		%P	5,85	6,70	7,39	6,86	◆	◆	◆
75,0900 mg/kg BB mencit	1	Σ P	198/5188	237/5029	242/5217	237/5181	237/5129	330/5007	566/5113
		%P	3,82	4,71	4,64	4,57	4,62	6,59	11,07
	2	Σ P	246/5226	290/5141	314/5082	299/5072	322/5231	609/5094	622/5005
		%P	4,71	5,64	6,18	5,90	6,16	11,96	12,43
	3	Σ P	332/5030	293/5065	288/5005	307/5109	354/5125	773/5016	955/5022
		%P	6,60	5,78	5,75	6,01	6,91	15,41	19,02

Keterangan :

Σ P : Jumlah parasit / jumlah eritrosit

%P : Persen parasitemia

◆ : Mencit mati

Lampiran 8

Persen pertumbuhan parasit rata-rata

Untuk menghitung persen pertumbuhan parasit digunakan rumus berikut :

$$\% \text{ pertumbuhan rata-rata} = \frac{(D_1-D_0)+(D_2-D_1)+\dots+(D_5-D_4)+(D_6-D_5)}{6}$$

Keterangan :

D_0 - D_6 : persen parasitemia hari ke-0 sampai hari ke-6

Contoh perhitungan % pertumbuhan parasit rata-rata :

- Persen parasitemia pada hari ke-0 (D_0) = 7,75
- Persen parasitemia pada hari ke-1 (D_1) = 8,46
Persen pertumbuhan parasit = $8,46 - 7,75 = 0,71$
- Persen parasitemia pada hari ke-2 (D_2) = 8,80
Persen pertumbuhan parasit = $8,80 - 8,46 = 0,34$
- Persen parasitemia pada hari ke-3 (D_3) = 13,11
Persen pertumbuhan parasit = $13,11 - 8,80 = 4,31$
- Persen parasitemia pada hari ke-4 (D_4) = 14,77
Persen pertumbuhan parasit = $14,77 - 13,11 = 1,66$
- Persen parasitemia pada hari ke-5 (D_5) = 16,55
Persen pertumbuhan parasit = $16,55 - 14,77 = 1,78$
- Persen parasitemia pada hari ke-6 (D_6) = 21,66
Persen pertumbuhan parasit = $21,66 - 16,55 = 5,11$

Persen pertumbuhan parasit rata-rata =

$$\frac{0,71 + 0,34 + 4,31 + 1,66 + 1,78 + 5,11}{6} = \frac{13,91}{6} = 2,32$$

Lampiran 9

Persen penghambatan

Untuk menghitung persen penghambatan suspensi uji terhadap pertumbuhan *Plasmodium berghei* digunakan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan :

X_e : persen pertumbuhan parasit rata-rata pada bahan uji

X_k : persen pertumbuhan parasit rata-rata pada kontrol negatif

Contoh perhitungan persen penghambatan :

Persen penghambatan parasit rata-rata pada ekstrak DCM dosis 0,8016 mg/kg

BB mencit = 1,89

Persen penghambatan parasit rata-rata pada kontrol negatif = 2,20

$$\begin{aligned} \% \text{ penghambatan} &= 100 \% - [1,89 / 2,20 \times 100 \%] \\ &= 100 \% - 85,91 \% \\ &= 14,09 \% \end{aligned}$$

Persen penghambatan parasit rata-rata pada ekstrak Metanol dosis 1,0012 mg/kg

BB mencit = 1,48

Persen penghambatan parasit rata-rata pada kontrol negatif = 1,64

$$\begin{aligned} \% \text{ penghambatan} &= 100 \% - [1,48 / 1,64 \times 100 \%] \\ &= 100 \% - 90,24 \% \\ &= 9,76 \% \end{aligned}$$

Lampiran 10

Hasil analisis probit**Ekstrak DCM**

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

DATA Information

6 unweighted cases accepted.
 0 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.

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

Parameter estimates converged after 11 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	.54700	.06544	8.35852
Intercept	Standard Error	Intercept/S.E.	
	-.96075	.09803	-9.80103

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 2.148 DF = 4 P = .709

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

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

Observed and Expected Frequencies

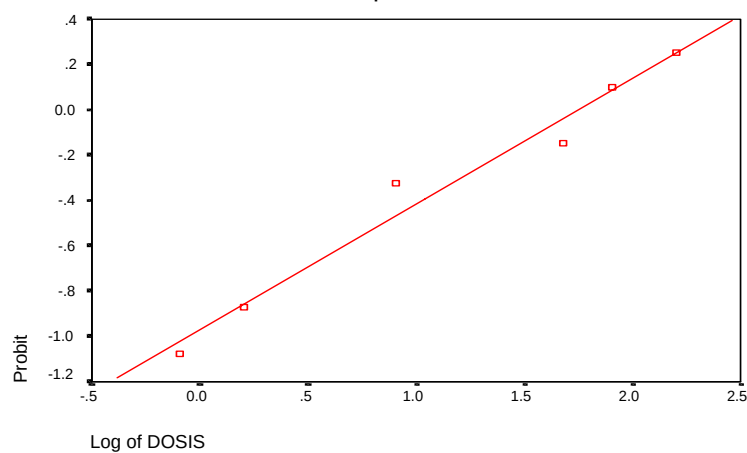
DOSIS	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Expected Residual	Prob
-.10	100.0	14.1	15.546	-1.456	.15546
.20	100.0	19.2	19.805	-.565	.19805
.90	100.0	37.3	32.051	5.229	.32051
1.68	100.0	44.2	48.379	-4.139	.48379
1.90	100.0	53.9	53.216	.724	.53216
2.20	100.0	60.0	59.692	.308	.59692

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

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.00319	.00022	.01722
.02	.01004	.00096	.04394
.03	.02080	.00247	.07971
.04	.03596	.00503	.12488
.05	.05615	.00896	.18004
.06	.08204	.01464	.24596
.07	.11440	.02250	.32353
.08	.15406	.03303	.41373
.09	.20197	.04682	.51770
.10	.25913	.06451	.63665
.15	.72716	.24161	1.50934
.20	1.65113	.68135	3.03587
.25	3.33675	1.63062	5.62271
.30	6.27642	3.48820	10.00929
.35	11.27129	6.83842	17.62628
.40	19.64459	12.46800	31.32813
.45	33.62588	21.45391	56.78729
.50	57.06942	35.46022	105.24699
.55	96.85750	57.29089	199.55334
.60	165.79216	91.84023	388.27352
.65	288.95700	147.98547	780.84866
.70	518.91309	242.79661	1643.06531
.75	976.07384	411.88851	3688.28703
.80	1972.54431	738.50940	9117.86315
.85	4478.94498	1452.62745	26292.88465
.90	12568.76029	3388.92093	100071.94408
.91	16125.98350	4156.34661	138269.00556
.92	21140.12245	5187.33636	196488.81449
.93	28470.45615	6617.25356	289216.84767
.94	39699.74050	8683.15747	445464.78833
.95	58005.46606	11834.70827	729222.65697
.96	90562.45712	17022.99450	1301534.58157
.97	156605.27005	26605.88620	2654056.24889
.98	324337.65815	48147.87122	6846810.08201
.99	1021770.90906	122517.65039	30519211.4068

Probit Transformed Responses



Ekstrak Metanol

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

DATA Information

6 unweighted cases accepted.
 0 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.

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

Parameter estimates converged after 10 iterations.
 Optimal solution found.

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

	Regression Coeff.	Standard Error	Coeff./S.E.
DOSIS	1.10422	.09921	11.13013
Intercept		Standard Error	Intercept/S.E.
	-1.42172	.13187	-10.78149

Pearson Goodness-of-Fit Chi Square = 4.677 DF = 4 P = .322

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

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

Observed and Expected Frequencies

DOSIS	Subjects	Number of Responses	Observed Responses	Expected Residual	Prob
.00	100.0	9.8	7.764	1.996	.07764
.70	100.0	26.2	25.807	.413	.25807
1.00	100.0	35.4	37.565	-2.195	.37565
1.40	100.0	48.2	54.875	-6.705	.54875
1.70	100.0	66.9	67.541	-.671	.67541
1.88	100.0	80.5	74.194	6.296	.74194

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

Confidence Limits for Effective DOSIS

Prob	DOSIS	95% Confidence Limits	
		Lower	Upper
.01	.15162	.05429	.31425
.02	.26768	.10778	.51164
.03	.38393	.16643	.69750
.04	.50359	.23069	.88097
.05	.62795	.30076	1.06559
.06	.75771	.37683	1.25325
.07	.89336	.45910	1.44514
.08	1.03532	.54778	1.64210
.09	1.18391	.64309	1.84483
.10	1.33947	.74527	2.05388
.15	2.23314	1.36892	3.21134
.20	3.35229	2.21015	4.60025
.25	4.75005	3.31792	6.29128
.30	6.49562	4.75219	8.38024
.35	8.68107	6.58478	11.00465
.40	11.43116	8.90105	14.36679
.45	14.91847	11.80560	18.76647
.50	19.38764	15.43705	24.64855
.55	25.19564	19.99684	32.67982
.60	32.88209	25.79537	43.89028
.65	43.29884	33.32660	59.95188
.70	57.86675	43.40511	83.75682
.75	79.13196	57.45530	120.71927
.80	112.12655	78.20206	182.09135
.85	168.31894	111.61645	295.06701
.90	280.61787	174.01650	543.53986
.91	317.49054	193.63684	630.22628
.92	363.05858	217.43435	740.24636
.93	420.74718	246.95092	883.65360
.94	496.07677	284.62729	1077.08443
.95	598.58605	334.59609	1350.15093
.96	746.39700	404.52694	1761.07113
.97	979.03233	510.68458	2442.12328
.98	1404.19590	695.83708	3773.10980
.99	2479.11695	1132.25117	7495.55963

