

**POTENSI EKSTRAK PIGMEN BETALAIN BUNGA
JENGGER AYAM (*Celosia cristata*) TERHADAP
PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

oleh :
AZIZA SILVYA H.
0610910012 - 91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2011**

**POTENSI EKSTRAK PIGMEN BETALAIN BUNGA
JENGER AYAM (*Celosia cristata*) TERHADAP
PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang biologi

oleh :

AZIZA SILVYA H.

0610910012 - 91



**JURUSAN BIOLOGI
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG**

2011

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

POTENSI EKSTRAK PIGMEN BETALAIN BUNGA JENGGER AYAM (*Celosia cristata*) TERHADAP PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei*

oleh :

Aziza Silvy Hikmiati

NIM. 0610910012-91

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
Pada tanggal 17 Januari 2011
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Biologi

Pembimbing I

Pembimbing II

Ir. Retno Mastuti, M Agr. Sc., D Agr. Sc. Dr.dr.Loeki Enggar Fitri, M. Kes., Sp. ParK
NIP. 19620528 198701 2 001 NIP. 19641013 199103 2 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Biologi
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Brawijaya

Widodo, S.Si, Ph. D., Med. Sc.
NIP. 19730811 200003 1 002

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama : Aziza Silvya Hikmiati
NIM : 0610910012-91
Jurusan : Biologi
Penulisan skripsi berjudul :

POTENSI EKSTRAK PIGMEN BETALAIN BUNGA JENGER AYAM (*Celosia cristata*) TERHADAP PENGHAMBATAN PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei*

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari skripsi yang saya buat adalah benar -benar karya send iri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama -nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam skripsi ini
2. Apabila di kemudian hari ternyata skripsi yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran

Malang, 17 Januari 2011
Yang menyatakan,

Aziza Silvya Hikmiati
NIM. 0610910012-91

PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI

Skripsi ini tidak dipublikasikan namun terbuka untuk umum dengan ketentuan bahwa hak cipta ada pada penulis. Daftar pustaka diperkenankan untuk dicatat, tetapi pengutipannya hanya dapat dilakukan seizin penulis dan harus disertai kebiasaan ilmiah untuk menyebutkannya.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat ALLAH SWT, karena dengan pertolongan dan ridlo-Nya skripsi ini dapat selesai tepat waktu

Penulis menyampaikan terima kasih kepada semua pihak yang telah membantu hingga terselesaikan skripsi ini, diantaranya :

1. Ibu Ir. Retno Mastuti, M Agr.Sc.,D Agr.Sc dan Ibu Dr.dr. Loeki Enggar Fitri, M.Kes., Sp.ParK atas segala bimbingan, saran dan nasehatnya
2. Skripsi ini saya persembahkan untuk Bapak Bambang Setijadjid H., Ibu Lailil Farida, Mbak Iqlima Rakhilya S.Pt., Briptu. Susanto, serta Mas Agus Widyatama A. Md. yang memberi dukungan dan menemani dalam suka dan duka
3. Program Indonesian-Managing Higher Education For Relevance and Efficiency (I-MHERE) yang telah memberikan dukungan materi dan spiritualnya.
4. Bapak Widodo, Ph.D., Med.Sc., Ibu Dr. Sri Widyarti, M. Si. dan Bapak Muhaimin Rifai, Ph.D., Med.Sc. selaku dosen penguji skripsi
5. Bapak Drs. Edy P. Utomo, MS., Bapak Yoga D. Jatmiko S.Si., MApp. Sc, Prof. Dr.dr. Teguh W. Sardjono, DTM &H, MSc, Sp.ParK., Dr. dr. Sudjari DTM&H, MSi., Sp.ParK., dan Dr.dr.Aswin D. Baskoro, MS.,Sp.ParK. yang senantiasa memberi bantuan dan masukan pada penelitian ini.
6. Mbak Wati, Pak Sugi, Pak Ngatwin, Pak Budi, Ibu Kartini, Mbak Iha, Ibu Ina, Mbak Duwi S.Si, Mbak Lilik S.Si, Mbak Ratna S.Si, MP, yang telah banyak memberikan masukan dan Teti Wijayanti S.Si yang telah membantu secara spiritual penyelesaian penulisan.
7. Teman-teman angkatan 2006 (Sinta S.Si, Nia, Yayuk, Jayarani S.Si, Indri S.Si, Mbak Lucy S.Si), serta kakak 2005 dan adik tingkat 2007 yang telah membantu dan mendukung penulis

Penulis menyadari bahwa penulis skripsi ini masih banyak kekurangan. Oleh karena itu kritik dan saran akan diterima demi penyempurnaan di kemudian hari. Harapan penulis semoga skripsi ini bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 17 Januari 2011

Penulis

**POTENSI EKSTRAK PIGMEN BETALAIN BUNGA JENGER
AYAM (*Celosia cristata*) TERHADAP PENGHAMBATAN
PERTUMBUHAN *Plasmodium berghei***

A.S. Hikmiati¹, R. Mastuti¹, L.E. Fitri²

¹Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

²Laboratorium Parasitologi, Fakultas Kedokteran

Universitas Brawijaya

Malang, 2011

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui LD50 dan ED50 ekstrak bunga Jengger ayam (*C. cristata*) merah sebagai antimalaria pada mencit Balb/C yang diinfeksi *Plasmodium berghei*. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan dua faktor perlakuan sebagai variabel bebas yaitu kelompok lama pemaparan (3, 5 dan 7 hari) dan kelompok dosis ekstrak pigmen bunga *C.cristata* (100, 300, 500, 700, dan 900 mg/kg BB/hari), sedangkan variabel terikat adalah persentase penghambatan. Ekstraksi pigmen menggunakan modifikasi metode Hilou, yang diberikan secara oral pada hewan coba selama 7 hari. Derajat parasitemia diketahui melalui pembuatan hapusan darah yang diwarnai dengan Giemsa dan diamati dengan mikroskop. Nilai penghambatan diperoleh dari selisih derajat parasitemia pada perlakuan ekstrak terhadap kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak pigmen bunga Jengger ayam menghambat pertumbuhan *P.berghei* dengan nilai ED50 1246 mg/Kg BB. Ekstrak pigmen bunga jengger ayam bersifat sedikit toksik dengan nilai LD50 1765 mg/kg BB. Dosis ekstrak pigmen dan lama pemaparan berpengaruh terhadap persentase penghambatan. Dosis ekstrak pigmen dan lama pemaparan memiliki hubungan korelasi yang sangat kuat. Kemampuan ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dalam menghambat pertumbuhan *P.berghei* lebih rendah daripada artemisin.

Kata kunci : *Celosia cristata*, Pigmen betasianin, *Plasmodium berghei*

**POTENCY OF COCKSCOMB FLOWER BETALAIN PIGMENT
EXTRACT (*Celosia cristata*) ON GROWTH INHIBITION
OF *Plasmodium berghei***

A.S. Hikmiati¹, R. Mastuti¹, L.E. Fitri²

¹Biology Departement, Faculty of Mathematics and Natural Sciences

²Pharacytology Laboratory, Faculty of Health

Brawijaya University

Malang, 2011

ABSTRACT

This study aims to determine the LD50 and ED50 red cockscomb flower extract (*C. cristata*), as antimalarial in Balb/C mice that infected with *Plasmodium berghei*. This research used randomized block design with two treatment factors. The independent variables namely the duration of exposure (3, 5 and 7 days) and dose groups extract of flower pigments *C.cristata* (100, 300, 500, 700, and 900 mg/kg BW/ days), while the dependent variable was the percentage of inhibition. Pigment extraction using a modified Hilou method, which was provided orally in experimental mice for 7 days. The degree of parasitemia was identified by blood smear which stained with Giemsa and observed with a microscope. Inhibition values were obtained from the difference in the degree of parasitaemia of the treatment of positive control. The results showed that the cockscomb flower pigment extracts inhibited growth of *P.berghei* with ED50 of 1246 mg/kg BW. Cockscomb flower pigment extract was slightly toxic with LD50 of 1765 mg/kg BW. Dose pigment extract and length of exposure affected the percentage of growth inhibition of *P.berghei*. Dose pigment extract have strong correlation with length of exposure. Extract flower pigment of *C.cristata* inhibit growth of *P.berghei* lower than artemisin.

Keywords : Betacyanin pigments, *Celocia cristata*, *Plasmodium berghei*

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI	ii
LEMBAR PERNYATAAN	iii
PEDOMAN PENGGUNAAN SKRIPSI	iv
ABSTRAK	v
ABSTRACT	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Manfaat	2
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	3
2.1 Struktur Kimia dan sifat Betalain	3
2.2 Siklus Hidup <i>Plasmodium</i>	5
2.3 Aktifitas antimalaria pigmen betalain	6
2.4 Aktifitas antimalaria artemisin	8
2.5 Kerangka konsep	9
BAB III METODE PENELITIAN	10
3.1 Waktu dan Tempat	10
3.2 Prosedur kerja.....	10
3.2.1 Ekstraksi pigmen bunga Jengger ayam (<i>C.cristata</i>).....	10
3.2.2 Rancangan percobaan.....	11
3.2.3 Penentuan dosis letal (LD50)	11
3.2.4 Thawing isolat <i>Plasmodium berghei</i>	11
3.2.5 Pembuatan apusan darah tipis	11
3.2.6 Pemeriksaan parasitemia	12
3.2.7 Inokulasi <i>Plasmodium berghei</i>	12
3.2.8 Penentuan dosis efektif (ED50)	13

3.3 Pengamatan	14
3.4 Analisis data	14
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	15
4.1 Penentuan konsentrasi pigmen betasianin pada 100 mg bunga Jengger ayam(<i>C.cristata</i>) segar	15
4.2 Uji toksisitas ekstrak pigmen bunga <i>C.cristata</i> (LD50)	15
4.3 Morfologi sel eritrosit mencit yang terinfeksi	17
4.4 Pengaruh ekstrak pigmen bunga <i>C.cristata</i> terhadap besar penghambatan pertumbuhan <i>P. Berghei</i>	18
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	25
5.1 kesimpulan	25
5.2 Saran	25
DAFTAR PUSTAKA	26
LAMPIRAN	30



DAFTAR TABEL

Tabel	Judul	Halaman
4.1	Beberapa kriteria uji toksisitas akut senyawa	16
4.2	Pengaruh ekstrak pigmen bunga <i>C.cristata</i> terhadap persentase penghambatan pertumbuhan <i>P.berghei</i>	19
4.3	Nilai probit dan Log dosis ekstrak pigmen bunga <i>C.cristata</i> pada pengamatan hari ke-7.....	22
L.1	Nilai absorbansi supernatan ekstrak bunga <i>C.cristata</i>	33
L.2	Rata-rata derajat parasitemia setelah pemberian ekstrak bunga <i>C.cristata</i>	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Judul	Halaman
2.1	Jengger ayam (<i>Celosia cristata</i>).....	4
2.2	Siklus fase seksual dan aseksual <i>Plasmodium</i> serta merozoit yang menginfeksi eritrosit	5
2.3	Bagan konsep aktifitas antimalaria ekstrak pigmen bunga <i>C.cristata</i> dan artemisin	9
4.1	Uji toksisitas dosis kematian pada hewan coba.....	16
4.2	Fase eritrositik sel eritrosit yang terinfeksi <i>P. berghei</i>	17
4.3	Sel eritrosit yang terinfeksi <i>Plasmodium berghei</i>	18
4.4	Uji lanjutan pemberian ekstrak pigmen bunga <i>C.cristata</i> terhadap persentase penghambatan	20
4.5	Efektifitas pemberian ekstrak bunga <i>C. cristata</i> terhadap penghambatan pertumbuhan <i>P. Berghei</i> antara Log dosis dengan probit penghambatan.....	22
L.1	Ekstraksi bunga jengger ayam (<i>C.cristata</i>)	32
L.2	Ekstraksi kering beku ekstrak bunga jengger ayam pada suhu -50°C menggunakan alat <i>Freeze Drier</i>	32
L.3	Hasil nilai absorbansi maksimum pigmen betasianin	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Judul	Halaman
1	Kerangka Operasional	30
2	Komposisi media thawing <i>P.berghei</i> dan PBS	31
3	Ekstraksi bunga <i>C.cristata</i>	32
4	Nilai absorbansi supernatan ekstrak bunga <i>C.cristata</i> Hasil Pengamatan Uji Toksisitas LD50	33
5	Perhitungan kandungan pigmen betalain menggunakan rumus perhitungan kandungan amarantin	34
6	Rata-rata derajat parasitemia setelah pemberian ekstrak bunga <i>C.cristata</i>	35
7	Uji normalitas data persentase penghambatan	36
8	Analisis ragam dan uji <i>Tukey</i> persentase penghambatan...	37
9	Analisis data penghambatan melalui uji korelasi	39
10	Keterangan Kelaikan Etik	40



BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Tanaman memiliki kemampuan memproduksi lebih dari 200 ribu jenis komponen yang berbeda, termasuk salah satunya adalah pigmen (Tanaka dkk., 2008). Terdapat tiga jenis senyawa kimia pigmen bunga yaitu antosianin/flavonoid, karotenoid dan betalain. Betalain merupakan jenis pigmen yang terdiri dari betasianin yang memberikan warna merah-ungu dan betaxantin yang memberikan warna kuning-oranye (Cai, 2005).

Pigmen betalain dihasilkan oleh 13 famili tanaman ordo Caryophyllales yaitu famili Achatocarpaceae, Aziociae, Basellaceae, Cactaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Didieriaceae, Halophytaceae, Hoctorellaceae, Phytolaccaceae, Nyctaginaceae, Portulacaceae, dan Stegnospermaceae (Moreno dkk., 2008). Betalain merupakan jenis pigmen yang memiliki manfaat antara lain sebagai antimikrobal, antiinflamasi, antiviral (Cai dan Corke, 2003), antioksidan (Kanner dan Granit, 2001), dan antimalaria (Hilou dkk., 2006). Pigmen betalain pada kulit batang tanaman *Amaranthus spinosus* L. yang merupakan anggota famili Amaranthaceae telah terbukti berpotensi sebagai antimalaria (Hilou dkk., 2006). Sebanyak 0,2387 mg/g amarantin yang merupakan subklas betasianin telah terbukti mempunyai dosis efektif (ED50) sebesar 789.36 mg/kg, dengan nilai toksisitas akut atau dosis letal (LD50) sebesar 1473 mg/kg pada mencit (*Mus mucus*) terinfeksi *Plasmodium berghei*.

Saat ini obat antimalaria yang umum digunakan, mengalami penurunan aktifitas (Tjitra, 1995; Aryanti dkk., 2006). Oleh karena itu perlu dicari alternatif pengobatan malaria dari sumber tanaman lain. Betalain yang diketahui mampu menghambat pertumbuhan parasit, merupakan salah satu alternatif yang dapat menjawab masalah penurunan efektifitas obat antimalaria (Hilou dkk., 2006).

Potensi betalain sebagai antimalaria memberikan peluang untuk dilakukannya suatu tinjauan mengenai aktifitas betalain dalam proses menghambat pertumbuhan Plasmodium. Potensi pigmen tersebut dapat digunakan untuk menambah sumber alternatif tanaman sebagai antimalaria. Ekstrak bunga *C. cristata* berwarna merah mempunyai kandungan amarantin yang lebih tinggi dibanding bunga berwarna

kuning-oranye (Schliemann dkk., 2001). Oleh karena itu pada penelitian ini dipilih ekstrak bunga *C. cristata* berwarna merah untuk diuji dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*.

1.2 Perumusan Permasalahan

1. Berapakah LD50 dan ED50 ekstrak pigmen bunga Jengger ayam (*C. cristata*) berwarna merah sebagai antimalaria pada mencit yang terinfeksi *P. berghei* ?
2. Adakah hubungan antara besar dosis dan lama pemaparan ekstrak pigmen bunga *C. cristata* dengan persentase penghambatan *P. berghei* ?
3. Bagaimanakah perbedaan aktifitas antimalaria ekstrak pigmen bunga *C. cristata* dan artemisin ?

1.3 Tujuan Penelitian

1. Mengetahui LD50 dan ED50 ekstrak bunga Jengger ayam (*C. cristata*) berwarna merah sebagai antimalaria pada mencit yang terinfeksi *P. berghei*
2. Mengetahui hubungan antara besar dosis dan lama pemaparan ekstrak pigmen bunga *C. cristata* dengan persentase penghambatan *C. cristata* dengan persentase penghambatan *P. berghei*
3. Mengetahui perbedaan aktifitas antimalaria ekstrak pigmen bunga *C. cristata* dan artemisin

1.4 Manfaat

Manfaat yang dapat diperoleh dengan dilakukannya penelitian tentang potensi betasianin pada bunga *C. cristata* merah sebagai antimalaria adalah :

1. Memberikan bukti ilmiah mengenai khasiat bunga tanaman *Celosia cristata* merah sebagai tanaman obat yang memiliki potensi antimalaria
2. Dapat digunakan sebagai obat malaria yang aman karena terbuat dari bahan alami, serta sebagai peluang alternatif baru pengeksplorasian tanaman lain pada famili yang sama.

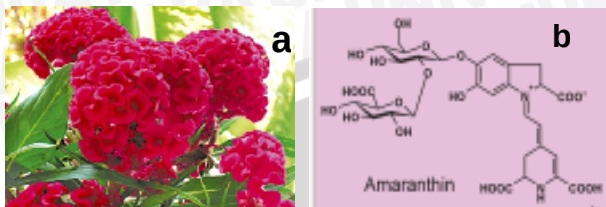
BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Struktur Kimia dan Sifat Betalain

Pigmen Betalain terdiri dari betaxantin (miraxantin, *metoxytyramine*, dan triptopan) (Cai dkk., 2001) dan betasianin (betanin, amarantin, gomphrenin dan bougenvilein) (Cai, 2005). Struktur penyusun betalain terdiri dari asam betalamik, cyclo-DOPA (dihidroxyphenylalanine), tyrosin dan asam amino. Betalain memiliki sifat larut dalam air (Cai, 2005). Pigmen betalain merupakan jenis senyawa metabolit sekunder golongan alkaloid yang stabil pada pH 3-7 (Stintzing dan Carle, 2007), dengan suhu penyimpanan dibawah 14°C dalam bentuk cair dan 25°C dalam bentuk kering. Jenis betaxantin dapat stabil pada suhu 40°C dalam bentuk kering melalui pemanasan. Kestabilan pigmen akan menurun jika lebih sering kontak dengan udara (Cai, 2005). Pigmen betalain telah terbukti sebagai bahan pewarna alami makanan yang aman dikonsumsi (Stintzing dan Carle, 2007), sehingga memungkinkan untuk digunakan sebagai obat oral. Menurut Tesoriere dkk. (2004) pigmen betalain pada tubuh manusia dapat diserap dengan baik setelah 3 jam pada usus dan menjadi tahan terhadap aktifitas oksidasi dalam tubuh, terutama di dalam darah. Pigmen betasianin untuk golongan amarantin memiliki berat molekul 726,6 g/mol banyak terkandung dalam ekstrak pigmen bunga *Celosia* berwarna merah. Ukuran molekul yang kecil tersebut yang menyebabkan pigmen betasianin cepat diserap dalam tubuh.

Celosia cristata merupakan anggota famili Amaranthaceae yang mengandung pigmen betalain, terutama pada organ bunga (Gambar 2.1). Tanaman *C. cristata* yang biasa disebut jengger ayam merupakan kingdom Plantae, subkingdom Tracheobionta, super divisi Spermatophyta, divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, sub kelas Hamamelidae, ordo Caryophyllales, famili Amaranthaceae, genus *Celosia*, spesies *C. cristata* (Plantamore, 2009).



Gambar 2.1 Jengger ayam (*Celosia cristata*) a). Bunga b). Struktur amaranthin subkelas betasianin (Tanaka dkk., 2008)

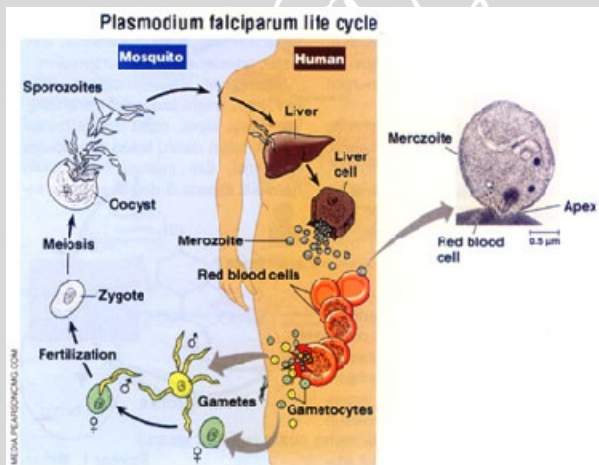
Tanaman *C. cristata* diketahui memiliki kandungan betalain total yang berbeda pada tiap jenis warna bunga. Kandungan betalain pada bunga kuning dan oranye yang dihitung menggunakan koefisien molar betaxantin memiliki total kandungan betalain berturut-turut sebesar 92.1 dan 228.2 nmol per berat basah dan untuk bunga merah yang dihitung menggunakan koefisien molar amarantin memiliki kandungan betalain total sebesar 396.0 nmol per berat basah. Pigmen betalain yang diukur terdiri dari amarantin, isoamarantin, asam betalamik, miraxantin, metorityramin dan triptopan. Senyawa amarantin ($C_{30}H_{35}N_2O_{19}$) bunga *C. cristata* merah memiliki massa relatif sebesar 727 m/z, dengan kandungan amarantin sebesar 373,6 nmol/gram berat segar, sehingga kandungan amarantin dalam tiap gram berat basah diperoleh sebesar 0,272 mg (Schleimann dkk, 2001).

Kandungan pigmen betalain terbesar pada tanaman *C. cristata* berbunga merah adalah pigmen jenis amarantin. Senyawa aktif amarantin pada bunga *C. cristata* merupakan subkelas betasianin yang mampu menurunkan pertumbuhan *Plasmodium*. Kemampuan amarantin sebagai antimalaria disebabkan adanya nitrogen pada struktur amarantin. Selain itu kemampuan tersebut karena amarantin dapat bertindak sebagai kelator ion seperti Ca^{2+} , Fe^{2+} , dan Mg^{2+} (Hilou dkk., 2006).

Menurut Schleimann dkk. (2001) kandungan amarantin pada bunga *C. cristata* berwarna merah adalah 27,2 mg/100 g. Kandungan tersebut lebih banyak dibanding kandungan amarantin pada jenis *Amaranthus Spinousus* yaitu sebanyak 23,87 mg/100 g, yang telah terbukti berpotensi sebagai antimalaria. Oleh karena itu perlu dibuktikan apakah bunga *C. cristata* berwarna merah efektif digunakan sebagai antimalaria.

2.2 Siklus Hidup *Plasmodium*

Plasmodium mempunyai siklus hidup yang kompleks. Siklus hidup *Plasmodium* terdiri dari fase seksual dan fase aseksual (Gambar 2.2). Fase seksual dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina menghisap eritrosit yang mengandung mikrogametosit dan makrogametosit dari penderita malaria, kemudian di dalam tubuh nyamuk (bagian lambung) terjadi perkawinan antara mikrogametosit dan makrogametosit menghasilkan zigot. Zigot berkembang menjadi ookinet, kemudian masuk ke dinding lambung nyamuk dan berkembang menjadi ookista. Setelah ookista matang dan pecah, akan mengeluarkan sporozoit yang berpindah ke kelenjar saliva nyamuk dan siap untuk ditularkan ke manusia untuk melanjutkan fase berikutnya, yaitu fase aseksual (Haridjanto, 2000).



Gambar 2.2 Siklus fase seksual dan aseksual *Plasmodium* serta merozoit yang menginfeksi eritrosit (Farmacia, 2006)

Fase aseksual diawali oleh gigitan nyamuk *Anopheles* betina yang membawa sporozoit masuk ke aliran darah, selama $\pm \frac{1}{2} - 2$ jam kemudian sporozoit menuju hepar untuk berkembang biak. Sporozoit-sporozoit ini dengan cepat (beberapa menit) menginvasi sel hepar kemudian berkembang menjadi skizon eksoeritrositik. Skizon eksoeritrositik yang matang akan pecah dan melepaskan merozoit dewasa ke aliran darah. Skizon-skizon eksoeritrositik mengandung sampai 30.000 merozoit (Haridjanto, 2000). Merozoit tersebut kemudian

menginvasi eritrosit dan berkembang menjadi *ringform*, kemudian membentuk tropozoit, dan akhirnya akan membentuk skizon kembali. Eritrosit yang mengandung skizon mengalami kerusakan membran dan melepaskan merozoit yang siap menginfeksi eritrosit yang lain. Sebagian besar merozoit masuk kembali ke eritrosit dan sebagian kecil lainnya membentuk gametosit jantan dan betina yang siap untuk dihisap nyamuk *Anopheles* betina untuk melanjutkan siklus hidupnya di tubuh nyamuk. Siklus untuk fase aseksual di eritrosit pada *Plasmodium* umumnya terjadi selama 48 jam (Gardiner, 2009)

Plasmodium berghei adalah suatu femoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil. Penelitian mengenai imunologi dan obat malaria banyak menggunakan *P. berghei* dan mencit sebagai induk semangnya. Pemeliharaan untuk kelangsungan hidup *Plasmodium* ini di laboratorium dilakukan dua cara. Pertama dengan menyimpan darah mencit yang mengandung parasit pada -70°C atau dalam nitrogen cair, kedua dengan memeliharanya pada makhluk hidup (mencit), namun pada cara kedua perlu dilakukan pemindahan parasit karena mencit yang telah terinfeksi akan mati dalam jangka waktu tertentu bila tidak diobati. Pemindahan parasit (pasase) merupakan pemeliharaan kelangsungan perkembangan secara aseksual. Namun pemindahan parasit tersebut lambat laun akan menyebabkan hilangnya produksi gametosit. Produksi gametosit dapat dipertahankan melalui siklus nyamuk (vektor) (Sadikin, 1989).

2.3 Aktifitas antimalaria pigmen betalain

Aktifitas pigmen betalain sebagai antimalaria terjadi pada proses penghambatan pertumbuhan *Plasmodium*. Pertumbuhan *Plasmodium* melalui proses sintesis membran untuk membentuk individu baru, membutuhkan kolin untuk sintesis fosfatidilkolin (PC) sebagai komponen membran yang dikatalisis oleh enzim cholinphospat cytidyltransferase. Senyawa kolin hanya diperoleh dari plasma darah inang vertebrata yang dimanfaatkan oleh *Plasmodium* dalam pembentukan fosfolipid yang terdiri dari PC dan Pospatidiletanolamin (PE). Sintesis pospolipid *Plasmodium* terjadi di intraselular *Plasmodium* (Kirk, 2001). Hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah pospolipid dalam eritrosit matur sebesar 500% dimana 85% pospolipid tersebut berasal dari *Plasmodium* (Biagini dkk., 2004).

Kolin merupakan prekursor pembentukan PC (Biagini dkk., 2004). Transport kolin yang berasal dari plasma inang ke dalam eritrosit yang terinfeksi, didegradasi oleh protease spesifik parasit untuk pembentukan PC (Kirk, 2001). Kolin masuk dalam membran eritrosit melalui pembawa kolin (*cholin carier*) yang dihasilkan oleh parasit (Biagini dkk., 2004). Selain kolin, yang berperan sebagai prekursor pembentukan PC adalah serin (Le Roch dkk., 2008). Metabolisme PC sangat diperlukan oleh parasit untuk proses pertumbuhan ketika pembelahan atau proses meiosis dan membentuk individu baru.

Kandungan kuarterner nitrogen pada pigmen betalain, termasuk betanin dan amarantin, mampu menghambat transport intraseluler kolin. Penyebab kegagalan transport kolin ke dalam intraseluler parasit adalah terhambatnya penetrasi kolin. Selain itu keberadaan senyawa nitrogen kuarterner juga menghambat aktifitas kolin kinase di intraseluler parasit yang bertugas mendegradasi kolin. Karena tidak adanya kemampuan parasit untuk mendegradasi kolin, kolin ditolak masuk oleh eritrosit. Namun jika dihubungkan dengan biosintesis fosfatidilkolin parasit maka ketidakseimbangan DNA dan protein antara kolin dengan parasit menjadi alasan penolakan tersebut (Ancelin dan Vial, 1989).

Kandungan orthodifenol dan beberapa karbon pada pigmen betalain berfungsi sebagai kelator kation Ca^{2+} , Fe^{2+} , dan Mg^{2+} intraseluler parasit (Hilou dkk., 2006). Kondisi sel saat pompa Ca^{2+} aktif dimanfaatkan oleh parasit dalam proses invasi merozoit ke dalam eritrosit saat menginfeksi dan menjadi akses masuknya merozoit parasit kedalam eritrosit serta proses pematangan tropozoid intraseluler (Biagini dkk., 2004). Hemoglobin yang dicerna melalui pengubahan ion Fe^{2+} melalui proses oksidasi menjadi heme yang mengandung Fe^{3+} diubah menjadi peptida, yang digunakan sebagai sumber asam amino yang merupakan bahan dasar pembentukan DNA dan RNA serta protein lain yang diperlukan oleh parasit (Biagini dkk., 2004). Pada sintesis asam nukleat, enzim ribonukleotida reduktase (RNR) pada *Plasmodium* memerlukan ion Mg dan Fe sebagai kofaktor. Oleh karena itu, betalain yang memiliki fungsi sebagai kelator Fe dan Mg dianggap mempunyai potensi sebagai obat antimalaria karena aktif menghambat pembentukan asam nukleat parasit (Hilou dkk., 2006) (Gambar 2.3).

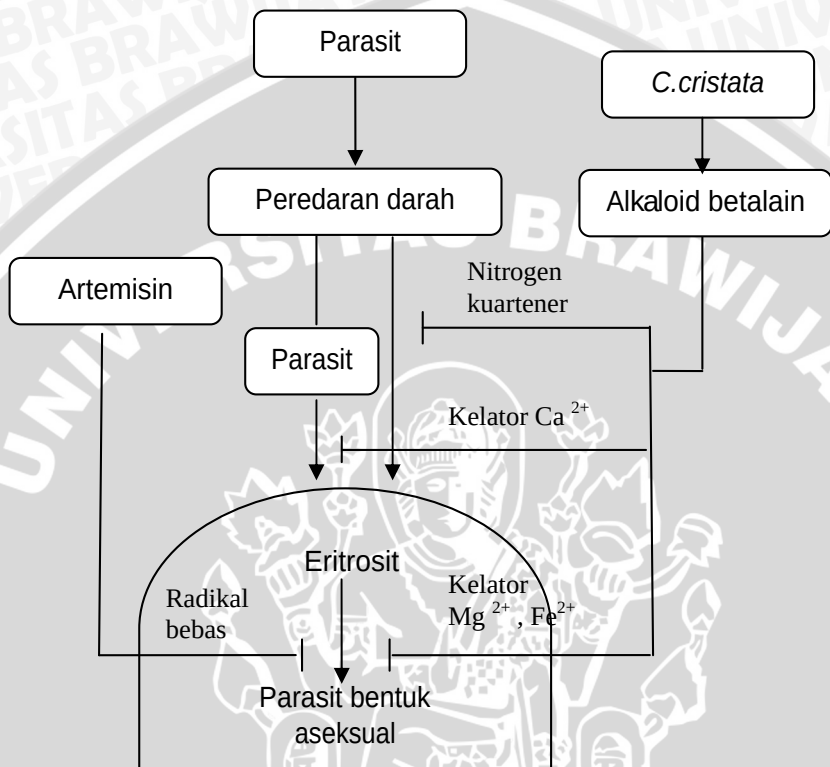
2.4 Aktifitas antimalaria Artemisin

Artemisin merupakan senyawa seskuiterpen lakton yang mengandung jembatan endoperoksida yang mempunyai aktifitas antimalaria. Pemutusan jembatan peroksida yang dikatalisis oleh heme menghasilkan radikal bebas berinti karbon. Parasit malaria sensitif terhadap radikal bebas. Struktur jembatan peroksida pada molekul artemisinin diputus oleh ion Fe^{2+} (ion besi II) menjadi radikal bebas yang sangat reaktif. Oleh karena itu Fe^{2+} -hem bertanggung jawab untuk mengaktifkan artemisinin membunuh parasit. Efek antimalaria dari artemisinin disebabkan oleh masuknya molekul hemozoin ke dalam vakuola makanan parasit dan berinteraksi dengan Fe^{2+} -hem. Interaksi menghasilkan "bom" radikal bebas yang menghancurkan komponen vital parasit sehingga parasit mati (Nurachman, 2009).

Menurut Nurachman (2009) kerja artemisinin dengan penghambatan enzim ATPase bergantung kalsium (PfATP6). PfATP6 aktivitasnya mirip dengan ATPase mamalia (disebut SERCA) yang terletak dalam kompartemen intrasel terbungkus membran yang disebut retikulum endoplasma/sarco. Ketika di dalam parasit, artemisinin diaktifkan oleh ion besi bebas atau proses-proses yang bergantung besi lain dekat dengan PFATP6 dalam retikulum endoplasma. Radikal bebas yang dihasilkan artemisinin mengikat dan menghambat PFATP6 secara irreversibel dan spesifik. Kemungkinan besar radikal bebas artemisinin memodifikasi berbagai sisi pada satu target tunggal dan juga dapat mengikat beberapa jenis protein parasit lain. Fungsi ATPase pada sistem kompleks pompa ion Na^+/K^+ adalah mengatur kadar ion di dalam sel. Kegagalan fungsi PfATP6 mengakibatkan penurunan drastis ion kalium dalam sel yang sangat mematikan parasit.

Artemisia annua yang tumbuh di Cina telah digunakan sebagai obat antimalaria semenjak tahun 1970 (DePadua dkk.,1999), dan memiliki nilai IC_{50} atau LD_{50} (pada 50% kematian *Plasmodium* dari total) pada konsentrasi 0,008 $\mu\text{g/mL}$ sampai 15,38 $\mu\text{g/mL}$ (Tan dkk., 1998). Kandungan artemisinin pada jenis *A. annua*, diketahui memiliki kadar tertinggi dibandingkan *A. Cina*, *A. vulgaris*, yaitu sebesar 4,99 ppm. Pada konsentrasi artemisinin 100 $\mu\text{g/mL}$ yang diperoleh dari tanaman *A.annua* memiliki tingkat kematian *P. falcifarum* sebesar 85,77% (Aryanti, 2006).

2.5 kerangka Konsep



Gambar 2.3 Bagan konsep aktifitas antimalaria ekstrak pigmen bunga *C. cristata* dan artemisinin.

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat

Penelitian dilaksanakan dari bulan November 2009 – Januari 2011 di Laboratorium Fisiologi Tumbuhan, Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam dan Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang.

3.2 Prosedur kerja

3.2.1 Ekstraksi pigmen bunga Jengger Ayam (*Celosia cristata*)

Bagian bunga (*inflorescence*) jengger ayam berwarna merah dipotong selebar 1 cm, kemudian potongan bunga tersebut dicuci, dikeringkan dengan kertas tisu dan ditimbang sebanyak 100 g. Potongan bunga kemudian digerus menggunakan mortar dengan penambahan 10 ml 80% metanol dan 50 mM asam askorbat. Hasil penggerusan disaring menggunakan penyaring teh untuk mendapatkan ekstrak yang dilanjutkan dengan sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit dan diperoleh supernatan. Supernatan digunakan untuk mengukur nilai absorbansi kandungan betasianin total pada panjang gelombang 534 nm, dengan menggunakan perhitungan kandungan amarantin. Supernatan yang dihasilkan kemudian dibekukan dan dimasukkan dalam kantong plastik kecil untuk diserbukkan menggunakan *freeze drier*. *Freeze drier* digunakan untuk proses kering beku dengan menyerap air dalam supernatan tanpa proses pemanasan, sehingga kondisi pigmen diharapkan tetap stabil.

Kandungan metanol pada ekstrak diukur dengan alat Gas kromatografi bertujuan untuk mengetahui keamanan ekstrak yang akan diberikan secara oral. Kandungan betasianin dihitung dari kandungan amarantin sesuai dengan rumus (Cai, 1998) :

$$AC = A_{534} MW / V (DF) / eLW$$

Keterangan :

AC : konsentrasi amaranthin (mg/g)

A_{534} : nilai absorbansi ? 534 nm

MW : berat molekul amarantin (726.6 g/mol)

V : volume ekstrak kering

DF : faktor pengenceran

- e : molar absorptifitas (5.66×10^4 L/cm mol)
L : lebar kuvet (1 cm)
W : berat kering ekstrak (g)

3.2.2 Rancangan percobaan

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok dengan dua faktor perlakuan sebagai variabel bebas yaitu kelompok lama pemaparan dan kelompok dosis ekstrak pigmen bunga *C.cristata*, sedangkan variabel terikat adalah persentase penghambatan (Lampiran 1).

3.2.3 Penentuan Dosis Letal (LD50)

Uji toksisitas ekstrak bunga dilakukan dengan menggunakan empat ekor mencit untuk setiap dosis atau berat kering ekstrak (gram) yang digunakan. Dosis yang digunakan yaitu 750 mg/Kg BB, 1500 mg/Kg BB, dan 3000 mg/Kg BB. Kondisi fisik mencit diamati setiap hari selama 7 hari untuk menentukan efek ekstrak tersebut hingga menyebabkan kematian pada separuh populasi (LD50).

3.2.4 Thawing Isolat *Plasmodium berghei*

Isolat *Plasmodium* hasil in vitro dari Dua Namro Jakarta yang disimpan di *Liquid Nitrogen Tank*, ditambah media M+ sebanyak 6 ml dan dihomogenasi, kemudian dilakukan sentrifugasi selama 5 menit dengan kecepatan 2000 rpm (Lampiran 2). Supernatan dibuang dan pelet ditambah media M+ 6 ml kembali hingga supernatan berwarna merah jernih. Setelah supernatan dibuang, pelet ditambah media M+ sesuai dengan jumlah mencit yang akan dijadikan donor. Media M+ ditambahkan hingga 0,25 ml untuk tiap ekor mencit yang akan diinfeksi dan dipindahkan dalam suntik insulin 1 ml. Semua pekerjaan yang berhubungan dengan isolat *P.berghei* dilakukan dalam *Laminar Air Flow* dan bersifat aseptik. Kemudian isolat diinfeksi pada hewan coba donor hingga positif terinfeksi dengan pemeriksaan melalui pembuatan hapusan darah dan penentuan tingkat keparahan dengan menghitung derajat parasitemia.

3.2.5 Pembuatan hapusan darah tipis

Satu tetes darah yang diambil dari pemotongan ujung ekor mencit diletakkan pada *object glass*. Kemudian tetesan darah tersebut dibuat hapusan dan ditunggu kering, setelah itu diberi metanol hingga merata dan ditunggu kering. Hapusan darah mencit dicat Giemsa (Giemsa : buffer Giemsa (1 : 7)) dan ditunggu selama 20 menit, selanjutnya dibilas

dengan air mengalir hingga tidak ada cat yang tersisa kemudian dikeringanginkan dan diamati.

Parasit red blood cell (PRBC) Plasmodium berghei diidentifikasi dengan meningkatnya jumlah eritrosit yang terinfeksi dibandingkan dengan eritrosit normal. Di dalam eritrosit yang terwarnai, granula berwarna lebih ungu dibandingkan dengan sitoplasma yang merupakan parasit intraeritrositik.

3.2.6 Pemeriksaan Parasitemia

Persentase derajat parasitemia menunjukkan banyaknya eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* pada 1000 eritrosit. *Plasmodium berghei* intraeritrositik fase trophozoit terdiri dari trophozoit dengan satu inti, yang berarti satu eritrosit diinfeksi oleh satu parasit *Plasmodium berghei*, dua inti, atau banyak inti. Jika sel eritrosit yang terinfeksi tampak membentuk cincin, maka parasit tersebut memasuki fase membentuk *ringform*, yang kemudian akan membentuk trophozoit ditandai dengan melebarnya sitoplasma parasit didalam sel eritrosit yang terinfeksi dan siap untuk memperbanyak diri dan membentuk skizon yang kelihatan lebih padat. Skizon matur menghasilkan 6-10 merozoit, merozoit merupakan sel parasit yang berada diluar sel eritrosit yang siap menginfeksi kembali (Gardiner, 2009).

Perolehan 1000 eritrosit pada hapusan darah tipis (*thin smear*)dihitung dengan menggunakan *hand counter*. Langkah-langkah perhitungan derajat parasitemia yaitu sebagai berikut :

1. Hapusan darah yang sudah dicat diperiksa dengan mikroskop menggunakan perbesaran 1000 kali
2. Derajat parasitemia dihitung melalui persentase parasitemia dengan perbesaran 1000 kali , menggunakan rumus :

$$P\% = \frac{PRBC}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100\%$$

Keterangan :

P% : nilai derajat parasitemia

PRBC : jumlah sel eritrosit yang terinfeksi dalam 1000 eritrosit yang diamati

3.2.7 Inokulasi *Plasmodium berghei*

Inokulasi parasit *Plasmodium berghei* dilakukan setelah mencit donor positif terinfeksi. Inokulasi Parasitemia dihitung dari sediaan hapusan darah tipis dengan pengecatan Giemsa seperti pada langkah pembuatan hapusan darah. Jumlah parasit dihitung per 1000 eritrosit

dengan mikroskop pada perbesaran 400X dihitung menggunakan hemositometer. Darah yang digunakan untuk menghitung jumlah sel eritrosit diambil melalui jantung dan dilakukan pengenceran menggunakan PBS hingga 10^4 untuk menghitung jumlah sel eritrosit dalam kolom hemositometer (Lampiran 2). Perolehan sel eritrosit sebanyak 10^6 parasit *Plasmodium berghei* dalam 0,2 ml darah dapat diperoleh dengan menggunakan rumus sebagai berikut :

$$\begin{aligned} JS \times 10^4 \times 10^4 &= a \\ \frac{P\%}{100} \times a &= b \\ \frac{b}{5 \times 10^4} &= c \end{aligned}$$

Keterangan :

- JS : jumlah sel dalam 25 kotak pada pengenceran 10^4 hasil perhitungan pada hemositometer
P% : nilai derajat parasitemia
 $5 \cdot 10^6$: jumlah sel yang diinginkan
C : besar pengenceran yang dilakukan

Setelah darah donor diencerkan menggunakan media M+ sesuai nilai pengenceran yang diperoleh, kemudian larutan tersebut ditransfer secara intraperitoneal (IP) ke mencit perlakuan sebanyak 0,2 ml. Hewan coba akan terinfeksi parasit dalam jangka waktu 3-7 hari setelah penginfeksian. Saat derajat parasitemia mencapai 5-7% (Irawati, 2007), merupakan awal pemberian ekstrak bunga *C. cristata*.

3.2.8 Penentuan dosis efektif (ED50)

Menentukan dosis efektif ekstrak bunga dilakukan dengan menggunakan 3 ekor mencit untuk setiap dosis atau berat kering ekstrak (gram) yang digunakan. Dosis ekstrak bunga *C.cristata* 100, 300, 500, 700, dan 900 mg/Kg BB/hari yang dibandingkan dengan perlakuan kontrol positif, kontrol negative dan pemberian artemisin dosis 0,04 mg/kg BB/hari. Setelah semua perlakuan diberikan, diambil darah 1 tetes melalui ujung ekor mencit pada hari ke-3, ke-5, dan ke-7 untuk dibuat hapusan darah dan dilakukan pengamatan pertumbuhan parasitemia pada fase aseksual.

3.3 Pengamatan

Hal yang diamati pada penelitian ini antara lain :

1. Kondisi fisik keempat mencit ketika diberikan perlakuan LD50 pada masing-masing dosis perlakuan
2. Derajat parasitemia hapusan darah mencit yang terinfeksi
3. Derajat parasitemia hapusan darah mencit donor
4. Derajat parasitemia hapusan darah mencit perlakuan
5. Penghambatan Pertumbuhan untuk menentukan ED50

Derajat penghambatan menunjukkan besar penghambatan dalam persentase, diperoleh melalui rumus :

$$I (\%) = \frac{\text{kontrol parasitemia} - \text{parasitemia pengobatan}}{\text{kontrol parasitemia}} \times 100\%$$

3.4 Analisa Data

1. Uji ANOVA yang dilanjutkan dengan *Tukey* atau BNT dan BNJ (bila dengan uji ANOVA menunjukkan nilai signifikan)
2. Uji Probit digunakan untuk mengetahui besar ED50
3. Uji korelasi digunakan untuk melihat hubungan antara variabel

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

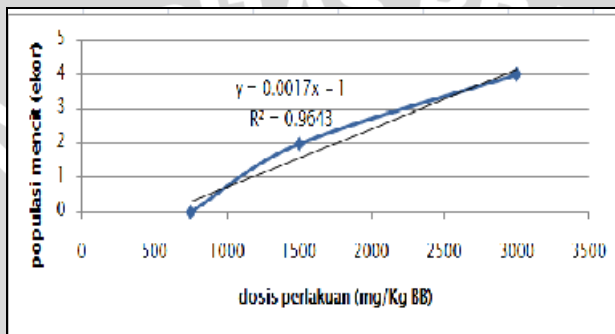
4.1 Penentuan konsentrasi pigmen betasianin pada 100 mg bunga Jengger ayam (*Celosia cristata*) segar

Pada penelitian ini ekstrak pigmen bunga *C.cristata* diperoleh dalam bentuk cair, kemudian diserbukkan menggunakan *freeze drier* dan dihasilkan ekstrak bunga *C.cristata* dalam bentuk serbuk (Gambar L.1;L2, Lampiran 3). Hasil ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dalam bentuk cair diperoleh sebanyak 100 ml dalam 100 gr bunga *C.cristata*. Ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dalam bentuk cair tersebut digunakan untuk menghitung nilai absorbansi maksimum. Nilai absorbansi maksimum ekstrak bunga *C.cristata* diperoleh pada panjang gelombang 534 nm (Lampiran 4). Menurut Cai, dkk. (1998) nilai absorbansi maksimum pada panjang gelombang antara 535-538 nm merupakan jenis pigmen betasianin. Nilai absorbansi maksimum digunakan untuk menghitung konsentrasi pigmen betasianin yang diwakili oleh pigmen jenis amarantin. Pigmen jenis amarantin merupakan jenis pigmen yang paling banyak terkandung dalam bunga *C.cristata* terutama yang berwarna merah (Schliemann, dkk., 2001). Konsentrasi pigmen betasianin diperoleh sebanyak 6,624 mg/gram bunga *C.cristata* segar (Lampiran 5), sehingga dalam 100 gram bunga *C.cristata* segar diperoleh amarantin sebanyak 12,122 mg yang diperoleh dari 1830 mg ekstrak pigmen dalam bentuk serbuk. Ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dalam bentuk serbuk tersebut kemudian digunakan sebagai bahan uji aktifitas antimalaria ekstrak bunga *C.cristata*.

4.2 Uji toksisitas ekstrak pigmen bunga *C.cristata* (LD50)

Hasil uji toksisitas selama tujuh hari pengamatan pada dosis 750 mg/Kg BB, 1500 mg/Kg BB, dan 3000 mg/Kg BB menunjukkan bahwa dosis 1500 mg/Kg BB menyebabkan kematian 50% (dua dari empat) ekor hewan coba. Namun hasil regresi linear dengan persamaan $y = 0,0017x - 1$ menunjukkan bahwa, nilai LD50 tujuh hari diperoleh pada dosis 1765 mg/Kg BB (Gambar 4.1). Menurut Loomis (1978), *Lethal Dose 50* adalah suatu besaran yang diturunkan secara statistik, untuk menyatakan dosis tunggal sesuatu senyawa yang diperkirakan dapat mematikan atau menimbulkan efek toksik pada 50% hewan coba setelah

perlakuan. Secara umum, semakin kecil nilai LD50, semakin toksik senyawa tersebut. Begitu pula sebaliknya, semakin besar nilai LD50, semakin rendah toksisitasnya. Dosis toksik pada *C.cristata* pada penelitian ini diketahui lebih tinggi jika dibandingkan tanaman *A. spinosus* yang memiliki nilai LD50 1473 mg/Kg BB (Hilou, dkk., 2006). Nilai LD50 yang lebih tinggi pada ekstrak pigmen bunga *C.cristata* menunjukkan bahwa toksisitas yang dimiliki oleh tanaman *C.cristata* lebih rendah.



Gambar 4.1 Uji toksisitas dosis kematian pada hewan coba

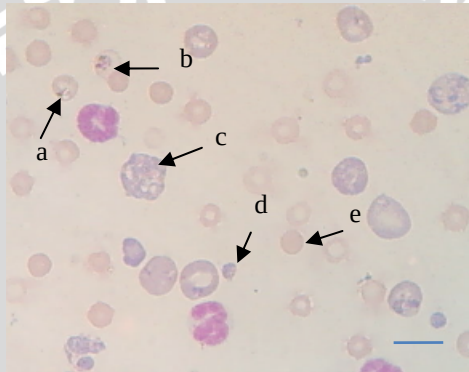
Hasil yang diperoleh (dalam mg/kg BB) dapat digolongkan menurut potensi toksisitas akut senyawa uji menjadi beberapa kelas (Tabel 4.1). Ekstrak pigmen betasianin yang terkandung dalam bunga *C.cristata* memiliki kriteria uji toksisitas yang sedikit toksik pada pemaparan selama 7 hari, sehingga masih cukup aman untuk dikonsumsi secara oral dengan dosis yang sesuai dan tidak berlebihan. Nilai LD50 yang lebih rendah, memiliki tingkat berbahaya yang lebih rendah pula. Nilai LD50 ekstrak pigmen bunga *C. cristata* selanjutnya dipergunakan sebagai dasar untuk menentukan dosis efektif ekstrak pigmen bunga *C. cristata* dalam menghambat 50% pertumbuhan *P. berghei* (ED50).

Tabel 4.1 Beberapa kriteria uji toksisitas senyawa akut (Loomis, 1978)

No.	Kelas	LD50 (mg/Kg BB)
1	Luar biasa toksik	< 1
2	Sangat toksik	1 – 50
3	Cukup toksik	50 – 500
4	Sedikit toksik	500-5000
5	Praktis tidak toksik	5000-15000
6	Relatif kurang berbahaya	> 15000

4.3 Morfologi sel eritrosit menciit yang terinfeksi

Ketika diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1000 kali, eritrosit yang terinfeksi akan tampak memiliki ukuran yang lebih besar dibandingkan dengan eritrosit normal. Hapusan darah tipis yang telah terwarnai Giemsa, tampak granula berwarna merah keunguan. Dalam satu bidang pandang dari hasil pengamatan dapat ditemukan beberapa tahapan pertumbuhan parasit pada fase eritrositik. Tahapan pada fase eritrositik yang dapat ditemukan seperti skizon, merozoit, ringform, dan trophozoit (Gambar 4.2).

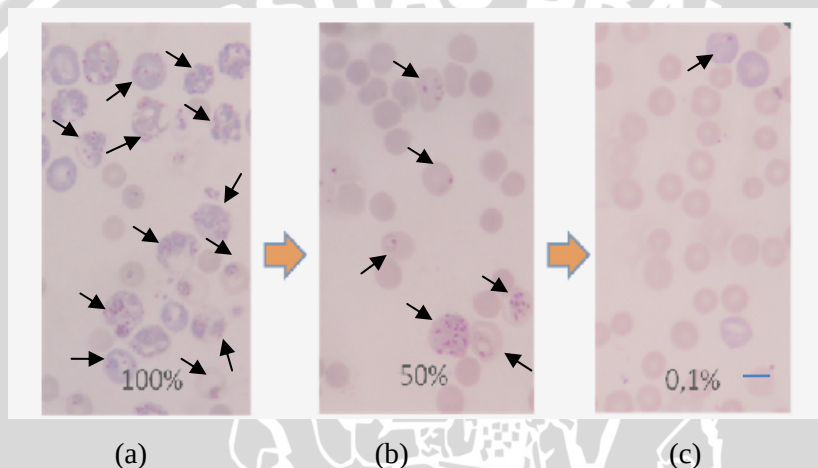


Gambar 4.2 Fase eritrositik sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* (bar = 14 μm). a). ringform, b). trophozoit, c). skizon d). merozoit, dan e). eritrosit normal

Saat sel eritrosit yang terinfeksi tampak membentuk cincin, maka parasit tersebut memasuki fase *ringform*, yang kemudian akan membentuk trophozoit ditandai dengan melebarnya sitoplasma parasit didalam sel eritrosit yang terinfeksi dan siap untuk memperbanyak diri. *Plasmodium berghei* intraeritrositik bentuk trophozoit terdiri dari satu eritrosit yang diinfeksi oleh satu, dua, atau banyak parasit *P. berghei*. Setelah terbentuk trophozoit kemudian membentuk skizon yang kelihatan lebih padat. Skizon matur menghasilkan 6-10 merozoit, merozoit merupakan sel parasit yang berada diluar sel eritrosit yang siap menginfeksi kembali (Gardiner, 2009)

Eritrosit yang terinfeksi pada kontrol positif dianggap memiliki pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* sebanyak 100%, ketika dibandingkan dengan perlakuan pemberian ekstrak pigmen dan pemberian artemisin. Hal tersebut ditunjukkan dengan besar derajat

parasitemia pada dosis 900 mg/Kg BB pada hari ketujuh sebesar 32,6% (Lampiran 6), jika dibandingkan dengan besar derajat parasitemia kontrol positif sebesar 59,13% (Lampiran 6) maka, ekstrak pigmen *C.cristata* memiliki kemampuan menghambat sebesar 44,87% (Tabel 4.2) yang mendekati penghambatan 50%. Besar derajat parasitemia perlakuan pemberian artemisin diperoleh 0% (Lampiran 6) yang menunjukkan hasil bahwa artemisin masih baik digunakan sebagai antimalaria dengan besar (Gambar 4.3).



Gambar 4.3 Sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* (bar = 7 μ m). a). kontrol positif, b). pemberian ekstrak pigmen, dan c). pemberian artemisin

4.4 Pengaruh ekstrak pigmen bunga *C.cristata* terhadap besar penghambatan pertumbuhan *P. Berghei*

Penghitungan penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* dimulai setelah pemberian ekstrak pigmen pada hari ketiga. Kelima dosis ekstrak pigmen tujuh hari setelah pemaparan menunjukkan peningkatan persentase penghambatan yang sesuai dengan peningkatan dosis ekstrak. Pertumbuhan Plasmodium yang meningkat tujuh hari setelah pemaparan ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dosis 900 mg/Kg BB, menunjukkan bahwa *Plasmodium berghei* masih mampu hidup dengan membentuk individu baru.

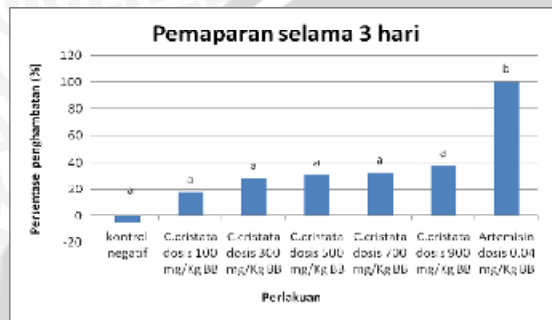
Pengaruh ekstrak pigmen bunga *C.cristata* terhadap besar penghambatan pertumbuhan Plasmodium dapat dilihat melalui

perhitungan persen penghambatan dari hasil pertumbuhan yang diamati pada kontrol positif terhadap perlakuan pemberian ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dan artemisin (Tabel 4.2).

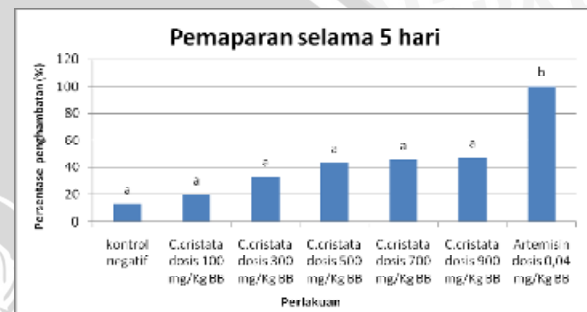
Tabel 4.2 Pengaruh ekstrak pigmen bunga *C.cristata* terhadap persentase penghambatan pertumbuhan *P.berghei*.

Perlakuan dosis pigmen (mg/Kg BB)	Penghambatan (%) pada hari ke-		
	3	5	7
0	-5,35	12,94	10,87
100	31,99	45,42	29,82
300	30,66	33,05	32,41
500	17,54	19,86	33,20
700	27,71	43,19	36,47
900	37,48	47,15	44,87
Artemisin 0,04	99,73	100,00	100,00

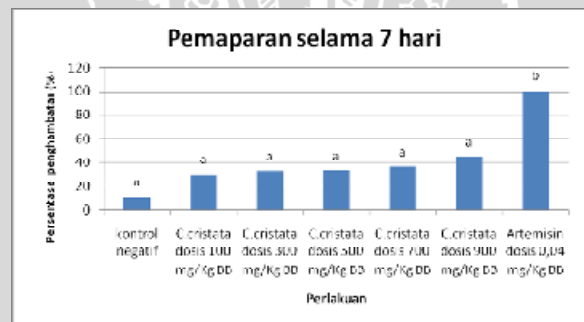
Pada penelitian ini sebaran data persentase penghambatan memiliki distribusi normal (Lampiran 7). Hasil uji analisis ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak pigmen dan lama pemaparan berpengaruh terhadap persentase penghambatan. Berdasarkan hasil uji *Tukey* diketahui bahwa persentase penghambatan pemberian dosis pigmen bunga *C.cristata* berbeda nyata dengan artemisin, baik selama 3, 5, maupun 7 hari pemaparan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak pigmen bunga *C.cristata* memiliki aktifitas penghambatan yang berbeda dengan artemisin (Gambar 4.4, Lampiran 8).



(a)



(b)



(c)

Gambar 4.4 Uji lanjutan pemberian ekstrak pigmen bunga *C.cristata* terhadap persentase penghambatan. a). Pemaparan selama 3 hari, b). 5 hari, dan c). 7 hari.

Pemberian ekstrak selama tujuh hari mampu menghambat pertumbuhan *P.berghei* lebih dari 30 %. Menurut Andrade-Neto, dkk. (2003) suatu ekstrak dikatakan aktif menurunkan parasitemia apabila ekstrak tersebut dapat menurunkan parasitemia lebih dari 30%, sehingga ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dapat dikatakan mampu dan aktif dalam menurunkan parasitemia.

Pada kelompok perlakuan pemberian aquades menunjukkan bahwa aktifitasnya sebagai pelarut tidak memberikan efek terhadap penghambatan pertumbuhan *P.berghei*. Rata-rata persentase penghambatan setelah pemberian aquades selama tiga hari adalah -5,35%. Nilai negatif menunjukkan bahwa aquades tidak memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan *P.berghei*.

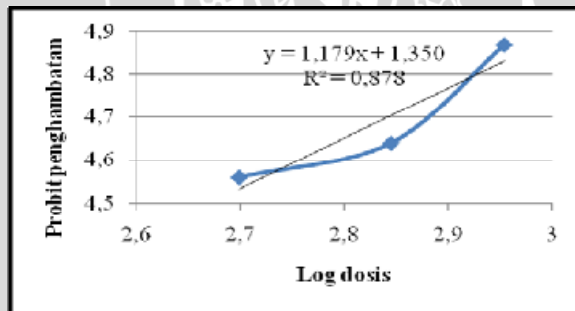
Pemberian artemisin pada dosis 0,04 mg/Kg BB selama tiga hari menunjukkan penghambatan pertumbuhan hampir 100 % dan mencapai 100 % pada lima dan tujuh hari pemaparan. Hal tersebut menunjukkan bahwa artemisin masih sangat baik digunakan sebagai antimalaria. Aktifitas artemisin dalam menghambat pertumbuhan *P.berghei* yaitu dengan menghambat enzim ATPase yang bergantung kalsium (PfATP6). PfATP6 mirip dengan ATPase mamalia yang terletak dalam kompartemen retikulum endoplasma yang banyak terdapat di luar vakuola makanan *P.berghei*. Artemisin yang terbungkus di dalam gelembung membran diangkut dalam eritrosit ke dalam sel *P.berghei*. Jika sudah berada di dalam sel *P.berghei* maka artemisin diaktifkan oleh ion besi bebas atau proses-proses yang bergantung dengan besi lain dekat dengan PfATP6 dalam retikulum endoplasma. Radikal bebas yang dihasilkan artemisin mengikat dan menghambat PfATP6 secara ireversibel dan spesifik. Kemungkinan besar radikal bebas artemisin memodifikasi berbagai sisi suatu target tunggal dan juga dapat meningkat pada beberapa jenis protein lain. Fungsi ATPase pada sistem kompleks pompa ion Na^+/K^+ adalah mengatur kadar ion kalium dalam sel yang sangat mematikan parasit (Nurachman, 2009).

Hasil uji korelasi menyatakan bahwa antara besar dosis ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dan lama pemaparan dengan persen penghambatan memiliki hubungan yang signifikan baik pada pemaparan selama 3, 5, dan 7 hari dengan nilai korelasi berturut-turut $P = 0,001$, $r = 0,681$; $P = 0,01$, $r = 0,66$; $P = 0,00$, $r = 0.751$, dengan hubungan korelasi yang sangat kuat (Lampiran 9).

Nilai penghambatan yang telah diperoleh dapat digunakan untuk mengetahui nilai dosis efektif (ED50) dengan penggunaan uji Probit (Tabel 4.3). Hasil uji probit dengan menggunakan besar log dosis dan probit penghambatan diperoleh persamaan $Y = 1,179X + 1,3504$ dengan $R^2 = 0,8785$ diperoleh nilai ED50 sebesar 1246 mg/Kg BB (Gambar 4.5). Nilai dosis efektif sebesar 1246 mg/Kg BB pada hewan coba dengan berat 30 gram, memiliki kandungan pigmen betasianin sebanyak 247,6 mg (Lampiran 5).

Tabel 4.3 Nilai probit dan Log dosis ekstrak pigmen bunga *C.cristata* pada pengamatan hari ke-7

Dosis (mg/Kg BB)	Penghambatan Hari ke-7	Log dosis	Probit penghambatan
100	29,82	2	4,48
300	32,41	2,477	4,53
500	33,20	2,699	4,56
700	36,47	2,845	4,64
900	44,87	2,954	4,87



Gambar 4.5 Efektifitas pemberian ekstrak bunga *C. cristata* terhadap penghambatan pertumbuhan *P. Berghei* antara Log dosis dengan probit penghambatan

Pigmen betasianin bunga *C.cristata* pada dosis 1246 mg/Kg BB hanya mampu menghambat pertumbuhan *P.berghei*. Kandungan amarantin pada bunga *C.cristata* memiliki kemampuan yang sama dengan *A.spinosus* dalam menghambat pertumbuhan *P.berghei*. Aktivitas antimalaria pigmen betasianin menurut Hilou, dkk (2006) memiliki kemampuan sebagai kelator besi, Ca^{2+} , dan Mg^{2+} . Ion Mg^{2+} digunakan oleh parasit sebagai salah satu komponen yang diperlukan dalam pembentukan DNA. Pada kultur in vitro pemindahan ion Mg^{2+}

dari ekstraselular media menyebabkan penghambatan pertumbuhan, sehingga ion Mg^{2+} berperan penting pada siklus hidup parasit (Kirk, 2001).

Kandungan nitrogen kuartener pada pigmen betasianin memiliki aktifitas sebagai penghambat pertumbuhan Plasmodium. Nitrogen kuartener menghambat kerja kolin kinase yang bertugas mengubah kolin menjadi pospokolina, sehingga kolin terhambat untuk dimanfaatkan oleh parasit dalam pembentukan fosfatidilkolin (Ancelin dan Vial, 1987; Biagini, 2004). Parasit memiliki dua jalur pembentukan fosfatidilkolin yaitu melalui jalur Kennedy CDP-kolin dan jalur serin dekarboksilase fosfoetanolamin metiltransferase (SDPM), sehingga ketika kolin gagal digunakan sebagai prekursor pembentukan fosfatidilkolin maka Plasmodium memanfaatkan serin sebagai sumber yang digunakan dalam pembentukan fosfatidilkolin. Kolin memiliki aktifitas antagonis terhadap enzim fosfoetanolamin metiltransferase (PfPmt) yang bertugas dalam reaksi fosfoetanolamin menjadi pospokolina (Witola dan Mamoun, 2007). Oleh karena itu meski kolin telah dihambat oleh nitrogen kuartener, namun Plasmodium masih mampu mensintesis fosfatidilkolin. Selain itu aktifitas pigmen betasianin khususnya jenis amaranthin bekerja dalam menghambat transport kolin, pembentukan DNA, dan proses invasi parasit ke dalam eritrosit (Biagini dkk., 2004).

Pigmen betasianin yang berfungsi sebagai agen kelator besi merupakan salah satu aktifitas sebagai antimalaria (Hilou dkk., 2006). Besi dimanfaatkan oleh Plasmodium sebagai enzim penting seperti dihidroorotat dehidrogenase untuk mensintesis pirimidin, ribonukleotida difosfat yang diperlukan dalam sintesis DNA, enzim mitokondria untuk transport elektron, pembentukan ATP, aconitase, siklus asam trikarboksilat, hidrolase fosfat, dan faktor transkripsi yang diomodulasi sintesis RNA (Lytton dkk., 1994). Keberadaan kelator besi dapat menyebabkan terjadinya penurunan energi atau produksi ATP Plasmodium, sedangkan puncak aktifitas RNase Plasmodium terletak pada tahapan trophozoit dan skizon, tepatnya pada fase eritrositik yaitu didalam pembuluh darah. Ketika ekstrak pigmen bunga *C. cristata* bereaksi didalam tubuh hewan coba maka semua aktifitas tersebut akan mengalami penurunan kerja. Proses invasi Plasmodium kedalam eritrosit memerlukan aktifitas enzim protease. Diketahui bahwa dua basa peptida cysteine netral kalsium protease menghambat kerja calpain I dan II. Aktifitas kelator kalsium (Ca^{2+}) merupakan kelator spesifik

kation yang mampu menghambat proses invasi Plasmodium (Blackman, 2000). Kemampuan kelator tersebut ternyata tidak bekerja spesifik, hal tersebut ditunjukkan oleh kondisi mencit yang sulit bertahan hingga pemaparan hari ketujuh. Kerja kelator ion diduga mampu menyerang sel normal lainnya, sehingga di dalam tubuh mencit terjadi penurunan aktifitas sel yang disebabkan gangguan transport ion. Oleh karena itu aktifitas pigmen betasianin ekstrak pigmen bunga *C.cristata* sebagai kelator ion Ca^{2+} diduga lebih efektif jika digunakan sebagai obat pencegahan atau prefentif.

Dosis efektif ekstrak pigmen bunga *C.cristata* yang mendekati nilai toksik menunjukkan penggunaan teknik ekstraksi belum mampu meningkatkan nilai penghambatan. Oleh karena itu, untuk mengoptimalkan aktifitas antimalaria pigmen betalain pada bunga *C.cristata* merah perlu dilakukan pemurnian senyawa amarantin. Isolasi pigmen tersebut dapat dilakukan menggunakan teknik purifikasi menggunakan HPLC (Cai dkk., 2001).



BAB V

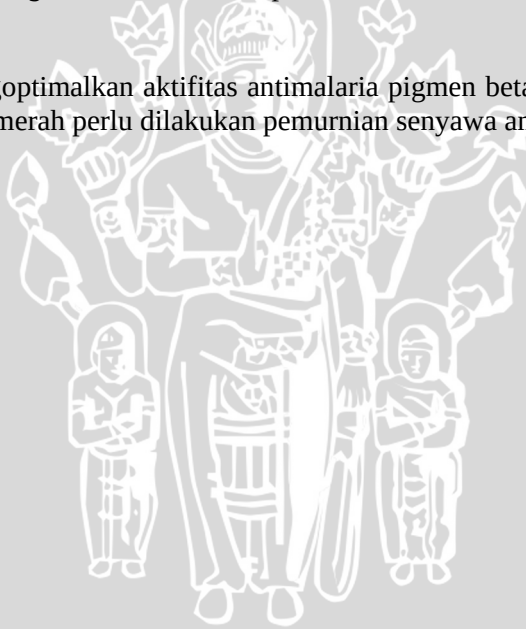
KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pada hasil penelitian ini ekstrak pigmen bunga *C.cristata* memiliki nilai LD50 sebesar 1765 mg/Kg BB dan dosis efektif ED50 sebesar 1246 mg/Kg BB. Selama tujuh hari pemaparan ekstrak bunga *C.cristata* memiliki kemampuan menghambat lebih dari 30 %, sehingga ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dapat dikatakan mampu dan aktif dalam menurunkan parasitemia. Dosis ekstrak pigmen dan lama pemaparan berpengaruh terhadap persentase penghambatan. Dosis ekstrak pigmen dan lama pemaparan memiliki hubungan korelasi yang sangat kuat. Kemampuan ekstrak pigmen bunga *C.cristata* dalam menghambat pertumbuhan *P.berhgei* lebih rendah daripada artemisin.

5.2 Saran

untuk mengoptimalkan aktifitas antimalaria pigmen betalain pada bunga *C.cristata* merah perlu dilakukan pemurnian senyawa amaranthin.



DAFTAR PUSTAKA

- Ancelin, M.L. dan Vial, H.J. 1989. Quaternary Ammonium Compounds Efficiently Inhibit *Plasmodium falciparum* Growth In Vitro by Impairment of Choline Transport, Antimicrobial Agent and Chemotherapy 29, 814 – 820
- Andrade-Neto, V.L., Brandao, M.G.L., Stehmann, J.R., Oliveira LA, dan Krettli, A.U. 2003. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *J. of Ethnopharmacolog.* 87: 253-256
- Aryanti, Ermayanti, T.M., Prinadi, K.I., dan Dewi, R.M. 2006 . Uji Daya Antimalaria *Artemisia spp.* Terhadap *Plasmodium falciparum* Antimalaria Test of *Artemisia sp.* on *Plasmodium falciparum*. Pusat Penelitian dan Pengembangan Teknologi Isotop dan Radiasi – BATAN. Pusat Penelitian Bioteknologi – LIPI. Universitas Negeri Jakarta. Pusat Penelitian dan Pemberantasan Penyakit Menular – DEPKES Majalah Farmasi Indonesia. 17: 81 – 84
- Biagini, G.A., Pasini, E.M., Hughes, R., De Koning, H.P., Vial, H.J. O'Neill, P.M., Ward S.A. dan Bray, P.G. 2004. Characterization of the choline carrier of *Plasmodium falciparum* : a route for the selective delivery of novel antimalarial drug . Lew, V.L., (Ed.) *.Blood* . Semimonthly by the American Society of Hematology. Washington DC. 104(10): 3372 – 3377
- Blackman, M.J. 2000. Protease Involved in Erythrocyte by The Malaria Parasite: Function and Potential as Chemotherapeutic Target. Division of Parasitology, National Institute for Medical Research, The Ridgeway, Mill Hill, London. Current Drug Target. : 59-83
- Cai, Y., Sun, M., Wu, H., Huang, R. dan Corke, H. 1998. Characterization and Quantification of Betacyanin Pigments from Diverse *Amaranthus* Species. *J. Agric. Food Chem.* 46(6): 1971 - 1978
- Cai, Y., Sun, M., dan Corke, H. 2001. Identification and Distribution of Simple and Acylated Betacyanins in the *Amaranthaceae*, *J. Agric. Food Chem.* 49: 1971 - 1978.

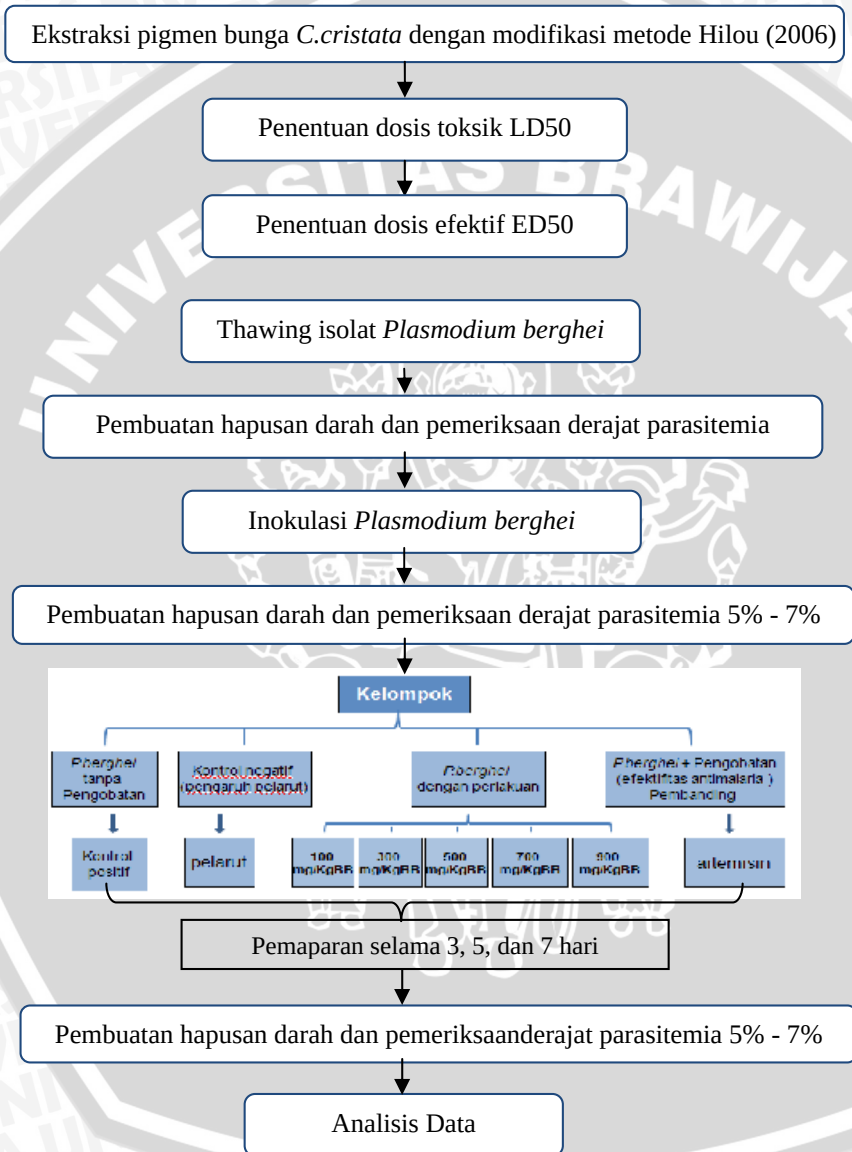
- Cai, Y., Sun, M., Schliemann, W., dan Corke, H. 2001. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigmen from *Celocia argentea*, *J. Agric. Food Chem.* 49: 4429 - 4435
- Cai, Y., Sun, M., dan Corke, H. 2003. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae, *J. Agric. Food Chem.* 51: 2288 - 2294
- Cai, Y., Sun, M., dan Corke, H. 2005. Characterization and application of Betalain pigments from plants of the Amaranthaceae, *Food Science and Technology.* 16: 370 – 376
- DePadua, L.S., Bunyapraphatsara, N. dan Lemmens R.H.M.J. 1999. Plant Resources Of South East Asia 12, *Medicinal and Poisonous Plants*, Prosea Bogor Indonesia. Hal: 139 – 142
- Dondrop, A.M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A.P., Tarning, J., Lwin, K.M., Arie, F., Hanpithkpong, W., Lee S.J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., Sam An, S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N.P.J., Lindegardh, N., Socheat, D. dan White, N.J. 2009. Artemisinin Resistant in *Plasmodium falciparum* Malaria, *The New England Journal of Medicine.* 361:1714 – b
- Farmacia. 2006. Malaria Penyakit Rawa-Rawa Yang Mendunia. <http://www.majalah-farmacia.com>. 5: 8
- Gardiner. 2009. Malaria Biology. <http://www.qimr.edu.au/research/labs/dong/index.html> . Tanggal akses 15 Maret 2010
- Hariyanto, P. N. 2000. Gejala Klinik Malaria Berat dalam Malaria Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi klinik dan Penanganan . EGC. Jakarta
- Herintsoa R., Baholy, R. R., Solovoniaina, dan R.A., Mirindra. 2008. Screening of Plant Extracts for Searching Antiplasmodial Activity. 11th NAPRECA Symposium Book of Proceedings, Antananarivo, Madagascar. Hal: 136-144
- Hilou, A., Nacoulma, O.G., dan Guigumde, T.R. .2006. In Vivo Antimalarial Activities of Extract From *Amaranthus spinosus* l. and *Boerhaavia erecta*. In Mice ,*Journal of Ethnopharmacology.* 103: 236 – 240
- Hodgson, E. 2000. A Textbook of Modern Toxicology. 2nded. McGraw – hill Book Co. Singapore. Hal: 292 – 295
- Irawati, L. 2007. Efek Minyak Buah Merah *Pandanus conoidus* terhadap Jumlah Eritrosit dan Kadar Hemoglobin Pada Mencit

- Balb/C Terinfeksi *Plasmodium berghei* yang Mendapat Terapi Artemisin. Skripsi Prodi Kedokteran Umum. Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya, Malang
- Plantamor. 2009. Jengger ayam (*Celosia cristata*) . <http://www.plantamor.com/index.php?plant=303>. Tanggal akses 18 november 2009
- Kanner, J., Harel, S., dan Granit, R. 2001. Betalain-A New Class of Dietary Cationized Antioxidants, *J. Agric. Food Chem.* 49: 5178 – 5185
- Kayser, O., Kiderlen, A.F., dan Croft, S.L. 2000. *Natural Products as Potential Antiparasitic Drugs*. www.fuberlin.de/akkyscr/antiparasiticsfromnature.pdf . Tanggal akses 18 November 2009
- Kirk, K . 2001. Membrane Transport in the Malaria-Infected Erythrocyte. *Physiol Rev*, 81: 495 - 537.
- Le Roch, K.G., Jhonson, J.R., Ahiboh, H., Chung, D.D., Prudhomme, J., Plouffe, D. Henson, K., Zhou, Y., Witola, W., Yates, J.R., Mamoun C.B., Winzeler E.A. dan Vial, H. 2008. A Systematic Approach To Understand The Mechanism of Action of The Bisthiazolium Compound T4 on The Human Malaria Parasite, *Plasmodium falciparum*, *BioMed Centra*, 9: 531
- Lytton, S.D., Mester, B., Libman, J., Shanzer, A. dan Cabantchik, Z.L. 1994. Mode of Action Iron (III) Chelator as Antimalarial; II. Evidence for Different Effect on Parasite Iron-Dependent Nucleic Acid Synthesis. *Blood*. 84(3): 910-915
- Moreno, D.A., Gracia-Viguera, C., Gil, J.I., dan Gil-Izquierdo, A. 2008. Betalain In The Era Of Global Agri-Food Science, Technology and Nutritional Healt, *Phytochem Rev.* 7: 261 – 280
- Nuracman, Z. 2009. Artemisin Pembunuh Parasit Malaria. <http://www.unisodem.org>. Tanggal akses 12 November 2009
- Tanaka, Y., Sasaki, N., dan Ohimya A. 2008. Biosynthesis of Plant Pigmen : Anthocyanins, betalains and Carotenoids, *The Plant Journal*. 54: 733 - 749
- Tesoriere, L., Allegra, M., Butera, D., dan Livrea, M.A. 2004. Absorption, Excretion, and Distribution of Dietary Antioxidant Betalain In LDLs: Potential Health Effects of Betalain In Human, *Am. J. Clin. Nutr.* 80: 941 -945
- Tjitra, E. 1995. Manifestasi Klinis dan Pengobatan Malaria. Haridjanto (Ed). *Cermin Dunia Kedoktera.*, Pusat Penelitian Penyakit

- Menular, Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan RI, Jakarta. Hal: 101
- Sadikin, M. 1989. Peningkatan Daya Tahan Tubuh Oleh Kenaikan Suhu Tubuh Pada Mencit Terinfeksi dengan Plasmodium berghei ANKA. *Cermin Dunia Kedokteran*. 55: 32-7
- Schliemann, W., Cai, Y., Degenkol, T., Jurgen S., dan Corke, H. 2001. Betalains of *Celosia argentea*. *Phytochemistry*. 58: 159–165
- Slater, A.F.G., Swiggard, W.J., Orton B.R., Flitter, W.D., Golberd, D.E., Cerami, A. dan Henderson G.B. 1991. An iron-carboxylate bond link the heme unit of malaria pigmen, *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 88, 325 - 329
- Stintzing, F.C., Kammerer, D., Schieber, A., Hilou, A., Nacoulma, O.G, dan Carle, R. 2004. Betacyanins and Phenolic Compounds From *Amaranthus spinosus* and *Boerhaavia erecta*. *Zeitschrift fur Naturforschung*. 59: 1–8
- Stintzing, F.C., dan Carle, R. 2007. Betalain – Emerging Prospects For Food Scientists, *Food Science & Technology*. 18: 514 – 525
- Tan, R.X., Zheng, W.F., dan Tang, H.Q. 1998. Biological Active Substances from The Genus *Artemisia*. *Planta Medica*. 64 : 295 – 302
- White N.J., dan Breman, J.G. 2005. Malaria dan Babesiosis: Diseases Caused by Red Blood Cell Parasites. Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., dan Jameson J.L. (Ed). *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16th Edition. McGraw-Hill. USA. Hal: 1218-1233
- Weiser. 2006. Biochemistry of *Plasmodium*. <http://www.tulane.edu/~wiser/malaria/fv.html>. Tanggal akses 12 November 2009

LAMPIRAN

Lampiran 1. Kerangka Operasional



Lampiran 2. Komposisi media thawing *P.berghei* dan PBS

+ Larutan M+ Media thawing *P.berghei*

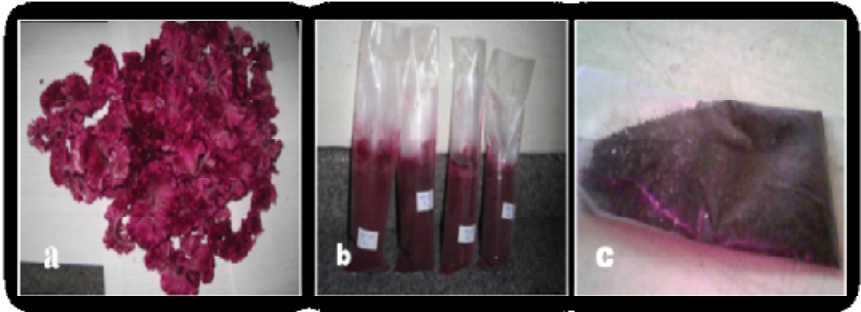
- **Larutan M- (1 Liter)** 100 ml
 - RPMI 10,04 gr
 - Hepes 5,98 gr
 - Gentamisin 2,5 ml
 - Aquades sampai 1 Liter
 - Bahan-bahan tadi dicampur (pH 7,4)
- Natrium bikarbonat 5 ml
- Gentamicin 1,25 ml
- Untuk membuat larutan M+ 10 % detelah ketiga bahan tersebut dicampur, diambil 90 ml dan ditambahkan 10 ml serum NCS

+ Larutan PBS (Pospat Buffer Saline) 1 Liter

- NaCl 8 gr
- KCl 0,2 gr
- Na₂HPO₄ 1,15 gr
- KH₂PO₄ 0,2 gr
- Aquades sampai 1 Liter

Lampiran 3. Ekstraksi bunga *C.cristata*

A. Ekstraksi bunga jengger ayam (*C.cristata*)



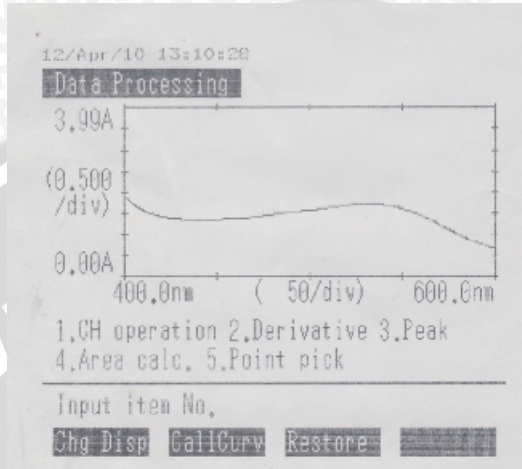
Gambar L.1. Ekstraksi bunga jengger ayam (*C.cristata*) a). potongan bunga, b). supernatan hasil ekstraksi, dan c). ekstrak bunga jengger ayam dalam bentuk *powder*.

B. Proses kering beku menggunakan alat *Freeze Drying*



Gambar L.2. Ekstraksi kering beku ekstrak bunga jengger ayam pada suhu -50°C menggunakan alat *Freeze Drier*

Lampiran 4. Nilai absorbansi supernatan ekstrak bunga *C.cristata*



Gambar L.3. Hasil nilai absorbansi maksimum pigmen betasianin

Tabel L.1 Nilai absorbansi supernatan ekstrak bunga *C.cristata*

No.	Panjang gelombang	Nilai absorbansi
1.	540	1,7111
2.	539	1,7153
3.	538	1,7166
4.	537	1,7179
5.	536	1,7437
6.	535	1,7437
7.	534	1,7466
8.	533	1,7466
9.	532	1,7451
10.	531	1,7451
11.	530	1,7407
12.	529	1,7407
13.	528	1,7365
14.	537	1,7321
15.	526	1,7292

Lampiran 5. Perhitungan kandungan pigmen menggunakan rumus perhitungan kandungan amarantin

Panjang gelombang (? max.) 534

Nilai absorbansi 0,43

Berat ekstrak pigmen 2,5 mg dalam 3 ml aquades

$$AC = A_{534} \cdot (MW) V (DF) / eLW$$

Keterangan :

AC : konsentrasi amaranthin (mg/g)

A_{534} : nilai absorbansi ? 534 nm

MW : berat molekul amarantin (726.6 g/mol)

V : volume ekstrak kering

DF : faktor pengenceran

e : molar absorbtifitas ($5,66 \times 10^4$ L/cm mol)

L : lebar kuvet (1 cm)

W : berat kering ekstrak (g)

maka, diperoleh perhitungan sebagai berikut :

$$AC = \frac{0,43 (726,6) 3 (1)}{5,66 \cdot 10^4 (1) 0,0025}$$

$$= 6,624 \text{ mg/gram ekstrak pigmen bunga } C. cristata$$

100 gram bunga segar = 1830 mg ekstrak pigmen bunga *C. cristata*

6,624 mg amarantin = 1 gram ekstrak pigmen bunga *C. cristata*

maka, diperoleh perhitungan sebagai barikut :

$$100 \text{ gram bunga segar} = 1,83 \times 6,624 \text{ mg amarantin} \\ = 12,122 \text{ mg amarantin}$$

Pada dosis efektif (ED50) sebesar **1246 mg/Kg BB**, maka :

$$1246 \text{ mg} = 1000 \text{ gram}$$

$$12,46 \text{ mg} = 10 \text{ gram}$$

$$247,6 \text{ mg} = 30 \text{ gram}$$

Jika berat mencit rata-rata 30 gram, maka mengandung **247,6 mg** pigmen betasianin

Lampiran 6. Rata-rata derajat parasitemia setelah pemberian ekstrak bunga *C.cristata*

Tabel L.2 Rata-rata derajat parasitemia setelah pemberian ekstrak bunga *C.cristata*

Perlakuan	Lama pemaparan			
	0 hari (P%±SD)	3 hari (P%±SD)	5 hari (P%±SD)	7 hari (P%±SD)
Kontrol Positif	6,13±1,06	24,9±4,86	40,43±18,6	59,13±15,9
Kontrol negatif (aquades)	5,43±0,51	26,23±6,76	35,2±6,60	52,7±6,71
Artemisin 0,04 mg/Kg BB	7,53±1,45	0,07±0,06	0±0,0	0±0,0
C.cristata 100 mg/Kg BB	5,6±0,56	16,93±4,56	22,07±2,86	41,5±11,73
C.cristata 300 mg/Kg BB	5,13±0,15	17,27±5,95	27,4±14,22	39,97±9,76
C.cristata 500 mg/Kg BB	6,53±1,72	20,53±1,30	32,4±0,24	39,5±0,66
C.cristata 700 mg/Kg BB	5,33±0,42	18±7,86	22,97±8,92	37,57±15,51
C.cristata 900 mg/Kg BB	5,2±0,26	15,57±2,46	21,37±1,79	32,6±6,86

Lampiran 7. Uji normalitas data persentase penghambatan

NPar Tests

One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

		Pengham batan
N		21
Normal Parameters ^{a,b}	Mean	39,4765
	Std. Deviation	28,28576
Most Extreme Differences	Absolute	,250
	Positive	,250
	Negative	-,126
Kolmogorov-Smirnov Z		1,147
Asymp. Sig. (2-tailed)		,144

a. Test distribution is Normal.

b. Calculated from data.

Lampiran 8. Analisis Ragam dan Uji Tukey Persentase penghambatan

Univariate Analysis of Variance

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: Penghambatan

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	15641,178 ^a	8	1955,147	65,081	,000
Intercept	32726,296	1	32726,296	1089,354	,000
Perlakuan	15340,529	6	2556,755	85,106	,000
Hari	300,649	2	150,325	5,004	,026
Error	360,503	12	30,042		
Total	48727,978	21			
Corrected Total	16001,681	20			

a. R Squared = ,977 (Adjusted R Squared = ,962)

Post Hoc Tests

Perlakuan

Homogeneous Subsets

Pemaparan 3 hari

Tukey HSD

perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
kontrol negatif	3	-5,3548	
ekstrak pigmen 500 mg/Kg BB	3	17,5368	
ekstrak pigmen 700 mg/Kg BB	3	27,7108	
ekstrak pigmen 300 mg/Kg BB	3	30,6560	
ekstrak pigmen 100 mg/Kg BB	3	31,9946	
ekstrak pigmen 900 mg/Kg BB	3	37,4833	
Artemisin 0,04 mg/Kg BB	3		99,7323
Sig.		,185	1,000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Penghambatan pemaparan 5 hari

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
kontrol negative	3	12,9359	100,0000 1,000
ekstrak pigmen 500 mg/Kg BB	3	19,8556	
ekstrak pigmen 300 mg/Kg BB	3	33,0530	
ekstrak pigmen 700 mg/Kg BB	3	43,1907	
ekstrak pigmen 100 mg/Kg BB	3	45,4201	
ekstrak pigmen 900 mg/Kg BB	3	47,1515	
Artemisin 0,04 mg/Kg BB	3		
Sig.		,251	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Penghambatan pemaparan 7 hari

Tukey HSD

Perlakuan	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
kontrol negative	3	10,8743	100,0000 1,000
ekstrak pigmen 100 mg/Kg BB	3	29,8023	
ekstrak pigmen 300 mg/Kg BB	3	32,4165	
ekstrak pigmen 500 mg/Kg BB	3	33,1940	
ekstrak pigmen 700 mg/Kg BB	3	36,4581	
ekstrak pigmen 900 mg/Kg BB	3	44,8672	
Artemisin 0,04 mg/Kg BB	3		
Sig.		,159	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3,000.

Lampiran 9. Analisis data penghambatan melalui uji Korelasi

Correlations pemaparan 3 hari

		perlakuan	penghambatan
perlakuan	Pearson Correlation	1	,681(**)
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	21	21
penghambatan	Pearson Correlation	,681(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	21	21

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations pemaparan 5 hari

		penghambatan	perlakuan
penghambatan	Pearson Correlation	1	,660(**)
	Sig. (2-tailed)		,001
	N	21	21
perlakuan	Pearson Correlation	,660(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,001	
	N	21	21

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Correlations pemaparan 7 hari

		perlakuan	penghambatan
perlakuan	Pearson Correlation	1	,751(**)
	Sig. (2-tailed)		,000
	N	21	21
penghambatan	Pearson Correlation	,751(**)	1
	Sig. (2-tailed)	,000	
	N	21	21

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

Lampiran 10. Keterangan Kelaikan Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN FAKULTAS KEDOKTERAN UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KETERANGAN KELAIKAN ETIK ("ETHICAL CLEARANCE")

No. 0290 / EC / KEPK-S1-JK / 10 / 2010

Setelah Tim Etik Penelitian Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya mempelajari dengan seksama rancangan penelitian yang diusulkan :

Judul : Potensi Pigmen Betalain Ekstrak Bunga Jengger Ayam (*Celosia cristata*) Terhadap Penurunan Derajat Parasitemia *Plasmodium berghei*

Peneliti : Aziza Silvy H

NIM : 0610910012

Unit / Lembaga : Jurusan Biologi Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang

Tempat Penelitian : Laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang

Maka dengan ini menyatakan bahwa penelitian tersebut telah memenuhi syarat atau laik etik.

Malang, 08 OCT 2010



Koordinator Divisi I,

Prof. Dr. Teguh W. Sardjono, DTM&H, MSc, SpPark
MIP-19520410 198002 1 001