

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN *Helianthus annuus* L. DENGAN EKSTRAKSI BERTINGKAT TERHADAP *Plasmodium* *falciparum* SECARA *IN VITRO*



NUR 'AISYAH KUSUMANINGRUM


**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMAKOGNOSI DAN FITOKIMIA
SURABAYA**

2016

SKRIPSI

**UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN
Helianthus annuus L. DENGAN EKSTRAKSI
BERTINGKAT TERHADAP *Plasmodium
falciparum* SECARA *IN VITRO***

**NUR 'AISYAH KUSUMANINGRUM
NIM. 051211133027**



**FAKULTAS FARMASI UNIVERSITAS AIRLANGGA
DEPARTEMEN FARMAKOGNOSI DAN FITOKIMIA
SURABAYA
2016**

LEMBAR PERSETUJUAN
PUBLIKASI KARYA ILMIAH

Demi perkembangan ilmu pengetahuan, saya menyetujui skripsi/karya ilmiah saya, dengan judul:

UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN *Helianthus annuus* L. DENGAN EKSTRAKSI BERTINGKAT TERHADAP *Plasmodium falciparum* SECARA *IN VITRO*

untuk dipublikasikan atau ditampilkan di internet atau media lain yaitu Digital Library Perpustakaan Universitas Airlangga untuk kepentingan akademik sebatas sesuai dengan Undang-Undang Hak Cipta.

Demikian pernyataan persetujuan publikasi karya ilmiah ini saya buat dengan sebenarnya.

Surabaya, 7 Oktober 2016



Nur 'Aisyah Kusumaningrum
NIM . 051211133027

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini,

Nama : Nur 'Aisyah Kusumaningrum
NIM : 051211133027
Fakultas : Farmasi

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa hasil tugas akhir yang saya tulis dengan judul:

UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN *Helianthus annuus* L. DENGAN EKSTRAKSI BERTINGKAT TERHADAP *Plasmodium falciparum* SECARA *IN VITRO*

adalah benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri. Apabila di kemudian hari diketahui bahwa skripsi ini merupakan hasil plagiarisme, maka saya bersedia menerima sanksi berupa pembatalan kelulusan dan atau pencabutan gelar yang saya peroleh.

Demikian surat pernyataan ini saya buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Surabaya, 7 Oktober 2016



Nur 'Aisyah Kusumaningrum
NIM . 051211133027

Lembar Pengesahan

UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN
***Helianthus annuus L.* DENGAN**
EKSTRAKSI BERTINGKAT TERHADAP
***Plasmodium falciparum* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Dibuat untuk memenuhi syarat
mencapai gelar Sarjana Farmasi pada
Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
2016

Oleh :

NUR 'AISYAH KUSUMANINGRUM
NIM : 051211133027

Disetujui Oleh

Pembimbing Utama

Pembimbing Serta



Dr. Wiwid Ekasari, Apt., M.Si
NIP. 196901221994032001



Dr. Herra Studiawan, Apt., MS.
NIP. 19570310198601101

v

KATA PENGANTAR

Segala puji dan syukur saya panjatkan kehadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya skripsi ini dapat diselesaikan dengan sebaik-baiknya.

Dengan selesainya skripsi yang berjudul “Uji *In Vitro* Aktivitas Antimalaria Ekstrak N-Heksana, Ekstrak Kloroform, Dan Ekstrak Etanol 96% Daun *Helianthus Annuus* L. Terhadap *Plasmodium Falciparum*” ini, saya mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Allah SWT atas segala nikmat, karunia dan ridha-Nya, atas segala kemudahan serta kekuatan untuk menghadapi segala tantangan dan ujian dalam proses pengerjaan skripsi.
2. Dr. Wiwied Ekasari, M.Si selaku pembimbing utama dan ketua proyek penelitian (PUPT DIKTI 2016) yang dengan ikhlas dan penuh kesabaran membimbing dan meluangkan waktunya serta memberi saran serta dukungan moril maupun materil kepada saya sehingga skripsi ini dapat saya selesaikan.
3. Prof. Dr. Mohammad Nasih, SE.,Mt., Ak selaku rektor Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan fasilitas kepada mahasiswa untuk menyelesaikan skripsi ini.
4. Dr. Hj. Umi Athiyah, M.S., Apt. selaku Dekan Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang telah memberikan kesempatan dan program skripsi kepada mahasiswa sehingga saya mendapatkan pengalaman dan pembelajaran yang luar biasa dalam proses pengerjaan skripsi.
5. Ayah dan ibu saya yang selalu memberikan semangat dan motivasi untuk selalu tidak lelah untuk berusaha, tidak mudah putus asa dan tidak

takut dalam proses mengerjakan skripsi ini. Serta adik kandung dan keluarga besar saya yang selalu memberi semangat dan menghibur selama menyelesaikan skripsi ini.

6. Drs. Herra Studiawan, Apt., MS. selaku dosen pembimbing serta saya, yang telah sabar membimbing dan meluangkan waktunya untuk berdiskusi serta memberikan semangat dan motivasi demi terselesaikannya skripsi ini dengan baik.

7. Dr. rer. nat. Mulja Hadi Sentosa. dan Lusiana Arifianti, S.Farm., M.Farm., Apt . selaku dosen penguji yang telah memberikan saran dan usulan agar skripsi ini dan saya secara pribadi menjadi lebih baik lagi.

8. Setyo Prihatiningtyas, S.Farm.,Apt.,M.Sc selaku dosen wali yang selama masa pendidikan sarjana memberikan saran dan motivasi dalam menyelesaikan studi.

9. Para dosen dan guru yang tidak dapat saya sebutkan satu persatu, yang telah memberikan ilmunya hingga saya menyelesaikan pendidikan sarjana.

10. Mbak Nur Aini yang telah banyak membantu secara teori maupun teknis untuk menyelesaikan penelitian skripsi ini.

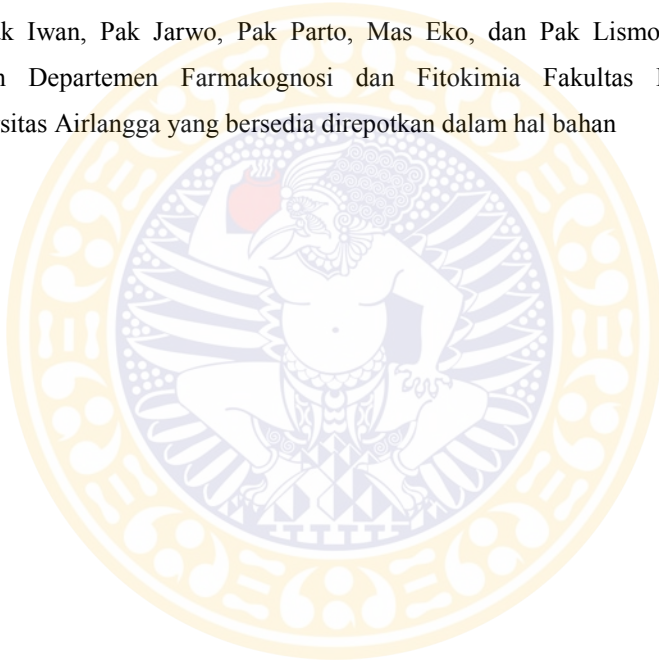
11. Anggota tim antimalaria *in vitro* dan tim Rotaroat antara lain Dwi, Tessa, Enita, Bening dan Annisa atas kerja sama, teguran, pelajaran sosial dan motivasinya dalam proses pengerjaan skripsi ini.

12. Anggota kosan yang selalu memberikan semangat, Saran, motovasi, teguran, pelajaran sosial dan motivasinya dalam proses pengerjaan skripsi ini.

13. Anggota tim KKN-BBM 52 Sumberrejo Bojonegoro yang selalu memberikan semangat, Saran, motivasi, teguran, pelajaran sosial dan motivasinya dalam proses pengerjaan skripsi ini.

14. Bu Unik selaku salah seorang yang bekerja di Matera Medika Malang yang banyak membantu dalam memperoleh serbuk Bunga Matahari dan determinasinya.

15. Pak Iwan, Pak Jarwo, Pak Parto, Mas Eko, dan Pak Lismo selaku laboran Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga yang bersedia direpotkan dalam hal bahan



RINGKASAN
UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN *Helianthus annuus* L. DENGAN EKSTRAKSI BERTINGKAT TERHADAP *Plasmodium falciparum* SECARA *IN VITRO*

Nur 'Aisyah Kusumaningrum

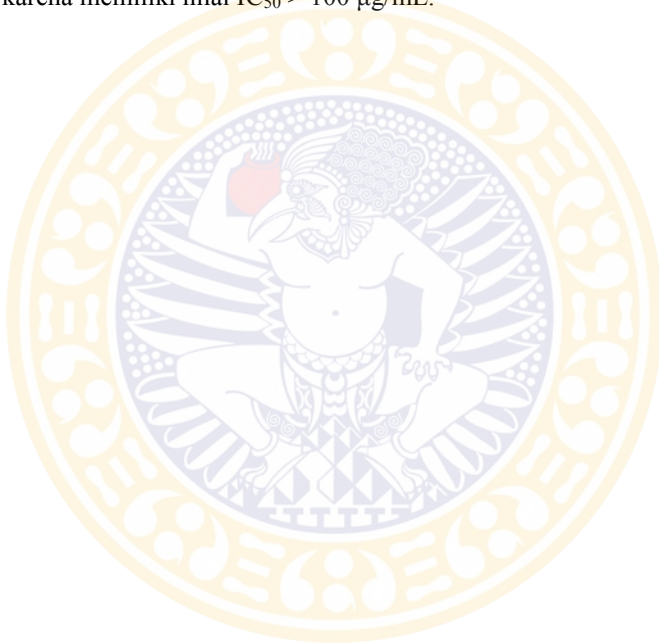
Malaria adalah salah satu masalah kesehatan penting di dunia. Secara umum ada 4 jenis malaria, yaitu *tropika*, *tertiana*, *ovale* dan *quartana*. Gejala malaria diantaranya adalah demam, sakit kepala, dan muntah yang biasanya muncul antara 10 dan 15 hari setelah gigitan nyamuk. Jika tidak segera diobati, malaria dapat dengan cepat mengganggu aliran darah ke organ vital sehingga dapat mengancam jiwa (WHO, 2015). Upaya penanggulangan penyakit malaria di Indonesia sejak tahun 2007 dapat dipantau dengan menggunakan Indikator Annual Parasite Incidence (API). API adalah jumlah kasus positif malaria per 1000 penduduk pada satu tahun.

Pada tahun 1973 ditemukan pertama kali adanya kasus resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin di Kalimantan Timur. Selain itu, kasus resistensi plasmodium terhadap Sulfadoksin-Pirimethamin (SP) di beberapa tempat di Indonesia. Maka dari itu diperlukan obat Antimalaria yang lebih poten untuk menanggulangi masalah resistensi. Salah satu caranya adalah pengobatan yang berasal dari tanaman. Bunga Matahari merupakan salah satu tanaman yang berpotensi menjadi obat alternative untuk malaria. Bunga matahari termasuk dalam famili Asteraceae. Dari famili ini ada beberapa tanaman yang juga memiliki khasiat sebagai Antimalaria, diantaranya *Dicoma tomentosa* (Jansen *et al*, 2012) *Tithonia diversifolia* (Elufioye *et al*, 2004) dan *Bidens pilosa* L. (Andrade *et al*, 2004).

Serbuk simplisia *H. annuus* L yang didapatkan selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut yang pertama n-Heksana diulang sebanyak tiga kali, dilanjutkan dengan Kloroform diulang sebanyak tiga kali, dan yang terakhir Etanol 96% diulang sebanyak tiga kali. Pemilihan pelarut tersebut berdasarkan pada polaritan senyawa – senyawa yang telah terbukti memiliki aktivitas antimalarial pada *H. annuus* L, yaitu sesquiterpen. Sebelum dilakukan uji aktivitas antimalaria, parasite *Plasmodium falciparum* terlebih dahulu dibiakkan dengan metode Trager dan Jensen (1976). Ekstrak *H.annuusi* L yang akan dilakukan uji, dilarutkan terlebih dahulu dengan DMSO (dimetil sulfoksida) dan dimasukkan ke

dalam *microwell* kemudian ditambahkan 500 μL suspensi parasit sehingga didapatkan konsentrasi bahan uji sebesar 100, 10, 1, 0,1, dan 0,01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dan diinkubasi 48 jam. Untuk mengamati persen parasitemia dibuat preparat hapusan darah dengan pewarnaan Giemsa.

Berdasarkan hasil penelitian dan pengolahan data dengan analisis probit, didapatkan ekstrak kloroform dan Etanol 96% daun *H. annuus* L. terbukti memiliki aktivitas antimalaria dengan IC_{50} ekstrak kloroform sebesar 0.037 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sangat aktif) dan IC_{50} ekstrak etanol 96% sebesar 17.637 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Aktif). Sedangkan ekstrak n-heksana termasuk kategori inaktif karena memiliki nilai $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g}/\text{mL}$.



ABSTRACT
ANTIMALARIAL ACTIVITY OF SOME EKSTRACT FROM
Helianthus annuus L.* AGAINST *Plasmodium falciparum
WITH *In Vitro* ASSAY

UJI AKTIVITAS ANTIMALARIA DAUN *Helianthus annuus L.*
DENGAN EKSTRAKSI BERTINGKAT TERHADAP *Plasmodium*
falciparum* SECARA *IN VITRO

Nur 'Aisyah Kusumaningrum

Helianthus annuus L. as A traditional herbal medicine, have been empirically used as antimalarial agent in Indonesia. Antimalarial activity were observed from methanol extract and petroleum ether extract sunflower seeds showed 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.1µg/mL and 0.6 µg/mL. In addition, the results of dichloromethane extract of sunflower leaves showed that it could significantly inhibit the growth of *Plasmodium berghei* (p<0.05) with the result of ED50 is 4.64 mg/kgBW. The study was aimed to evaluate the in vitro antimalarial activity of n-hexane extract, chloroform extract, and 96% ethanolic extract of *Helianthus annuus L.* leaves. The n-hexane, chloroform, and 96% ethanolic extracts were obtained by multiple maceration of powdered dried *Helianthus annuus L.* leaves and the assay was done using 3D7 strain of *Plasmodium falciparum*. The concentration of test solutions were 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL, and 0,01 µg/mL. Among the extracts, chloroform fraction and ethanol 96% fraction showed active antimalarial activity with IC50 value of 0.037 µg/mL and 17.637 µg/mL, while n-hexane extracts showed inactive antimalarial activity with IC50 > 100 µg/mL.

Keywords: *Helianthus annuus L.*, Sunflower, *Plasmodium falciparum* 3D7, antimalarial activity, in vitro.

DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	xii
DAFTAR TABEL	xvii
DAFTAR GAMBAR	xviii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xx
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Tinjauan Tentang <i>Helianthus annuus</i> L	
2.1.1 Klasifikasi <i>Helianthus annuus</i> L	5
2.1.2 Sinonim dan Nama Daerah <i>Helianthus annuus</i> L .	5
2.1.3 Morfologi <i>Helianthus annuus</i> L	6
2.1.4 Kandungan Kimia <i>Helianthus annuus</i> L	6
2.1.5 Khasiat <i>Helianthus annuus</i> L	6
2.2. Tinjauan Tentang Ekstrak	
2.2.1 Definisi Ekstrak	6
2.2.2 Proses Pembuatan Ekstrak	
2.2.2.1 Pembuatan Serbuk simplisia dan Klasifikasinya	7
2.2.2.2 Cairan Pelarut	7
2.2.2.3 Separasi dan Pemurnian	8
2.2.2.4 Pemekatan / Penguapan	8

2.2.2.5	Pengeringan Ekstrak	8
2.2.2.6	Rendemen	9
2.2.3	Metode Ekstraksi	
2.2.3.1	Cara Dingin	9
2.2.3.2	Cara Panas	9
2.3	Tinjauan Tentang Malaria	
2.3.1	Definisi Malaria	10
2.3.2	Patogenesis Malaria	10
2.3.3	Obat Antimalarial	11
2.4	Tinjauan Tentang <i>Plasmodium falciparum</i>	
2.4.1	Klasifikasi <i>Plasmodium falciparum</i>	13
2.4.2	Morfologi <i>Plasmodium falciparum</i>	13
2.4.3	Siklus hidup <i>Plasmodium falciparum</i>	15
2.5	Tinjauan Tentang Pembiakan	17
2.6	Metabolit Sekunder dari Produk Alam yang Memiliki Aktivitas Antimalaria	
2.6.1	Alkaloid	18
2.6.2	Terpenoid	18
2.6.3	Flavonoid	19
2.6.4	Quinon	20
2.6.5	<i>Xanthone</i> dan Kumarin	20
2.6.6	Peptida	21
2.6.7	Fenol	22
2.6.8	Lignan	22
2.7	Tinjauan Tentang Skrining Fitokimia	23
BAB III KERANGKA KONSEPTUAL		24

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1	Sampel Penelitian	27
4.2	Variabel Penelitian	27
4.2.1	Variabel Bebas	27
4.2.2	Variabel Tergantung.....	27
4.2.3	Variabel Kenda.....	27
4.3	Jenis dan Rancangan Penelitian	
4.3.1	Jenis Penelitian.....	27
4.3.2	Rancangan Penelitian	27
4.3.2.1	Ekstraksi Daun <i>Helianthus annus L</i>	27
4.3.2.2	Uji Aktivitas Antimalaria <i>In Vitro</i> Ekstrak n- Heksana, ekstrak Kloroform dan ekstrak Etanol 96% daun <i>Helianthus annuus L</i>	28
4.3.2.3	Skrining Golongan Senyawa	28
4.3.2.4	Skema Penelitian	28
4.4	Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian	
4.4.1	Bahan Penelitian	
4.4.1.1	Bahan Tanaman	29
4.4.1.2	Bahan untuk Ekstraksi Daun <i>Helianthus annuus L</i>	29
4.4.1.3	Bahan untuk Uji <i>In Vitro</i>	30
4.4.1.4	Biakan <i>Plasmodium falciparum</i>	30
4.4.1.5	Bahan untuk Skrining Golongan Senyawa	30
4.4.2	Instrumen Penelitian	
4.4.2.1	Instrumen untuk Pembuatan Ekstrak Daun	
	<i>Helianthus annuus L</i>	31
4.4.2.2	Instrumen untuk Pembuatan Media dan Pemiakan	31

<i>P.falciparum</i>	
4.4.2.3 Instrumen untuk Uji Aktivitas Antimalaria terhadap <i>Plasmodium falciparum</i>	31
4.4.2.4 Instrumen untuk Skrining Golongan Senyawa.	31
4.5 Prosedur Penelitian	
4.5.1 Persiapan Ekstrak n-Heksana, ekstrak Kloroform, dan ekstrak Etanol 96% Daun <i>Helianthus annuus</i> L	
4.5.1.1 Pembuatan Simplisia Daun <i>Helianthus annuus</i> L	32
4.5.1.2 Pembuatan Ekstrak n-Heksana, ekstrak Kloroform, dan ekstrak Etanol 96% Daun <i>Helianthus annuus</i> L secara Maserasi	32
4.5.2 Prosedur Pembiakan <i>Plasmodium falciparum</i>	
4.5.2.1 Pembuatan Media Biakan	33
4.5.2.2 Preparasi Eritrosit dan Plasma Segar Manusia	34
4.5.3 Kultivasi <i>Plasmodium falciparum</i>	
4.5.3.1 Prosedur Pencairan (<i>Thawing</i>)	35
4.5.3.2 Prosedur Penggantian Media	36
4.5.3.3 Subkultur	36
4.5.4 Pengamatan Pertumbuhan <i>P. falciparum</i>	
4.5.4.1 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah Tipis	37
4.5.5 Pengujian Aktivitas Antimalaria .	
4.5.5.1 Preparasi Suspensi Sel Parasit Uji	37
4.5.5.2 Preparasi Sampel	38
4.5.6 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif	39
4.5.7 Preparasi Lempeng Sumur Mikro	40

4.5.8	Pengamatan Hasil	41
4.5.9	Pengolahan Data	
4.5.9.1	Perhitungan Persentase Parasitemia	41
4.5.9.2	Perhitungan Persentase Pertumbuhan	41
4.5.9.3	Perhitungan Persentase Penghambatan	42
4.5.9.4	Perhitungan IC50	42
4.5.10	Skrining Fitokimia	
4.5.10.1	Skrining untuk Golongan Terpenoid	42
BAB V HASIL PENELITIAN		
5.1	Hasil Ekstraksi Daun <i>H. annuus</i> L Secara Maserasi	43
5.2	Hasil Uji Aktivitas Antimalaria	44
5.3	Hasil Identifikasi Profil Kromatografi	
5.3.1	Ekstrak n-Heksana	46
5.3.2	Ekstrak Kloroform.....	47
5.3.3	Ekstrak Etanol 96%	48
5.4	Hasil Skrining Golongan Senyawa Terpenoid ekstrak Kloroform dan Etanol 96%	49
BAB VI PEMBAHASAN		50
BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN		
7.1	Kesimpulan	54
7.2	Saran	54
DAFTAR PUSTAKA		
LAMPIRAN		

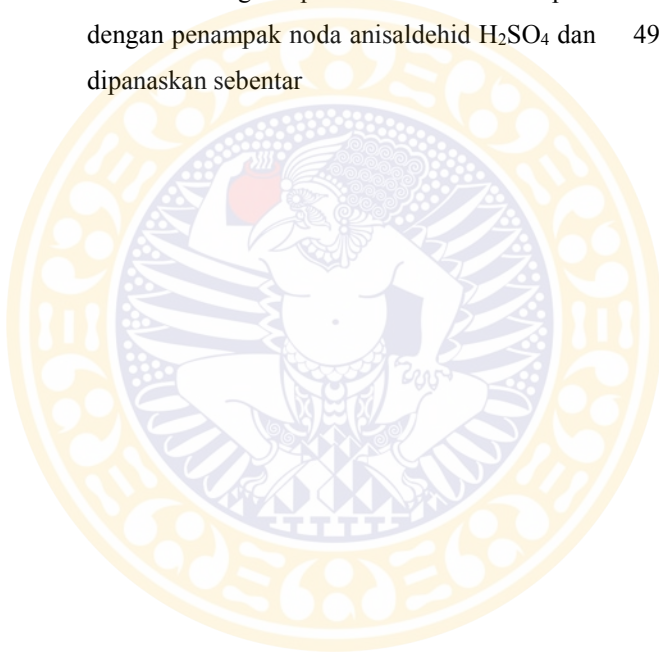
DAFTAR TABEL

		Halaman
Tabel 2.1	Masa Inkubasi (Departemen Kesehatan RI, 2011..	16
Tabel 5.1	Hasil pembuatan serbuk simplisia daun <i>H. annuus L.</i>	43
Tabel 5.2	Berat dan rendemen hasil ekstraksi daun <i>H.annuus L</i> secara maserasi.....	43
Tabel5.3	Rata-rata persen parasitemia pada uji aktivitas antimalaria secara <i>in vitro</i> terhadap <i>P. falciparum</i> ...	44
Tabel5.4	Rata-rata persentase pertumbuhan <i>P. falciparum</i> setelah pemberian ekstrak daun <i>H.annuus L</i>	44
Tabel5.5	Rata-rata persentase penghambatan <i>P. falciparum</i> setelah pemberian ekstrak daun <i>H.annuus L</i>	45
Tabel5.6	Nilai IC50 uji aktivitas antimalaria ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol 96% daun <i>H.annuus L</i>	45

DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1	Tanaman <i>Helianthus annuus</i> 5
Gambar 2.2	Siklus Hidup Plasmodium (CDC, 2015)..... 17
Gambar 2.3	Artemision 19
Gambar 2.4	Struktur Kimia Flavonoid 19
Gambar 2.5	Contoh – contoh Quinon 20
Gambar 2.6	Struktur kimia <i>Xanthone</i> 21
Gambar 2.7	Struktur kimia kumarin 21
Gambar 2.8	Struktur kimia peptide 22
Gambar 2.9	Struktur kimia fenol 22
Gambar 2.10	Unit C ₆ -C ₃ yang membentuk lignin 23
Gambar 2.11	Reaksi pembentukan struktur dasar senyawa lignin..... 23
Gambar 3.1	Skema Kerangka konseptual uji aktivitas antimalaria Ekstrak n-Heksan, ekstrak Kloroform dan ekstrak Etanol 96% Daun <i>Helianthus annuus</i> L. secara <i>in vitro</i> pada <i>Plasmodium falcifarum strain 3D7</i> 24
Gambar 4.1	Skema Penelitian uji aktivitas antimalaria Ekstrak n-Heksan, ekstrak Kloroform dan ekstrak Etanol 96% Daun <i>Helianthus annuus</i> L. secara <i>in vitro</i> pada <i>Plasmodium falcifarum strain 3D7</i> 29
Gambar 4.2	Denah <i>Microwell plate disposable</i> 40

Gambar 5.1	Profil kromatografi ekstrak n-heksana daun <i>Helianthus annuus</i> L.	46
Gambar 5.2	Profil kromatografi ekstrak kloroform daun <i>Helianthus annuus</i> L.	47
Gambar 5.3	Profil kromatografi ekstrak daun <i>Helianthus annuus</i> L.	48
Gambar 5.4	Hasil skrining terpenoid setelah disemprot dengan penampak noda anisaldehyd H ₂ SO ₄ dan dipanaskan sebentar	49



DAFTAR LAMPIRAN

		Halaman
Lampiran 1	Data Jumlah Parasitemia	60
Lampiran 2	Cara perhitungan persen parasitemia dan Data persen parasitemia	61
Lampiran 3	Cara perhitungan persen pertumbuhan dan Data persen pertumbuhan	62
Lampiran 4	Analisa probit ekstrak n-heksana daun <i>Helianthus annuus</i> L.....	63
Lampiran 5	Analisa probit ekstrak kloroform daun <i>Helianthus annuus</i> L.....	70
Lampiran 6	Analisa probit ekstrak etanol 96% daun <i>Helianthus annuus</i> L.....	76
Lampiran 7	Surat determinasi tanaman <i>Helianthus annuus</i> L.....	79

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah

Menurut sejarah kata “malaria” berasal dari bahasa Italia yang terdiri dari dua suku kata, “*mal* dan *aria*” yang berarti udara yang jelek. Penyakit malaria sudah dikenal sejak 4000 tahun yang lalu yang mungkin sudah mempengaruhi populasi dan sejarah manusia (Arsunan, 2012). Malaria disebabkan oleh parasit yang disebut *Plasmodium*, ditularkan melalui gigitan nyamuk *Anopheles* yang terinfeksi. Dalam tubuh manusia, parasit berkembang biak dalam hati, kemudian menginfeksi sel darah merah. Gejala malaria diantaranya adalah demam, sakit kepala, dan muntah yang biasanya muncul antara 10 dan 15 hari setelah gigitan nyamuk. Jika tidak segera diobati, malaria dapat dengan cepat mengganggu aliran darah ke organ vital sehingga dapat mengancam jiwa (WHO, 2015).

Penyakit malaria ini sangat mempengaruhi angka kematian dan kesakitan bayi, anak, dan ibu melahirkan serta dapat menurunkan produktifitas tenaga kerja. Penyakit ini tersebar di seluruh dunia, mulai dari daerah tropik, subtropik, dan daerah dengan iklim dingin. Dari hasil estimasi WHO pada tahun 2011, terdapat 3,3 milyar orang yang beresiko terkena penyakit malaria dengan populasi tertinggi terdapat di negara Afrika (Sari *et al.*, 2015). Di Indonesia, diperkirakan 35% penduduk yang tinggal di daerah yang berisiko tertular malaria. Dari 497 Kabupaten/Kota yang ada di Indonesia saat ini, 54% masih merupakan wilayah endemis malaria.

Upaya penanggulangan penyakit malaria di Indonesia sejak tahun 2007 dapat dipantau dengan menggunakan Indikator Annual Parasite Incidence (API). API adalah jumlah kasus positif malaria per 1000

penduduk pada satu tahun. API ini digunakan untuk menentukan tren morbiditas malaria dan menentukan endemisitas suatu daerah. API juga merupakan suatu syarat suatu daerah masuk dalam fase eliminasi yaitu API kurang dari 1 per 1000 penduduk (Kementerian Kesehatan RI,2013)

Secara nasional kasus malaria selama dekade terakhir 2005-2014, Pada tahun 2005 Annual Parasite Incidence (API) adalah 4,10 per 1.000 per penduduk, pada tahun 2012 adalah 1,69 per 1.000 penduduk (417.819 kasus malaria) dan di akhir tahun 2014 adalah 0,99 per 1000 penduduk (252,027 kasus malaria). Namun, pada beberapa daerah seperti Papua, Papua Barat dan NTT tercatat bahwa API di provinsi tersebut termasuk tingkat endemis resiko tinggi (API > 5 per 1000 populations) dimana hal ini, beberapa daerah tersebut belum mencapai target wilayah endemis rendah (API 0-1‰) (Kementerian Kesehatan RI,2014)

Pada tahun 1973 ditemukan pertama kali adanya kasus resistensi *Plasmodium falciparum* terhadap klorokuin di Kalimantan Timur. Sejak itu kasus resistensi terhadap klorokuin yang dilaporkan semakin meluas. Sejak tahun 1990, dilaporkan telah terjadi resistensi parasit *P. falciparum* terhadap klorokuin dari seluruh provinsi di Indonesia. Selain itu, dilaporkan juga adanya kasus resistensi plasmodium terhadap Sulfadoksin-Pirimethamin (SP) di beberapa tempat di Indonesia. Dari penelitian-penelitian yang dilakukan oleh Litbangkes dan Lembaga Penelitian lainnya telah ditemukan adanya resistensi *Plasmodium vivax* terhadap klorokuin di beberapa wilayah di Indonesia (Bangka, Papua) (Kemenkes RI, 2011). Maka dari itu diperlukan obat Antimalaria yang lebih poten untuk menanggulangi masalah resistensi. Salah satu caranya adalah pengobatan yang berasal dari tanaman.

Saat ini pengetahuan dan pemahaman masyarakat mengenai tumbuhan berkhasiat obat semakin berkembang. Masyarakat mulai

memahami bahwa penggunaan tumbuhan berkhasiat obat sebenarnya bisa sejajar dan saling mengisi dengan pengobatan modern. Tidak jarang, penggunaan tumbuhan berkhasiat obat dengan berbagai alasan herbal dijadikan sebagai pilihan utama untuk pengobatan. Dengan semakin meningkatnya kesadaran tersebut, riset-riset ilmiah pun kini semakin banyak diarahkan pada bahan-bahan alam untuk mengetahui keseluruhan efek khasiat yang terkandung dalam tanaman obat tersebut. Di Indonesia, dikenal lebih dari 20.000 jenis tumbuhan obat, namun baru 1.000 jenis tanaman telah terdata dan baru sekitar 300 jenis yang sudah dimanfaatkan untuk pengobatan tradisional. Salah satu tanaman yang telah lama digunakan sebagai pengobatan yaitu bunga matahari (Irianty *et al.*,2014).

Bunga matahari yang memiliki nama latin *Helianthus annuus* L. merupakan famili dari Asteraceae. Selain itu, bunga ini memiliki bermacam-macam nama daerah, diantaranya adalah Bunga panco matoari, kembang srengenge, Tampongare, dan Purbanegara. Tiap bagian dari tanaman ini memiliki banyak khasiat, diantaranya adalah dapat menurunkan tekanan darah, meringankan rasa nyeri, antiradang, antidisentri dan masih banyak lagi (Permadi,2008). Menurut Roihatul (2012) kandungan senyawa sesquiterpen pada *Helianthus annuus*, L memiliki aktivitas antimalarial karena dapat membunuh parasit *Plasmodium berghei strain ANKA* secara *in vivo* pada mencit. Pada penelitiannya, ekstrak dikolorometan daun bunga matahari pada dosis 0,05mg/BB - 5mg/BB memiliki potensi yang tinggi dan efikasi yang setara dengan artemisin 0,04mg/BB, karena derajat parasitemia mengalami penurunan hingga 0% pada hari ke-3 dan ke-4.

Berdasarkan Riskesdas 2010, Spesies parasit malaria yang paling banyak ditemukan adalah *P. falciparum* (86,4%) (Kemenkes,2011). Untuk menguji aktivitas ekstrak tanaman dengan *Plasmodium* ini, dilakuan secara *in vitro*. Hal ini dikarenakan *P. falcifarum* ini langsung menyerang manusia,

sehingga uji aktivitas dikondisikan serupa dengan siklus hidup plasmodium pada manusia. Sebelumnya telah ada penelitian tentang uji aktivitas antimalarial dari biji tanaman *H. annuus* L yang diujikan pada *P. falciparum* strain *K1* secara *in vitro* dengan menggunakan pelarut methanol dan petroleum eter. Didapatkan IC_{50} 0.3 - 27.5 $\mu\text{m/mL}$ (Mohamed *et al*,2014) .

Diketahui bahwa pada daun *H. annuus* L. juga memiliki aktivitas antimalaria, namun belum diuji secara *in vitro*. Maka perlu dilakukan uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* pada *P. falciparum* dengan strain dan pelarut yang berbeda. Pemilihan pelarut berdasarkan polaritas senyawa yang telah terbukti mempunyai aktivitas antimalaria pada *H. annuus* L. yaitu seskuiterpen. Seskuiterpen diduga larut dalam pelarut polar hingga non polar. Sehingga dipilih pelarut dengan menggunakan n-Heksana, Kloroform dan Etanol 96%.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform dan ekstrak etanol 96% daun *Helianthus annuus* L. Memiliki aktivitas antimalaria pada *P. Falciparum* strain 3D7 secara *in vitro*?

1.3. Tujuan Penelitian

Mengetahui aktivitas antimalaria pada ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol 96% daun *Helianthus annuus* L. terhadap *P. falciparum* secara *in vitro*.

1.4. Manfaat Penelitian

Mengetahui ekstrak dari daun *Helianthus annuus* L. yang memiliki aktivitas antimalaria paling tinggi pada *P. falciparum* strain 3D7 secara *in vitro*. Selain itu, dapat menambah penelitian mengenai obat antimalaria alternatif dari bahan alam yang selanjutnya dapat diuji secara klinis.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tentang *Helianthus annuus* L.



Gambar 2.1 Bunga dan Daun *Helianthus annuus* L

2.1.1 Klasifikasi *Helianthus annuus* L.(Plantamor,2012)

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Super Divisi	: Spermatophyta (Menghasilkan biji)
Divisi	: Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
Kelas	: Magnoliopsida (berkeping dua / dikotil)
Sub Kelas	: Asteridae
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: <i>Helianthus</i>
Spesies	: <i>Helianthus annuus</i> L.

2.1.2 Nama Daerah *Helianthus annuus* L

Kembang sarengenge (Sunda), Kembang mata are (Madura), Sungeng (Bali), Bungong Matuhuroi (Aceh), dan Bunga Panca matoari (Minangkabau). (Thomas, 1992)

2.1.3 Morfologi *Helianthus annuus* L

Herba yang tumbuh tegak, berbatang basah, berbentuk bulat dan ditumbuhi bulu kasar, berbulu setinggi 1-6 m. Berdaun tunggal berbentuk bulat telur yang lebar atau yang berbentuk jantung, panjangnya 12-26 dan lebarnya sekitar 10-20cm. Tepi daun bergerigi dan kedua permukaannya mempunyai bulu yang kasar. Bunganya berbau wangi, ukurannya sekitar 5-30 cm, mahkota berwarna kuning emas, bagian tengah mahkota berwarna coklat kemerah – merahan. Pada bijinya, berbentuk bujur telur leper, berwarna putih hitam, panjang biji sekitar 1-2cm. (Ong, 2008)

2.1.4 Kandungan Kimia *Helianthus annuus* L

Tumbuhan ini kaya kandungan kimia. Bunga mengandung quercimeritrin, helianthoside A,B,C, asam Oleanolik, dan asam echinosystic (Permadi,2008). Pada biji, 5-7% air, 14-25% protein, 20-60% minyak, dan 18-27% karbohidrat. Minyak pada biji mengandung Asam linoleik, asam oleik, asam palmitik, asam stearik, provitamin A dan tokoferol (Ong,2006)

2.1.5 Khasiat *Helianthus annuus* L

Menurunkan tekanan darah tinggi (Hipertensi), mengurangi nyeri sakit kepala, pusing, sakit gigi, nyeri menstruasi, nyeri lambung, radang payudara, dan rematik sendi. Biji merangsang pengeluaran *rash* (kemerahan) pada campak, tidak nafsu makan, lesu dan disentri berdarah. Daun untuk mengobati malaria. Reseptakulum (sumsum dari batang dan dasar bunga) untuk mengatasi kanker lambung, sakit lambung, sulit dan nyeri buang air kemih, air kemih berdarah (Wijayakusuma,2008)

2.2 Tinjauan Tentang Ekstrak

2.2.1 Definisi Ekstrak

Dalam buku Farmakope Indonesia Edisi IV disebutkan bahwa ekstrak adalah sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang

sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan. (Departemen kesehatan RI, 2000)

2.2.2 Proses Pembuatan Ekstrak

2.2.2.1 Pembuatan serbuk simplisia dan klasifikasinya

Proses awal pembuatan ekstrak adalah tahapan pembuatan serbuk simplisia kering (penyerbukan). Dari simplisia dibuat serbuk simplisia dengan peralatan tertentu sampai derajat kehalusan tertentu. Proses ini dapat mempengaruhi mutu ekstrak dengan dasar beberapa hal sebagai berikut:

1. Makin halus serbuk simplisia, proses ekstraksi makin efektif-efisien, namun makin halus serbuk, maka makin rumit secara teknologi peralatan untuk tahapan filtrasi.
2. Selama penggunaan peralatan penyerbukan dimana ada gerakan dan interaksi dengan benda keras (logam, dll.) maka akan timbul panas (kalori) yang dapat berpengaruh pada senyawa kandungan. Namun hal ini dapat dikompensasi dengan penggunaan nitrogen cair.

2.2.2.2 Cairan pelarut

Cairan pelarut dalam proses pembuatan ekstrak adalah pelarut yang baik (optimal) untuk senyawa kandungan yang berkhasiat atau yang aktif, dengan demikian senyawa tersebut dapat terpisahkan dari bahan dan dari senyawa kandungan lainnya, serta ekstrak hanya mengandung diperlakukan sebagian besar senyawa kandungan yang diinginkan. Faktor utama untuk pertimbangan pada pemilihan cairan penyari adalah sebagai berikut:

1. Selektivitas
2. Kemudahan bekerja dan proses dengan cairan tersebut
3. Ekonomis

4. Ramah lingkungan
5. Keamanan

Pada prinsipnya, cairan pelarut harus memenuhi syarat kefarmasian atau dalam perdagangan dikenal dengan kelompok spesifikasi “*pharmaceutical grade*”. Sampai saat ini berlaku aturan bahwa pelarut yang diperbolehkan adalah air dan alkohol (etanol) serta campurannya. Jenis pelarut lain seperti metanol dll. (alkohol dan turunannya), heksana dll. (hidrokarbon alifatik), toluen dll. (hidrokarbon aromatik), kloroform (dan segolongannya), aseton, umumnya digunakan sebagai pelarut untuk tahap separasi dan tahap pemurnian (fraksinasi).

2.2.2.3 Separasi dan pemurnian

Tujuan dari tahapan ini adalah menghilangkan (memisahkan) senyawa yang tidak dikehendaki semaksimal mungkin tanpa berpengaruh pada senyawa kandungan yang dikehendaki, sehingga diperoleh ekstrak yang lebih murni.

2.2.2.4 Pemekatan / penguapan (vaporasi dan evaporasi)

Pemekatan berarti peningkatan jumlah partial solute (senyawa terlarut) secara penguapan pelarut tanpa sampai menjadi kondisi kering, ekstrak hanya menjadi kental/pekat.

2.2.2.5 Pengeringan ekstrak

Pengeringan berarti menghilangkan pelarut dari bahan hingga menghasilkan serbuk, massa kering-rapuh, tergantung proses dan peralatan yang digunakan. Ada berbagai proses pengeringan ekstrak, yaitu dengan cara: pengeringan evaporasi, pengeringan vaporasi, pengeringan sublimasi, pengeringan konveksi, pengeringan kontak, pengeringan radiasi, dan pengeringan dielektrik.

2.2.2.6 Rendemen

Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

2.2.3 Metode Ekstraksi

Metode ekstraksi antara lain dengan menggunakan pelarut, destilasi uap, dan cara lainnya. Adapun metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut terdiri dari cara dingin dan cara panas.

2.2.3.1 Cara dingin

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Secara teknologi, termasuk ekstraksi dengan prinsip metode pencapaian konsentrasi pada keseimbangan. Maserasi kinetik berarti melakukan pengadukan yang kontinu (terus-menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama, dan seterusnya.

Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai sempurna (*exhaustive extraction*) yang umumnya dilakukan pada temperatur ruangan. Proses terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat) yang jumlahnya 1 – 5 kali bahan.

2.2.3.2 Cara panas

Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya, selama waktu tertentu dan jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik. Umumnya dilakukan pengulangan proses pada residu pertama sampai 3-5 kali sehingga dapat termasuk proses ekstraksi sempurna. (Departemen kesehatan RI, 2012)

Soxhlet adalah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya dilakukan dengan alat khusus sehingga terjadi ekstraksi kontinu dengan jumlah pelarut relatif konstan dengan adanya pendingin balik. (Departemen kesehatan RI, 2012)

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan pengasukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), yaitu secara umum dilakukan pada temperature 40 – 50° C. (Departemen Kesehatan RI, 2012)

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96 - 98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit). (Departemen kesehatan RI, 2012)

2.3 Tinjauan Tentang Malaria

2.3.1 Definisi Malaria

Penyakit malaria adalah salah satu penyakit yang penularannya melalui gigitan nyamuk *anopheles* betina. Penyebab penyakit malaria adalah genus *plasmodia family plasmodiidae*. Malaria adalah salah satu masalah kesehatan penting di dunia. Secara umum ada 4 jenis malaria, yaitu *tropika*, *tertiana*, *ovale* dan *quartana*. Di dunia ada lebih dari 1 juta meninggal setiap tahun (Dirjen P2PI, 2011).

2.3.2 Patogenesis Malaria

Demam mulai timbul bersamaan dengan pecahnya skizon darah yang mengeluarkan bermacam-macam antigen. Antigen ini akan merangsang sel-sel makrofag, monosit atau limfosit yang mengeluarkan berbagai macam sitokin, antara lain TNF (Tumor Nekrosis Factor) dan IL-6 (Interleukin-6). TNF dan IL-6 akan dibawa aliran darah ke hipotalamus yang merupakan pusat pengatur suhu tubuh dan terjadi demam. Proses skizogoni pada keempat plasmodium memerlukan waktu yang berbeda-beda.

Plasmodium falciparum memerlukan waktu 36-48 jam, *P. vivax*/*P. ovale* 48 jam, dan *P. malariae* 72 jam. Demam pada *P. falciparum* dapat terjadi setiap hari, *P. vivax*/*P. ovale* selang waktu satu hari, dan *P. malariae* demam timbul selang waktu 2 hari.

Anemia terjadi karena pecahnya sel darah merah yang terinfeksi maupun yang tidak terinfeksi. *P. vivax* dan *P. ovale* hanya menginfeksi sel darah merah muda yang jumlahnya hanya 2% dari seluruh jumlah sel darah merah, sedangkan *P. malariae* menginfeksi sel darah merah tua yang jumlahnya hanya 1% dari jumlah sel darah merah. Sehingga anemia yang disebabkan oleh *P. vivax*, *P. ovale* dan *P. malariae* umumnya terjadi pada keadaan kronis. Plasmodium falciparum menginfeksi semua jenis sel darah merah, sehingga anemia dapat terjadi pada infeksi akut dan kronis.

Splenomegali Limpa merupakan organ retikuloendothelial, dimana Plasmodium dihancurkan oleh sel-sel makrofag dan limposit. Penambahan sel-sel radang ini akan menyebabkan limpa membesar. (Departemen Kesehatan RI, 2012)

2.3.3 Obat Antimalaria

Kina merupakan obat antimalaria kelompok alkaloid kinkona yang bersifat skizontosida darah untuk semua jenis Plasmodium manusia dan gametosida *P. vivax* dan *P. malariae*. Obat ini merupakan obat antimalaria alternatif untuk pengobatan radikal malaria falciparum tanpa komplikasi yang resisten terhadap klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin (multidrug) (Zein, 2005; Gunawan 2009).

Klorokuin merupakan obat antimalaria kelompok 4-aminokuinolin yang bersifat skizontosida darah untuk semua jenis Plasmodium pada manusia sehingga dipakai sebagai obat malaria klinis dengan menekan gejala klinis. Obat ini juga bersifat gametosidal (melawan bentuk gamet) immature (muda) pada *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* dan *P. falciparum*

(stadium 1-3). Obat ini tidak efektif terhadap bentuk intrahepatic, digunakan bersama primakuin dalam pengobatan radikal pada *P. vivax* dan *P. ovale*. Penggunaan klorokuin sebagai pilihan pertama mulai terbatas karena berkembangnya resistensi klorokuin dari *P. falciparum* dan *P. vivax* (Depkes, 2008).

Sulfadoksin-primetamin Menurut Zein (2005), Sulfadoksin-pirimetamin adalah obat antimalaria kombinasi antara golongan sulfonamide/ sulfon dengan diaminopirimidine yang bersifat skizontosida jaringan, skizontosida darah dan sporontosidal. Obat ini sangat praktis karena dapat diberi dalam dosis tunggal namun obat ini memiliki kelemahan karena mudah mengalami resistensi. Oleh karena itu kombinasi obat ini digunakan secara selektif untuk pengobatan radikal malaria falsiparum di daerah yang resisten terhadap klorokuin.

Primakuin Menurut Depkes RI (2008), Primakuin merupakan obat antimalaria kelompok senyawa 8-aminokuinolin yang sangat efektif melawan gametosit seluruh spesies Plasmodium. Obat ini juga aktif terhadap skizon darah *P. falciparum* dan *P. vivax* tetapi dalam dosis tinggi sehingga harus berhati-hati, efektif terhadap skizon jaringan *P. falciparum* dan *P. vivax*

Derivat Artemisinin Menurut Depkes RI (2008), derivat artemisinin merupakan kelompok obat antimalaria baru yang penggunaannya terbatas pada daerah-daerah yang resistensi klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin.

2.4 Tinjauan Tentang *Plasmodium falciparum*

2.4.1 Klasifikasi *Plasmodium falciparum* (NCBI, 2015)

Kingdom	: Protista
Filum	: Apicomplexa
Kelas	: Aconoidasida
Ordo	: Haemosporida
Famili	: Plasmodiidae
Genus	: <i>Plasmodium</i>
Spesies	: <i>Plasmodium falciparum</i>

2.4.2 Morfologi *Plasmodium falciparum*

Morfologi plasmodium pada manusia, memiliki sitoplasma dengan bentuk tidak teratur pada berbagai stadium pertumbuhan dan mengandung kromatin, pigmen serta granula. Pigmen malaria ialah suatu kompleks yang terdiri dari protein yang telah di denaturasi, yaitu *hamozoin* atau *hamatin*, suatu hasil metabolisme parasit dengan bahan-bahan dari eritrosit. Pigmen ini tidak ada pada parasit eksoeritrositik yang terdapat dalam sel hati. Gametosit dapat dibedakan dari trophozoit tua karena sitoplasma lebih padat, tidak ada pembelahan kromatin dan pigmen yang tersebar dibagian tepi. Eritrosit yang dihinggap *P. vivax* membesar dan menjadi pucat, karena kekurangan hemoglobin. *P. vivax* mempunyai afinitas yang besar terhadap retikulosit, sehingga pembesarnya tampak lebih nyata dari pada sebenarnya.

Trofozoit muda tampak sebagai cincin dengan inti pada satu sisi, sehingga merupakan cincin stempel. Bila trofozoit tumbuh maka bentuknya menjadi tidak teratur, berpigmen halus dan menunjukkan gerakan ameboid yang jelas. Setelah 36 jam mengisi lebih dari setengah sel darah merah yang membesar, intinya membelah dan menjadi skizon. Gerakannya menjadi kurang, mengisi hampir seluruh sel yang membengkak mengandung

pigmen yang tertimbun di dalam sitoplasma. Setelah 48 jam skizon mencapai ukuran maksimal 8–10 mikron dan mengalami segmentasi. Pigmen berkumpul dipinggir, inti yang membelah dengan bagian-bagian sitoplasma membentuk 16–18 sel berbentuk bulat atau lonjong, berdiameter 1,5–2 mikron yang disebut merozoit.

Gametosit berbentuk lonjong, hampir mengisi seluruh eritrosit. Mikro gametosit mempunyai inti besar yang berwarna merah muda pucat dan sitoplasma berwarna biru pucat. Makrogametosit mempunyai sitoplasma yang berwarna lebih biru dengan inti yang padat berwarna merah dan letaknya biasanya di bagian pinggir parasit. Dengan pewarnaan, butir-butir halus bulat, uniform, berwarna merah muda atau kemerah-merahan sering tampak di dalam sel darah merah yang di infeksi oleh *P. vivax*.

Trofozoit yang sedang tumbuh mempunyai butir-butir pigmen yang kasar dan berwarna tengguli tua atau hitam. Parasit ini dapat berbentuk pita yang melintang pada sel darah merah, bentuk kromatin seperti benang dan kadang-kadang vakuol. Pigmen kasar berkumpul dipinggir parasit, dalam waktu 72 jam skizon menjadi matang dan bersegmentasi, hampir mengisi seluruh sel darah merah yang tidak membesar. Parasit menyerupai bungseruni atau roset dengan pigmen tengguli yang padat, dikelilingi oleh 8–10 merozoit lonjong, masing-masing dengan kromatin berwarna merah dan sitoplasma biru.

Plasmodium falcifarum berbeda dengan plasmodium lain manusia. Hanya ditemukan bentuk-bentuk cincin dan gemotosit dalam darah tepi, kecuali pada infeksi berat. Skizogoni terjadi dalam kapiler alat-alat dalam, juga di dalam jantung, dan hanya beberapa skizon terdapat di dalam darah tepi. Sel darah merah yang terinfeksi tidak membesar, infeksi multiple di dalam sel darah merah sangat khas. Dengan adanya bentuk-bentuk cincin

halus yang khas, sering kali dengan titik kromatin rangkap, walaupun tidak ada gametosit, kadang-kadang cukup untuk identifikasi spesies ini. Dua titik kromatin (nucleus) sering dijumpai pada bentuk cincin *P. falcifarum*

Bentuk skizon lonjong atau bulat, jarang sekali ditemukan di dalam darah tepi. Skizon ini menyerupai skizon *P. vivax*, tetapi tidak mengisi seluruh eritrosit. Skizon matang biasanya mengandung 16–20 merozit kecil. Gemotosit yang muda mempunyai bentuk lonjong sehingga memanjangkan dinding sel darah merah, setelah mencapai perkembangan akhir parasit menjadi berbentuk pisang yang khas yang disebut juga bentuk sabit. Di dalam sel darah merah yang dihindangi *P. falcifarum* sering tampak presipitat sitoplasma yang disebut titik *Maurer*. Titik-titik ini tampak sebagai bercak-bercak merah yang bentuknya tidak teratur, sebagai kepingan-kepingan atau batang-batang di dalam sitoplasma (Arsunan. 2012)

2.4.3 Siklus Hidup *Plasmodium falcifarum*

Parasit malaria memerlukan dua hospes untuk siklus hidupnya, yaitu manusia dan nyamuk *Anopheles* betina

1. Siklus Pada Manusia.

Pada waktu nyamuk *Anopheles* infektif menghisap darah manusia, sporozoit yang berada di kelenjar liur nyamuk akan masuk ke dalam peredaran darah selama lebih kurang setengah jam. Setelah itu sporozoit akan masuk ke dalam sel hati dan menjadi trophozoit hati. Kemudian berkembang menjadi skizon hati yang terdiri dari 10,000-30,000 merozoit hati (tergantung spesiesnya). Siklus ini disebut siklus ekso-eritrositer yang berlangsung selama lebih kurang 2 minggu. Pada Merozoit yang berasal dari skizon hati yang pecah akan masuk ke peredaran darah dan menginfeksi sel darah merah. Di dalam sel darah merah, parasit tersebut berkembang dari stadium trophozoit sampai skizon (8-30 merozoit, tergantung spesiesnya). Proses perkembangan aseksual ini disebut

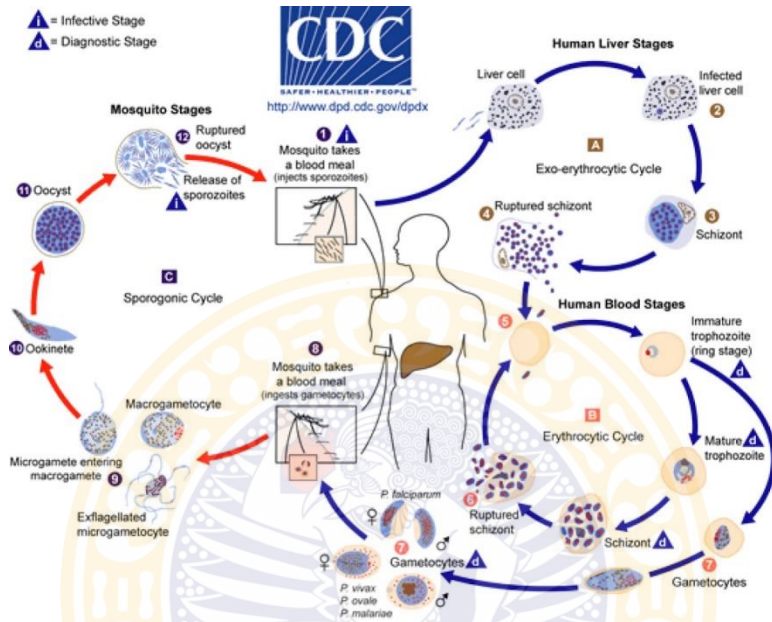
skizogoni. Selanjutnya eritrosit yang terinfeksi (skizon) pecah dan merozoit yang keluar akan menginfeksi sel darah merah lainnya. Siklus ini disebut siklus eritrositer. Pada *P. falciparum* setelah 2-3 siklus skizogoni darah, sebagian merozoit yang menginfeksi sel darah merah dan membentuk stadium seksual (gametosit jantan dan betina). Pada spesies lain siklus ini terjadi secara bersamaan. Hal ini terkait dengan waktu dan jenis pengobatan untuk eradikasi. Siklus *P. knowlesi* pada manusia masih dalam penelitian. Reservoir utama Plasmodium ini adalah kera ekor panjang (*Macaca sp*). Kera ekor panjang ini banyak ditemukan di hutan-hutan Asia termasuk Indonesia. Pengetahuan mengenai siklus parasit tersebut lebih banyak dipahami pada kera dibanding manusia.

2. Siklus pada nyamuk anopheles betina.

Apabila nyamuk Anopheles betina menghisap darah yang mengandung gametosit, di dalam tubuh nyamuk gamet jantan dan betina melakukan pembuahan menjadi zigot. Zigot berkembang menjadi ookinet kemudian menembus dinding lambung nyamuk. Pada dinding luar lambung nyamuk ookinet akan menjadi ookista dan selanjutnya menjadi sporozoit. Sporozoit ini bersifat infeksius dan siap ditularkan ke manusia. Masa inkubasi adalah rentang waktu sejak sporozoit masuk ke tubuh manusia sampai timbulnya gejala klinis yang ditandai dengan demam. Masa inkubasi bervariasi tergantung spesies *Plasmodium* (tabel 2.1).

Tabel 2.1 Masa inkubasi

Plasmodium	Masa Inkubasi (rata-rata)
<i>P. falciparum</i>	9 – 14 hari (12)
<i>P. vivax</i>	12 – 17 hari (15)
<i>P. ovale</i>	16 – 18 hari (17)
<i>P. malariae</i>	18 – 40 hari (28)
<i>P. knowlesi</i>	10 – 12 hari (11)



Gambar 2.2 Siklus Hidup Plasmodium (CDC, 2011)

Masa prepaten adalah rentang waktu sejak sporozoit masuk ke tubuh manusia sampai parasit dapat dideteksi dalam sel darah merah dengan pemeriksaan mikroskopik (Departemen Kesehatan RI, 2012)

2.6 Tinjauan Tentang Pemiakan

Pemiakan pertama kali ditemukan oleh Trager dan Jensen (1976). Media pemiakan *P. falciparum* menggunakan *Rosewell Parle Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640) yang ditambah dapor *N-2-Hydroxyl Ethyl Piperazin-N-2-Ethane Sulphonic Acid* (HEPES), glukosa, gentamisin dan natrium bikarbonat. Eritrosit yang mengandung parasit dengan kadar parasitemia tertentu disuspensikan dalam media biak yang lengkap sehingga diperoleh hematokrit 5%. Kemudian dibagi dalam cawan-cawan petri dan diinkubasi dalam inkubator CO₂ (kadar CO₂ ± 5%) pada suhu 37°C. Bila

menggunakan eksikator, kadar CO₂ berkisar 3%. Penggantian media harus dilakukan setiap hari untuk mendapatkan pembiakan berkesinambing yang baik dan bila persen parasitemia tinggi maka perlu dilakukan subkultur atau pengenceran dengan penambahan eritrosit. Untuk mengetahui pertumbuhan *P. falciparum* perlu dibuat hapusan darah tipis yang diwarnai dengan Giemsa. Bentuk dan warna diamati dengan mikroskop menggunakan perbesaran 1000 kali. Untuk menghindari kontaminasi bakteri, ke dalam media lengkap ditambahkan Gentamisin 25 mg/L. Kontaminasi bakteri ditandai dengan timbulnya bercak-bercak atau koloni yang berwarna hitam pada media pertumbuhan. (Trager dan Jensen, 1976)

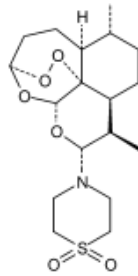
2.7 Metabolit Sekunder dari Produk Alam yang Memiliki Aktivitas Antimalaria

2.6.1 Alkaloid

Alkaloida adalah senyawa kimia yang secara khas diperoleh dari tumbuhan dan hewan, bersifat basa, mengandung satu atau lebih atom nitrogen (biasanya dalam cincin heterosiklik), dibiosintesis dari asam amino, banyak diantaranya memiliki aktivitas biologis pada manusia dan hewan (Trease dan Evans, 1983). Alkaloid merupakan senyawa yang berpengaruh terhadap susunan syaraf pusat, mempunyai atom nitrogen heterosiklis dan disintesis oleh tumbuhan dari asam amino atau turunannya (Waller dan Nowacki, 1978).

2.6.2 Terpenoid

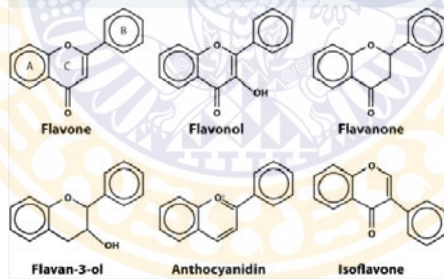
Kelompok terpenoid dibagi menjadi 3 yaitu, monoterpenoid, seskuiterpenoid dan triterpenoid (Robinson,1995). Terpenoid memiliki fungsi sebagai insektisida serta berdaya racun terhadap hewan tingkat tinggi (Robinson,1995). Seskuiterpenoid ini memiliki fungsi sebagai penolak serangga. Beberapa senyawa ini penting dalam pertahanan terhadap serangan mikroba.



Gambar 2.3 Artemison (Fraga,2007)

2.6.3 Flavonoid

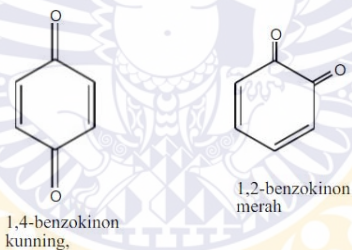
Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa phenolik dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (Gambar 2.4). Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub-sub kelompoknya (Redha, 2010)



Gambar 2.4 Struktur kimia flavonoid

2.6.4 Quinon

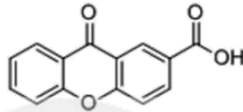
Kuinon adalah segolongan senyawa karbonil. Strukturnya siklik kuinondan merupakan diketon yang berkonjugasi. Contoh yang paling sederhana adalah 1,4- benzokuinon (Hart, 1983: 224). Senyawa-senyawa kuinon adalah zat warna yang tersebar luas di alam dan strukturnya sangat beragam, sumbangannya terhadap warna tumbuhan pada tumbuhan tinggi nisbi kecil. Banyak zat pewarna buatan dan alami (pewarnadan pigmen) adalah turunan kuinon. Pigmen ini sering terdapat dalam kulit, galih atau akar, serta dalam daun, tetapi pada jaringantersebut warnanya tertutupi oleh pigmen lain. Sebaliknya pada bakteria, fungus, dan lumut, kuinon berperan sedikit dalam mewarnai makhluk tersebut; misalnya, badan buah kebanyakan Basidiomycete diwarnai oleh kuinon (Harborne, 1987: 109).



Gambar 2.5 Contoh – contoh Quinon (Suminar, 1987)

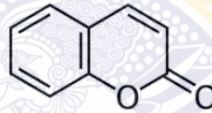
2.6.5 *Xanthone* dan *Kumarin*

Xanthone merupakan substansi kimia alami yang tergolong senyawa polyphenolic. *Xanthone* sangat bermanfaat untuk kesehatan tubuh sebagai antioksidan, antiproliferatif, antiinflamasi dan antimikroba (Mardiana, 2012).



Gambar 2.6 Struktur kimia *Xanthone* (Poerwanto *et al.*, 2009)

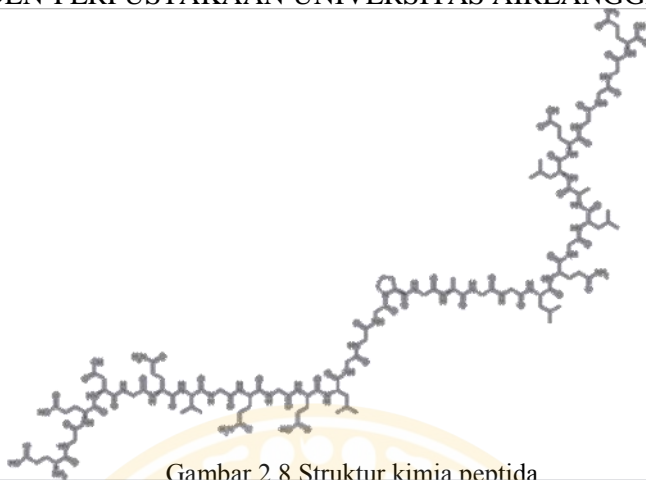
Kumarin merupakan golongan senyawa fenilpropanoid yang memiliki cincin lakton lingkar enam dan memiliki inti 2H-1-benzopiran-2-on dengan rumus molekul $C_9H_6O_2$. Kumarin dan turunannya banyak memiliki aktifitas biologis diantaranya dapat menstimulasi pembentukan pigmen kulit, mempengaruhi kerja enzim, anti koagulan darah, antimikroba dan menunjukkan aktifitas menghambat efek karsinogen.



Gambar 2.7 Struktur kimia kumarin

2.6.6 Peptida

Peptida merupakan molekul yang terbentuk dari dua atau lebih asam amino. Jika jumlah asam amino masih di bawah 50 molekul disebut peptida, namun jika lebih dari 50 molekul disebut dengan protein. Asam amino saling berikatan dengan ikatan peptida. Ikatan peptida terjadi jika atom nitrogen pada salah satu asam amino berikatan dengan gugus karboksil dari asam amino lain. Peptida terdapat pada setiap makhluk hidup dan berperan pada beberapa aktivitas biokimia. Peptida dapat berupa enzim, hormon, antibiotik, dan reseptor.



Gambar 2.8 Struktur kimia peptida

2.6.7 Fenol

Senyawa fenol meliputi aneka ragam senyawa yang berasal dari tumbuhan, yang mempunyai ciri sama yaitu cincin aromatik yang mengandung satu atau dua penyulih hidroksil. Senyawa fenol cenderung mudah larut dalam air karena umumnya berikatan dengan gula sebagai glikosida dan biasanya terdapat dalam vakuola sel (Harborne, 1987). Fenolat memiliki berbagai aktivitas, misalnya antibakteri, antijamur, antioksidan, sedatif, dan lain-lain (Saifudin *et al.*, 2011).

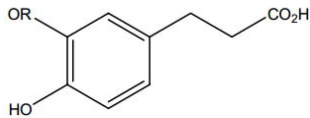


Gambar 2.9 Struktur kimia fenol

2.6.8 Lignan

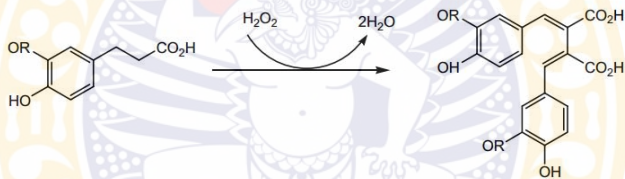
Lignan adalah metabolit sekunder tumbuhan yang merupakan turunan asam sinamat dan berhubungan secara biokimia dengan metabolisme fenilalanin. Lignan merupakan komponen turunan dua unit C₆-C₃ yang dihubungkan pada posisi β-β' karena itu lignan memiliki ikatan 8-8' (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN),

2000). Lignan juga sering disebut sebagai komponen yang memiliki struktur 2,3-dibenzilbutana.



Gambar 2.10 Unit C₆-C₃ yang membentuk lignan

Reaksi penggabungan kedua unit tersebut merupakan reaksi dimerisasi dan dikatalisis dengan adanya enzim peroksidase serta dikontrol oleh suatu glikoprotein yang biasa disebut dengan protein pemandu (Frias, 1991). Reaksinya dapat dilihat pada gambar berikut :



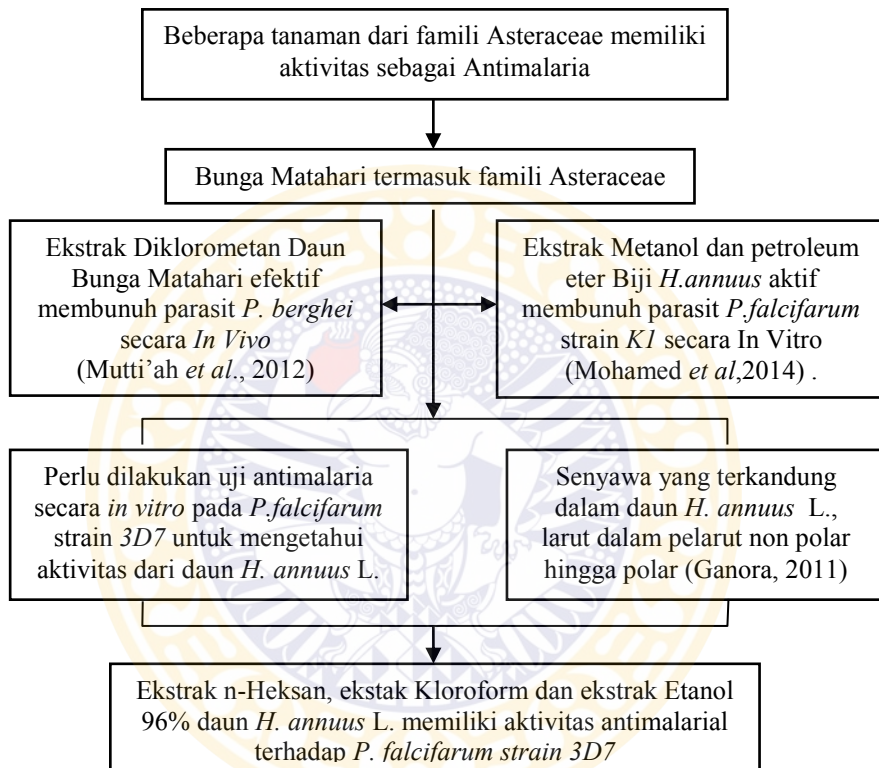
Gambar 2.11 Reaksi pembentukan struktur dasar senyawa lignan

2.8 Tinjauan Tentang Skrining Fitokimia

Skrining fitokimia adalah suatu kegiatan menggunakan prosedur tertentu yang bertujuan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam suatu bahan tanaman. Maka dari itu, untuk ekstraksi awal harus digunakan pelarut yang dapat melarutkan banyak senyawa yang bersifat polar, semipolar, atau nonpolar. (Depkes RI, 2000)

BAB III

KERANGKA KONSEPTUAL



Gambar 3.1. Skema Kerangka Konseptual Pengujian aktivitas antimalaria Ekstrak n-Heksan, ekstrak Kloroform dan ekstrak Etanol 96% Daun *Helianthus annuus* L. secara *in vitro* pada *Plasmodium falcifarum* strain 3D7

Malaria adalah penyakit serius dan fatal yang disebabkan oleh parasit yang biasa menginfeksi jenis nyamuk tertentu yang menyerang manusia. Orang-orang yang terinfeksi malaria biasanya ditandai dengan demam tinggi, menggigil, dan sakit seperti flu. Ada empat jenis parasit malaria menginfeksi manusia, diantaranya adalah *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, dan *P. Malariae* (CDC,2015)

Obat tradisional telah digunakan untuk mengobati malaria selama ribuan tahun dan merupakan sumber dari dua kelompok utama (artemisinin dan kina turunan) dari obat antimalaria modern. Adanya peningkatan resistensi obat dan kesulitan di daerah miskin untuk mendapatkan akses pengobatan antimalaria yang efektif, obat tradisional bisa menjadi sumber penting dan pengobatan berkelanjutan. Lebih dari 75% pasien malaria memilih pengobatan tradisional untuk mengobati antimalarial (Willcox and Bodeker, 2004).

Salah satu tanaman yang biasanya digunakan sebagai obat antimalarial secara tradisional adalah daun bunga matahari. Bunga Matahari merupakan famili dari Asteraceae. Dari famili ini ada beberapa tanaman yang juga memiliki khasiat sebagai Antimalaria, diantaranya *Dicoma tomentosa* (Jansen *et al*, 2012) *Tithonia diversifolia* (Elufioye *et al*, 2004) dan *Bidens pilosa* L. (Andrade *et al*, 2004).

Selain itu, sebelumnya telah ada penelitian yang melaporkan bahwa daun bunga matahari yang di ekstraksi dengan pelarut diklorometan mampu membunuh parasite *Plasmodium berghei* baik pada dosis 0,05 mg/g BB, dosis 0,5 mg/g BB, dosis 3 (5 mg/g BB), dan pada masing-masing dosis tersebut telah diketahui bahwa derajat parasitemia mencapai 0% pada hari ke-3 dan ke-4 pasca terapi (Mutti'ah *et al.*, 2012).

Pada tahun 2014 telah dilakukan penelitian oleh Mohamed mengenai aktivitas antimalarial biji *H.annuus* secara *in vitro* pada *Plasmodium*

falcifarum strain K1 dan didapatkan IC_{50} 0.3 - 27.5 $\mu\text{m}/\text{mL}$. Perlu dilakukan uji aktivitas daun *H.annuus* L. dengan pelarut bertingkat yakni n-heksana, kloroform, dan etanol 96% dengan *Plasmodium falcifarum strain 3D7*.



BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 Sampel Penelitian

Sampel penelitian yaitu ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol 96% daun *Helianthus annuus* L.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol 96% daun *Helianthus annuus* L.

4.2.2 Variabel Tergantung

Persentase penghambatan parasit *P. falciparum* strain 3D7

4.2.3 Variabel Kendali

Suhu inkubasi, durasi inkubasi, persen parasitemia awal

4.3 Jenis dan Rancangan Penelitian

4.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental quasi.

4.3.2 Rancangan Penelitian

4.3.2.1 Ekstraksi Daun *Helianthus annuus* L

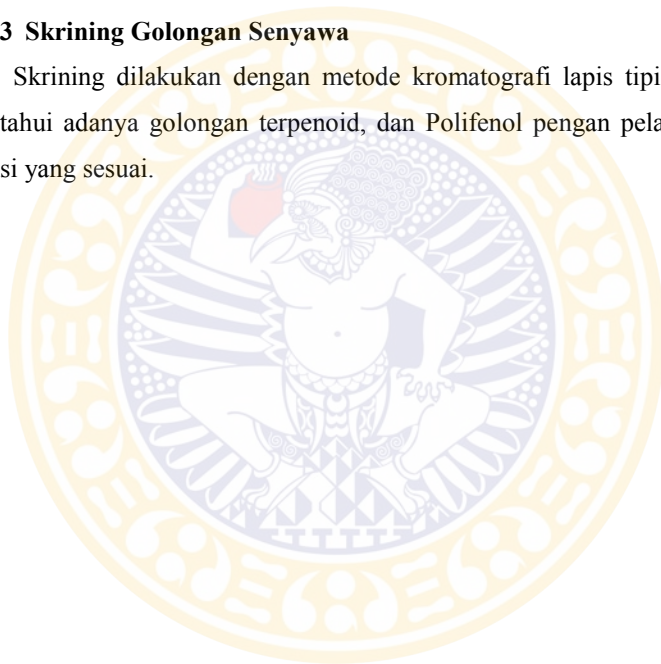
Ekstraksi daun *Helianthus annuus* L dilakukan dengan cara maserasi bertingkat dengan pelarut n-heksana. Kemudian residu serbuk daun *Helianthus annuus* L direndam dengan pelarut kloroform, selanjutnya residu serbuk direndam lagi dengan pelarut etanol 96%.

4.3.2.2 Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro* Ekstrak n-Heksana, Ekstrak Kloroform dan Ekstrak Etanol 96% Daun *Helianthus annuus* L

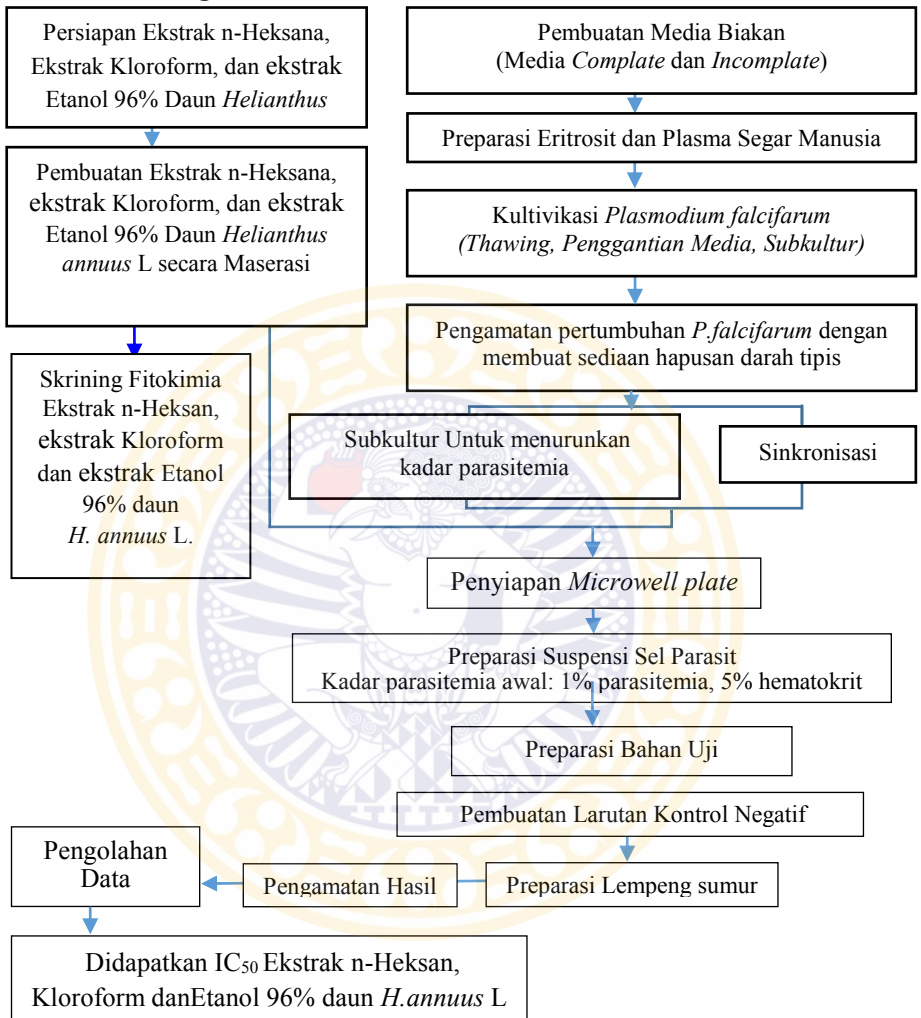
Dilakukan persiapan kultur parasit *P. falciparum* dengan metode Trager dan Jensen (1976). Kemudian sampel dipreparasi dengan melarutkannya dalam DMSO kemudian diencerkan dengan media sampai diperoleh 5 konsentrasi berbeda yaitu 100; 10; 1; 0,1; 0,01 $\mu\text{g/mL}$

4.3.2.3 Skrining Golongan Senyawa

Skrining dilakukan dengan metode kromatografi lapis tipis untuk mengetahui adanya golongan terpenoid, dan Polifenol pengan pelarut dan pereaksi yang sesuai.



4.3.2.4 Rancangan Penelitian



Gambar 4.1 Skema penelitian uji *in vitro* aktivitas antimalarial ekstrak n-heksana, Ekstrak kloroform dan etanol 96% daun *H.annuus* L. terhadap *P.falciparum*

4.4 Bahan Penelitian dan Instrumen Penelitian

4.4.1 Bahan Penelitian

4.4.1.1 Bahan Tanaman

Daun *Helianthus annuus* L. yang digunakan dalam penelitian ini dipesan dan dideterminasi dari Materia Medica, Batu, Jawa Timur.

4.4.1.2 Bahan untuk Ekstraksi Daun *Helianthus annuus* L

Pelarut yang digunakan untuk membuat ekstrak daun *Helianthus annuus* L adalah n-heksana (teknis redestilasi), kloroform (teknis redestilasi), dan etanol 96% (teknis redestilasi).

4.4.1.3 Bahan untuk Uji *In Vitro*

Bahan yang digunakan untuk membuat media pembiakan *Plasmodium falciparum* dan untuk membuat larutan uji *in vitro* adalah aquadest, HEPES buffer, RPMI 1640, natrium bikarbonat, gentamisin, plasma dan eritrosit manusia, DMSO, pewarna Giemsa, metanol, dan minyak emersi.

4.4.1.4 Biakan *Plasmodium falciparum*

Biakan *P. falciparum* yang digunakan dalam penelitian ini adalah strain 3D7 dan dikembangbiakkan di Laboratorium Malaria Departemen Farmakognosi dan Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga, Surabaya, Jawa Timur.

Untuk mendukung pembiakan *P. falciparum*, digunakan darah segar (*Packed Red Cell*) dan plasma (*Fresh Frozen Plasma*) manusia dengan golongan darah O positif yang diperoleh dari Palang Merah Indonesia cabang Surabaya, Jawa Timur.

4.4.1.5 Bahan untuk Skrining Golongan Senyawa

Bahan untuk skrining golongan senyawa antara lain adalah etanol, HCl 2N, NH₄OH pekat, kloroform bebas air, etil asetat, pereaksi dragendorf, n-heksana, pereaksi anisaldehyde asam sulfat, toluena, asam asetat glasial, dan pereaksi larutan 10% KOH dalam metanol. Bahan untuk

skrining golongan senyawa antara lain adalah etanol, HCl 2N, NH₄OH pekat, kloroform bebas air, etil asetat, pereaksi dragendorf, n-heksana, pereaksi anisaldehyde asam sulfat, toluena, asam asetat glasial, dan pereaksi larutan 10% KOH dalam methanol.

4.4.2 Instrumen Penelitian

4.4.2.1 Instrumen untuk Pembuatan Ekstrak Daun *Helianthus annuus* L

Instrumen yang digunakan untuk pembuatan ekstrak daun *Helianthus annuus* L adalah timbangan analitik, corong Buchner, pompa vakum, dan rotavapor.

4.4.2.2 Instrumen untuk Pembuatan Media dan Pemiakan *P. falciparum*

Instrumen yang digunakan untuk pembuatan media dan pemiakan *P. falciparum* adalah *Laminar Air Flow* (LAF), inkubator, *candle jar*, mikroskop dengan gelas objek, penyaring membran *micropore* 0,22 µm, erlenmeyer steril, *Beaker glass*, pengaduk magnetis, *sentrifuge*, cawan petri steril, mikropipet 500 µL dan 1000 µL, tabung falcon steril, *yellow tip* steril, *blue tip* steril, dan pinset anatomis.

4.4.2.3 Instrumen untuk Uji Aktivitas Antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum*

Instrumen yang digunakan untuk menguji aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* adalah *microwell plate* (lempeng sumur mikro), mikropipet 500 µL dan 1000 µL, *yellow tip* steril, *blue tip* steril, tabung falcon, mikroskop dengan gelas objek, *candle jar*, inkubator, dan *Laminar Air Flow* (LAF).

4.4.2.4 Instrumen untuk Skrining Golongan Senyawa

Instrumen yang digunakan untuk skrining golongan senyawa adalah tabung reaksi, erlenmeyer, bejana eluasi, dan lempeng KLT silika gel GF 254 (Merck).

4.5 Prosedur Penelitian

4.5.1 Persiapan Ekstrak n-Heksana, Ekstrak Kloroform, dan Ekstrak Etanol 96% Daun *Helianthus annuus L*

4.5.1.1 Pembuatan Simplisia Daun *Helianthus annuus L*

1. Daun *Helianthus annuus L* yang telah dipanen disortasi basah, dibilas air untuk membersihkan dari pengotor hingga bersih kemudian ditimbang beratnya.
2. Kemudian dikeringkan dengan cara diangin-anginkan sampai kering. Setelah kering, dilakukan sortasi kering dan ditimbang beratnya.
3. Simplisia diserbuk dengan menggunakan blender dan diayak dengan derajat ayakan nomor 40. Selanjutnya ditimbang beratnya.

4.5.1.2 Pembuatan Ekstrak n-Heksana, Ekstrak Kloroform, dan Ekstrak Etanol 96% Daun *Helianthus annuus L* secara Maserasi

1. Serbuk simplisia ditimbang 50 gram kemudian
2. Rendam dalam pelarut n-heksana 250 ml dalam wadah tertutup , didiamkan selama 1 hari dengan pengadukan setiap beberapa menit. Lakukan penyaringan dengan corong Buchner yang telah dihubungkan dengan pompa vakum untuk mendapatkan filtratnya. Serbuk simplisia diambil kemudian direndam kembali dengan pelarut yang sama sebanyak 250 mL dalam wadah tertutup selama 1 hari. Maserasi diulang hingga tiga kali perendaman dengan pelarut yang sama. Selanjutnya, filtrat yang telah didapat dari tiga kali re-maserasi dipekatkan dengan rotavapor dan

dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh berat ekstrak stabil.

3. Residu serbuk simplisia yang telah kering kemudian direndam dalam pelarut kloroform 250 mL dalam wadah tertutup. Didiamkan selama 1 hari dengan pengadukan setiap beberapa menit. Lakukan penyaringan dengan corong Buchner yang telah dihubungkan dengan pompa vakum untuk mendapatkan filtratnya. Serbuk simplisia diambil kemudian direndam kembali dengan pelarut yang sama sebanyak 250 mL dalam wadah tertutup selama 1 hari. Maserasi diulang hingga tiga kali perendaman dengan pelarut yang sama. Selanjutnya, filtrat yang telah didapat dari tiga kali re-maserasi dipekatkan dengan rotavapor dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh berat ekstrak stabil.

4. Residu serbuk simplisia yang telah kering kemudian direndam dalam pelarut etanol 96% 250 mL dalam wadah tertutup dan didiamkan selama 1 hari dengan pengadukan setiap beberapa menit. Setelah itu, dilakukan penyaringan dengan corong Buchner yang telah dihubungkan dengan pompa vakum untuk mendapatkan filtratnya. Serbuk simplisia diambil kemudian direndam kembali dengan pelarut yang sama sebanyak 250 mL dalam wadah tertutup selama 1 hari. Maserasi diulang hingga tiga kali perendaman dengan pelarut yang sama. Selanjutnya, filtrat yang telah didapat dari tiga kali re-maserasi dipekatkan dengan rotavapor dan dimasukkan ke dalam oven pada suhu 40°C hingga diperoleh berat ekstrak stabil

4.5.2 Prosedur Pemiakan *Plasmodium falciparum*

4.5.2.1 Pembuatan Media Biakan

Media yang digunakan untuk pembiakan *P. falciparum* secara *in vitro* terdiri dari media tak lengkap dan media lengkap.

A. Pembuatan media tak lengkap sebanyak 1 L

1. *Beaker glass* yang berisi HEPES 5,94 gram dan hipoksantin 50 mg ditambah air steril. Diaduk dan dicampur sampai larut dan homogen selama 1 jam dengan menggunakan pengaduk magnetis.
2. Ditambahkan 1 *sachet* serbuk RPMI berisi 10,4 gram. *Sachet* RPMI dibilas perlahan dengan air steril selama beberapa kali.
3. Ditambahkan air steril sampai dengan volume 1 liter dan dicampur sampai homogen.
4. Ditambahkan NaHCO₃ sebanyak 2 gram dan diaduk hingga larut.
5. Dimasukkan Gentamisin 25 mg dan diaduk sampai larut.
6. Disterilisasi dengan cara disaring menggunakan membran *micropore* 0,22 µm, kemudian disimpan dalam botol steril pada suhu 4°C.

B. Pembuatan media lengkap sebanyak 50 mL

1. Dimasukkan 42,5 mL media tak lengkap ke dalam tabung falcon bertutup 50 mL yang telah disterilkan terlebih dahulu.
2. Ditambahkan plasma yang telah dipreparasi pada 4.5.2.2 sebanyak 7,5 mL, dikocok dengan perlahan sampai tercampur rata sehingga diperoleh media dengan kadar plasma sebesar 15%. Media ini digunakan untuk membiakkan *P. falciparum*.

4.5.2.2 Preparasi Eritrosit dan Plasma Segar Manusia**A. Preparasi Eritrosit 50%**

1. Diambil 7,5 mL darah, kemudian dimasukkan ke dalam tabung falcon bertutup yang telah disterilkan
2. Darah pada tabung falcon dicuci dengan media lengkap dengan cara menambahkan 7,5 mL media lengkap kemudian dilakukan proses sentrifuge pada kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Proses ini diulang sebanyak tiga kali.

3. Darah yang telah dicuci dicampur kembali dengan media lengkap dengan volume yang sama sehingga kandungan eritrosit menjadi 50% dan disebut RBC 50%.

B. Preparasi Plasma Segar Manusia

1. Plasma diaktivasi dengan menginkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit
2. Plasma yang telah diaktivasi kemudian diambil sejumlah 15 mL dan dimasukkan ke dalam tabung falcon bertutup.
3. Dilakukan *sentrifuge* pada 1500 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan fibrin pada plasma

4.5.3 Kultivasi *Plasmodium falciparum*

4.5.3.1 Prosedur Pencairan (*Thawing*)

1. Parasit beku *P. falciparum* dihangatkan di dalam inkubator pada suhu 37°C selama 15 menit sampai mencair.
2. Parasit yang telah mencair disuspensi dengan 2 ml NaCl 3,5% menggunakan mikropipet, lalu dimasukkan dalam tabung falcon steril bertutup 15 mL dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Kemudian supernatan yang didapat dibuang.
3. Parasit dicuci dengan medium tak lengkap kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Setelah itu, bagian supernatan dibuang. Proses ini diulangi dua kali.
4. Parasit kemudian ditambahkan 4 mL media lengkap dan 1 ml RBC 50%, dicampur sampai homogen dengan menggunakan pipet.
5. Suspensi parasit kemudian ditambahkan dalam cawan petri, kemudian diberi label tanggal, bulan, tahun, kadar hematokrit, dan tipe strain parasit.
6. Biakan kemudian dimasukkan ke dalam bejana eksikator yang telah berisi lilin. Lilin dinyalakan kemudian eksikator ditutup rapat. Setelah

lilin mati, eksikator dimasukkan ke dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C. Media biakan diganti dengan media yang baru setiap 24 jam.

4.5.3.2 Prosedur Penggantian Media

7. Diambil larutan media lengkap pada cawan petri yang berisi biakan parasit dengan cara dipipet sebanyak mungkin.

8. Ditambahkan media lengkap baru ke dalam biakan dengan jumlah yang sama dengan yang telah diambil pada tahap (1). Kemudian dicampur hingga merata.

9. Biakan dimasukkan kembali ke dalam candle jar dan diinkubasi pada suhu 37°C.

4.5.3.3 Subkultur

Tujuan subkultur adalah untuk menurunkan kadar parasitemia yang tinggi menjadi lebih rendah sesuai yang diinginkan. Biakan yang telah mencapai kadar parasitemia yang tinggi harus diencerkan dan dipindahkan ke tempat pembiakan yang baru untuk dibiakkan lebih lanjut. Kadar parasitemia awal dibuat sekitar 0,1-0,2% dengan cara mengencerkan menggunakan RBC 50% hematokrit. Setelah diencerkan, dibuat sediaan hapusan darah tipis untuk menghitung jumlah parasitemianya. Sediaan kemudian diinkubasi kembali dalam inkubator pada suhu 37°C

4.5.4 Pengamatan Pertumbuhan *P. falciparum*

4.5.4.1 Pembuatan Sediaan Hapusan Darah Tipis

1. Diteteskan kurang lebih 1 tetes suspensi sel parasit pada gelas objek, lalu dengan bantuan satu sisi *cover glass*, suspensi sel parasit tersebut diratakan. Kemudian dibiarkan di udara terbuka hingga kering.

2. Dilakukan fiksasi hapusan darah tipis tersebut dalam metanol absolut, kemudian diletakkan dalam udara terbuka hingga metanol kering.

3. Pewarna Giemsa 20% dalam aquadest ditetaskan pada hapusan darah tipis hingga menutupi seluruh permukaan hapusan darah, kemudian

dibiarkan selama 20 menit lalu dicuci dengan air dan dibiarkan di udara terbuka hingga kering.

4. Setelah sediaan kering, hapusan diperiksa dengan mikroskop pada perbesaran 10 x 100 untuk menghitung parasitemia.

4.5.5 Pengujian Aktivitas Antimalaria

4.5.5.1 Preparasi Suspensi Sel Parasit Uji

Kadar parasitemia awal tiap *well* pada pengujian aktivitas antimalaria secara *in vitro* adalah 1% parasitemia dan 5% hematokrit. Dalam 1 *plate* terdapat 24 *well*.

1. Seluruh suspensi dalam petri (± 5 mL) dimasukkan tabung falcon steril bertutup 15 mL kemudian disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit. Sebanyak 4,5 mL supernatan dibuang sehingga diperkirakan terdapat 5% sel darah merah terinfeksi parasit dan 50% hematokrit dengan jumlah total ± 500 μ L.

2. Dibuat suspensi sel parasit agar kandungan parasitemia menjadi 1% dan hematokrit menjadi 10%, dengan menambahkan larutan RBC 50% sebanyak 2000 μ L ke dalam tabung, kemudian ditambahkan larutan media lengkap sebanyak 10,0 mL, kemudian suspensi tersebut dicampur dengan hati-hati menggunakan mikropipet hingga tercampur rata.

3. Sebelum dimasukkan ke dalam *microwell*, dibuat hapusan darah tipis sebagai D_0 , yaitu kadar parasitemia awal pada jam ke-0 sebelum diberi zat uji.

4. Dimasukkan sebanyak 500 μ L suspensi sel parasit ke dalam masing-masing *well* yang sudah berisi 500 μ L larutan uji. Volume suspensi sel dibuat cukup untuk 25 *well*.

4.5.5.2 Preparasi Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak n-heksana, Ekstrak kloroform, dan Ekstrak etanol 96% daun *Heliantus annuus* L.

Masing-masing sampel dibuat dengan konsentrasi 100; 10; 1; 0,1; dan 0,01 ppm. Prosedur preparasi sampel adalah sebagai berikut:

1. Masing-masing ekstrak ditimbang sejumlah 10 mg, lalu dilarutkan dalam 100 μL DMSO (dimetil sulfoksida) (100000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

2. Larutan induk sampel 100000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sebanyak 5 μL , kemudian ditambahkan 245 μL media lengkap (2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

3. Larutan induk sampel 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sebanyak 120 μL dan dimasukkan ke dalam *microwell*. Kemudian ditambahkan 1080 μL media lengkap (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Selanjutnya dilakukan duplikasi dengan cara memipet 500 μL larutan 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tersebut, lalu dimasukkan ke *well* di bawahnya dan masing-masing *well* kemudian ditambah 500 μL suspensi parasit. Selanjutnya larutan tersebut disebut dengan U_1 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

4. Larutan induk sampel 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sebanyak 120 μL lalu dimasukkan ke *microwell*. Kemudian ditambah 1080 μL media lengkap (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Selanjutnya dilakukan duplikasi dengan cara memipet 500 μL larutan 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tersebut, lalu dimasukkan ke *well* di bawahnya dan masing-masing *well* kemudian ditambah 500 μL suspensi parasit. Selanjutnya larutan tersebut disebut dengan U_2 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

5. Larutan induk sampel 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sebanyak 120 μL lalu dimasukkan ke *microwell*. Kemudian ditambah 1080 μL media lengkap (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Selanjutnya dilakukan duplikasi dengan cara memipet 500 μL larutan 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tersebut, lalu dimasukkan ke *well* di bawahnya dan masing-masing *well* di bawahnya dan masing-masing *well* kemudian ditambah 500 μL suspensi parasit. Selanjutnya larutan tersebut disebut dengan U_3 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

6. Larutan induk sampel 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dipipet sebanyak 120 μL lalu dimasukkan ke *microwell*. Kemudian ditambah 1080 μL media lengkap (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Selanjutnya dilakukan duplikasi dengan cara memipet 500 μL

larutan 0,2 µg/mL tersebut, lalu dimasukkan ke *well* di bawahnya. Masing-masing *well* kemudian ditambah 500 µL suspensi parasit. Selanjutnya larutan tersebut disebut dengan U₄ (0,1 µg/mL).

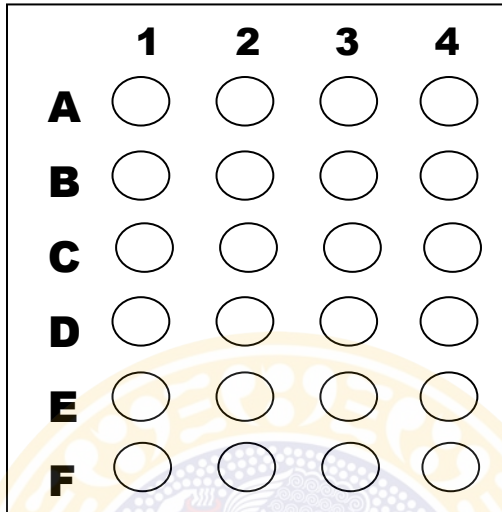
7. Larutan induk sampel 0,2 µg/mL dipipet sebanyak 120 µL lalu dimasukkan ke *microwell*. Kemudian ditambah 1080 µL media lengkap (0,02 µg/mL). Selanjutnya dilakukan duplikasi dengan cara memipet 500 µL larutan 0,02 µg/mL tersebut, lalu dimasukkan ke *well* di bawahnya. Masing-masing *well* kemudian ditambah 500 µL suspensi parasit. Selanjutnya larutan tersebut disebut dengan U₅ (0,01 µg/mL).

4.5.6 Pembuatan Larutan Kontrol Negatif

Larutan tanpa sampel diambil sebanyak 490 µL dan DMSO 10 µL, homogenkan. Kemudian dimasukkan ke dalam masing-masing *microwell* dan dilakukan replikasi. Kemudian ditambahkan 500 µL suspensi parasit tiap *well*. Larutan ini selanjutnya disebut dengan K(-).

4.5.7 Preparasi Lempeng Sumur Mikro

Uji aktivitas antimalaria pada penelitian ini dilakukan dalam *microwell plate disposable* yang steril. *Microwell* terdiri dari 24 *well* dengan 6 baris (A-F) dan 4 kolom (1-4) yang diberi larutan uji dan kontrol negatif.

Gambar 4.2 Denah *Microwell*

Keterangan:

Kolom A Baris 1-4 = D1 = Larutan ekstrak 100 $\mu\text{g/mL}$

Kolom B Baris 1-4 = D2 = Larutan ekstrak 10 $\mu\text{g/mL}$

Kolom C Baris 1-4 = D3 = Larutan ekstrak 1 $\mu\text{g/mL}$

Kolom D Baris 1-4 = D4 = Larutan ekstrak 0,1 $\mu\text{g/mL}$

Kolom E Baris 1-4 = D5 = Larutan ekstrak 0,01 $\mu\text{g/mL}$

Kolom F Baris 1-4 = K- = Kontrol negative

Pada penelitian ini digunakan dua buah *microwell*. *Microwell* pertama pada kolom 1 dan 2 diisi larutan uji ekstrak n-heksana, sedangkan kolom 3 dan 4 diisi larutan uji Ekstrak kloroform. Larutan uji Ekstrak etanol diisikan pada dua kolom yang terdapat pada *microwell* kedua. Masing-masing konsentrasi dilakukan sebanyak dua kali. *Microwell* yang telah diisi larutan uji dan suspensi parasit selanjutnya dimasukkan dalam *candle jar* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C.

4.5.8 Pengamatan Hasil

1. Setelah 48 jam, kira-kira 950 μL bagian atas suspensi dalam microwell dibuang, kemudian dibuat sediaan hapusan darah tipis
2. Sediaan hapusan darah tipis diwarnai dengan Giemsa 20% dengan metode yang sama seperti pada 4.5.2.1
3. Setelah kering, hapusan darah tipis kemudian diperiksa dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 10 x 100
4. Pengamatan dilakukan dengan menghitung persentase parasitemia seperti pada 4.5.5.1

4.5.9 Pengolahan Data

4.5.9.1 Perhitungan Persentase Parasitemia

Persen parasitemia diperoleh dengan cara menghitung jumlah eritrosit terinfeksi parasit malaria dalam 5000 eritrosit yang diamati

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

4.5.9.2 Perhitungan Persentase Pertumbuhan

Persen pertumbuhan diperoleh dengan cara sebagai berikut:

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \% \text{ Parasitemia tiap konsentrasi uji} - \text{Rerata } \% \text{ parasitemia Do}$$

4.5.9.3 Perhitungan Persentase Penghambatan

$$\text{Persen Penghambatan} = 100\% - \left(\frac{X_u}{X_k} \right) \times 100\%$$

Keterangan:

X_u = persen pertumbuhan larutan uji

X_k = persen pertumbuhan pada kontrol negatif

4.5.9.4 Perhitungan IC₅₀

IC₅₀ merupakan konsentrasi sampel yang dapat menghambat pertumbuhan parasit sebanyak 50%. Perhitungan IC₅₀ dilakukan dengan menggunakan analisis Probit (*probability unit*) yaitu dengan membuat kurva hubungan antara probit persen penghambatan dengan logaritma konsentrasi sampel menggunakan persamaan garis regresi linier.

4.5.10 Skrining Fitokimia

4.5.10.1 Skrining untuk Golongan Terpenoid

1. Sedikit ekstrak ditambah beberapa tetes n-heksana, diaduk sampai larut, kemudian ditotolkan pada fase diam.
2. Uji kromatografi lapis tipis ini menggunakan:
Fase diam : Kiesel gel GF 254
Fase gerak : n-heksana – etil asetat (4:1)
Penampak noda : Pereaksi anisaldehyda asam sulfat
3. Adanya terpenoid atau steroid ditunjukkan dengan terjadinya warna merah ungu atau ungu. (Anonim, 2013)

BAB V

HASIL PENELITIAN

Hasil Ekstraksi Daun *H. annuus* L Secara MaserasiTabel 5.1 Hasil pembuatan serbuk simplisia daun *H. annuus* L.

Hasil	Berat
Serbuk simplisia daun	500 gram

Tabel 5.2 Berat dan rendemen hasil ekstraksi daun *H.annuus* L secara maserasi dengan berat bahan awal ekstraksi 50 gram dan perbandingan pelarut 1:5 b/v

Hasil Ekstraksi	Berat	Rendemen
Ekstrak n-Heksana	2,7642 Gram	5,53%
Ekstrak Kloroform	1,3168 Gram	2,63%
Ekstrak Etanol 96%	2,3902 Gram	4,78%

5.1. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria

Tabel 5.3 Rata-rata persen parasitemia pada uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* terhadap *P. falciparum* setelah pemberian ekstrak daun *H.annuus* L. dan diinkubasi selama 48 jam. Persentase parasitemia dihitung dengan 5000 eritrosit.

Konsentrasi sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Rata-rata Persen Parasitemia (%)		
	Ekstrak n-Heksana	Ekstrak Kloroform	Ekstrak Etanol 96%
D0	0.77	0.84	0.41
Kontrol (-)	2.88	2.99	2.44
100	2.37	1.19	1.33
10	2.59	1.39	1.44
1	2.64	1.55	1.58
0,1	2.72	1.87	1.86
0,01	2.95	2.02	1.95

Tabel 5.4 Rata-rata persentase pertumbuhan *P. falciparum* setelah pemberian ekstrak daun *H. annuus* L dan diinkubasi selama 48 jam.

Konsentrasi sampel (µg/mL)	Rata-rata Persen Pertumbuhan (%)		
	Ekstrak n-Heksana	Ekstrak Ekstrak Kloroform	Ekstrak Etanol 96%
Kontrol (-)	2.113	2.153	2.033
100	1.605	0.357	0.920
10	1.820	0.550	1.036
1	1.870	0.710	1.175
0,1	1.950	1.035	1.454
0,01	2.185	1.180	1.543

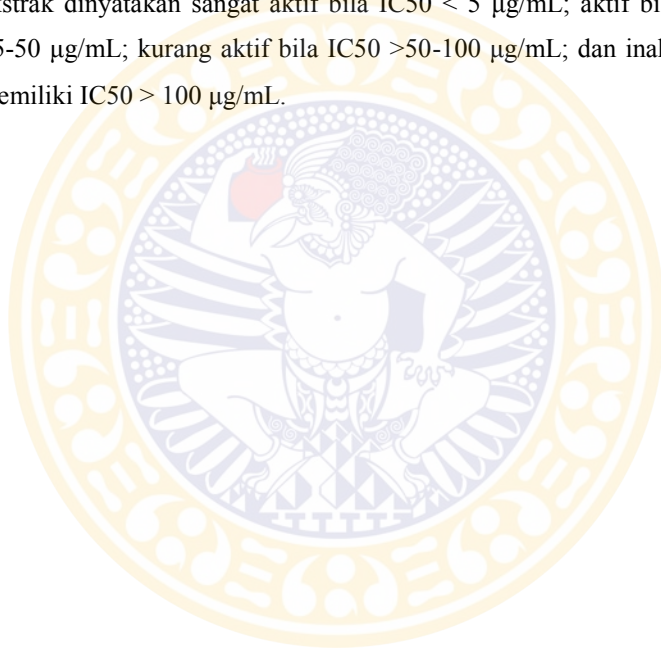
Tabel 5.5 Rata-rata persentase penghambatan *P. falciparum* setelah pemberian ekstrak daun *H. annuus* L dan diinkubasi selama 48 jam.

Konsentrasi sampel (µg/mL)	Rata-rata Persen Penghambatan (%)		
	Ekstrak n-Heksana	FEkstrak Kloroform	Ekstrak Etanol 96%
100	24.02	83.40	54.73
10	13.85	74.46	49.06
1	11.48	67.03	42.21
0,1	7.68	51.94	28.49
0,01	-3.43	45.22	24.13

Tabel 5.6 Nilai IC₅₀ uji aktivitas antimalaria ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol 96% daun *H. annuus* L.

Sampel	IC ₅₀ (µg/mL)	Aktivitas*
Ekstrak n-heksana	164765.662 µg/mL	Inaktif
Ekstrak kloroform	0.037 µg/mL	Sangat Aktif
Ekstrak etanol 96%	17.637 µg/mL	Aktif

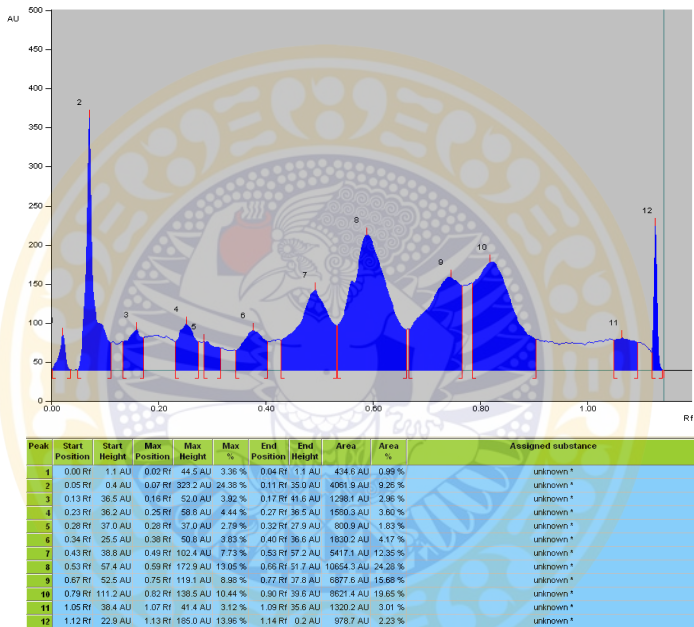
*Berdasarkan Chinchilla *et al.*, 2012, aktivitas antimalaria suatu ekstrak dinyatakan sangat aktif bila IC₅₀ < 5 µg/mL; aktif bila IC₅₀ >5-50 µg/mL; kurang aktif bila IC₅₀ >50-100 µg/mL; dan inaktif bila memiliki IC₅₀ > 100 µg/mL.



5.2. Hasil Identifikasi dengan Profil Kromatogram

5.3.1 n-Heksana

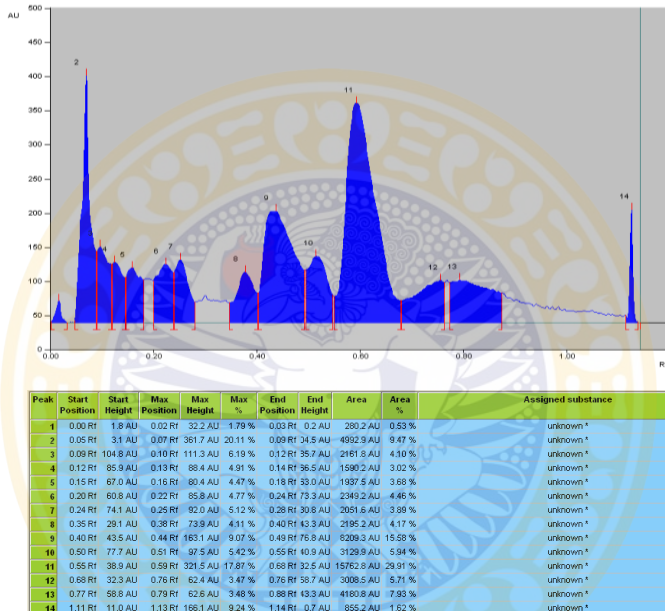
Pada profil kromatogram ekstrak n-heksana daun *Helianthus annuus* L. digunakan komposisi eluen n-heksana : etil asetat (7:3). Dari hasil kromatografi terdapat 12 *peak* pada ekstrak n-heksana daun *Helianthus annuus* L.



Gambar 5.1 Profil kromatogram ekstrak n-heksana daun *Helianthus annuus* L.

5.3.2 Kloroform

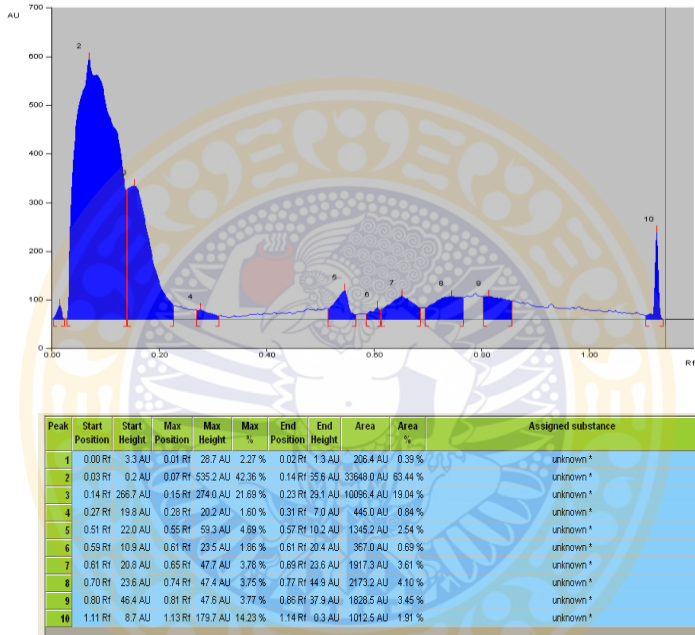
Pada profil kromatogram Ekstrak kloroform daun *Helianthus annuus* L. digunakan komposisi eluen n-heksana : etil asetat (7:3). Dari hasil kromatografi terdapat 14 *peak* pada Ekstrak kloroform daun *Helianthus annuus* L.



Gambar 5.2 Profil kromatogram Ekstrak kloroform daun *Helianthus annuus* L.

5.3.3 Etanol 96%

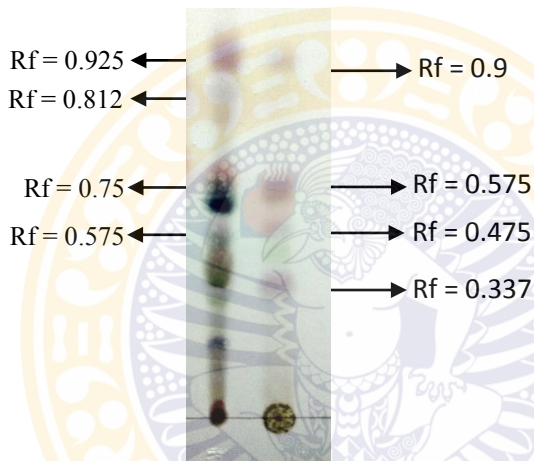
Pada profil kromatogram Ekstrak Etanol 96% daun *Helianthus annuus* L. digunakan komposisi eluen n-heksana : etil asetat (7:3). Dari hasil kromatografi terdapat 10 *peak* pada Ekstrak Etanol 96% daun *Helianthus annuus* L.



Gambar 5.3 Profil kromatogram Ekstrak Etanol 96% daun *Helianthus annuus* L.

5.4 Hasil Skrining Golongan Senyawa Terpenoid pada Ekstrak Kloroform dan Etanol 96%

Identifikasi senyawa dilakukan dengan eluen n-Heksana : etil asetat (7:3) dan penampak noda Aninsaldehid H_2SO_4 . Setelah plat KLT disemprot dengan penampak noda, muncul noda berwarna ungu yang menunjukkan adanya senyawa terpenoid dalam ekstrak n- Heksana, kloroform dan Etanol 96%.



Gambar 5.4 Hasil skrining terpenoid setelah disemprot dengan penampak noda Aninsaldehid H_2SO_4 dan dipanaskan sebentar

Keterangan :

- A = Ekstrak Kloroform Daun Bunga Matahari
- B = Ekstrak Etanol 96% Daun Bunga Matahari

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antimalaria pada ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol daun *Helianthus annuus* L. terhadap *P. falciparum* secara *in vitro*. Hasil uji aktivitas tersebut nantinya akan ditentukan dari ekstrak dan ekstrak manakah yang memiliki aktivitas antimalarial paling tinggi berdasarkan IC₅₀. Penelitian ini menggunakan daun *H. annuus* L yang telah dibuat serbuk oleh Matera Medika, Batu, Jawa Timur. Pemilihan daun Bunga Matahari ini didasari oleh pendekatan Kemotaksonomi, dimana famili dari Asteraceae telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Selain itu, telah ada penelitian mengenai *H. annuus* L dengan pelarut yang berbeda dan bagian tanaman yang berbeda terbukti memiliki aktivitas antimalaria.

Serbuk simplisia *H. annuus* L yang didapatkan selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi dengan pelarut yang pertama n-Heksana diulang sebanyak tiga kali, dilanjutkan dengan Kloroform diulang sebanyak tiga kali, dan yang terakhir Etanol 96% diulang sebanyak tiga kali. Pemilihan pelarut tersebut berdasarkan pada polaritas senyawa – senyawa yang telah terbukti memiliki aktivitas antimalarial pada *H. annuus* L, yaitu sesquiterpen. Tahap selanjutnya yaitu, serbuk simplisia yang telah ditimbang sebanyak 50 gram direndam semalam dalam pelarut sebanyak 5 kali berat serbuk, yaitu 250ml. Maserasi dilakukan berulang sebanyak tiga kali, karena pada ekstraksi ke-2 dengan pelarut yang sama mampu menarik 99% senyawa secara aktif, sehingga ekstraksi yang ketiga diharapkan lebih dari 99% senyawa dari serbuk simplisia yang dapat tertari oleh pelarut tersebut. Sampel yang telah terekstrak selanjutnya disaring dengan bantuan

corong *buchner* untuk memisahkan antara filtrat dengan residu. Filtrat yang telah selanjutnya dipekatkan dengan bantuan *rotary evaporator vaccum*, selanjutnya disimpan dalam oven dengan suhu 40°C hingga didapatkan berat ekstrak yang konstan. Didapatkan rendemen dari masing-masing pelarut yaitu n- heksana 5,53%, Kloroform 2,63% dan etanol 96% 4,78%.

Metode pembiakan parasit dilakukan dengan metode Trager dan Jensen (1976) dengan menggunakan *candle jar* untuk meminimalkan gas O₂. Parasit tumbuh optimal pada kondisi gas O₂ yang sedikit dan 5% CO₂ (Jensen, 2002). Ekstrak *H. annuusi* L yang akan dilakukan uji, dilarutkan terlebih dahulu dengan DMSO (dimetil sulfoksida) dan dimasukkan ke dalam *microwell* kemudian ditambahkan 500 µL suspensi parasit sehingga didapatkan konsentrasi bahan uji sebesar 100, 10, 1, 0,1, dan 0,01 µg/mL. Konsentrasi DMSO dalam *well* pada konsentrasi bahan uji tertinggi tidak lebih dari 1% (WHO, 2015). *Microwell* diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 48 jam sesuai dengan durasi satu siklus aseksual pada eritrosit. Setelah 48 jam, bagian media komplit pada suspensi parasit dibuang dan dibuat hapusan tipis dari darah yang telah bersih. Hapusan darah tipis difiksasi dengan metanol untuk merekatkan hapusan darah yang telah dibuat. Kemudian hapusan yang telah difiksasi diwarnai dengan Giemsa 20% lalu didiamkan selama 20 menit. Hapusan darah tipis selanjutnya dihitung jumlah parasit yang terinfeksi dengan mikroskop dengan perbesaran 10 x 100 sebanyak 5000 eritrosit.

Berdasarkan hasil pengolahan data, seperti yang tercantum dalam tabel hasil persen parasitemia menunjukkan bahwa konsentrasi bahan uji berbanding lurus dengan persen penghambatannya terhadap parasit. Semakin besar konsentrasi bahan uji maka semakin tinggi persen penghambatannya. Pada suspensi parasit yang diberi ekstrak n-heksana

Ekstrak kloroform dan Ekstrak etanol 96%, terjadi penurunan persen penghambatan seiring dengan menurunnya konsentrasi bahan uji. Hasil persentase penghambatan dianalisa dengan metode log-probit untuk mendapatkan nilai IC_{50} . IC_{50} adalah konsentrasi bahan uji yang dapat menghambat pertumbuhan parasit sebanyak 50%. Menurut Chinchilla *et al.*, (2012) hasil analisa probit, IC_{50} untuk ekstrak n-heksana sebesar 164765.662 $\mu\text{g/mL}$, termasuk kategori inaktif., Sedangkan IC_{50} untuk Ekstrak kloroform sebesar 0.037 $\mu\text{g/mL}$, termasuk kategori aktivitas antimalaria sangat aktif karena $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$. Selain itu, Ekstrak etanol 96% juga menunjukkan aktivitas antimalarial yang aktif karena memiliki IC_{50} 17.637 $\mu\text{g/mL}$ yang termasuk dalam rentang IC_{50} 50-5 $\mu\text{g/mL}$.

Sebelumnya, telah dilaporkan dalam penelitian Mohamed (2014) bahwa Ekstrak Metanol dan petroleum eter biji bunga Matahari yang telah terbukti memiliki aktivitas sebagai antimalaria pada *P.falcifarum strain K1* secara *in vitro* dengan IC_{50} ekstrak petroleum eter 0,6 $\mu\text{g/mL}$ dan IC_{50} ekstrak methanol 0,1 $\mu\text{g/mL}$. Dari keempat ekstrak tersebut, ekstrak petroleum eter dan methanol biji *H.annuus* L serta Ekstrak kloroform dan Ekstrak etanol 96% daun *H.annuus* L, termasuk kategori aktif hingga sangat aktif karena termasuk dalam rentang IC_{50} 5-50 $\mu\text{g/mL}$ dan $IC_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$ (Chinchilla *et al.*, 2012) sehingga berpeluang untuk dijadikan alternatif pengobatan malaria baru ataupun sebagai pengkombinasi dengan obat antimalaria lainnya.

Selain bijinya yang telah terbukti memiliki aktivitas antimalarial secara *in vitro*, Daun dari bunga matahari yang diekstraksi dengan pelarut diklorometan telah terbukti memiliki aktifitas antimalarial secara *in vivo*. Ekstrak diklorometan daun bunga matahari mampu membunuh parasit *P. berghei* baik pada dosis 1 (0,05 mg/g BB), dosis 2 (0,5 mg/g BB), dosis 3

(5 mg/g BB), dan pada masing-masing dosis tersebut telah diketahui bahwa derajat parasitemia mencapai 0% pada hari ke-3 dan ke-4 pasca terapi (Muti'ah, 2012).

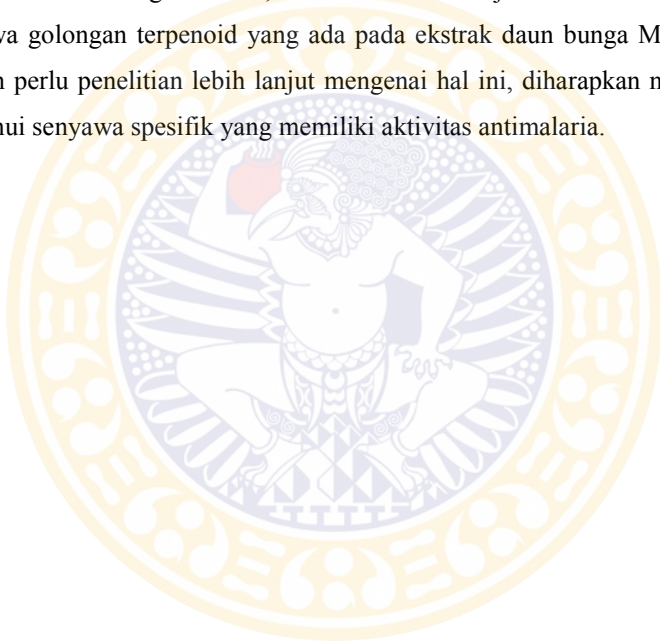
Dari dua penelitian sebelumnya mengenai bunga matahari, pelarut semi polar yaitu diklorometan untuk ekstraksi daun dan petroleum eter untuk ekstraksi biji bunga matahari telah terbukti memiliki aktivitas antimalaria. Selain pelarut semi polar, pelarut polar yang digunakan untuk ekstraksi biji bunga matahari yaitu methanol juga terbukti memiliki aktivitas antimalaria. Hal ini semakin mendukung data yang didapatkan, bahwa pelarut kloroform (semipolar) dan etanol 96% (polar) memiliki aktivitas sebagai antimalaria. Oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai Ekstrak kloroform dan Ekstrak etanol 96% Daun Bunga Matahari ini, baik untuk mengetahui senyawa yang memiliki aktivitas antimalaria maupun uji aktivitas antimalaria secara *in vivo*.

Kemudian dilakukan identifikasi senyawa golongan terpenoid untuk memastikan bahwa Ekstrak kloroform dan Ekstrak etanol 96% daun *H. annuus* L. benar mengandung senyawa golongan terpenoid yang diduga memiliki aktivitas antimalaria pada penelitian ini. Untuk memperkuat hasil dilakukan identifikasi dengan menggunakan profil kromatogram.

Pemeriksaan profil kromatografi dilakukan dengan fase diam silika gel GF254 dan fase gerak yang digunakan adalah n-Heksana : Etil asetat (7:3). Chamber dijenuhkan dengan fase gerak selama kurang lebih 30 menit. Ditotolkan sepuluh mikroliter ekstrak pada fase diam dan kemudian dieluasi. Plat KLT dikeringkan kemudian diamati di bawah sinar UV 254 dan UV366. Profil kromatografi ekstrak n-Heksana, Ekstrak Kloroform dan Ekstrak Etanol 96% secara kualitatif menghasilkan bercak kuning hingga hijau. Setelah dibandingkan antar profil, didapatkan bahwa ekstrak dengan

pelarut kloroform lebih banyak menarik senyawa yang ada pada daun Bunga Matahari. Hal ini terbukti dengan didapatkannya 16 peak dari profil kromatografi Ekstrak kloroform. Sedangkan pada Ekstrak etanol 96% memiliki 10 peak dan ekstrak n- heksana menunjukkan 12 peak.

Setelah diamati dengan densitometri, selanjutnya plat disemprot dengan anisaldehyd H_2SO_4 kemudian dipanaskan hingga terlihat warna ungu. Bila warna ungu muncul, maka ekstrak menunjukkan bahwa terdapat senyawa golongan terpenoid yang ada pada ekstrak daun bunga Matahari. Namun perlu penelitian lebih lanjut mengenai hal ini, diharapkan nantinya diketahui senyawa spesifik yang memiliki aktivitas antimalaria.



BAB VII

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

- Ekstrak kloroform daun *Helianthus annuus* L. terbukti memiliki aktivitas antimalarial dengan IC_{50} 0.037 $\mu\text{g/mL}$ (sangat aktif) dan telah terbukti mengandung senyawa golongan terpenoid.
- Ekstrak etanol 96% daun *Helianthus annuus* L. terbukti memiliki aktivitas antimalarial dengan IC_{50} 17.637 $\mu\text{g/mL}$ (Aktif)
- Sedangkan ekstrak n-heksana termasuk kategori inaktif karena memiliki nilai $IC_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$.

7.2 Saran

Berdasarkan hasil yang didapatkan dari penelitian ini, maka dapat dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan senyawa aktif antimalaria dari Ekstrak kloroform daun *H.annuus* L dan uji aktivitas antimalaria secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Andrade-Neto *et al.* 2004. Antimalarial Activity Of *Bidens Pilosa* L. (Asteraceae) Ethanol Extracts From Wild Plants Collected In Various Localities Or Plants Cultivated In Humus Soil . **Phytotherapy Research Phytother.** Res. 18, 634–639 (2004)
- Anonim. 2013. ***Petunjuk Praktikum Fitokimia.*** Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Anonim. 2015. **Health topics : Malaria.** Diakses dari <http://www.who.int/topics/malaria/en/> pada tanggal 18 November 2015.
- Arsunan. 2012. *Malaria Di Indonesia Tinjauan Aspek Epidemiologi.* Edisi 1, Makasar : Masagena Press, Hal 1
- CDC. 2015. **Malaria : Frequently Asked Questions.** Diakses dari <http://www.cdc.gov/malaria/about/faqs.html> pada tanggal 10 Desember 2015.
- Chinchilla. 2012. In vitro antimalarial activity of extracts of some plants from a biological reserve in Costa Rica. *Int. J. Trop. Biol.* ISSN-0034-7744) Vol. 60 (2): 881-891
- Departemen Kesehatan RI. 2000. **Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat.** Jakarta: Departemen Kesehatan RI.
- Departemen Kesehatan RI. 2007. **Pedoman Penatalaksanaan Kasus.** Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Departemen Kesehatan RI. 2008. **Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia.** Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia

- Departemen Kesehatan RI. 2012. **Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia**. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Depkes RI, 2010. **Pertemuan Koordinasi Tingkat SR Dan SSR Kegiatan Intensifikasi Pengendalian Malaria Gf ATM Malaria Round 8 Wilayah Kalimantan Dan Sulawesi**. Ditjen P2PL, Jakarta. http://www.penyakitmenular.info/def_menu.asp?menuID=17&menuType=1&SubID=1&DetId=518.
- Direktorat PPBB, DitJen PP dan PL. 2011. **Buku Saku Eliminasi Malaria**. Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia
- Direktorat PPBB, DitJen PP dan PL. 2013. **Kegiatan Pengendalian Penyakit Bersumber Binatang Ditjen PP dan PL Kemenkes RI**. Diakses dari <http://pppl.depkes.go.id/berita?id=1199>. Pada tanggal 14 Januari 2016.
- Eluviroye, T. 2004. Antimalarial activities of *Tithonia diversifolia* (Asteraceae) and *Crossopteryx febrifuga* (Rubiaceae) on mice in vivo. [Journal of Ethnopharmacology](#) (Impact Factor: 3). 93(2-3):167-71.
- Fraga, B. 2007. Natural sesquiterpenoids. **The Royal Society of Chemistry 2007 Nat. Prod. Rep.** 24, 1350–1381 | 1361
- Frias, I., J. M. Siverio, C. Gonzales, J. M. Trujillo, and J. M. Perez. 1991. Purification of a new peroxides catalyzing the formation of lignan-type compound. **J. Biochem**, 273, p.109-113.
- Ganora, L. 2011. Solubility of Herbal Constituents. Boulder: **Herbal Constituents**

- Harbone, J.B. 1987. **Metode Fitokimia : Penuntun Cara modern Menganalisis Tumbuhan**. Terjemahan Kossasih P dan Iwang SJ. Bandung: ITB.
- Hart, Harold, 1983, **Kimia Organik suatu Kuliah Singkat**. terjemahan Suminar Achmadi. Edisi 6. Jakarta: Erlangga.
- Jansen, *et al.* 2012. Anti-plasmodial activity of *Dicoma tomentosa* (Asteraceae) and identification of urospermal A-15-O-acetate as the main active compound. **Malaria Journal**. 11:289
- Kementerian Kesehatan RI.2014. **Indonesia National Malaria Control Program Strategic Plan 2015-2019**. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
- Kementrian Kesehatan RI. 2011. **Buletin Jendela Data dan Informasi Kesehatan Epidemilogi Malaria di Indonesia**. Edisi 1, Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Hal 6
- Kementrian Kesehatan RI. 2011. **InfoDATIN Situasi Malaria di Indonesia**. Edisi 1, Jakarta: Kementerian Kesehatan Republik Indonesia, Hal 3
- Mardina, 2012. Pengaruh Perubahan Iklim Terhadap Insiden Malaria Di Kabupaten Bintan Kepulauan Riau dan Kabupaten Banggai Sulawesi Tengah. **Jurnal Ekologi Kesehatan (The Indonesian Journal of Health Ecology**, p-ISSN: 1412-4025, e-ISSN: 2354-8754)
- Mohamed et al.,2014. Anti-malarial Activity of Some Medicinal Sudanese Plants. **Journal Of Forest Products & Industries. Vol 3**. ISSN:2325-4513
- Muti'ah et al., 2012. Potensi Antimalaria Ekstrak Diklorometan Daun Bunga Matahari (*Helianthus Annuus L.*) Secara In Vivo Pada Hewan Coba. Edisi1, Malang: **Sainstis**, Nomer 2

- NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2015. *Taxonomy Browser (Plasmodium falciparum)*. Diakses dari www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5833&lvl=3&keep=1&srchode=1&unlock&lin=f pada tanggal 13 November 2015.
- Ong, 2006. Khasiat Ubat dan Kegunaan Lain. Slangor Darul Ehsan : Yeosh princo SDN. BHD. Page 260
- Permadi A.2008. **Membuat Kebun Tanaman Obat**. Jakarta: Pustaka Bunda (Anggota Ikapi). Hal 20-21
- Redha, A. 2010. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. **Jurnal Belian** Vol. 9 : 196 – 202
- Robinson, T. 1995. **Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi**. Edisi ke-4 Terjemahan Kosasih Padmawinata. ITB Press. Bandung
- Sari et al., 2015. Efek Pemberian Dosis Berulang dan Dosis Tunggal Ekstrak Kulit Batang Cempedak (*Artocarpus Champeden Spreng.*) Pada Mencit Terinfeksi Plasmodium Berghei. Edisi 13, Surabaya: **Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia**, Hal 23-28
- Simanjuntak,1995. **Tumbuhan sebagai sumber zat aktif anti malaria**. Edisi 23, Jakarta : Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan
- Trager, W. and Jensen, J.B. 1976. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**. vol. 193, p. 673-675.
- Trease, G.E., and Evans, W.C. (1983). **Pharmacognosy**. Twelfth Edition. London : Bailliere Tindall. Pages 537-544.
- Waller, G. R. dan Nowacki E. K. (1978). **Alkaloid Biology And Metabolism In Plants**. New York : Plenum Press. Page 9.
- Wijayakusuma, 2008. **Ramuan Herbal Taklukan Penyakit**. Jakarta : Pustaka Bunda (Anggota IKAPI), hal 261

Willcox, M.L. & G. Bodeker. 2004. Traditional herbal medicines for malaria. **British Medical Journal** vol.329:1156-1159.

Zein U, 2005. Penanganan terkini malaria falciparum. Divisi penyakit tropik dan infeksi bagian Ilmu Penyakit Dalam Fakultas Kedokteran USU; h.1-13



LAMPIRAN

Lampiran 1

Data Jumlah Parasitemia

Data jumlah eritrosit terinfeksi *P. falciparum* per 5000 eritrosit setelah pemberian ekstrak n-heksana, Ekstrak kloroform, dan Ekstrak etanol 96% daun *H.annus* L dan diinkubasi selama 48 jam pada uji aktivitas antimalaria

Sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Persen Parasitemia (%)					
	Ekstrak n-heksana		Ekstrak Kloroform		Ekstrak Etanol 96%	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
D0	38/5075	40/5120	38/5019	46/5025	21/5100	21/5112
Kontrol (-)	158/5088	169/5343	154/5129	146/5015	138/5148	155/5180
100	126/5056	115/5088	60/5124	63/5148	65/5022	70/5122
10	133/5120	132/5120	70/5120	71/5040	74/5146	75/5160
1	132/5005	133/5040	76/5040	80/5019	76/5020	81/5020
0,1	136/5024	142/5208	97/5076	95/5160	95/5040	94/5100
0,01	152/5146	150/5076	105/5100	100/5049	96/5040	101/5049

secara *in vitro*.

Keterangan:

D0 = jumlah eritrosit terinfeksi per 5000 eritrosit pada jam ke-0

Kontrol (-) = jumlah eritrosit terinfeksi per 5000 eritrosit pada larutan tanpa sampel

Lampiran 2

Cara Perhitungan Persen Parasitemia dan Data Persen Parasitemia

Untuk menghitung persen parasitemia digunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Persen parasitemia} = \frac{\text{Jumlah eritrosit terinfeksi}}{\text{Jumlah}}$$

Data persen parasitemia setelah pemberian ekstrak n-heksana, Ekstrak kloroform, dan Ekstrak etanol 96% *daun H.annuus* L dan diinkubasi selama 48 jam.

Sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Persen Parasitemia (%)					
	Ekstrak n-heksana		Ekstrak Kloroform		Ekstrak Etanol 96%	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
D0	0.77	0.78	0.76	0.92	0.41	0.41
Kontrol (-)	3.11	3.16	3.00	2.91	2.68	2.99
100	2.49	2.26	1.17	1.22	1.29	1.37
10	2.60	2.58	1.37	1.41	1.44	1.45
1	2.64	2.64	1.51	1.59	1.56	1.61
0,1	2.71	2.73	1.91	1.84	1.88	1.84
0,01	2.95	2.96	2.06	1.98	1.90	2.00

Lampiran 3

Cara Perhitungan Persen Pertumbuhan dan Data Persen Pertumbuhan

Untuk menghitung persen pertumbuhan digunakan rumus berikut:

$$\text{Persen pertumbuhan} = \text{Persen parasitemia Un} - \text{Persen parasitemia}$$

Keterangan:

Persen parasitemia Un = Persen parasitemia tiap konsentrasi

Persen parasitemia D0 = Persen parasitemia pada jam ke-0

Data perhitungan persentase pertumbuhan *P. falciparum* setelah pemberian ekstrak n-heksana, ekstrak kloroform, dan ekstrak etanol 96% daun *H. annuus* L dan diinkubasi selama 48 jam.

Sampel ($\mu\text{g/mL}$)	Persen Pertumbuhan (%)					
	Ekstrak n- heksana		Ekstrak Kloroform		Ekstrak Etanol 96%	
	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2	Rep 1	Rep 2
Kontrol (-)	2.34	2.39	2.16	2.07	2.27	2.58
100	1.72	1.49	0.33	0.38	0.88	0.96
10	1.83	1.81	0.53	0.57	1.03	1.04
1	1.87	1.87	0.67	0.75	1.15	1.20
0,1	1.94	1.96	1.07	1.00	1.47	1.43
0,01	2.18	2.19	1.22	1.14	1.49	1.59

Lampiran 4

Analisa Probit Ekstrak n-Heksan Daun *Helianthus annuus* L.**Warnings**

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		4
	Missing	5
Rejected	LOG Transform Cannot be Done	0
	Number of Responses > Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	13	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PR	Dosis	.234	.072	3.248	.001	.093	.376
OBI T ^a	Intercept	-1.222	.095	-12.819	.000	-1.318	-1.127

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.560	2	.756 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Cell Counts and Residuals

	Number	Dosis	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
PROBIT	1	2.000	100	24	22.551	1.469	.226
	2	1.000	100	14	16.158	-2.308	.162
	3	.000	100	11	11.080	.400	.111
	4	-1.000	100	8	7.261	.429	.073

Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
PROBIT	.010	.000	.000	.003	-4.712	-13.077	-2.594
	.020	.000	.000	.014	-3.549	-10.161	-1.851
	.030	.002	.000	.042	-2.811	-8.316	-1.374
	.040	.006	.000	.098	-2.255	-6.933	-1.009
	.050	.016	.000	.196	-1.804	-5.814	-.708
	.060	.038	.000	.359	-1.419	-4.868	-.445

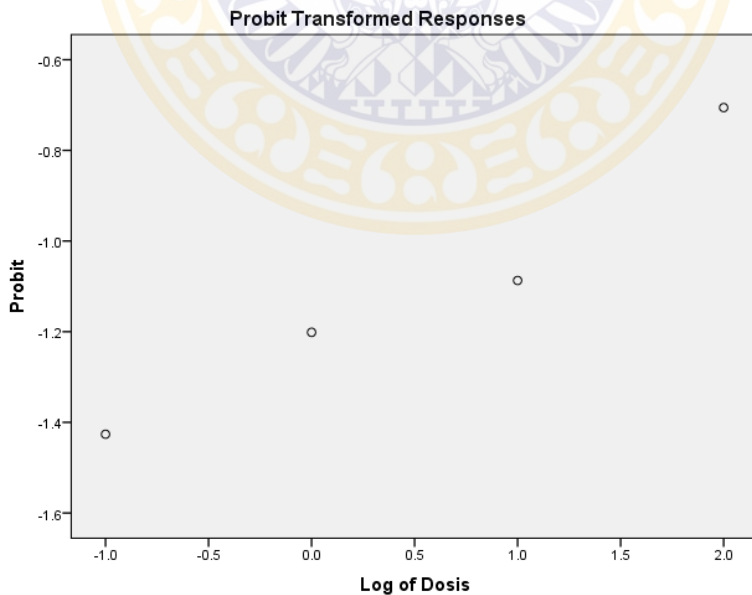
.070	.083	.000	.620	-1.082	-4.045	-.208
.080	.166	.000	1.031	-.780	-3.316	.013
.090	.312	.002	1.678	-.506	-2.664	.225
.100	.559	.008	2.711	-.253	-2.078	.433
.150	6.213	.985	44.958	.793	-.007	1.653
.200	42.146	8.957	2039.06 4	1.625	.952	3.309
.250	217.815	33.540	95460.6 74	2.338	1.526	4.980
.300	952.096	95.678	3463868 .453	2.979	1.981	6.540
.350	3734.96 3	241.023	1012742 53.575	3.572	2.382	8.005
.400	13663.4 32	566.675	2546833 886.971	4.136	2.753	9.406
.450	47921.8 33	1280.35 5	5837389 0531.48 5	4.681	3.107	10.766
.500	164765. 662	2834.40 5	1282694 724148. 670	5.217	3.452	12.108
.550	566500. 100	6242.68 3	2833022 7917675 .930	5.753	3.795	13.452
.600	1986889 .097	13873.0 72	6601812 0285352 4.600	6.298	4.142	14.820

.650	7268539 .120	31575.0 42	1715017 2563267 616.000 5322353	6.861	4.499	16.234
.700	2851363 3.531	74936.6 80	0801938 2460.00 0 2172452	7.455	4.875	17.726
.750	1246367 61.652	190035. 548	2410365 116000. 000 1353823	8.096	5.279	19.337
.800	6441358 93.251	534572. 333	7621707 2870000 0.000 1675966	8.809	5.728	21.132
.850	4369706 838.281	1781176 .830	4080359 6500000 000.000 7216784	9.640	6.251	23.224
.900	4860013 3515.24 2	8079857 .257	9879362 7700000 00000.0 00 3123800	10.687	6.907	25.858
.910	8696067 1523.42 0	1163820 5.529	9466384 1850000 000000. 000	10.939	7.066	26.495

			1534717			
	1636180		9793166			
.920	73321.5	1729843	3450000	11.214	7.238	27.186
	44	6.442	0000000			
			.000			
			8835960			
	3278445		7801556			
.930	43691.8	2674292	8600000	11.516	7.427	27.946
	47	1.874	0000000			
			.000			
			6242631			
	7124793		5568147			
.940	00143.2	4349670	1000000	11.853	7.638	28.795
	10	6.835	0000000			
			0.000			
			5805755			
	1726797		9355138			
.950	725456.	7573787	5300000	12.237	7.879	29.764
	700	4.193	0000000			
			00.000			
			7976269			
	4885885		2082975			
.960	832006.	1452780	0600000	12.689	8.162	30.902
	901	84.488	0000000			
			000.000			

				1999265			
				1133333			
.970	1754903	3234870		2670000	13.244	8.510	32.301
	8027332	94.616		0000000			
	.140			00000.0			
				00			
				1448318			
				8021304			
.980	9603758	9372015		5320000	13.982	8.972	34.161
	0979502	24.785		0000000			
	.220			0000000			
				.000			
				1.238E+			
.990	1399318	5007618		037	15.146	9.700	37.093
	9135819	606.694					
	08.200						

a. Logarithm base = 10



Lampiran 5

Analisa Probit Ekstrak Kloroform Daun *Helianthus annuus* L.**Warnings**

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

		N of Cases
Valid		5
	Missing	4
	LOG Transform Cannot be	0
Rejected	Done	0
	Number of Responses >	0
	Number of Subjects	0
Control Group		0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	8	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PRO	Dosis	.278	.043	6.492	.000	.194	.362
BIT ^a	Intercept	.399	.060	6.691	.000	.339	.458

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + BX$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PROBIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.554	3	.907 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Cell Counts and Residuals

	Number	Dosis	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probability
P	1	2.000	100	83	83.029	.371	.830
R	2	1.000	100	74	75.078	-.618	.751
O	3	.000	100	67	65.488	1.542	.655
B	4	-1.000	100	52	54.782	-2.842	.548
I							
T	5	-2.000	100	45	43.713	1.507	.437

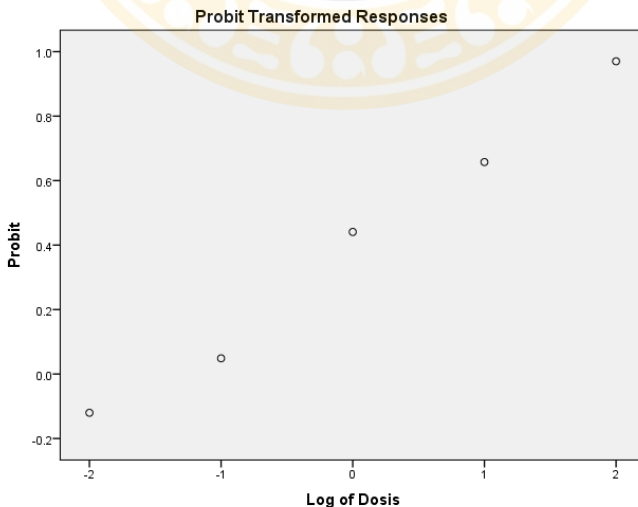
Confidence Limits

	Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
P	.010	.000	.000	.000	-9.788	-13.982	-7.525
R	.020	.000	.000	.000	-8.809	-12.583	-6.770
O	.030	.000	.000	.000	-8.187	-11.695	-6.290
BI	.040	.000	.000	.000	-7.720	-11.028	-5.929

T	.050	.000	.000	.000	-7.340	-10.485	-5.635
	.060	.000	.000	.000	-7.016	-10.024	-5.385
	.070	.000	.000	.000	-6.733	-9.619	-5.165
	.080	.000	.000	.000	-6.479	-9.257	-4.968
	.090	.000	.000	.000	-6.248	-8.928	-4.789
	.100	.000	.000	.000	-6.035	-8.625	-4.624
	.150	.000	.000	.000	-5.154	-7.372	-3.939
	.200	.000	.000	.000	-4.455	-6.378	-3.393
	.250	.000	.000	.001	-3.854	-5.528	-2.922
	.300	.000	.000	.003	-3.315	-4.768	-2.496
	.350	.002	.000	.008	-2.816	-4.067	-2.097
	.400	.005	.000	.019	-2.342	-3.407	-1.714
	.450	.013	.002	.046	-1.883	-2.776	-1.336
	.500	.037	.007	.112	-1.432	-2.167	-.951
	.550	.105	.026	.283	-.980	-1.578	-.547
	.600	.301	.097	.786	-.522	-1.011	-.105
	.650	.896	.335	2.525	-.047	-.475	.402
	.700	2.832	1.075	9.892	.452	.032	.995
	.750	9.800	3.358	48.657	.991	.526	1.687
	.800	39.044	10.957	312.370	1.592	1.040	2.495
	.850	195.580	41.035	2891.41 6	2.291	1.613	3.461
	.900	1485.23 7	207.08 3	49624.3 69	3.172	2.316	4.696
	.910	2423.57 3	304.89 9	99007.0 45	3.384	2.484	4.996

.920	4125.56 0	463.58 9	209936. 748	3.615	2.666	5.322
.930	7404.72 9	733.96 2	480352. 939	3.870	2.866	5.682
.940	14230.3 87	1224.4 90	1212295 .474	4.153	3.088	6.084
.950	29976.8 97	2192.0 74	3489472 .488	4.477	3.341	6.543
.960	71934.9 13	4338.0 81	1210280 2.800	4.857	3.637	7.083
.970	211003. 460	10021. 391	5593844 0.596	5.324	4.001	7.748
.980	882164. 914	30426. 120	4290848 38.508	5.946	4.483	8.633
.990	8408775 .456	174447 .425	1068870 1653.75 0	6.925	5.242	10.029

a. Logarithm base = 10.



Lampiran 6

Analisa Probit Ekstrak Etanol 96% Daun *Helianthus annuus* L.**Warnings**

Relative Median Potency Estimates are not displayed because there is no grouping variable in the model.

Data Information

	N of Cases
Valid	5
Missing	4
Reject	0
ed	0
Number of Responses >	0
Number of Subjects	0
Control Group	0

Convergence Information

	Number of Iterations	Optimal Solution Found
PROBIT	7	Yes

Parameter Estimates

	Parameter	Estimate	Std. Error	Z	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
PRO	Dosis	.218	.041	5.270	.000	.137	.299
BIT ^a	Intercept	-.272	.058	-4.699	.000	-.330	-.214

a. PROBIT model: $\text{PROBIT}(p) = \text{Intercept} + \text{BX}$ (Covariates X are transformed using the base 10.000 logarithm.)

Chi-Square Tests

		Chi-Square	df ^b	Sig.
PRO BIT	Pearson Goodness-of-Fit Test	.958	3	.811 ^a

a. Since the significance level is greater than .150, no heterogeneity factor is used in the calculation of confidence limits.

b. Statistics based on individual cases differ from statistics based on aggregated cases.

Cell Counts and Residuals

	Number	Dosis	Number of Subjects	Observed Responses	Expected Responses	Residual	Probabil ity
P	1	2.000	100	55	56.528	-1.798	.565
R	2	1.000	100	49	47.857	1.203	.479
O	3	.000	100	42	39.286	3.174	.393
B	4	-1.000	100	28	31.206	-2.716	.312
I							
T	5	-2.000	100	24	23.943	.187	.239

Confidence Limits

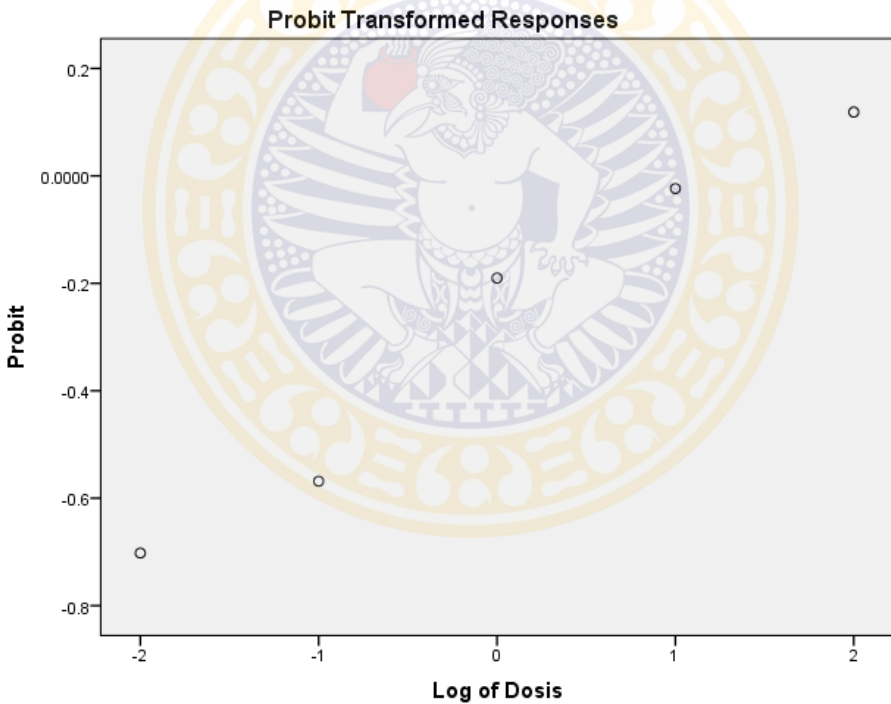
	Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis) ^a		
		Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
P	.010	.000	.000	.000	-9.419	-15.086	-6.804
R	.020	.000	.000	.000	-8.169	-13.102	-5.887
O	.030	.000	.000	.000	-7.376	-11.844	-5.305
B	.040	.000	.000	.000	-6.780	-10.898	-4.866

I .050	.000	.000	.000	-6.294	-10.130	-4.508
T .060	.000	.000	.000	-5.881	-9.476	-4.203
.070	.000	.000	.000	-5.519	-8.903	-3.936
.080	.000	.000	.000	-5.195	-8.391	-3.695
.090	.000	.000	.000	-4.900	-7.925	-3.477
.100	.000	.000	.001	-4.629	-7.497	-3.275
.150	.000	.000	.004	-3.505	-5.730	-2.433
.200	.002	.000	.018	-2.612	-4.338	-1.753
.250	.014	.001	.071	-1.846	-3.160	-1.152
.300	.070	.007	.262	-1.158	-2.133	-.582
.350	.302	.058	1.000	-.520	-1.235	.000
.400	1.216	.335	4.401	.085	-.474	.644
.450	4.681	1.415	23.818	.670	.151	1.377
.500	17.637	4.812	152.266	1.246	.682	2.183
.550	66.454	14.674	1085.28 3	1.823	1.167	3.036
.600	255.795	42.994	8459.78 1	2.408	1.633	3.927
.650	1030.19 4	126.373	73016.6 87	3.013	2.102	4.863
.700	4472.24 8	385.629	722493. 148	3.651	2.586	5.859
.750	21807.4 00	1267.34 5	8693255 .254	4.339	3.103	6.939
.800	127295. 002	4716.98 4	1402265 71.569	5.105	3.674	8.147

.850	995221. 426	21632.7 30	3616980 515.957	5.998	4.335	9.558
.900	1323286 7.885	145780. 912	2177796 53729.2 56	7.122	5.164	11.338
.910	2472121 7.548	230888. 900	5865281 53306.9 57	7.393	5.363	11.768
.920	4874458 1.254	380368. 765	1721346 095732. 597	7.688	5.580	12.236
.930	1028340 29.508	658312. 135	5625419 490844. 873	8.012	5.818	12.750
.940	2367168 65.381	1214285 .662	2112058 0451982 .203	8.374	6.084	13.325
.950	6126288 25.851	2439905 .898	9553880 7068936 .660	8.787	6.387	13.980
.960	1872328 046.467	5535921 .045	5629993 4797598 6.000	9.272	6.743	14.751
.970	7393577 470.694	1514716 2.518	4986760 1383533 23.000	9.869	7.180	15.698

.980	4589455 2836.62 1	5768004 3.887	9068007 9437358 464.000 8783826	10.662	7.761	16.958
.990	8156051 29454.2 27	4737317 93.348	6674697 38000.0 00	11.911	8.676	18.944

a. Logarithm base = 10.



Lampiran 8

Surat Determinasi Daun *Helianthus annuus*

DINAS KESEHATAN PROPINSI JAWA TIMUR
UPT MATERIA MEDICA

Jalan Lahor No.87 Telp. (0341) 593396 Batu (65313)

KOTA BATU

Nomor : 074/537/101.8/2015
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Bunga Matahari**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : NUR 'AISYAH KUSUMANINGRUM
NIM : 051211131027
Universitas : UNIVERSITAS AIRLANGGA SURABAYA

1. Perihal determinasi tanaman bunga matahari
 - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 - Kelas : Magnoliopsida
 - Bangsa : Asterales
 - Suku : Asteraceae
 - Marga : Helianthus
 - Jenis : *Helianthus annuus* L.
 - Nama Umum : Bunga matahari, sunflower, mirasol, xiang ri kui, himawari, koujitsuki.
 - Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15a-109b-119b-120a-121a-122a.
2. Morfologi : Habitus: Terna semusim, tinggi 3-5 m tergantung varietasnya. Batang: Ditumbuhi rambut kasar, tegak, jarang bercabang. Daun: Tunggal, lebar, hijau. Bunga: Majernuk, terdapat dua tipe bunga: bunga tepi atau bunga lidah yang membawa satu kelopak besar berwarna kuning cerah dan steril, dan bunga tabung yang fertil dan menghasilkan biji, bunga tabung jumlahnya bisa mencapai 2000 kuntum dalam satu tandan bunga. Buah: Buah kurung (achene), buah kering berdingg agak keras dan tak terlalu tebal ini sering disangka 'biji' bunga. Biji: Biji yang sesungguhnya terletak di dalam, terlindung oleh buah yang serupa tempurung. Akar: Tunggang, putih kotor.
3. NamaSimplicia : *Helianthii annii Folium/ Daun Bunga Matahari.*
4. Kandungan kimia : Daun mengandung saponin dan tannin.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
 - Anonim. <http://www.plantamor.com/index.php?plant=661>, diakses 11 Desember 2010.
 - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Hutapea, Johny Ria. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
 - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA*. Pradnya Paramita, Jakarta.

Demikian surat keterangan determinasi ini kami buat untuk dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 28 September 2015

Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin RM, Drs., Apt., MKes.
 NIP. 196111021991031003