AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) TERHADAP *Plasmodium falciparum* 3D7 SECARA *IN VITRO*

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kefarmasian

Oleh:
Retno Pratiwi
NIM 135070500111011

PROGRAM STUDI SARJANA FARMASI
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*)

TERHADAP *Plasmodium falciparum* 3D7 SECARA *IN VITRO*

Oleh:

Retno Pratiwi

Telah diuji pada:
Hari : Jumat
Tanggal : 5 Juli 2019
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji – I

Ema Pristi Yunita, S. Farm., M. Farm. Klin., Apt.
NIK.2012058602282001

Penguji – II/ Pembimbing I,

Dr. Dra. Sri Winarsih, M. Si., Apt.
NIP. 195406231981032001

Penguji – III/ Pembimbing II,

Uswatun Khasanah, M Farm., Apt.
NIK. 2011068512222001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

Alvan Febrian Shalas, S. Farm., M. Farm., Apt.
NIK. 2011068502181001

repository.ub.ac.id

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Retno Pratiwi

NIM : 135070500111011

Program Studi : Program Studi Sarjana Farmasi

Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambil-alihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 11 Juli 2019

Yang membuat pernyataan,

(Retno Pratiwi)

NIM. 135070500111011

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

Kata Pengantar

Assalamualaikum Wr. Wb.

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas berkat rahmat- Nya penulis dapat menyelesaikan proposal tugas akhir yang berjudul "AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) TERHADAP *Plasmodium faliparum* 3D7 SECARA *IN VITRO*".

Tidak lupa penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada:

1. Ayah dan ibu saya, Bapak I Dewa Gede Tjahjadi, Ibu Festi Wahyu Nuraini, dan adik saya Widia Anggraeni yang setiap waktu menemani penulis serta memberi dukungan psikologi dan kasih sayang.
2. Ibu Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt. selaku dosen pembimbing pertama, Ibu Uswatun Khasanah, S. Farm., M. Farm, Apt., sebagai dosen pembimbing kedua atas kesabarannya dalam membimbing dan mengarahkan penulis dari awal proses pembuatan naskah hingga penyusunan naskah selesai.
3. Ibu Ema Pristi Yunita, S. Farm., M. Farm. Klin., Apt. selaku penguji yang telah menyempatkan untuk hadir dan memberi masukan dalam penyusunan Tugas Akhir saya.
4. Bapak Alvan Febrian Shalas, S. Farm., M. Farm., Apt. selaku Ketua Program Studi beserta seluruh dosen Program Studi Sarjana Farmasi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya
5. Mia Nur Diana, Widya Lukitasari, Dian Abril, Rodyah, Feziah dan Rizcha Anastasia atas bantuan berupa infomasi, dukungan, dan semangat.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

6. Teman-teman farmasi 2013 FKUB yang mendukung, mengarahkan, dan menghibur saya selama proses penyusunan naskah dan berkas Tugas Akhir
7. dr. Dearisa Surya, Sp. Kj. atas bibingan konseling, motivasi, dan semangat yang telah diberikan.
8. Teman-teman komunitas *Bipolar Care* Indonesia sebagai teman berbagi cerita baik suka maupun duka.
9. Kepada semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu-persatu.

Pembuatan naskah ini tidak luput dari kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu saran dan kritik penulis harapkan agar kedepannya dapat memberikan kontribusi yang lebih baik.

Malang, 11 Juli 2019

Penulis

repository.ub.ac.id

ABSTRAK

Pratiwi, Retno. 2019. **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt., (2) Uswatun Khasanah M.farm., Apt.

Indonesia masih memiliki daerah endemik penyakit malaria. *Plasmodium falciparum* merupakan parasit yang menjadi penyebab utama penyakit malaria. Daun *Mimosa pudica* mengandung flavonoid, terpenoid, dan alkaloid yang berpotensi sebagai antimalaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan aktivitas antimalaria ekstrak etanol 96% daun *M. pudica* dengan klorokuin. Plasmodium dikultur menggunakan metode Trager dan Jensen yang telah dimodifikasi. Persen parasitemia awal yang digunakan untuk pengujian adalah 1%. Persen parasitemia dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya. Persen hambatan dihitung dengan membandingkan persen pertumbuhan dengan kontrol negatif. Aktivitas antimalaria ditentukan dengan nilai IC_{50}. Hasil korelasi Spearman antara konsentrasi ekstrak dengan persen parasitemia dan persen hambatan menunjukkan korelasi yang kuat ($p = 0,000$) dengan nilai r berturut-turut -0,960 dan 0,960. Hasil korelasi Spearman antara konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia dan persen hambatan menunjukkan korelasi yang kuat ($p = 0,000$) dengan nilai r berturut-turut -0,985 dan 0,985. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka persen parasitemia semakin menurun dan persen hambatan pertumbuhan semakin meningkat. Berdasarkan analisis probit, dapatkan nilai IC_{50} ekstrak sebesar 0,080 ± 0,045 µg/mL dan IC_{50} klorokuin 0,062 ± 0,08 µg/mL. Tidak terdapat perbedaan antara aktivitas antimalaria ekstrak etanol *M. pudica* dengan klorokuin (t test, $p = 0,754$). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *M. pudica* memiliki aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 .

Kata kunci: *Mimosa pudica*; *Plasmodium falciparum*; antimalaria.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

ABSTRACT

Pratiwi, Retno. 2019. ***In Vitro* Antimalarial Activity of *Mimosa pudica* Extract against *Plasmodium falcifarum* 3D7**. Final Project, Pharmacy Study Program Faculty of Medicine, Brawijaya University. Advisor: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt. (2) Uswatun Khasanah M.farm., Apt.

There are several endemic areas of malarial infection in Indonesia. *Plasmoodium falciparum* is the main cause of malarial infection. *Mimosa pudica* leaves contain flavonoids, terpenoids, and alkaloids that have the potential to be developed as antimalarial agents. The aim of this study was to determine antimalarial activity of ethanol extract of *M. pudica* leaves compared to chloroquine. Plasmodium culture was carried out using Trager and Jensen with modification. *P. falciparum* with 1% initial parasitemia percentage was used as antimalarial test. Parasitemia percentage was observed under light microscope. Inhibition percentage and IC_{50} were calculated. Result of Pearson correlation of extract concentrations between percent parasitemia and percent inhibition showed a strong correlation ($p = 0.000$) with r values -0.960 and 0.960 respectively. Result of Pearson correlation of chloroquine concentration between percent parasitemia and growth inhibition showed a strong correlation ($p = 0.000$) with r values -0.985 and 0.985 respectively. The values of percent parasitemia decrease as the values of concentration increase while the values of percent inhibition increase as the values of concentration increase. Based on probit analysis, IC_{50} *M. pudica* extract was 0.080 ± 0.045 µg/mL and IC_{50} chloroquine was 0.062 ± 0.08 µg / mL. There was no difference of antimalarial activity between extract and chloroquine (t test, $p = 0.754$). It can be concluded that *M. pudica* extract has antimalarial activity against *P. falciparum* 3D7.

Keywords: *Mimosa pudica; Plasmodium falciparum*; antimalarial.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR ISI

Halaman

HALAMAN JUDUL i

HALAMAN PENGESAHAN ii

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN iii

KATA PENGANTAR iv

ABSTRAK (BAHASA INDONESIA) vi

ABSTRACT (BAHASA INGGRIS) vii

DAFTAR ISI viii

DAFTAR TABEL xiii

DAFTAR GAMBAR xiv

DAFTAR LAMPIRAN xv

DAFTAR SINGKATAN xv

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang 1

1.2 Rumusan Masalah 5

1.2.1 Sub Masalah 5

1.3 Tujuan Penelitian 5

1.3.1 Tujuan Umum 5

1.3.2 Tujuan Khusus 5

1.4 Manfaat Penelitian 6

1.4.1 ManfaatAkademik 6

1.4.2 Manfaat Praktis 6

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*)..... 7

2.1.1 Taksonomi 7

2.1.2 Morfologi 8

2.1.3 Aktivitas Farmakologi Putri Malu (*Mimosa pudica*) 9

2.1.4 Kandungan Metabolit Sekunder Putri Malu (*M. pudica*).....11

2.1.5 Mekanisme Antimalaria 11

2.1.5.1 Flavonoid 11

2.1.5.2 Terpenoid 12

2.1.5.3 Alkaloid 12

2.2 Ekstraksi 13

2.2.1 Ekstrak 14

2.2.2 Metode Ekstraksi 15

2.2.2.1 Maserasi 16

2.2.2.2 Perkolasi 16

2.2.2.3 Sokhlet 17

2.2.2.4 Sonikasi 17

2.2.2.5 MAE 18

2.3 Penyakit Malaria 19

2.3.1 Pengertian..... 19

2.3.2 Epidemiologi 19

2.3.3 Etiologi.....20

2.3.4 Patogenesis 20

2.3.5 Manifestasi Klinis 22

2.3.6 Obat Antimalaria 23

2.3.7 Resistensi Obat Antimalaria 25

2.4 *Plasmodium falciparum* 26

2.4.1 Taksonomi 26

2.4.2 Morfologi 27

2.4.3 Siklus Hidup..... 28

2.4.3.1 Fase Aseksual 29

2.4.3.2 Fase Seksual 29

2.5 Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro* 30

2.5.1 Uji Secara Visual (*WHO Microtest*) 30

2.5.2 Uji dengan Metode Radioisotop 31

2.5.3 Uji dengan Metode Non-radioaktif 31

BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian 34

3.2 Uraian Kerangka Konsep 35

3.3 Hipotesis Penelitian 36

BAB IV METODE PENELITIAN

4.1 RancanganPenelitian 37

4.2 VariabelPenelitian 37

4.2.1 Variabel Bebas 37

4.2.2 Variabel Tergantung 37

4.2.3 Kontrol positif dan kontrol negatif 37

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian 38

4.4 Bahan dan Alat Penelitian 38

4.4.1 Bahan Uji 38

4.4.2 Parasit Malaria 38
4.4.3 Bahan Uji Aktivitas *In Vitro* 38
4.4.4 Alat Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro* 39
4.5 Definisi Operasional 39
4.6 Prosedur Penelitian 40
4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Putri Malu (*M. pudica*) 40
4.6.2 Pembiakan *Plasmodium falciparum* 41
4.6.3 Uji Aktivitas Antimalaria secara *In Vitro*.....45
4.6.4 Pembuatan Preparat dan Perhitungan Parasit.....46
4.6.5 Evaluasi Hasil Uji Aktivitas Antimalaria secara *In vitro* 47
4.7 Analisis Data 49
BAB V HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA
5.1 Hasil Ekstraksi 51
5.2 Uji Aktivitas Antimalaria 51
5.2.1 Kultur *P. falciparum 3D7* 52
5.2.2 Persen Parasitemia 54
5.2.3 Persen Hambatan Pertumbuhan 56
5.2.4 IC_{50} 58
5.3 Analisis Data 59
5.3.1 Analisis Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu (*M. pudica*) dan Klorokuin dengan Persen Parasitemia 59
5.3.2 Analisis Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Klorokuin dengan Persen Hambatan Pertumbuhan 59

5.3.3 Perbandingan IC_{50} Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dengan Klorokuin 60

BAB VI PEMBAHASAN

6.1 Ekstraksi Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) 61

6.2 Aktivitas Antimalaria 61

6.2.1 Kutur *P. falciparum* 61

6.2.2 Persen Parasitemia 63

6.2.3 Persen Hambatan Pertumbuhan 65

6.3 Mekanisme Antimalaria Ekstrak Daun Putri Malu (*M. pudica*) 66

6.4 Keterbatasan Penelitian 67

BAB VII KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan 68

7.2 Saran 68

Daftar Pustaka..... 69

repository.ub.ac.id

DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 2.1 Periode Inkubasi dan Demam pada Infeksi Malaria 22

Tabel 2.2. Penggolongan obat antimalaria berdasarkan lokasi kerja pada organel subseluler *Plasmodium* 24

Tabel 5.1 Persen Parasitemia D0 dan K- 54

Tabel 5.2 Persen Parasitemia $H_{48\ jam}$ 54

Tabel 5.3 Persen Hambatan Pertumbuhan $H_{48\ jam}$ 56

Tabel 5.4 Nilai IC_{50} 58

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*) 6

Gambar 2.2 Morfologi *P. falciparum* pada Hapusan Darah Tipis 27

Gambar 2.3 Siklus Hidup *Plasmodium 28*

Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian 34

Gambar 4.1 Mikroplat Uji Aktivitas Antimalaria 47

Gambar 4.2 Alur Penelitian 50

Gambar 5.1 Hasil Maserasi Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)..... 51

Gambar 5.2 Apusan Darah Tipis D0 sebelum Pengujian 52

Gambar 5.3 Apusan Darah Tipis K- $H_{48\ Jam}$.....53

Gambar 5.4 Apusan Darah Tipis U1 Konsentrasi 100µg/mL $H_{48\ Jam}$ 53

Gambar 5.5 Apusan Darah Tipis K+ Konsentrasi 10µg/mL $H_{48\ Jam}$ 53

Gambar 5.6 Diagram Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dengan Persen Parasitemia 55

Gambar 5.7 Diagram Hubungan Konsentrasi Klorokuin dengan Persen Parasitemia.....55

Gambar 5.8 Diagram Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dengan Persen Hambatan Pertumbuhan 57

Gambar 5.9 Diagram Hubungan Konsentrasi Klorokuin dengan Persen Hambatan Pertumbuhan 57

Gambar 5.10 Diagram IC_{50} Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Klorokuin 58

repository.ub.ac.id

DAFTAR LAMPIRAN

Halaman

Lampiran 1. Sertifikat Determinasi Tanaman Putri Malu.....73

Lampiran 2. Prosedur Thawing dan Pembiakan *P. falciparum*..... 74

Lampiran 3. Prosedur Sub Kultur 75

Lampiran 4. Alur Penelitian Sinkronisasi Kultur 76

Lampiran 5. Alur Penelitian Uji Aktivitas Antimalaria 77

Lampiran 6. Tabel Hasil Pengamatan 78

Lampiran 7. Analisis Statistik 79

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

DAFTAR SINGKATAN

ACT	: *Artemisinin–based Combination Therapy*
CDC	: *Centers for Disease Control and Prevention*
DEPKES RI	: Departemen Kesehatan Republik Indonesia
DMSO	: *Dimethyl Sulfoxide*
DNA	: *deoxyribonucleic acid*
FKUB	: Fakultas Kedokteran Universitas Brawiaya
HEPES	: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid*
IC	: *Inhibition Concentration*
ITD	:*Institute of Tropical Disease*
Kemenkes RI	: Kementerian Kesehatan Indonesia
M. pudica	: *Mimosa pudica*
NPMRD	: *Natural Product Medicine Research Development*
P. falciparum	: *Plasmodium falciparum*
RBC	: *Red Blood Cell*
Rpm	: *Revolution per minute*
RPMI	: *Roswell Park Memorial Institute*
SATREPS	: *Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development*
WHO	: *World Health Organization*

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

AKTIVITAS ANTIMALARIA EKSTRAK DAUN PUTRI MALU (*Mimosa pudica*) TERHADAP *Plasmodium falciparum* 3D7 SECARA *IN VITRO*

Oleh:

Retno Pratiwi

Telah diuji pada:
Hari : Jumat
Tanggal : 5 Juli 2019
dan dinyatakan lulus oleh:

Penguji – I

Ema Pristi Yunita, S. Farm., M. Farm. Klin., Apt.
NIK.201205860228200 1

Penguji – II/ Pembimbing I,

Dr. Dra. Sri Winarsih, M. Si., Apt.
NIP. 195408231981032001

Penguji – III/ Pembimbing II,

Uswatun Khasanah, M.Farm., Apt.
NIK. 201106851222200 1

Mengetahui,

Ketua Program Studi Sarjana Farmasi,

Alvan Febrian Shalas, S. Farm., M. Farm., Apt.
NIK. 201106850218100 1

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

ABSTRAK

Pratiwi, Retno. 2019. **Aktivitas Antimalaria Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi Farmasi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si., Apt., (2) Uswatun Khasanah M.farm., Apt.

Indonesia masih memiliki daerah endemik penyakit malaria. *Plasmodium falciparum* merupakan parasit yang menjadi penyebab utama penyakit malaria. Daun *Mimosa pudica* mengandung flavonoid, terpenoid, dan alkaloid yang berpotensi sebagai antimalaria. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan aktivitas antimalaria ekstrak etanol 96% daun *M. pudica* dengan klorokuin. Plasmodium dikultur menggunakan metode Trager dan Jensen yang telah dimodifikasi. Persen parasitemia awal yang digunakan untuk pengujian adalah 1%. Persen parasitemia dihitung secara visual dengan mikroskop cahaya. Persen hambatan dihitung dengan membandingkan persen pertumbuhan dengan kontrol negatif. Aktivitas antimalaria ditentukan dengan nilai IC_{50}. Hasil korelasi Spearman antara konsenterasi ekstrak dengan persen parasitemia dan persen hambatan menunjukkan korelasi yang kuat ($p = 0,000$) dengan nilai r berturut-turut -0,960 dan 0,960. Hasil korelasi Spearman antara konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia dan persen hambatan menunjukkan korelasi yang kuat ($p = 0,000$) dengan nilai r berturut-turut -0,985 dan 0,985. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak, maka persen parasitemia semakin menurun dan persen hambatan pertumbuhan semakin meningkat. Berdasarkan analisis probit, dapatkan nilai IC_{50} ekstrak sebesar 0,080 ± 0,045 µg/mL dan IC_{50} klorokuin 0,062 ± 0,08 µg/mL. Tidak terdapat perbedaan antara aktivitas antimalaria ekstrak etanol *M. pudica* dengan klorokuin (t test, $p = 0,754$). Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol *M. pudica* memiliki aktivitas antimalaria terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 .

Kata kunci: *Mimosa pudica*; *Plasmodium falciparum*; antimalaria.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

ABSTRACT

Pratiwi, Retno. 2019. ***In Vitro* Antimalarial Activity of *Mimosa pudica* Extract against *Plasmodium falcifarum* 3D7**. Final Project, Pharmacy Study Program Faculty of Medicine, Brawijaya University. Advisor: (1) Dr. Dra. Sri Winarsih, M.Si.,Apt. (2) Uswatun Khasanah M.farm., Apt.

There are several endemic areas of malarial infection in Indonesia. *Plasmoodium falciparum* is the main cause of malarial infection. *Mimosa pudica* leaves contain flavonoids, terpenoids, and alkaloids that have the potential to be developed as antimalarial agents. The aim of this study was to determine antimalarial activity of ethanol extract of *M. pudica* leaves compared to chloroquine. Plasmodium culture was carried out using Trager and Jensen with modification. *P. falciparum* with 1% initial parasitemia percentage was used as antimalarial test. Parasitemia percentage was observed under light microscope. Inhibition percentage and IC_{50} were calculated. Result of Pearson correlation of extract concentrations between percent parasitemia and percent inhibition showed a strong correlation ($p = 0.000$) with r values -0.960 and 0.960 respectively. Result of Pearson correlation of chloroquine concentration between percent parasitemia and growth inhibition showed a strong correlation ($p = 0.000$) with r values -0.985 and 0.985 respectively. The values of percent parasitemia decrease as the values of concentration increase while the values of percent inhibition increase as the values of concentration increase. Based on probit analysis, IC_{50} *M. pudica* extract was 0.080 ± 0.045 µg/mL and IC_{50} chloroquine was 0.062 ± 0.08 µg / mL. There was no difference of antimalarial activity between extract and chloroquine (t test, $p = 0.754$). It can be concluded that *M. pudica* extract has antimalarial activity against *P. falciparum* 3D7.

Keywords: *Mimosa pudica; Plasmodium falciparum*; antimalarial.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Penyakit malaria merupakan infeksi parasit menular yang umum terjadi pada daerah tropis dan subtropis. Penyakit ini disebabkan oleh infeksi protozoa genus *Plasmodium* yang penularannya diperantarai oleh nyamuk *Anopheles*. Spesies Plasmodium yang menyebabkan malaria yaitu *Plasmodium falciparum, Plasmodium vivax, Plasmodium ovale, Plasmodium malaria*, dan *Plasmodium knowlesi*. Berdasarkan WHO (2017), pada akhir tahun 2016 terdapat sekitar 216 juta kasus malaria di seluruh dunia. Sebanyak 90% kasus terjadi di daerah Afrika, 7% di Asia Tenggara, dan 2% di daerah Mediterania. Pada akhir tahun 2016 diperkirakan terjadi 445.000 kematian akibat penyakit malaria di seluruh dunia dimana 27.000 kematian berasal dari Asia Tenggara. Sebanyak 66% dari kasus malaria di Asia Tenggara disebabkan oleh *Plasmodium falciparum.*

Tahun 2016, angka kematian akibat infeksi malaria di Indonesia sebanyak 161 jiwa (WHO, 2017). *Annual Paracyte Incidence* (API) atau Angka kejadian malaria per 1000 penduduk Indonesia yang paling tinggi berada di Provinsi Papua yaitu sebanyak 39,93‰; disusul dengan Papua barat 10,20‰; Nusa Tenggara Timur 5,17‰, serta 3,83‰ di Provinsi Maluku (Kemenkes RI, 2017).

Telah dilaporkan resistensi dari *Plasmodium* terhadap obat atimalaria yang telah tersebar pada daerah endemik. Resistensi *P. falciparum* terhadap klorokuin di Indonesia telah dilaporkan sejak tahun 1973 di Kalimantan Timur dan kian meluas ke daerah sekitarnya (Yusuf, 2015). Meskipun demikian terdapat

laporan bahwa klorokuin masih bisa digunakan terhadap *Plasmodium falciparum* yang sensitif klorokuin di luar daerah endemik. Selain itu sensitivitas *P. falciparum* terhadap klorokuin kembali meningkat setelah penghentian penggunaan klorokuin pada suatu daerah dihentikan selama beberapa tahun (Torres *et al.,* 2003; Mekonnen *et al.,* 2014).

Saat ini WHO merekomendasikan artemisinin sebagai antimalaria lini pertama. Namun antimalaria seperti klorokuin dan artemisinin memiliki beberapa kelemahan antara lain proses sintesis yang rumit, biaya produksi yang mahal, dan timbulnya efek samping pada tubuh termasuk mempengaruhi perkembangan janin. Salah satu usaha yang dapat dilakukan untuk mengatasi hal tersebut adalah dengan mengembangkan antimalaria baru dengan memanfaatkan bahan tanaman yang relatif aman dan mudah didapat (Yusuf, 2015).

Tanaman telah menjadi sumber pengobatan untuk kesehatan manusia sejak dahulu kala dan analisa terhadap kandungan aktif tanaman masih terus dilakukan hingga saat ini. Telah diketahui bahwa tanaman kina (*chincona*) mengandung senyawa alkaloid quinin, quinidin, *chinchonine,* dan *cinchonidine* yang bersifat toksik terhadap *Plasmodium* (Yusuf, 2015).

Tanaman lain yang memiliki aktivitas antimalaria diantaranya adalah meniran hijau (*Phyllantus niruri*) dan putri malu (*Mimosa pudica*) dimana ekstrak metanol daunnya diuji secara *in vivo* terhadap tikus albino yang terinfeksi *Plasmodium berghei*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak *Phyllantus niruri* pada konsentrasi 800 mg/kg per hari selama empat minggu menghasilkan persen hambatan sebesar 60,8% terhadap parasit. Penggunaan ekstrak *Mimosa pudica* pada konsentrasi 800 mg/kg per hari selama empat

minggu menghasilkan persen hambatan sebesar 54,87% (Aarthi *et al.,* 2011; Widyawaruyati *et al.*, 2014).

Berdasarkan Widiawaruyati (2014), ekstrak etanol daun *Alectryon serratus* memiliki aktivitas antimalaria dengan IC_{50} 12,3 µg/mLpada *P. falciparum* 3D7 sensitif klorokuin. Penelitian oleh Adia (2016) menunjukkan bahwa galur plasmodium resisten klorokuin belum tentu memiliki ketahanan lebih tinggi terhadap suatu agen antimalaria baru dibandingkan dengan galur sensitif klorokuin. Ekstrak etil asetat hasil maserasi kulit batang *Zanthoxylum chalybeum* memiliki aktivitas antimalaria dengan IC_{50} 3,21 µg/mLterhadap *P. falciparum* galur sensitif klorokuin. Nilai IC_{50} ekstrak etil asetat kulit batang *Zanthoxylum chalybeum* adalah 0,57 µg/mLterhadap *P. falciparum* galur FCR_3 resisten klorokuin. Proses ekstraksi yang digunakan pada penelitian tersebut adalah maserasi karena memiliki tahapan yang sederhana dan tidak memerlukan panas.

Telah dilakukan *screening* fitokimia pada tanaman *Zanthoxylum chalybeum, Phyllantus niruri*, dan *Mimosa pudica* (putri malu), didapatkan bahwa ketiga tanaman tersebut memiliki kandungan metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antimalaria yaitu terpenoid, alkaloid, dan flavonoid (Aarthi *et al.,* 2011; Adia *et al.*, 2016). Senyawa terpenoid berperan dalam alterasi membran *Plasmodium* sehingga akan menghambat pertumbuhan plasmodium pada fase tropozoid. Senyawa flavonoid dapat mengganggu proses proses pembentukan hemozoin. Senyawa alkaloid berpotensi mengganggu proses pembentukan DNA (Desgrouas *et al.,* 2014; Widyawaruyati *et al.*, 2014).

Tanaman putri malu merupakan tanaman yang mudah didapat di Indonesia, biasanya putri malu berada diantara semak belukar dengan ciri khas memiliki daun yang peka terhadap sentuhan. Pada umumnya tanaman ini

dianggap sebagai tanaman rumput yang mengganggu atau invasif. Berdasarkan Ayurveda tanaman putri malu bermanfaat untuk mengatasi luka, disentri, asma bronkial, demam, *jaundice*, serta infeksi saluran kemih (Joseph *et al.,* 2013).. Tanaman ini memiliki senyawa aktif yaitu mimosin, dimana mimosin termasuk senyawa alkaloid yang dapat menghambat replikasi DNA (Muhammad, 2012)

Metabolit sekunder dari ekstrak metanol daun putri malu memiliki efek farmakologi sebagai antibakteri terhadap bakteri gram negatif seperti *Esherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (KHM 250 mg/mL), *Bacillus subtilis* dan *Streptoccus pyogenes* (KHM 200 mg/ml), *Pseudomonas aeruginosa* (KHM 225 mg/mL) (Tomar *et al,* 2014). Selain itu tanaman ini juga memiliki efek analgesik antiinflamasi, hipolipidemik, hepatoprotektif, dan antioksidan (Joseph *et al*., 2013).

Belum banyak penelitian mengenai efek antimalaria tanaman putri malu. Penelitian yang dilakukan oleh Aarthi (2011) menggunakan *Plasmodium berghei,* jenis ini merupakan penyebab malaria pada rodensia (hewan pengerat) sehingga tidak berisiko terjadi penularan pada manusia. Adanya enzim *PfPMT* (*P. falciparum phosphoetanolamine N-methyltransferase*) menyebabkan *Plasmodium falciparum* dapat membentuk lapisan fosfolipid yang lebih banyak dibandingkan dengan *Plasmodium berghei* (Dechamps *et al.,* 2010).

Uraian di atas mendorong dilakukannya uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun putri malu terhadap *Plasmodium falciparum strain* 3D7 sensitif klorokuin.

1.2 Rumusan Masalah

1.2.1 Masalah Penelitian

Bagaimana aktivitas antimalaria dari ekstrak etanol daun putri malu (*Mimosa pudica*) terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7?

1.2.2 Sub Masalah

1. Apakah ekstrak etanol daun putri malu mampu menurunkan konsentrasi parasitemia?
2. Apakah ekstrak etanol daun putri malu mampu meningkatkan persen hambatan pertumbuhan?
3. Apakah aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun putri malu tidak berbeda dengan klorokuin?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

1. Mengetahui pengaruh ekstrak daun putri malu terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7.
2. Mengetahui ada tidaknya perbedaan aktivitas antimalaria ekstrak daun putri malu dibandingkan dengan klorokuin.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Menganalisis hubungan antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persen parasitemia.
2. Menganalisis hubungan antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persen hambatan.
3. Membandingkan IC_{50} dari ekstrak daun putri malu dengan klorokuin.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Manfaat akademik dari penelitian ini adalah menambah ilmu pengetahuan mengenai aktivitas antimalaria ekstrak daun putri malu sebagai dasar penelitian lebih lanjut untuk pengembangan antimalaria baru.

1.4.2 Manfaat Praktis

Manfaat praktis dari penelitian ini adalah memberikan informasi mengenai aktivitas antimalaria putri malu sebagai salah satu usaha untuk menanggulangi resistensi obat antimalaria.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tinjauan Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Gambar 2.1 Tanaman Putri Malu (*Mimosa pudica*) (Sumber: dokumentasi pribadi)

2.1.1 Taksonomi

Sub kingdom : Tracheobionta

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Familia : Fabaceae

Genus : *Mimosa*

Species : *Mimosa Pudica*

(Joseph *et al.,* 2013)

Putri malu dapat tumbuh di daerah beriklim tropis pada ketinggian 1 - 1200m di atas permukaan laut. Putri malu biasanya tumbuh liar di pinggir jalan

pada tempat yang terkena sinar matahari. Nama daerah putri malu antara lain padang getap (Bali), daun kaget-kaget (Manado), rebah bangun (Minangkabau); kucingan (Jawa); rondo kagit (Sunda) (Wandra, 2015).

2.1.2 Morfologi

Genus *Mimosa* biasanya memiliki duri pendek dan memiliki bulu halus pada cabangnya yang rendah. Putri malu dapat tumbuh tinggi sekitar 0,5 m dan menyebar lebih dari 0,3 m. Batangnya tegak, ramping, berduri dan memiilki banyak cabang. Daun putri malu adalah daun majemuk menyirip ganda (*bippinate*), daun berbentuk lonjong, seperti tanaman paku, berwarna hijau atau kemerahan dengan anak daun 15 - 25 pasang, panjang daun 9 - 12 mm dengan lebar 1,5 mm. Bunga berwarna merah muda, dan berbenrtuk seperti bola, memiliki putik berwarna kuning. Setiap tandan buahnya terdiri dari 2 - 8 buah yang berupa polong dengan ukuran 1,5 - 2,5 cm berwarna hijau remang dan berbulu halus. Akar tanaman ini terdiri dari 6 - 8 lapis sel gabus, korteks terdiri dari sel parenkim berdinding tebal (Varnika *et al,* 2012; Joseph *et al.,* 2013).

Putri malu memiliki ciri khas berupa gerak niktinasti dan seismonasti. Gerak niktinasti adalah gerakan dimana anak daun tanaman akan terlipat dan seluruh daun terkulai ke bawah lalu kembali terbuka saat matahari terbit. Seismonasti adalah gerakan ketika daun menutup akibat adanya stimulus berupa sentuhan atau getaran. Pergerakan tanaman tersebut disebabkan oleh berkurangnya tekanan pada sel tanaman ketika menerima rangsang. Respon daun yang terkulai merupakan gerakan perlindungan diri putri malu dari pengganggu karena tanaman akan terlihat seperti tanaman yang sudah mati (Dalimartha, 1999; Joseph *et al.,* 2013).

2.1.3 Aktivitas Farmakologi Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Berdasarkan pedoman pengobatan tradisional Ayurveda (India) dan Unani (Yunani), akar putri malu digunakan untuk mengangani demam, *jaundice*, kusta, disentri, infeksi vagina, radang, asma, vitiligo, serta *fatigue*. Dekokta akar putri malu dapat digunakan untuk mengurangi nyeri sakit gigi. Berdasarkan WHM (*Western Herbal Medicine*), tanaman ini digunakan di daerah barat untuk mengatasi insomnia, hemoroid, penyembuh luka, dan diare. Penggunaan putri malu jika dikonsumsi secara langsung dapat bersifat toksik sehingga konsumsinya tidak diekomendasikan bagi ibu hamil dan menyusui. Daun putri malu di negara Indonesia digunakan untuk mengatasi insomnia, keseluruhan tanaman digunakan untuk hematuria. Suku Wawonii di Sulawesi menggunakan tanaman ini sebagai sedatif (Joseph *et al.,* 2013; Bahtiar *et al.,* 2017).

Putri malu telah diketahui memiliki aktivitas farmakologis yang cukup luas, hal ini dapat disebabkan oleh senyawa bioaktif yang dikandungnya. Telah dilaporkan penggunaan bagian tanaman putri malu untuk mengobati berbagai penyakit. Berdasarkan Vinothapooshan (2010), salep yang dibuat dari ekstrak daun putri malu memiliki efek sebagai penyembuh luka. Ekstrak *M. pudica* dengan pelarut metanol memiliki potensi yang lebih tinggi (93,87%) dibandingkan ekstrak dengan pelarut kloroform (80,72%) dan dietil eter (70,76%) terhadap tikus albino selama 16 hari. Efek ini diakibatkan oleh adanya senyawa fitosterol, alkaloid, dan glikosida. ekstrak etanol daun putri malu memiliki fek anti-inflamasi terhadap tikus yang mengalami edema pada cakarnya dimana konsentrasi ekstrak 300 mg/kg memberikan hambatan secara signifikan (43,48%) setelah empat jam diberikan injeksi *carrageenan*. Hasil serupa dengan

menggunakan natrium diklofenak yang memiliki hambatan inflamasi 50,31% (Muhammad, 2016).

Tanaman putri malu juga diteliti mengenai efek antioksidan. Hasil uji mengindikasikan bahwa ekstrak etanol tanaman memiliki efek antioksidan yang baik (IC_{50} 19 *µ*g/mL) dibandingkan dengan antioksidan standard vitamin C (IC_{50} 5,2 *µ*g/mL). Ekstrak metanol daun putri malu diberikan pada tikus wistar albino yang diinduksi hepatitis. Hasil menyimpulkan bahwa ekstrak dapat meningkatkan konsentrasi bilirubin, SGOT, SGPT. Daun putri malu yang diekstrak dengan pelarut kloroform memiliki aktivitas hipolipidemik pada tikus wistar albino karena terjadi penurunan konsentrasi trigliserida, penurunan LDL, serta peningkatan HDL (Muhammad, 2016).

Tanaman putri malu juga memiliki efek anti plasmodial. Senyawa yang berperan antara lain flavonoid, terpenoid, dan alkaloid. Senyawa terpenoid berperan dalam alterasi membran *Plasmodium* sehingga akan menghambat *intake* sehingga menghambat perkembangan fase tropozoid, senyawa flavonoid dapat mengganggu proses pembentukan hemozoin pada vakuola makanan, senyawa alkaloid berpotensi merusak keutuhan membran plasmodium (Desgrouas *et al.,* 2014; Widyawaruyati *et al.*, 2014). Ekstrak metanol daun *Mimosa pudica* diuji secara *in vivo* terhadap tikus albino yang terinfeksi *Plasmodium berghei*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak *Mimosa pudica* pada konsentrasi 800 mg/kg per hari selama empat minggu menghasilkan persen hambatan sebesar 54,87% (Aarthi *et al.,* 2011).

Metabolit sekunder dari ekstrak metanol daun putri malu memiliki efek farmakologi sebagai antibakteri dengan merusak DNA dan membran sel bakteri. Penelitian telah dilakukan terhadap bakteri *Esherichia coli* dan *Staphylococcus*

aureus (KHM 250 mg/ml), *Bacillus subtilis* dan *Streptoccus pyogenes* (KHM 200mg/ml), dan *Pseudomonas aeruginosa* (KHM 225 mg/ml) (Tomar *et al,* 2014).

2.1.4 Kandungan Metabolit Sekunder Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Ekstrak tanaman putri malu mengandung minyak lemak berwarna kuning-hijau dengan persentase diatas 17%, terdapat senyawa dimetil ester krosetin yang bermanfaat untuk mengatasi gangguan pernapasan. Akarnya mengandung tannin dengan persentase diatas 10%, biji putri malu mengandung mucilago yang tersusun atas *d-xylose* dan asam d-glukoronat. Telah dilaporkan bahwa tanaman ini memiliki fitohormon turgorin yang berfungsi untuk mengatur gerak niktinasti tanaman. Senyawa 4-α-(b-D-glukopiranosil-6-sulfat) asam galat pada daunnya berperan dalam pergerakan seismonasti. Hasil *screening* fitokimia ekstrak daun putri malu menunjukkan adanya senyawa komponen bioaktif seperti terpenoid, mimosin, flavonoid, glikosida, alkaloid, kuinin, fenol, tannin, saponin, dan kumarin (Joseph *et al.,* 2013).

2.1.5 Mekanisme Antimalaria

2.1.5.1 Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan senyawa fenol yang kerangkanya terdiri atas 15 atom karbon (C_6-C_3-C_6) dengan dua cincin benzena. Contoh senyawa flavonoid yang memiliki efek antimalaria antara lain genistein, kaempferol, luteolin, mirisetin, serta kuersetin (Chetia *et al*., 2015).

Beberapa senyawa flavonoid yang diisolasi dari kulit batang *Artocarpus champeden* (cempedak) memiliki aktivitas antimalaria terhadap *P. falciparum* 3D7, senyawa tersebut antara lain Artokoarpon A (IC_{50} = 0,0066 µg/ml), Artokarpon B (IC_{50} = 0,0800 µg/ml), dan heteroflavanon C (IC_{50} = 0,0006 µg/ml) (Widyawaruyanti *et al*., 2011).

Sel eritrosit yang terinfeksi akan mengalami peningkatan permeabilitas terhadap zat yang dibutuhkan parasit, proses ini diperantarai oleh jalur permeasi baru (*New Permeation Pathhway,*NPP). Flavonoid bekerja pada jalur permeasi baru sehingga menghambat masuknya nutrisi parasit saat stadium intraeritrositik. Flavonoid juga bekerja pada vakuola makanan parasit dengan menghambat proses detoksifikasi heme (Widyawaruyanti et al., 2011).

2.1.5.2 Terpenoid

Terpenoid tersusun dari satu unit isopren atau gabungan llebih dari satu unit isopren (C_5H_8) (Sastrahidayat, 2014). Berdasarkan Widyawaruyati (2014), ekstrak batang *Barringtonia asiatica* (keben) dan ekstrak daun *Dysoxylum gadichaudanum* (kedoya) mengandung terpenoid dengan persen penghambatan 53% dan 40,1% pada *Plasmodium falciparum* 3D7. Konstituen lain seperti alkaloid, polifenol, flavonoid, dan antrakuinon tidak teridentifikasi pada kedua ekstrak tersebut. Hal ini menunjukkan bahwa senyawa terpenoid juga berpotensi sebagai antimalaria. Terpenoid bekerja dengan menghambat pertumbuhan fase plasmodium dari ring menuju tropozoit dan menghambat masuknya nutrisi ke dalam parasit melalui jalur permeasi.

2.1.5.3 Alkaloid

Alkaloid adalah senyawa basa nitrogen dimana struktur antara alkaloid satu dengan yang lain berbeda-beda meskipun berada dalam satu golongan. Umumnya senyawa alkaloid memiliki prekursor dari asam amino seperti mimosin yang merupakan derivat dari lysin. Penelitian yang dilakukan oleh Naughton (2006) mengemukakan bahwa mimosin dapat digunakan untuk sinkronisasi plasmodium karena memiliki efek penghambatan yang reversibel terhadap proses pembelahan sel pada fase S (replikasi DNA) sehingga pembentukan

skizon dari tropozoid terhambat. Alkaloid dari tanaman kina seperti quinine, quinidine, cinchonine dan cinchonidine telah dilaporkan bersifat toksik terhadap parasit malaria. Mekanisme kuinin dan kuinidin sebagai antimalaria masih belum diketahui dengan pasti namun terdapat penelitian yang menyatakan bahwa efek antimalaria senyawa tersebut disebabkan karena inhibisi proses digesti hemoglobin, mengganggu replikasi DNA, dan mengganggu proses pembentukan hemozoin. Alkaloid golongan 4-aminokuinolin berperan dalam menghambat proses detoksifikasi heme (Pacifici, 2018; Hill, *et al.,* 2018).

Penelitian lain terhadap senyawa alkaloid yang memiliki efek antimalaria antara lain senyawa bisbenzilisokuinolin. Senyawa yang termasuk bisbenzilisokuin seperti tetrandin dan furniferin memiliki nilai IC_{50} kurang dari 1μM terhadap *Plasmodium falciparum* galur multiresisten (Nindatu, 2008). Terdapat dua hipotesis mengenai mekanisme antimalaria bisbenzilisokuinolin yaitu merusak membran parasit dan dengan memodulasi P-glikoprotein sehingga akan menghambat pengeluaran senyawa yang bersifat racun terhadap parasit (Desgrouas *et al.,* 2014).

2.2 Ekstraksi

Ekstraksi adalah proses penarikan senyawa kimia dari tanaman atau hewan dengan pelarut (*menstruum*) yang sesuai. Senyawa kimia tersebut dipisahkan dari residu berupa komponen yang inert atau inaktif menggunakan proses ekstraksi standard. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk mendapatkan material yang berfungsi terapetik. Ekstrak yang didapatkan mengandung berbagai metabolit sekunder seperti alkaloid, glikosida, fenol, terpenoid, dan flavonoid. Ekstrak dapat dimanfaatkan sebagai obat dalam bentuk ekstrak cair atau tingtur, dapat juga dikembangkan lebih jauh menjadi tablet atau kapsul, atau

diraksinasi dan diisolasi sehingga diperoleh senyawa aktif tunggal yang berguna dalam pengobatan modern. (Handa *et al.,* 2008; Gupta *et al.,* 2012).

Pelarut yang banyak digunakan dalam ekstraksi adalah etanol (C_2H_5OH) dan metanol (CH_3OH). Kedua senyawa tersebut merupakan pelarut universal karena memiliki gugus polar (OH) dan gugus karbon non polar sehingga bisa menarik senyawa yang bersiat polar maupun non polar. Berdasarkan pertimbangan untuk mengurangi resiko toksisitas akut dan kronik dari alkohol, penggunaan etanol lebih dipilih dalam penelitian nutrisional atau penelitian medisinal yang akan diaplikasikan untuk makhluk hidup. Metanol memiliki toksisitas yang lebih tinggi dibandingkan etanol karena saat berada dalam tubuh manusia metanol memiliki tiga mekanisme metabolisme (sistem katalase H_2O_2, CYP2E1, alkohol dehidrogenase) yang akan menghasilkan asam format dan formaldehid yang dapat menyebabkan neurotoksik dan asidosis metabolik (Dhorokov, 2015) . Metanol dapat digunakan dengan syarat dalam pengujian sisa pelarut ekstrak memiliki hasil yang negatif terhadap methanol. Metanol adalah pelarut yang lebih baik dibandingkan dengan etanol karena dapat menarik senyawa polar yang lebih banyak (DEPKES RI, 2000).

2.2.1 Ekstrak

Ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari implisia nabati atau hewani dengan pelarut yang sesuai, kemudian semua atau hampir semua pelarut diuapkan dan massa atau serbuk yang tersisa diperlakukan sedemikian hingga memenuhi baku yang telah ditetapkan (DEPKES RI, 2014).

Pembagian ekstrak berdasarkan sifatnya berdasarkan Voight (1994) adalah sebagai berikut:

1. Ekstrak encer : ekstrak yang memiliki konsistensi seperti madu dan dapat dituang.
2. Ekstrak kental (*extractum spissum*): berupa sediaan liat dan tidak dapat dituang dengan kandingan air tidak lebih dari 30%.
3. Ekstrak kering (*extractum siccum*): ektrak yang setelah pelarutnya diuapkan memiliki konsistensi yang kering dan mudah digosokkan dengan kandungan kandungan air tidak lebih dari 5%.
4. Ekstrak cair (*extractum fluidum*): ekstrak dalam bentuk cairan sehingga dalam komposisi jamu terdiri atas satu bagian atau dua bagian ekstrak cair.

2.2.2 Metode ekstraksi

Metode ekstraksi secara umum terbagi atas ekstraksi yang menggunakan energi panas, ekstraksi dingin (tidak menggunakan panas), serta metode ekstraksi dipercepat (*accelerated*) (Azwanida, 2015).

Ekstraksi dingin lebih sesuai untuk metabolit sekunder yang tidak tahan panas untuk meminimalisir proses degradasi senyawa tersebut. Penelitian yang dilakukan terhadap ekstrak buah *sea buckthorn* (*Hippophae rhamnoides* L.) menunukkan bahwa pemanasan selama 25 menit pada suhu 60, 70, 80, 90 dan 100˚C menyebabkan penurunan konsentrasi flavonoid total sebanyak 77.91%, 79.46%, 81.52%, 86.33% dan 90.04%. (Ursache *et a.,* 2017). Hal ini menunjukkan bahwa temperatur merupakan faktor yang dapat mempengaruhi hasil ekstraksi.

2.2.2.1 Maserasi

Maserasi adalah teknik ekstraksi yang benyak digunakan dalam penelitian tanaman obat maupun dalam skala industri. Maserasi dilakukan dengan merendam ekstrak kasar atau serbuk pada wadah inert yang tertutup rapat pada suhu ruang dalam waktu minimal 3 hari dengan pengadukan atau agitasi yang sering. Perendaman suatu bahan dalam pelarut dapat melunakkan meningkatkan permeabilitas dinding sel dengan cara masuknya pelarut kedalam dinding sel tanaman atau pembengkakan sel, senyawa yang terdapat dalam dinding sel terlepas dan masuk ke dalam pelarut, lalu terjadi difusi senyawa yang terekstraksi keluar dari sel. Setelah 3 hari dilakukan pemisahan larutan dengan residu melalui filtrasi atau dekantasi. Kerugian dari metode maserasi adalah memakan banyak waktu, volume pelarut yang dibutuhkan banyak. Keuntungan metode maserasi adalah dapat mmenghindari rusaknya senyawa-senyawa yang tidak tahan terhadap suhu tinggi atau termolabil (Azwanida, 2015; Mukhriani, 2014).

2.2.2.2 Perkolasi.

Perkolasi menggunakan alat berupa perkolator yaitu wadah silinder dengan keran pada bagian bawah. Serbuk tanaman dimampatkan pada perkolator lalu dibasahkan secara perlahan mengunakan sedikit pelarut, perkolator ditutup lalu didiamkan sekitar 4 jam. Ditambahkan pelarut pada bagian atas perkolator dan didiamkan selama 24 jam. kemudian hasil ekstraksi diteteskan secara perlahan di bagian bawah. Perkolasi biasanya dilakukan pada kecepatan 6 tetes per menit. Pelarut baru ditambahkan hingga perkolat mencapai volume tiga perempat dari volume akhir yang dibutuhkan. Pelarut ditambahkan dalam perkolat hingga volume akhir tercapai. Kelebihan dari

metode ini adalah sampel selalu dialiri pelarut baru. Kerugiannya adalah pelarut akan sulit menjangkau seluruh area jika sampel dalam perkolator tidak homogen, metode ini membutuhkan banyak pelarut, dan memakan banyak waktu. (Handa *et al.,* 2008; Mukhriani,2014).

2.2.2.3 Sokhlet

Ekstraksi sokhlet dilakukan dengan cara serbuk simplisia ditempatkan pada kertas filter (*thimble*) di dalam aparatus sokhlet. Solven dipanaskan dari bagian bawah labu lalu solven menguap melewati sample menuju kondensor. Solven akan mengalami pengembunan dan menetes kembali ke sample sehingga terjadi kontak untuk ekstraksi. Proses ini berlangsung secara terus-menerus hingga tetesan solven dari tabung sifon tidak meninggalkan residu saat menguap. Keuntungan dari metode ini adalah proses ektraksi yang kontinyu, tidak membutuhkan banyak pelarut. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi, sample yang digunakan terbatas pada serbuk simplisia yang halus (Azwanida, 2015; Mukhriani,2014).

2.2.2.4 Sonikasi

Metode sonikasi atau *Ultrasound-assisted extraction* (UAE) menggunakan gelombang ultrasonik 20 kHz sampai 2000 kHz. Akan terbentuk gelembung kavitasi pada solven, gelembung tersebut akan pecah dan mennimbulkan gelombang kejut dan pancaran cairan pada dinding sel tanaman. Efek mekanik tersebut meningkatkan kontak solven dengan sample dan meningkatkan permeabilitas dinding sel. Hal ini akan memfasilitasi pelepasan senyawa dan mempercepat masuknya solven dalam sel tanaman. Prosedur ini dapat digunakan untuk skala besar dan skala kecil dengan biaya ukup rendah, proses ekstraksi lebih singkat (antara 30 menit hingga 12 jam), membutuhkan volume

solven lebih sedikit. Namun penggunaan gelombang ultrasonik lebih dari 20 kHz dapat berpengaruh pada senyawa kimia tanaman melalui pembentukan radikal bebas. Penggunaan metode sonikasi di lapangan memerlukan optimasi untuk menghasilkan mutu yang lebih baik (Jos *et al.,* 2011; Halfadji *et al.,* 2013)

2.2.2.5 MAE

Microwave assisted extraction (MAE) meruppakan metode ekstraksi menggunakan mikrowave untuk memfasilitasi partisi analit dari sample menuju solven. Radiasi mikrowave berinteraksi dengan dipol dari bahan polar dan bahan yang bisa terpolarisasi. Hal ini menyebabkan pemanasan didekat permukaan dari bahan dan panas dialirkan dengan konduksi. Rotasi dipol dari molekul terinduksi oleh gelombang mikro akan mengganggu ikatan hidrogen, meningkatkan penetrasi solven kedalam sel. Pada pelarut non polar, pemanasan yang buruk terjadi karena energi dialirkan melalui absorbsi dielektrik. MAE dapat digunakan sebagai metode selektif yang sesuai untuk molekul polar dan pelarut dengan konstantan dielektrik yang tinggi (Azwanida, 2015).

Keuntungan dari metode ini adalah waktu yang dibutuhkan lebih sigkat, volume solven yang dibutuhkan lebih rendah dari metode maserasi dan ekstraksi sokhlet. Metode ini kurang sesuai untuk senyawa yang rentan terhadap degradasi termal. Metode ini terbatas untuk molekul fenolat kecil seperti asam fenolat(asam galat dan asam elagat), quersetin, isoflavin, dan trans-resveratrol karena molekul ini stabil pada kondisi panas diatas 100°C selama 20 menit. Penambahan siklus dari MAE (dari 2 × 10 s menjadi 3 × 10 s) mengakibatkan penurunan fenolat dan flavanon karena terjadi oksidasi. Tanin dan antosianin tidak sesuai untuk MAE karena dapat mengalami degradasi pada suhu tinggi (Azwanida, 2015).

2. 3 Penyakit Malaria

2.3.1 Pengertian

Malaria merupakan infeksi parasit akibat gigitan nyamuk Anopheles betina yang mengandung *Plasmodium.* Plasmodium dapat hidup di dalam sel darah merah yang umumnya menimbulkan demam, hepatosplenomegali dan anemia. Penyakit ini dapat menyebabkan kematian bagi anak-anak maupun orang dewasa terutama pada masyarakat pada daerah endemik. (Kemenkes RI, 2013; WHO, 2015).

2.3.2 Epidemiologi

Berdasarkan *World Malaria Report*, pada akhir tahun 2016 tercatat bahwa infeksi malaria di sebanyak 216 juta kasus. Sebanyak 90% kasus malaria terjadi pada daerah Afrika, 7% kasus terjadi pada daerah Asia Tenggara, dan sisanya pada daerah Mediterania. Angka kematian akibat infeksi malaria di seluruh dunia mencapai 445.000 jiwa dari berbagai usia dimana 27.000 diantaranya berasal dari daerah Asia Tenggara. *Plasmodium falciparum* merupakan species yang dominan menginfeksi di daerah Asia Tenggara dengan prevalensi kasus sebesar 66% (WHO, 2017).

Pada tahun 2014 angka prevalensi infeksi *Plasmodium falciparum* di Indonesia mencapai 57%, sehingga dapat dikatakan bahwa *Plasmodium falciparum* adalah penyebab malaria yang dominan di Indonesia (WHO, 2015). Pada tahun 2016, jumlah kasus malaria di Indonesia atau *Annual Paracyte Incidence* (API) per 1000 penduduk yang paling tinggi berada di Provinsi Papua yaitu sebanyak 39,93‰; disusul dengan Papua barat 10,20‰; Nusa Tenggara Timur 5,17‰, serta 3,83‰ di Provinsi Maluku. (Kemenkes RI, 2017)

2.3.3 Etiologi

Penyebab utama dari penyakit malaria adalah adanya *Plasmodium* yang masuk ke aliran darah baik melalui gigitan nyamuk Anopheles, transfusi darah dari orang yang terinfeksi, ataupun penularan secara alamiah dari ibu hamil kepada janin yang dikandungnya (Agudelo, *et al.,* 2013)

Spesies *Plasmodium* yang menjadi agen penyakit malaria pada manusia antara lain *Plasmodium falciparum* penyebab malaria tropika*, Plasmodium vivax dan Plasmodium ovale* merupakan penyebab malaria tersiana. Kedua spesies ini memiliki siklus dorman dalam hepatosit dalam bentuk hipnozoit selama 3 - 45 minggu sebelum menginfeksi sel darah merah. *P. malariae* merupakan penyebab dari malaria kuartana yang prevalensinya lebih rendah daripada *P.vivax* dan *P. falciparum*. Species lain yang menyebabkan malaria yaitu *Plasmodium knowlesi yang* ditransmisikan secara zoonotik dari hewan primata ke manusia. Malaria ini berada pada daerah yang memiliki banyak hutan di Asia Tenggara terutama di Kalimantan (Kemenkes RI, 2013; WHO, 2015).

2.3.4 Patogenesis

Plasmodium yang berada pada fase eritrositik akan berkembang biak dalam sel darah merah. Ketika skizon pecah mengeluarkan merozoit ke aliran darah, sel-sel imun (makrofag, limfosit, monosit) akan mengaluarkan mediator inflamasi seperti *Tumor Necrosis Factor* (TNF) dan interleukin-6 (IL-6) pada aliran darah yang akan terbawa ke hipotalamus sehingga menyebabkan terproduksinya prostalglandin. Prostalglandin akan menyebabkan demam dengan menginisiasi pembentukan siklik adenosin monofosfat yang dapat mengubah *set point* suhu tubuh di hipotalamus serta menyebabkan respon

adaptif berupa menggigil dan vasokontriksi perifer (Ghanatti, *et al.,* 2013; Kemenkes RI, 2013).

Infeksi malaria juga dapat menimbulkan anemia. Anemia yang disebabkan oleh *P. falciparum* lebih berat daripada spesies lainnya karena *P. falciparum* menginfeksi semua jenis sel darah merah. *P. vivax* dan *P. ovale* hanya menginfeksi eritrosit muda (2% dari jumlah seluruh eritrosit), *P. malariae* hanya menginfeksi eritrosit tua (1% dari jumlah seluruh eritrosit). Eritrosit yang terinfeksi dan mengalami lisis akan mengeluarkan produk antara lain vakuola digestif dan hematin yang akan mengaktivasi komplemen dan memicu fragmen C3 untuk berdeposisi pada eritrosit yang tidak terinfeksi. Sehingga terjadi dekstruksi terhadap eritrosit yang tidak terinfeksi (Kemenkes RI, 2013; Lindorfer, *et al.,* 2016).

Splenomegali atau pembesaran limpa terjadi karena adanya respon imun terhadap parasit. Limpa merupakan organ tempat parasit dihancurkan oleh sel-sel imun. Antigen dari malaria akan menstimulasi limfosit B untuk memproduksi antibodi. Produksi antibodi menyebabkan sel-sel imun yang ada pada limpa semakin bertambah sehingga menyebabkan splenomegali (Kemenkes RI, 2013; Leoni, *et al.,* 2015).

Plasmodium falciparum dapat menyebabkan infeksi malaria berat karena memiliki patogenesis tersendiri yaitu adanya seskuestrasi. Seskuestrasi adalah proses penyabaran eritrosit terinfeksi ke pembuluh darah kapiler tubuh termasuk ke organ dalam dan otak. Terbentuk knob atau tonjolan pada permukaan eritrosit yang akan dikenali sebagai antigen. Antigen memicu sel-sel imun untuk mengeluarkan sitokin, hal ini menyebabkan terekspresinya reseptor endotel kapiler dan memicu sitoadherensi (perlekatan antara eritrosit terinfeksi dengan

endotel). Akibatnya terjadi sumbatan pada pembuluh kapiler dan terjadi iskemia jaringan (Kemenkes RI, 2013; Shorvon, *et al.,* 2011).

2.3.5 Manifestasi Klinis

Terdapat periode inkubasi dari parasit dimana pada masa tersebut gejala belum muncul walaupun parasit sudah masuk ke dalam tubuh manusia. Pada awal infeksi pasien mengalami gejala yang bersifat non-spesifik dan seperti penyakit flu. Lebih dari dua hari sebelum demam, pasien dapat mengalami gejala prodromal berupa malaise, anoreksia, kelelahan, pusing, sakit kepala, sakit punggung di bagian tulang punggung bagian bawah dan tulang ekor, pegal, mual, muntah, dan merasa kedinginan. Biasanya demam bersifat irregular disertai menggigil dan sedikit kedinginan. Setelah beberapa hari demam akan muncul pada periode tertentu tergantung dari fase skiogoni dan siklus aseksual parasit (Bartoloni, *et al.,* 2012).

Tabel 2.1 Periode Inkubasi dan Demam pada Infeksi Malaria (Kemenkes, 2013)

Plasmodium	Masa Inkubasi (rata-rata)	Periode Timbulnya Demam
P. falciparum	9-14 hari (12)	38-48 jam
P.vivax	12-17 hari (15)	48 jam
P. ovale	16-18 hari (17)	48 jam
P. malariae	18-40 hari (28)	72 jam

Masa inkubasi adalah rentang waktu sejak sporozoit masuk sampai timbulnya gejala klinis. Gejala klinis dari malaria umumnya adalah demam, anemia, dan splenomegali. Splenomegali dapat diketahui melalui pemeriksaan fisik dua minggu setelah timbulnya serangan. Limpa akan terasa nyeri dan mengalami pembengkakan. Meskipun jarang terjadi, komplikasi dari splenomegali menyebabkan rupturnya limpa, serta mengganggu fungsi liver. Konsentrasi Hb yang rendah pada pasien malaria menunjukkan bahwa pasien

mengalami anemia karena lisisnya eritrosit. Anemia menimbulkan manifestasi klinis berupa lemas, pusing, pucat, penglihatan kabur, jantung berdebar-debar, kurangnya nafsu makan (Bartoloni, *et al.,* 2012).

Malaria berat umumnya terjadi pada pasien dengan sistem imun rendah yang terinfeksi *P.falciparum*. Komplikasi malaria berat meliputi gangguan sistem syaraf pusat (malaria serebral), gangguan pernapasan, penyakit ginjal akut, dan/atau anemia berat. Progresi dari komplikasi dapat berlangsung dengan cepat sehingga akan berakibat fatal bagi pasien. Gejala klinis dari malaria berat antara lain gangguan kesadaran atau koma, kondisi umum lemah hingga pasien tidak mampu duduk atau berjalan tanpa dibantu, kejang lebih dari dua episode dalam 24 jam, sulit bernapas, hemoglobinuria, pendarahan spontan yang abnormal, edema pulmoner, ikterus disertai disfungsi organ vital, mengalami *shock* (tekanan darah sistolik < 70mmHg pada pasien dewasa dan < 50mmHg pada pasien anak (Bartoloni, *et al.,* 2012).

2.3.6 Obat Antimalaria

Soedarto (2012) mengelompokkan obat antimalaria berdasarkan aktivitasnya terhadap parasit yaitu gametosida (klorokuin, kuinin dan primakuin), skizontosida jaringan (primakuin dan pirimetamin), skizontosida darah (klorokuin, kuinin, meflokuin, halofantrin, pirimetamin).

Berdasarkan Muti'ah (2012), obat antimalaria dapat dikategorikan berdasarkan lokasi kerjanya di dalam organel sub-seluler *Plasmodium* yaitu pada sitosol, vakuola makanan, mitokondria, dan apikoplas (organel yang berperan dalam metabolisme asam lemak). Pengelompokkan tersebut disajikan pada Tabel 2.2.

Tabel 2.2. Penggolongan obat antimalaria berdasarkan lokasi kerja pada organel subseluler *Plasmodium* (Muti'ah, 2012; Brigford, *et al.,* 2018)

Lokasi	Contoh Obat	Jalur Mekanisme	Molekul Target
Sitosol	Primethamine, Proguanyl Sulfadoxine, dapsone	Metabolisme folat	Dihidrofolat reduktase Dihidroproteoat sintetase
Vakuola makanan	Klorokuin Artemisin	Polimerisasi heme Transport Protein	Hemozoin Proteasome
Mitokondria	Atovaquone	Transport elektron	Sitokrom oksidoreduktase
Apikoplas	Quinolone	Sintesis DNA	DNA gyrase

Klorokuin merupakan senyawa alkaloid aminokuinolin dengan mekanisme kerja menghambat detoksofikasi heme pada vakuola *P. falciparum*. Pengobatan malaria falsiparum sensitif klorokuin umumnya dilakukan pada daerah Amerika Tengah, Timur Tengah, dan Haiti. Pasien diberikan terapi klorokuin oral dengan inisial dosis 600 mg dilanjutkan dengan 300 mg pada jam ke 6, 24, dan 48. Untuk terapi profilaksis dapat diberikan 300 mg seminggu sekali. Efek samping klorokuin antara lain mual, muntah, diare, dan pada beberapa kasus dapat memicu psoriasis (CDC, 2019).

Pengobatan malaria di Indonesia saat ini dengan pemberian ACT(*Artemisinin–based Combination Therapy*) untuk meningkatkan efektifitas dan mencegah resistensi. Malaria tanpa komplikasi diobati dengan pemberian ACT secara oral. Satu tablet mengandung 40 mg dihidroartemisinin dan 320 mg piperakuin. Obat diberikan selama tiga hari secara peroral dengan dosis tunggal harian dihidroartemisinin 2 - 4 mg/kgBB dan piperakuin 16 - 32 mg/kgBB. Primakuin untuk malaria falsiparum hanya diberikan pada hari pertama saja dengan dosis 0,25 mg/kgBB. Pengobatan malaria pada ibu hamil sama dengan pengobatan pada orang dewasa namun tidak diberikan Primakuin karena bersifat teratogenik. Malaria berat diobati dengan injeksi artesunat intramuskular (dosis

2,4mg/kgbb) sebanyak 3 kali jam ke 0, 12, 24. Selanjutnya diberikan setiap 24 jam sehari sampai penderita mampu minum obat, dilanjutkan dengan ACT oral, dan primakuin sebagai gametosidal dan hipnozoidal (Kemenkes RI, 2017).

2.3.7 Resistensi Obat Antimalaria

Obat antimalaria yang digunakan saat ini memiliki target dan mekanisme kerja yang spesifik, adanya resistensi yang kian meluas menyebabkan obat antimalaria kehilangan efikasinya. Pada tahun 1957 terdapat laporan resistensi obat antimalaria klorokuin di perbatasan Thailand - Kamboja, Venezuela, Colombia, dan Port Moresby di Papua Nugini. Resistensi kemudian menyebar ke Afrika dengan adanya laporan resistensi klorokuin pada tahun 1988. Di Indonesia sendiri, resistensi *Plasmodium* falciparum terhadap klorokuin pertamakali dilaporkan pada tahun 1973 di Kalimantan Timur. Tahun 1967 Proguanil dan pirimetamin digunakan sebagai pengganti klorokuin namun terdapat laporan resistensi di Thailand pada tahun yang sama. Derivat artemisinin kemudian dikembangkan dan direkomendasikan sebagai obat lini pertama oleh WHO (Kemenkes RI, 2013; Yusuf,2015).

Penyebab utama resistensi adalah mutasi genetik pada satu titik atau multiplikasi pada gen tertentu parasit. Hal ini perlu diketahui terutama pada *P. falciparum* karena dapat menyebabkan malaria berat dan merupakan spesies yang paling banyak menginfeksi manusia. Resistensi klorokuin terjadi karena mutasi pada gen parasit antara lain *P.falciparum chloroquine transporter* (Pcrt) yang menyebabkan akumulasi klorokuin dalam vakuola makanan berkurang karena terjadi efflux atau uptake yang semakin rendah. Gen *P. falciparum multidrug resistance* 1 (Pfmdr1) akan mengurangi akumulasi dan meningkatkan efflux beberapa obat antimalaria seperti klorokuin, kuinin, meflokuin, artemisinin.

Resistensi parasit terhadap obat sulfadoksin-pirimetamin disebabkan oleh mutasi pada gen yang berperan pada jalur asam folat seperti *P. falciparum dihydropteroate synthase* (Pfdhps) dan *P. falciparum dihydrofolatereductase* (Pfdhfr) (Yusuf, 2015).

Hal mempengaruhi resistensi antara lain laju mutasi, kepatuhan terapi, ketahanan parasit, kekuatan obat, reinfeksi penyakit malaria terutama pada penduduk daerah endemik malaria. Usaha yang dapat dilakukan untuk mencegah penyebaran resistensi antara lain, mengurangi monoterapi, pemberian obat anti malaria setelah konfirmasi laboratorium, penggunaan obat kombinasi, dan pengembangan anti malaria baru (Yusuf, 2015).

2.4. *Plasmodium falciparum*

2.4.1 Taksonomi

Filum : Apikompleksa

Kelas : Aconoidasida

Ordo : Haemosporida

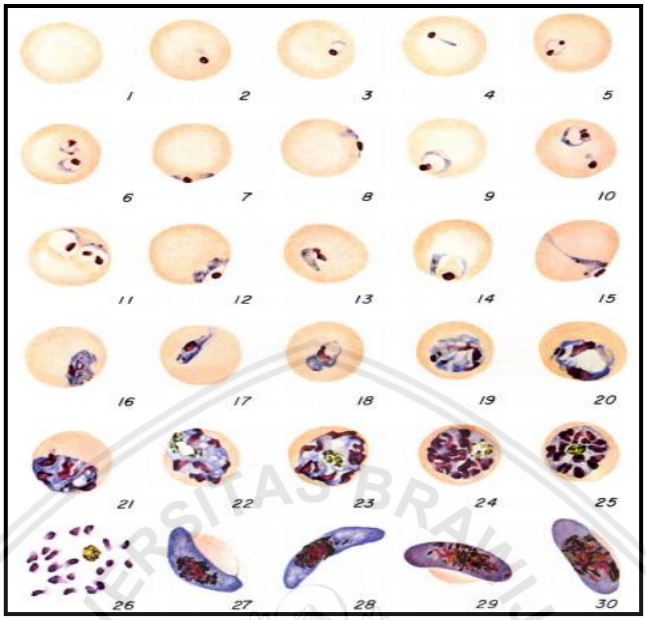
Familia : Plasmodiidae

Genus : *Plasmodium*

Species : *Plasmodium falciparum*

(Zeibig, 2013)

2.4.2 Morfologi



Gambar 2.2 Morfologi *P. falciparum* pada Hapusan Darah Tipis (CDC, 2017)

Keterangan: (1) sel eritrosit normal ;(2-18) perkembangan tropozoit; (19-26) skizon; (26) merozoit; (27-28) gametosit betina; (29-30) gametosit jantan

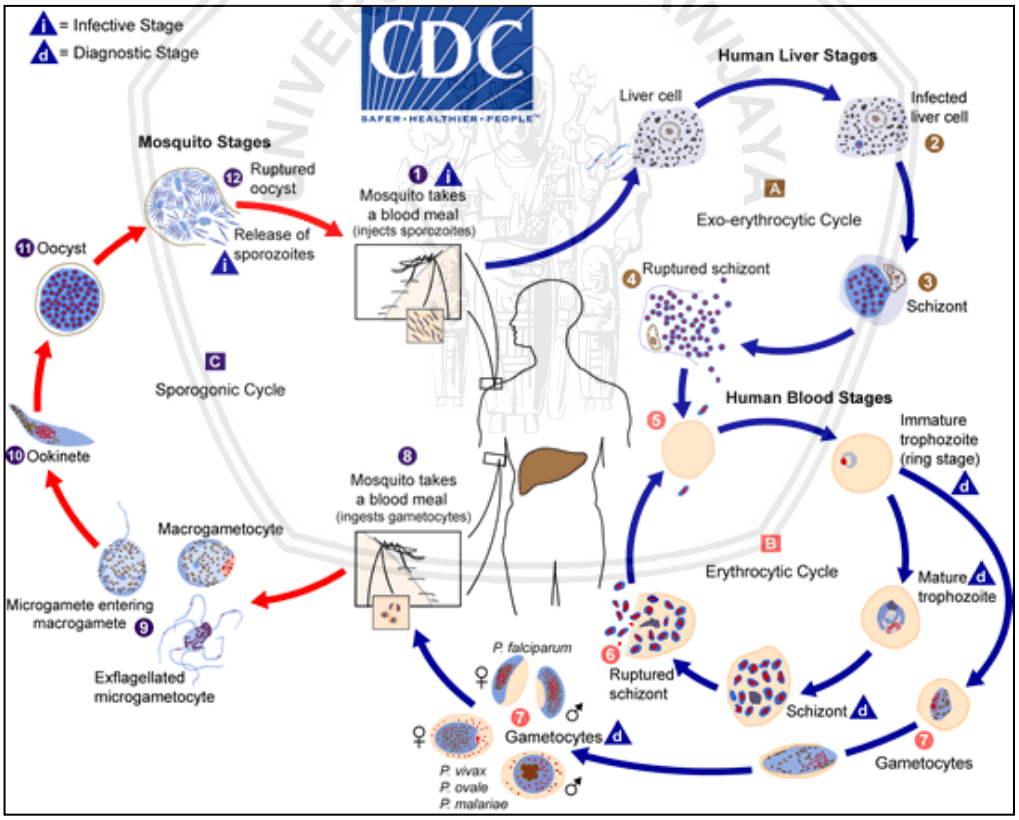
Tropozoit muda berbentuk cincin (*ring*) atau *head phone* dengan ukuran sekitar 1/5 diameter sel darah merah. Stadium ini dapat ditemukan di bagian tengah atau tepi eritrosit. Terdapat satu atau dua bintik kromatin, sitoplasma halus. Eritrosit tidak membesar dan dapat terinfeksi lebih dari satu tropozoit. Terlihat bintik-bintik Maurer (granula merah jambu) pada tropozoit lanjut, sitoplasma menjadi lebih tebal dan padat, terjadi peningkatan pigmen dan kromatin, tropozoit matang jarang ditemukan pada bagian tepi eritrosit terinfeksi. Tropozoid lanjut dapat berbentuk *amoeboid*, terdapat sedikit pigmen berwarna kuning pada daerah sitoplasma (Setiani, 2014; CDC, 2017).

Tropozoid akan mengalami pembelahan nukleus dan sitoplasma sehingga membentuk skizon dengan ukuran sekitar 2/3 eritrosit. Skizon yang

sudah matang mengandung 8-24 merozoit kecil dengan pigmen lebih gelap, berbentuk seperti gumpalan (Setiani, 2014; CDC, 2017).

Sel gametosit *P.falciparum* berbentuk seperti sabit, sosis, atau pisang dengan benang kromatin merah yang berbentuk massa tunggal (makrogamet) atau kromatin yang tersebar pada sitoplasma (mikrogamet). Ukuran gametosit umumnya 1,5 kali lebih panjang dari diameter sel darah merah. Makrogametosit (betina) berwarna biru lebih gelap, sitoplasma mikrogametosit (jantan) berwarna lebih pucat (Setiani, 2014; CDC, 2017).

2.4.3 Siklus Hidup



Gambar 2.3 Siklus Hidup *Plasmodium* (CDC, 2017)

2.4.3.1 Fase Aseksual

Siklus aseksual *P. falciparum* pada manusia terdiri dari 2 siklus, yaitu siklus eksoeritrositik dan siklus eritrositik. Siklus eksoerotrositik *P. falciparum* dimulai ketika nyamuk menggigit manusia sehat. Sporozoit akan masuk kedalam tubuh manusia, mengikuti aliran darah menuju liver dan akan matang menjadi skizon. Proses ini berlangsung sekitar 5 - 7 hari. Siklus eritrositik berlangsung sekitar 48 jam, dimulai ketika skizon pecah mengeluarkan merozoit yang masuk ke aliran darah dan menginfeksi eritrosit. Merozoit tersebut akan berkembang menjadi tropozoit muda (ring), tropozoit matang, lalu akan membentuk skizon yang kemudian pecah melepaskan merozoit lagi. Skizgoni terjadi sekitar 36 jam pasca invasi merozoit. Pada hari ke 10 - 15 diantara bentuk tropozoit ada yang berkembang menjadi gametosit yang akan dihisap oleh nyamuk (Setiani, 2014; CDC, 2017).

2.4.3.2 Fase Seksual

Siklus seksual dari parasit malaria dimulai ketika nyamuk *Anopheles* betina menghisap darah dari orang yang terinfeksi. Gametosit yang terkandung dalam darah manusia akan membelah menjadi gametosit jantan dan betina dalam lambung nyamuk. Gametosit jantan lalu memproduksi 4 sampai 8 flagela. Setiap falgelum terpisah dari tubuh induk dan bergerak menuju gametosit betina sehingga terjadi fertilisasi lalu terbentuk zigot (ookinet). Zigot akan bergerak menuju dinding sel lambung nyamuk, kemudian membetuk kista (ookista). Parasit malaria berlipat ganda hingga ookista mengandung ribuan parasit baru. Kemudian ookista pecah dan melepaskan sporozoit yang akan bergerak ke seluruh tubuh nyamuk termasuk kelenjar saliva (WHO, 2010).

2.5 Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro*

Uji aktivitas antimalaria secara *in vitro* dapat dikelompokkan berdasarkan hubungan tingkat pertumbuhan *Plasmodium* dengan konsentrasi obat. Metode tersebut antara lain penghitungan parasit secara visual menggunakan mikroskop, metode menggunakan radioisotop, metode non-radioaktif (Basco,2007).

Aktivitas antimalaria secara *in vitro* dari bahan uji ditentukan dari nilai IC_{50} yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50}, maka aktivitas antimalaria semakin tinggi. Ekstrak dikatakan sangat aktif jika IC_{50} < 5 µg/mL, aktif jika IC_{50} = 5 - 50 µg/mL, rendah jika IC_{50} = 50-100 µg/mL, dan tidak aktif jika IC_{50} > 100 µg/ml (Chincilla *et al.,* 2012).

2.5.1 Uji Secara visual (*WHO Microtest*)

Uji secara visual pertamakali dikembangkan oleh Trager, yaitu tes 48 jam. W.Trager membuat kultur *P. falciparum* dalam petri dish 35 mm atau 16 mm sumuran beralas datar dengan persen parasitemia awal 0,2 - 1,0%. Kultur diberi paparan media bebas obat sebagai kontrol dan media yang mengandung berbagai konsentrasi obat selama 48 jam dalam *candle jar* (Basco, 2007).

Metode Trager mengalami berbagai modifikasi, metode yang sering digunakan saat ini adalah mikrotes yang dikembangkan oleh Rieckmann *et al.* (1978). Uji dilakukan dengan cara menyiapkan plat 96 sumuran dengan memberi 50 µl RPMI 1640, $NaHCO_3$, HEPES, dan larutan gentamisin ke dalam 2 - 12 sumuran (sumuran 2 dan 3 tidak mengandung obat, sumuran 4 - 12 mengandung obat dengan kosentrasi yang semakin meningkat). Sumuran 1 mengandung antikoagulan EDTA (*ethylene diamine tetraacetic acid*). Dilakukan

inkubasi kultur selama 24-30 jam dalam *candle jar* pada suhu 37 - 38°C, supernatan dibuang, disiapkan dua hapusan darah tipis dari tiap sumuran dengan pewarnaan Romanowski atau Giemsa. Tahap selanjutnya adalah menghitung total skizon (paling sedikit mengandung dua inti sel) pada apusan darah terhadap 200 parasit aseksual menggunakan mikroskop (Basco,2007).

Keuntungan dari metode ini yaitu peralatan yang digunakan tidak banyak dan prosedur lebih sederhana. Kekurangan metode ini adalah membutuhkan banyak waktu, membutuhkan tenaga ahli, dan jumlah parasit yang dihitung tergantung dari tenaga yang menghitung (Basco,2007; Sinha, 2017).

2.5.2 Uji dengan Metode Radioisotop

Metode radio isotop dilakukan menggunakan prekursor radioaktif [^{3}H] hipoxantine untuk mengetahui aktivitas obat pada *Plasmodium* secara *in vitro.* Proses pembelahan sel parasit membutuhkan basa purin dari luar tubuh parasit dimana hipoxantin berperan sebagai prekursor utamanya. Penggunaan hipoxantin oleh parasit saat stadium ring masih rendah dan akan semakin meningkat saat fase tropozoit dan skizon. Konsentrasi parasitemia awal untuk melakukan uji ini sekitar 0,1-1,0% selama 42 jam inkubasi (Basco,2007).

Keuntungan dari metode ini adalah prosesnya semiotomatis, cepat, akurat, dan mengurangi variabilitas dari hasil penelitian. Metode ini tidak disarankan untuk digunakan dilapangan karena sejak tahun 1970-an regulasi mengenai zat radioaktif diperketat. Metode ini memerlukan peralatan yang mahal, membutuhkan waktu lama, dan memiliki banyak tahapan prosedur (Basco,2007).

2.5.3 Uji dengan Metode Non-radioaktif

Uji non-radoiaktif terdiri dari FACS*,* uji flourometri, metode berbasis ELISA, dan metode kolorimetri berbasis non-ELISA*. Fluorescence-activated cell sorter*

(FACS) merupakan metode *flow cytometry* yang spesifik untuk mendeteksi tipe sel yang ada dalam suspensi saat mengalir melalui kolom. Sample dikonjugasikan dengan fluorokrom atau pewarna yang berikatan dengan DNA parasit sebagai marker analisa. Fluoresensi akan semakin kuat ketika tropozoit berkembang menjadi skizon. Metode ini membutuhkan waktu yang singkat, hasil akurat, spesifik, obyektif, otomatis, dan non-radioaktif. Kekurangan metode ini yaitu membutuhkan biaya yang mahal, membutuhkan teknisi yang sudah ahli untuk mengoperasikan alat, dan kurang sesuai untuk iklim tropis (Basco,2007).

FACS merupakan metode yang memerlukan banyak biaya oleh karena itu digunakan metode fluorometri sebagai alternatif. Prosedur ini memerlukan tahapan ekstraksi DNA pada kloroform untuk menghilangkan hemozoin. Intensitas fluoresensi akan ditentukan menggunakan minifluorometer atau spektrofotometer. Metode ini memerlukan persentase parasitemia awal sebanyak 1%. Zat pewarna DNA (etidium bromida) yang digunakan merupakan zat yang mutagenik sehingga membutuhkan penanganan khusus (Basco,2007).

Metode kolorimetri berbasis non-ELISA didasarkan pada enzim laktat dehidrogenase dengan urutan asam amino yang khas pada *P. falciparum*. Enzim ini digunakan untuk pembentukan ATP secara anaerob pada parasit sehingga akumulasi enzim LDH pada parasit dapat digunakan untuk mengetahui kelangsungan hidup parasit yang diuji. Data diekspresikan dalam OD (Optical Density) untuk menghitung nilai IC_{50}. Kekurangan metode ini yaitu membutuhkan persen parasitemia yang tinggi yaitu 1-2%. Oleh karena itu metode berbasis ELISA dikembangkan sebagai alternatif (Basco,2007; Sinha, 2017).

Uji berbasis ELISA dilakukan terhadap enzim HRP II *Plasmodium falciparum* dimana enzim ini berperan dalam pembentukan hemozoin. HRP II

paling banyak disekresikan saat stadium tropozoid lanjut dan skizon (setelah 60-72 jam inkubasi). Persentase parasitemia awal yang dibutuhkan untuk uji adalah 0,05-0,1%. Keuntungan dari metode ini yaitu prosedur lebih sederhana, variabilitas rendah, persentase parasitemia awal yang rendah. Kerugian metode ini yaitu diperlukan alat khusus dengan biaya yang tidak sedikit dan membutuhkan waktu inkubasi yang lama (Basco,2007; Sinha, 2017).

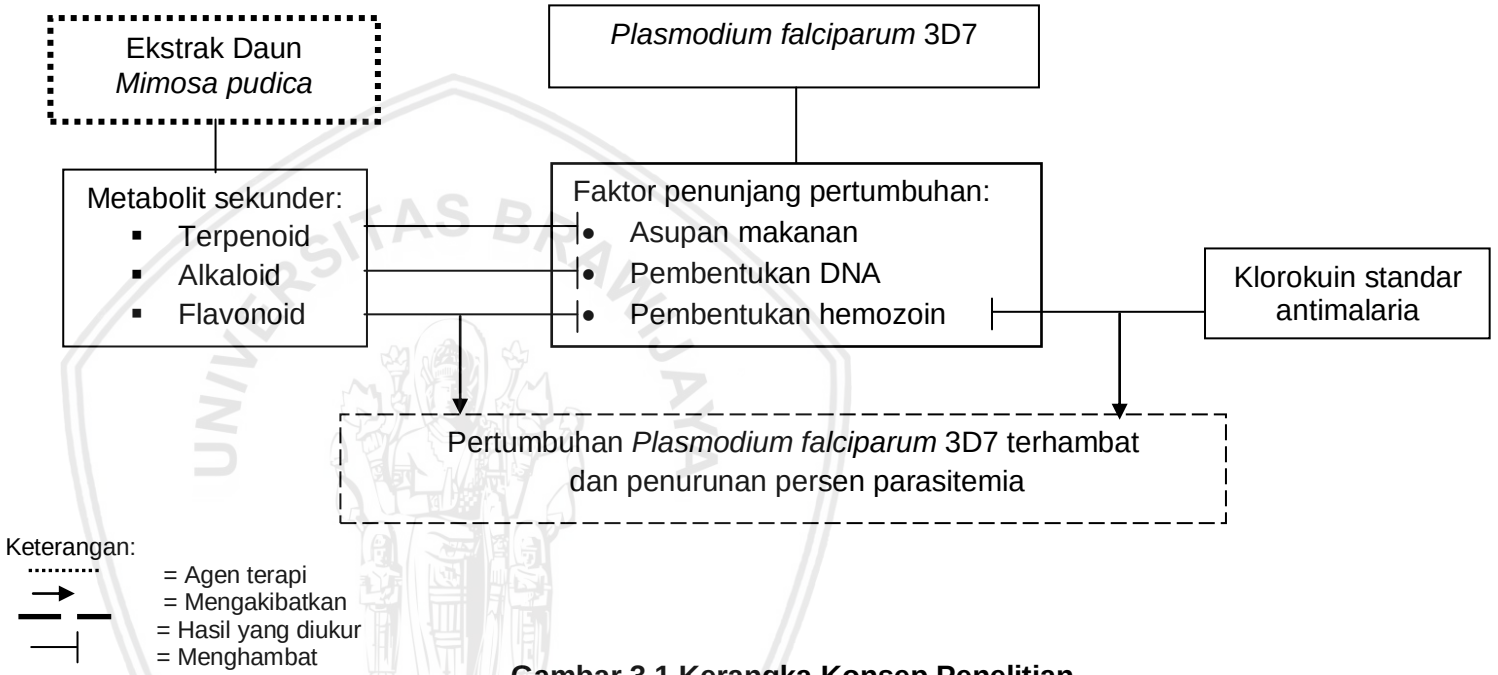
repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

repository.ub.ac.id

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

3.2 Uraian Kerangka Konsep

Ekstrak etanol daun putri malu mengandung flavonoid, terpenoid, dan alkaloid. Senyawa tersebut berpotensi menghambat faktor penunjang kehidupan *Plasmodium* antara lain pembentukan hemozoin, pembentukan DNA, dan menghambat masuknya asupan nutrisi pada parasit melalui jalur permeasi.

Plasmodium falciparum merupakan spesies yang paling banyak menginfeksi manusia dan dapat menyebabkan malaria berat. Oleh karena itu diperlukan penelitian lebih lanjut terhadap *Plasmodium falciparum* sebagai bukti bahwa ekstrak *M. pudica* memiliki efek antimalaria yang bermanfaat bagi manusia.

Plasmodium falciparum 3D7 merupakan galur sensitif terhadap klorokuin. Klorokuin merupakan obat antimalaria yang bekerja dengan menghambat pembentukan hemozoin pada vakuola makanan sehingga heme yang tidak terpolimerisasi akan meracuni parasit. Pertumbuhan parasit yang terhambat ditandai dengan penurunan persen parasitemia yang semakin rendah ketika diberikan konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi, hal ini dijadikan acuan untuk mengetahui tingkat aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun *M. Pudica* secara *in vitro*.

3.3 Hipotesis Penelitian

Hipotesis dari penelitian ini adalah ekstrak etanol *M. pudica* memiliki aktivitas antimalaria yang potensial terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 yang dapat dinyatakan dengan: .

1. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol *M. pudica,* maka persentase parasitemia semakin rendah.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol *M. pudica,* maka persentase hambatan pertumbuhan semakin tinggi.
3. Nilai IC_{50} ekstrak etanol *M. pudica* tidak berbeda dengan IC_{50} klorokuin.

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro* dengan menguji aktivitas antimalaria ekstrak etanol daun *Mimosa pudica* terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 dan membandingkannya dengan dua kelompok kontrol yang masing-masing dilakukan secara duplo.

4.2 Variabel Penelitian

4.2.1 Variabel Bebas

Variabel bebas yang digunakan adalah konsentasi ekstrak etanol daun *Mimosa pudica* sebesar 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mL dan 100 µg/ml.

4.2.2 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah persentase parasitemia, persen hambatan pertumbuhan, dan IC_{50}.

4.2.3 Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif yang digunakan adalah klorokuin dengankonsentrasi 0,001 µg/mL, 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mLdan 10 µg/ml. Sedangkan kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil kultur *Plasmodium* yang kemudian diinfeksikan pada RBC (*red blood cell*) manusia tanpa diberikan perlakuan apapun.

4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pelaksanaan uji aktivitas antimalaria *in vitro* dilakukan di Laboratorium NPMRD (*Natural Product Medicine Research Development*), ITD (*Institute of Tropical Disease*), Universitas Airlangga Surabaya dan Laboratorium Bahan Alam FKUB. Jadwal penelitian meliputi uji antimalaria *in vitro*, perhitungan persen parasitemia, analisis data, dan pembuatan laporan.

4.4 Bahan dan Alat Penelitian.

4.4.1. Bahan Uji

Bahan uji berupa ekstrak etanol daun *Mimosa pudica*. Ekstrak dilarutkan dalam DMSO. Setelah itu dilakukan serial pengenceran dengan medium hingga diperoleh lima konsentrasi akhir bahan uji 0,01 µg/mL, 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 10 µg/mLdan 100 µg/ml.

4.4.2 Parasit Malaria

Parasit yang digunakan untuk uji aktivitas antimalaria *in vitro* adalah *Plasmodium falciparum strain* 3D7 sensitif klorokuin yang dibiakkan dengan metode Trager dan Jensen (Basco, 2007).

4.4.3 Bahan Uji Aktivitas *In Vitro*

Uji aktivitas antimalaria menggunakan bahan antara lain RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640, HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid*), $NaHCO_3$, hipoxanthin, gentamisin, darah manusia, aquades steril (*sterille water for injection*), DMSO (*dimethyl sulfoxide*), pewarna Giemsa, minyak imersi. Bahan media terdiri dari media tidak lengkap dan media lengkap.

4.4.3.1 Media Tidak Lengkap

Media tidak lengkap terdiri atas *hypoxanthine*, RPMI 1640, HEPES, $NaHCO_3$, Gentamisin, *water for injection* sampai volumenya 1 L.

4.4.3.2 Media Lengkap

Media lengkap mengandung 45 mL media tidak lengkap dan serum.

4.4.4. Alat Uji Aktivitas Antimalaria *In Vitro*

Instrumen penelitian ini menggunakan neraca analitik, *laminar air flow*, inkubator, lemari pendingin, *spuit injection* 1 mL dan 10 mL, *candle jar,* efendorf 1,5 mL, mikroskop cahaya, kaca objek, gelas ukur, mikropipet, sentrifugasi, *petridish*, erlenmeyer 2 mL, *blue tip, yellow tip, microplate* 24 sumuran, lilin, pinset, *autoclave*, tabung falkon 50 mL dan 20 mL, lampu spiritus, penyaring membran ukuran 0,22 µm, *stirrer, water bath* dan *latex handschoen*.

4.5 Definisi Operasional

a. Ekstrak etanol daun *Mimosa pudica*: Ekstrak yang diperoleh dari hasil penelitian dengan metode maserasi daun menggunakan pelarut etanol. Kandungan triterpenoid, tannin, alkaloid, dan flavonoid telah diidentifikasi dengan metode KLT. Serbuk kering daun putri malu diperoleh dari Balai Materia Medika Kota Batu, Malang, Jawa Timur (Legyana, 2018).
b. Persen parasitemia: persentase eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* terhadap 1000 sel darah merah pada hapusan darah tipis.
c. Hambatan pertumbuhan parasit: merupakan penurunan tingkat parasitemia pada kultur yang mendapat pemberian bahan uji dibandingkan dengan kontrol negatif (tanpa pemberian bahan uji) dan kontrol positif dengan pemberian klorokuin.

d. IC_{50}: konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* sebesar 50%.
e. Darah Manusia: darah dengan golongan O yang tersedia di Laboratorium NPMRD, ITD, Universitas Airlangga diperoleh dari bank darah (PMI) untuk proses pembuatan RBC50.
f. *Plamodium falciparum*: parasit yang digunakan pada penelitian ini dengan tipe galur 3D7 sensitif klorokuin yang dibiakkan di Laboratorium SATREPS *(Science and Technology Research Partnership for Sustainable Development*), ITD, Universitas Airlangga.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun *Mimosa pudica*

a. Ditimbang serbuk kering daun putri malu sebanyak 300 gram menggunakan neraca analitik, kemudian dibasahi dengan 1 L etanol 96%
b. Serbuk yang telah dibasahi lalu dimasukkan dalam beaker glass 1 L, diaduk menggunakan *over head stirrer* dengan kecepatan 400 rpm selama 30 menit.
c. Campuran serbuk putri malu dan pelarut yang sudah homogen dimasukkan dalam toples. Toples ditutup rapat selama 24 jam.
d. Dipisahkan filtrat dan ampas serbuk daun putri malu. Filtrat ditampung dalam toples kaca yang lain.
e. Dilakukan proses remaserasi ke-1, ampas dimasukkan kembali ke dalam *beaker glass* 1 L dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1 L.
f. Ampas yang telah basah diaduk menggunakan *over head stirrer* dengan kecepatan 400 rpm selama 30 menit.

g. Campuran ampas serbuk daun putri malu dan pelarut yang sudah homogen dimasukkan dalam toples. Toples ditutup rapat selama 24 jam.
h. Dipisahkan filtrat dan ampas serbuk daun putri malu. Filtrat ditampung dalam toples kaca yang sudah berisi filtrat hasil maserasi.
i. Dilakukan proses remaserasi ke-2, ampas dimasukkan kembali ke dalam *beaker glass* 1 L dan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 1 L.
j. Ampas yang telah basah diaduk menggunakan *over head stirrer* dengan kecepatan 400 rpm selama 30 menit. Campuran yang sudah homogen dimasukkan dalam toples. Toples ditutup rapat selama 24 jam.
k. Dipisahkan filtrat dan ampas serbuk daun putri malu. Filtrat ditampung dalam toples kaca yang berisi filtrat hasil maserasi dan remaserasi 1.
l. Filtrat hasil ekstraksi dijadikan satu dan disaring menggunakan corong buchner dan vakum.
m. Kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator.*
n. Larutan hasil ekstraksi disimpan dalam *beaker glass* 250 mL kemudian di oven pada suhu 40˚C hingga menjadi ekstrak kental.
o. Ekstrak kental disimpan dalam wadah tertutup rapat.

4.6.2. Pembiakan *Plasmodium falciparum*

4.6.2.1 Penyiapan Media Tidak Lengkap

a. Disiapkan erlenmeyer dan *stirrer plate.*
b. Ditimbang 50 mg *hypoxanthine*, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dalam *sterile water for injection* sampai larut.
c. Ditimbang 10,4 g serbuk RPMI 1640, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer. Warna larutan akan menjadi merah terang.
d. Ditimbang 5,94 g HEPES, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer.

e. Ditimbang NaHCO3 sebanyak 2,3 g, kemudian ditambahkan ke dalam erlenmeyer.
f. Ditambahkan gentamisin 25 mg/L sebanyak 0,5 mLke dalam larutan dengan menggunakan spuit injeksi.
g. Ditambahkan *steril water for injection* sampai volumenya 1 L.
h. Media disterilisasi menggunakan metode filtrasi (dilakukan dengan cara menyaring media menggunakan filter membrane 0,22 µm di dalam LAFC, kemudian disimpan di dalam botol disposable pada suhu 4°C. Media ini disebut dengan media tidak lengkap.

4.6.2.2 Pembuatan Media Lengkap

a. Dimasukkan 45 mLmedia tidak lengkap kedalam falcon 50 mL
b. Ditambahkan serum 5 mL, diaduk perlahan sampai tercampur.
c. Media ini digunakan untuk membiakkan *Plasmodium falciparum*.

4.6.2.3 Penyiapan Serum dan *Red Blood Cell* (RBC) (Basco, 2007)

a. Darah diperoleh dari PMI dimasukkan dalam beberapa tabung 50 mL, kemudian darah disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Diambil lapisan atas eritrosit sekitar 1 mm.
b. Supernatan (plasma) diambil untuk diproses lebih lanjut dalam penyiapan serum, sisa packed cell ditambahkan media tidak lengkap sebanyak 2-3X total volume pellet, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit. Proses ini diulangi sebanyak dua kali.
c. *Packed cell* ditambahkan media tidak lengkap dengan rasio 1:1 sehingga kandungan eritrosit menjadi 50% dan disebut RBC 50% yang siap ditambahkan ke biakan *Plasmodium falciparum*. Eritrosit kemudian disimpan pada suhu 4°C.

d. Plasma yang telah dipisahkan kemudian diinaktivasi dengan cara menginkubasi pada suhu 56°C selama 30 menit.

e. Plasma yang telah diinaktivasi kemudiaan dimasukkan ke dalam tabung falcon 15 mL, lalu disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit untuk mengendapkan fibrin pada plasma, sehingga hanya serum yang digunakan untuk pembuatan media lengkap.

4.6.2.4 Penyiapan Kultur *Plasmodium*

a. Pencairan (Thawing) parasit *P. falciparum* 3D7 (Moll *et al*.,2008).

1) Parasit beku *Plasmodium falciparum* dihangatkan diatas penangas air pada suhu 37°C sampai mencair (kira-kira selama 1 - 2 menit).

2) Parasit beku yang telah mencair dimasukkan dalam tabung steril 15 mL, kemudian ditambahkan NaCl 3,5% sesuai jumlah volume stock parasit yang dicairkan lalu didiamkan selama 5 menit dan disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.

3) Supernatan dibuang pelan-pelan dengan menggunakan pipet tetes, lalu ditambahkan media tidak lengkap sampai volume 5 mL, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.

4) Supernatan dibuang sisa pellet ditambahkan media lengkap hingga volume 5 mLkemudian disentrifugasi dengan kecepatan 1500 rpm selama 5 menit pada suhu 4°C.

5) Supernatan dibuang, sisa pellet ditambahkan RBC 50% 0,5 mLdan media lengkap 4,5 mL, lalu disuspensikan.

6) Suspensi parasit kemudiaan dimasukkan dalam cawan petri kemudian diberi label tanggal, bulan, tahun dan tipe strainnya.

7) Biakan kemudian dimasukkan dalam *candle jar* yang berisi lilin. Lilin dinyalakan, kemudian *candle jar* ditutup rapat. Setelah lilin mati *candle jar* dimasukkan dalam inkubator dan diinkubasi pada suhu 37°C. Setiap 24 jam media diganti dengan media biak yang baru.

b. Penggantian Media

1) Diambil larutan media lengkap pada cawan petri yang berisi biakan parasit dengan cara dipipet.
2) Diambil satu tetes endapan eritrosit dan dibuat hhapusan darah tipis untuk menghitung jumlah parasitemianya.
3) Diambil media lengkap baru untuk ditambahkan ke dalam biakan.
4) Biakan diinkubasi pada suhu 37°C

c. Subkultur (Moll *et al*., 2008; Worldwide Antimalarial Resistance Network, 2011).

Subkultur bertujuan untuk menurunkan konsentrasi parasitemia yang tinggi menjadi lebih rendah sesuai yang diinginkan. Biakan yang telah mencapai konsentrasi parasitemia tinggi harus diencerkan dan dipindahkan ke tempat pembiakan yang baru untuk dibiakkan lebih lanjut. Konsentrasi parasitemia awal dibuat sekitar 0,1 - 0,2% dengan mengencerkan dengan RBC 50%. Setelah itu dibuat sediaan darah tipis untuk menghitung jumlah parasitemianya. Sediaan kemudian diinkubasi kembali dalam inkubator pada suhu 37°C.

d. Sinkronisasi

1) Disiapkan 5% sorbitol, media lengkap, dan RPMI pada suhu 37˚C.
2) Kultur disentrifugasi 1500 rpm selama 5 menit, supernatan dibuang

3) Pellet diresuspensikan dalam larutan sorbitol, diinkubasi selama 5 menit pada suhu 37˚C.
4) Dilakukan sentrifugasi 1800rpm selama 5 menit, supernatan dibuang, dibilas dua kali dengan media lengkap, supernatan dibuang
5) Tambahkan RBC untuk mempertahankan hematokrit 5%

4.6.3 Uji Aktivitas Antimalaria secara *In Vitro*

4.6.3.1 Penyiapan Suspensi Parasit

Dimisalkan tingkat parasitemia pada cawan petri untuk pengujian 3% dan hematokrit 5% diinginkan konsentrasi parasitemia awal setiap sumuran adalah 1% dan hematokrit 5%. Maka suspensi diencerkan sebanyak 3x dengan penambahan RBC 50% hingga diperoleh konsentrasi hematrokit 5%, dan penambahan media lengkap hingga diperoleh total volume sebanyak 3x volume awal. Setiap sumuran berisi 500 µL suspensi parasit.

a. Penyiapan bahan uji

Bahan uji yang akan digunakan adalah ekstrak etanol daun putri malu. Ditimbang 10 mg ekstrak, kemudian dilarutkan dalam 100 µL DMSO, kemudian diambil 10 µL dan ditambahkan media lengkap sebanyak 490 µL, hingga diperoleh volume akhir 500 µL.

b. Pengujian sampel

1) Lempeng sumur untuk uji diisi dengan media lengkap sebanyak 1080 µL.
2) Untuk sumur kontrol negatif diisi 1000 µL.
3) Diambil sebanyak 120 µL dari larutan bahan uji, ditambahkan ke dalam sumuran yang telah diberi media lengkap sebanyak 1080 µL.
4) Dilakukan serial pengenceran sampai diperoleh konsentrasi 100; 10; 1; 0,1; 0,01 µg/mLdengan cara mengambil 120 µL larutan bahan uji bahan uji yang

sudah dicampur dengan media lengkap pada U-1 ke U-2 dan seterusnya sampai U-5 lalu dibuang 120 µL.

5) Dibuang 80 µL dari tiap-tiap sumur uji, kecuali sumur kontrol negatif.
6) Kultur dibuat duplo dengan cara memipet 500 µL larutan yang kemudian dimasukkan ke dalam sumuran di sebelahnya.
7) Masing-masing sumuran ditambahkan 500 µL suspensi parasit dengan konsentrasi parasitemia 1% dan hematokrit 5%.
8) Diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Kultur dipanen dan dibuat sediaan lapisan darah tipis dengan pewarnaan Giemsa 20%, dihitung persen parasitemia dan persen hambatan pertumbuhan *P. falciparum*.

4.6.4 Pembuatan Preparat dan Perhitungan Parasit

4.6.4.1 Pembuatan Preparat Darah Tipis

a. Diteteskan kurang lebih dua tetes suspensi sel parasit ke atas gelas obyek mikroskop dengan bantuan satu sisi gelas obyek mikroskop lain, suspensi parasit diratakan.
b. Dibiarkan di udara terbuka.
c. Difiksasi hhapusan tipis tersebut dalam metanol absolut selama kurang lebih satu detik, lalu dikeringkan.
d. Kemudian diwarnai dengan Giemsa

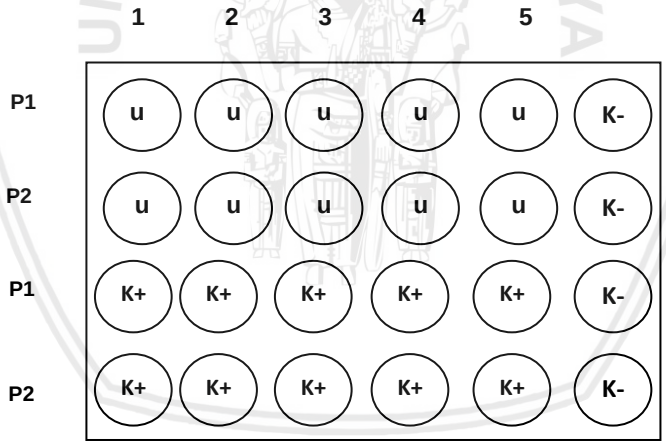
4.6.4.2 Pengecatan dan Pewarnaan dengan Giemsa

a. Dibuat larutan Giemsa 20% untuk pewarnaan preparat darah tipis.
b. Pewarna Giemsa 20% diteteskan sehingga menutupi seluruh permukaan lapisan darah. Pewarnaan dilakukan selama 20 menit, sediaan dicuci dengan air lalu dikeringkan.

c. Setelah sediaan kering, diperiksa dengan mikroskop dengan perbesaran 10X100, untuk menghitung tingkat parasitemia.

4.6.4.3 Perhitungan Persen Parasitemia

Perhitungan dilakukan pada preparat darah tipis yang telah diwarnai dengan Giemsa. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan cara menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi parasit malaria pada rentang 500 sampai 2000 eritrosit. Kemudian dikalikan 100%. Jika persen parasitemia diatas 10% maka persen parasitemia dihitung terhadap 500 eritrosit, jika persen parasitemia kurang dari 1% maka persen parasitemia dihitung terhadap 2000 eritrosit atau lebih. Gametosit tidak dihitung karena masih bisa ditemukan setelah eliminasi fase aseksual dengan obat.



Gambar 4.1 Mikroplat Uji Aktivitas Antimalaria

Keterangan:
U :Mikroplat yang ditambah dengan sampel ekstrak etanol daun putri malu
K- :Mikroplat tanpa adanya penambahan apapun
K+:Kultur yang ditambah kloroquin
1 :Pemberian ekstrak konsentrasi 100 µg/mLuntuk mikroplat U, Pemberian klorokuin konsentrasi 10 µg/mLuntuk mikroplat k+
2 :Pemberian ekstrak konsentrasi 10 µg/mLuntuk mikroplat U, Pemberian klorokuin konsentrasi 1 µg/mLuntuk mikroplat k+
3 :Pemberian ekstrak konsentrasi 1 µg/mLuntuk mikroplat U, Pemberian klorokuin konsentrasi 0,1 µg/mLuntuk mikroplat k+
4 :Pemberian ekstrak konsentrasi 0,1 µg/mLuntuk mikroplat U, Pemberian klorokuin konsentrasi 0,01 µg/mLuntuk mikroplat K+
5 :Pemberian ekstrak konsentrasi 0,01 µg/mLuntuk mikroplat U, Pemberian klorokuin konsentrasi 0,001 µg/mLuntuk mikroplat K+
P1 :Pengujian pertama
P2 :Pengujian kedua

4.6.4 Evaluasi Hasil Uji Aktivitas Antimalaria secara *In Vitro*

4.6.5.1 Menghitung Persen Parasitemia dan Persen Hambatan

$$\% \text{ Parasitemia} = (Xe/1000) \times 100\%$$

$$\% \text{ Pertumbuhan} = \% \text{ Parasetimia} - D_0$$

$$\% \text{ Hambatan} = 100\% - \{(Xu/Xk) \times 100\%\}$$

Keterangan:
Xe : eritrosit terinfeksi
D0 : persen parasitemia pada hari ke-0
Xu : persen pertumbuhan dari sampel uji
Xk : persen pertumbuhan dari kontrol negatif

4.6.5.2 Menentukan IC_{50}

$$Y = bx + a$$

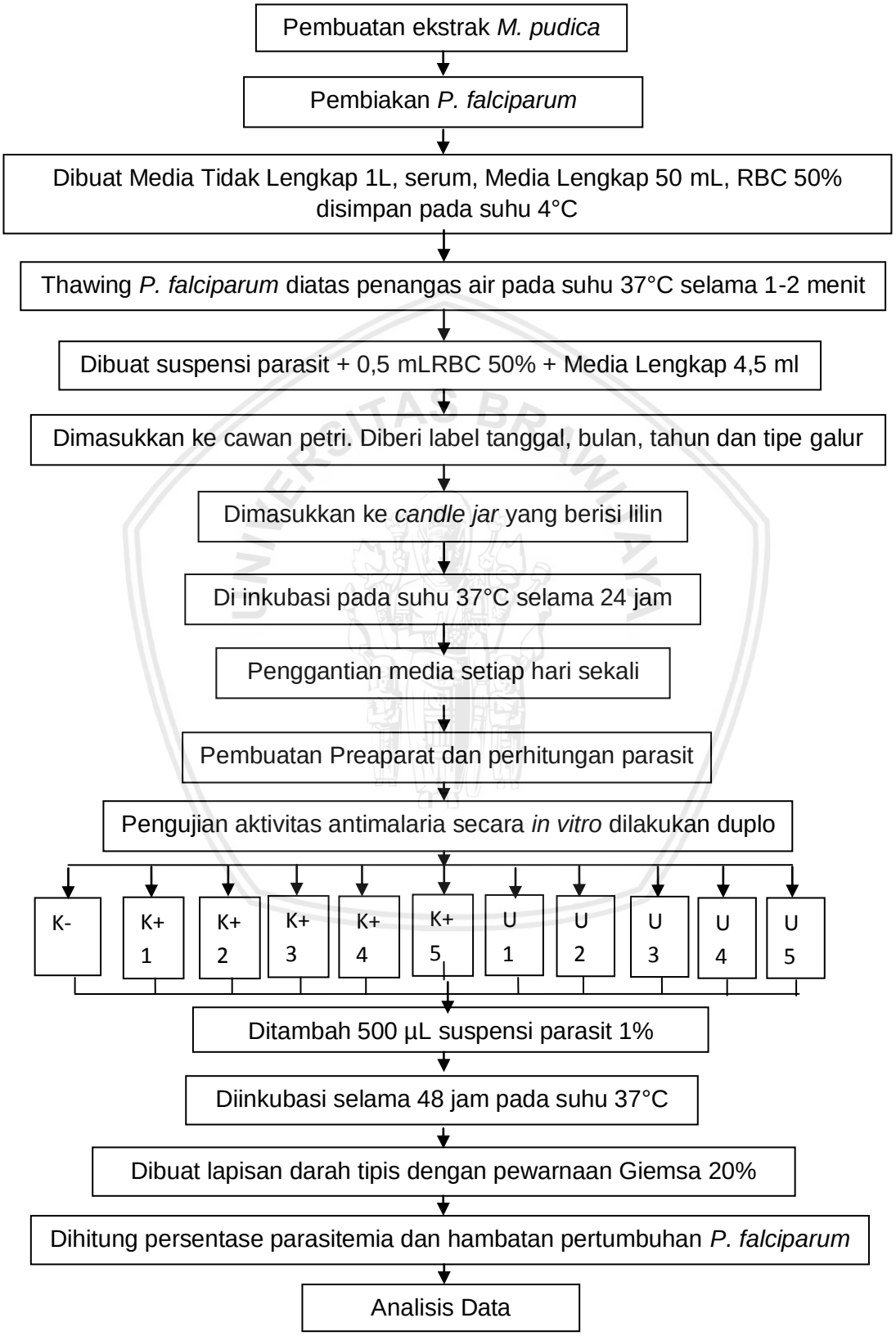
Keterangan:
Y = 50
X = IC_{50}
a dan b = hasil dari regresi liner antara variasi konsentrasi ekstrak *M. pudica* dengan nilai persen hambatan.

4.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dalam penelitian ini akan dianalisis menggunakan korelasi Spearman, *independent T test* (uji T tidak berpasangan) dan analisis probit pada SPSS dengan tarif kepercayaan 95% (α = 0,05). Korelasi Spearman digunakan untuk menganalisis hubungan antara konsentrasi senyawa ekstrak etanol daun putri malu dengan jumlah sel eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* dan menganalisis hubungan antara konsentrasi ekstrak etanol daun putri malu dengan persen hambatan. Konsentrasi ekstrak merupakan data ordinal sedangkan data persen parasitemia dan persen hambatan yang diperoleh merupakan data rasio (Nugroho *et al.,* 2008).

Aktivitas antimalaria secara *in vitro* dari bahan uji ditentukan dengan nilai IC_{50} yaitu konsentrasi ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan parasit

sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50}, maka aktivitas antimalaria semakin tinggi. Ekstrak dikatakan sangat aktif jika IC_{50} < 5 µg/mL, aktif jika IC_{50} = 5 - 50 µg/mL, rendah jika IC_{50} = 50 - 100 µg/mL, dan tidak aktif jika IC_{50} > 100 µg/mL. Digunakan analisis probit dengan membuat kurva baku hubungan antara probit (*probability unit*) persentase penghambatan dengan logaritma konsentrasi menggunakan persamaan regresi linier. Uji T tidak berpasangan dilakukan untuk menganalisis perbedaan IC_{50} pada perlakuan ekstrak etanol daun putri malu dengan klorokuin.



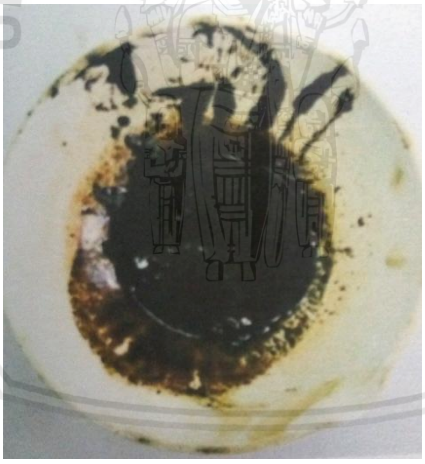
Gambar 4.2 Alur Penelitian

BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Ekstraksi

Maserasi dilakukan terhadap serbuk kering daun putri malu menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1 : 10. Karakteristik ekstrak yang didapatkan memiliki konsistensi kental, berwarna coklat kehijauan, rasa ekstrak pahit, memiliki bau khas aromatik. Rendemen yang didapat sebesar 12,528. Hasil KLT menunjukkan bahwa ekstrak mengandung alkaloid, terpenoid, dan flavonoid (Legyana, 2018).



Gambar 5.1 Hasil Maserasi Daun Putri Malu (Legyana, 2018)

5.2 Uji Aktivitas Antimalaria

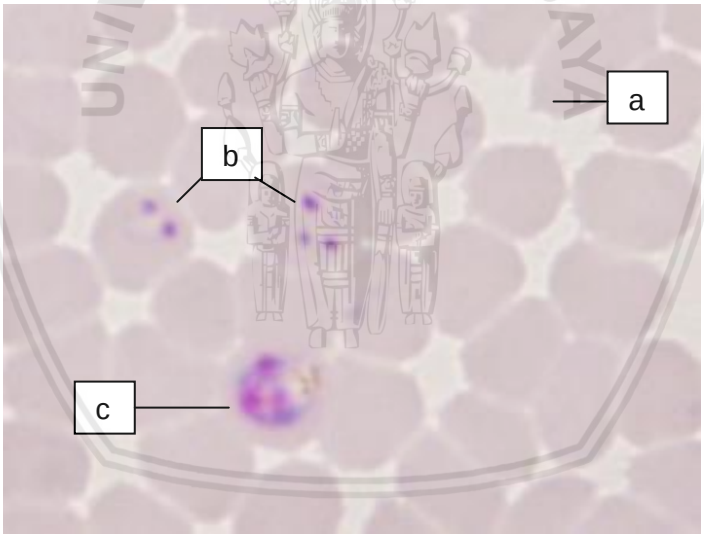
Konsentrasi ekstrak etanol daun putri malu yang digunakan dalam pengujian adalah 100; 10; 1; 0,1; 0,01 µg/mL. Konsentrasi klorokuin yang digunakan adalah 10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 µg/mL. Klorokuin merupakan senyawa murni yang memiliki sebagai antimalaria. Konsentrasi ekstrak yang digunakan lebih besar daripada klorokuin karena

ekstrak mengandung campuran metabolit sekunder dengan konsentrasi yang bervariasi dan tidak semua metabolit sekunder dalam ekstrak memiliki antimalaria.

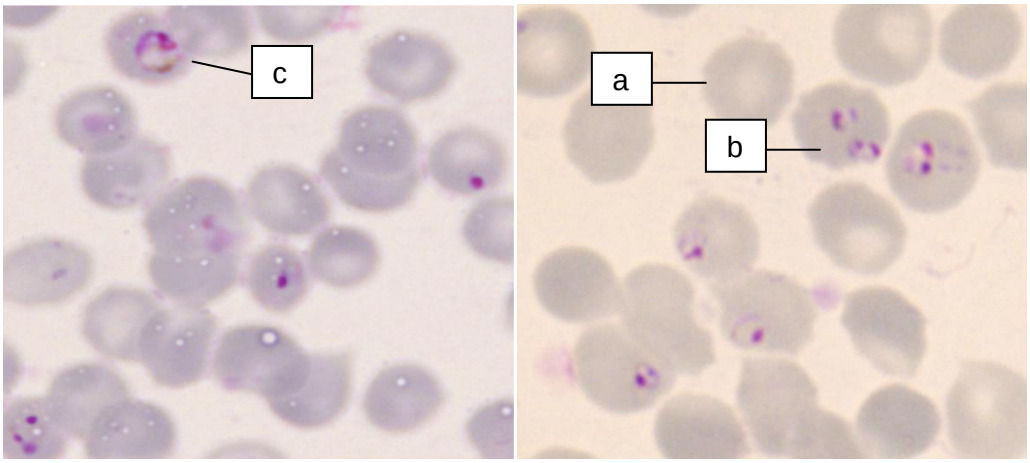
Uji aktivitas antimalaria dilakukan secara *in vitro* dengan pengamatan di bawah mikroskop. Hasil yang didapatkan berupa persentase parasitemia, persen pertumbuhan parasit, dan $IC_{50.}$

5.2.1 Kultur *P. falciparum 3D7*

Parasit dikultur dengan metode modiikasi Trager dan Jensen dalam cawan petri. Kemudian disiapkan suspensi parasit untuk uji aktivitas antimalaris secara *in vitro* kedalam *microplate* dan dibuat hapusan darah tipis dari tiap sumuran. Pengamatan hasil pengujian dilakukan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Diamati sel eritrosit sehat dan eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium falciparum* (Gambar 5.2 - 5.5).

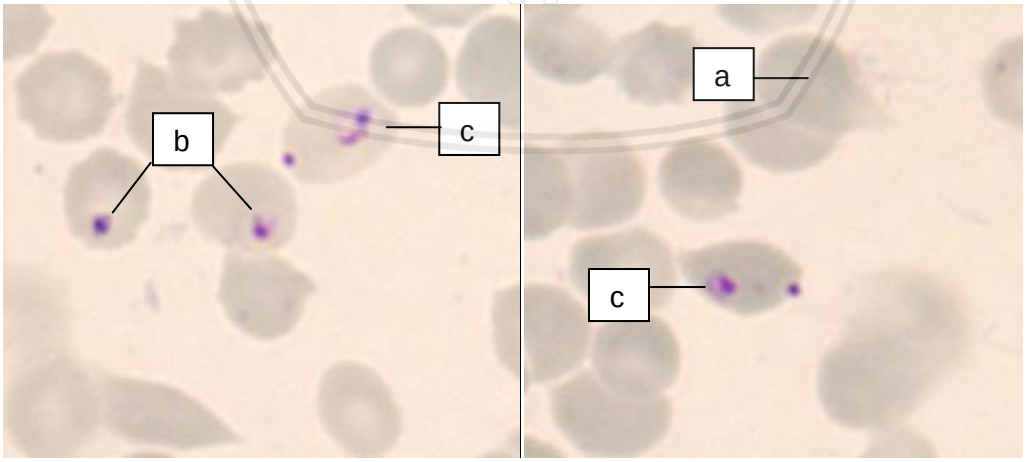


Gambar 5.2 Hapusan Darah Tipis D0 sebelum Pengujian
Keterangan: (a) Eritrosit normal, (b) tropozoit muda, (c) Skizon yang berisi merozooit



Gambar 5.3 Hapusan Darah Tipis K- $H_{48\ Jam}$
Keterangan: (a) Eritrosit normal, (b) tropozoit muda berbentuk cincin (c) tropozoit yang mulai berkembang menjadi skizon

Gambar 5.4 Hapusan Darah Tipis Ekstrak Konsentrasi 100µg/mL $H_{48\ Jam}$
Keterangan: (a) Eritrosit normal, (b) Skizon yang mengandung hemozoin, (c) tropozoit berbentuk cincin



Gambar 5.5 Hapusan Darah Tipis K+ Konsentrasi 10µg/mL $H_{48\ Jam}$
Keterangan: (a) Eritrosit normal, (b) tropozoit muda, (c) tropozoit berbentuk cincin

5.2.2 Persen Parasitemia

Perhitungan persen parasitemia dilakukan pada hari ke-0 sebelum dilakukan pengujian dan jam ke-48 setelah dilakukan pengujian. Perhitungan ini didasarkan pada perbandingan eritrosit yang terinfeksi *P. falciparum* dengan eritrosit sehat dikalikan 100%.

Tabel 5.1 Persen Parasitemia D0 dan K-

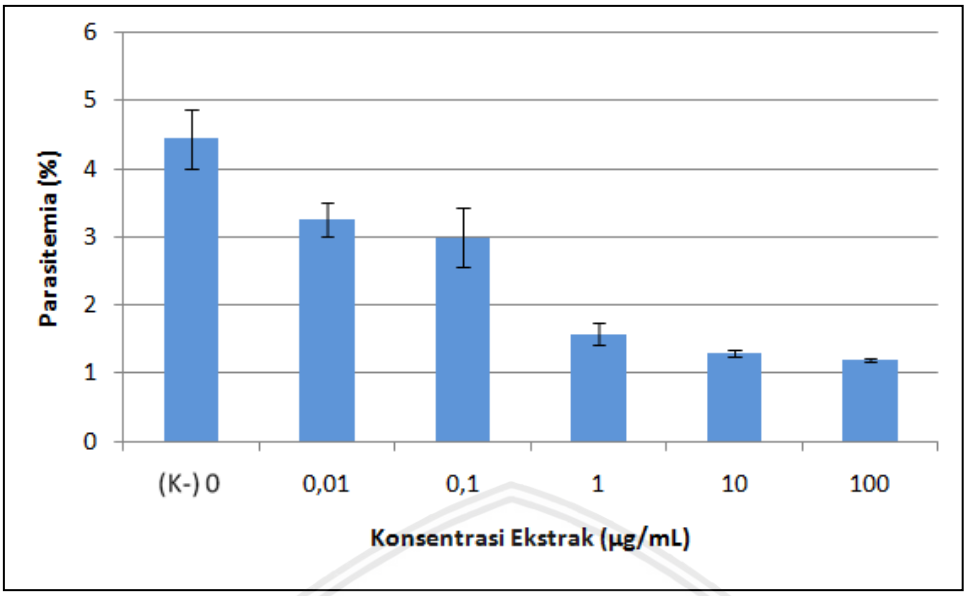
Kelompok	Parasitemia (%)		Pertumbuhan (%)	
D0	1,012		-	
K-	P_1=4,134	P_2=4,758	P_1=3,122	P_2=3,746
	$\bar{x}$=4,446±0,441		$\bar{x}$=3,434±0,441	

Keterangan:
D_0: Persen parasitemia jam ke-0
K-: Kontrol negatif setelah 48 jam (media + parasit)
P_1: Pengujian pertama
P_2: Pengujian kedua
$\bar{x}$: Rata-rata

Tabel 5.1 menunjukkan persen inisial parasitemia pada jam ke nol sebelum dilakukan pengujian. Setelah inkubasi 48 jam, didapatkan persen parasitemia kontrol negatif lebih dari empat kali lipat dari persen parasitemia awal yaitu sebesar 4,446 ± 0,441% dengan persen pertumbuhan 3,434 ± 0,441%

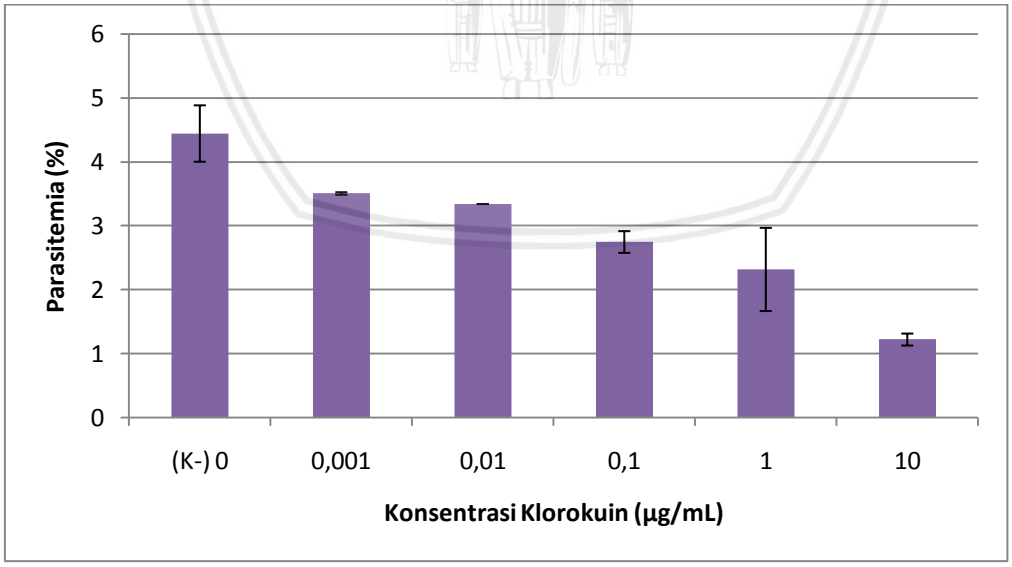
Tabel 5.2 Persen Parasitemia $H_{48\ jam}$

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	% Parasitemia		% Rata-rata±SD
		P_1	P_2	
Ekstrak	100	1,206	1,173	1,190±0,023
	10	1,273	1,340	1,307±0,047
	1	1,462	1,700	1,581±0,168
	0,1	2,695	3,298	2,997±0,426
	0,01	3,076	3,435	3,256±0,254
Klorokuin	10	1,158	1,291	1,225±0,094
	1	2,367	2,275	2,321±0,065
	0,1	2,629	2,870	2,750±0,170
	0,01	3,343	3,344	3,344±0,001
	0,001	3,495	3,523	3,509±0,020



Gambar 5.6 Diagram Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu dengan Persen Parasitemia

Berdasarkan Gambar 5.6 dapat dinyatakan bahwa persen parasitemia semakin tinggi ketika konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin rendah. Persentase parasitemia akan menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan.



Gambar 5.7 Diagram Hubungan Konsentrasi Klorokuin dengan Persen Parasitemia

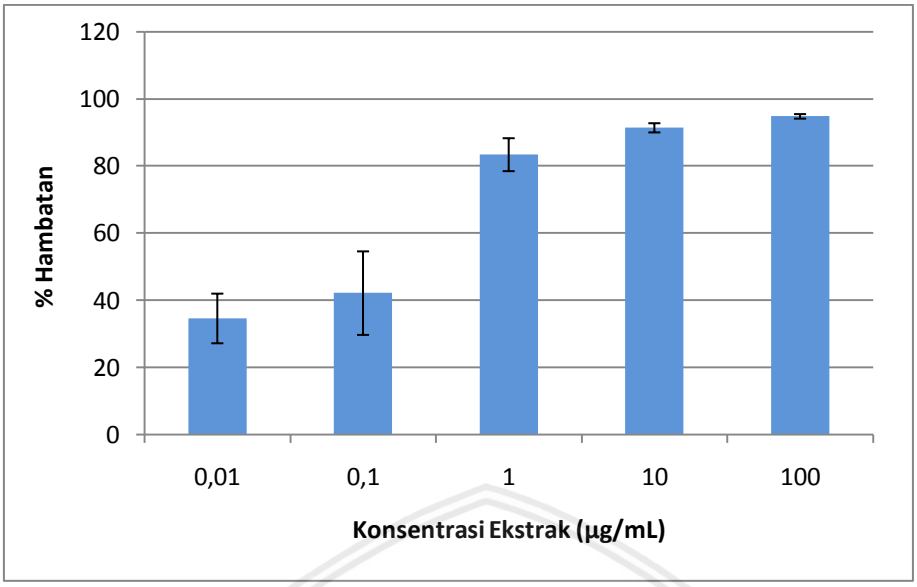
Berdasarkan Gambar 5.7 persen parasitemia semakin tinggi ketika konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin rendah. Persentase parasitemia akan menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak yang diberikan.

5.2.3 Persen Hambatan Pertumbuhan

Persen hambatan pertumbuhan menggambarkan seberapa besar ekstrak daun putri malu dengan berbagai konsentrasi menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum*. Perhitungan ini didasarkan pada perbandingan persentasi persen pertumbuhan sampel uji dengan persen pertumbuhan kontrol negatif.

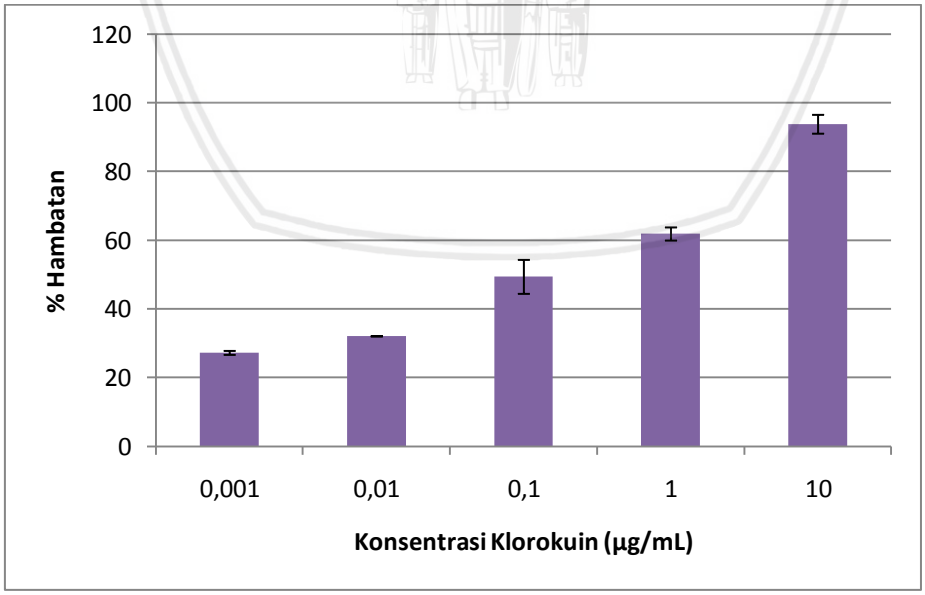
Tabel 5.3 Persen Hambatan Pertumbuhan $H_{48\ jam}$

Sampel	Konsentrasi (µg/mL)	% Hambatan		% Rata-rata±SD
		P_1	P_2	
Ekstrak	100	94,356	95,310	94,833±0,675
	10	92,391	90,456	91,424±1,368
	1	86,896	79,965	83,431± 4,901
	0,1	51,004	33,424	42,214±12,431
	0,01	39,904	29,453	34,679±7,390
Klorokuin	10	95,755	91,880	93,818±2,740
	1	60,533	63,237	61,885±1,912
	0,1	52,900	45,910	49,405±4,943
	0,01	32,135	32,089	32,112±0,033
	0,001	27,689	26,868	27,279±0,581



Gambar 5.8 Diagram Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu dengan Persen Hambatan Pertumbuhan

Berdasarkan Gambar 5.8 persen hambatan pertumbuhan semakin menurun ketika Konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin rendah. Persen hambatan pertumbuhan akan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi atau konsentrasi ekstrak yang diberikan.



Gambar 5.9 Diagram Hubungan Konsentrasi K+ dengan Persen Hambatan Pertumbuhan

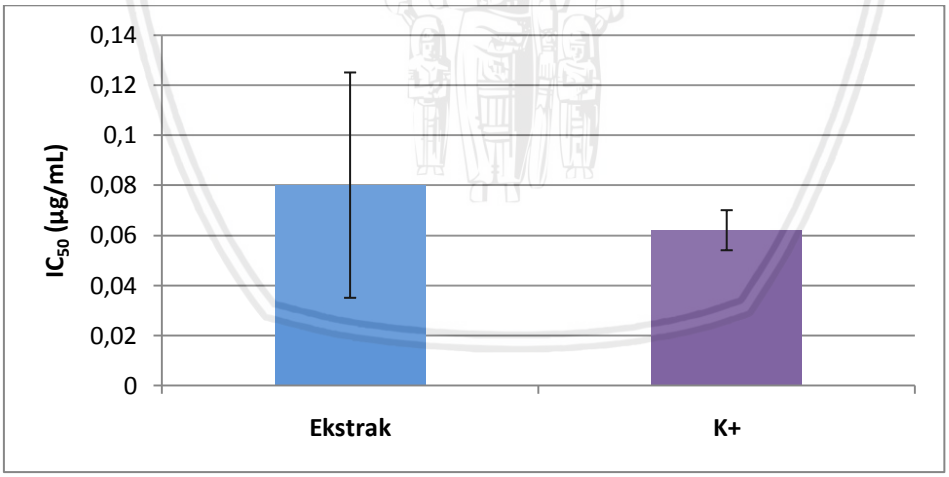
Berdasarkan Gambar 5.9 persen hambatan pertumbuhan semakin menurun ketika konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin rendah. Persen hambatan pertumbuhan akan meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi atau konsentrasi ekstrak yang diberikan.

5.2.4 IC_{50}

Konsentrasi hambatan ekstrak dinyatakan dengan IC_{50} yang menggambarkan jumlah konsentrasi yang mampu menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum* sebanyak 50%. Analisis menggunakan regresi probit (*probability unit*) dilakukan untuk mentukan IC_{50}. Analisis *independent t test* menghasilkan nilai signifikansi 0,754 yang berarti tidak terdapat perbedaan antara IC_{50} ekstrak dan IC_{50} klorokuin (Lampiran 7).

Tabel 5.4 Nilai IC_{50} (µg/mL)

Kelompok	P1	P2	Rata-rata±SD
Ekstrak	0,035	0,126	0,080± 0,045
Klorokuin	0,054	0,070	0,062± 0,008



Gambar 5.10 Diagram IC_{50} Ekstrak Daun Putri Malu dan Klorokuin

5.3 Analisis Data

5.3.1 Analisis Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Klorokuin dengan Persen Parasitemia

Nilai koefisien korelasi Spearman antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persen parasitemia adalah -0,960. Hal ini menandakan korelasi yang kuat antara kedua variabel tersebut.. Nilai sig (2-tailed) 0,000 sehingga terdapat pengaruh yang signifikan antara konsentrasi ekstrak terhadap persen parasitemia. Nilai koefisien korelasi konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia adalah -0,985. Terdapat korelasi yang tinggi antara kedua variabel tersebut. Nilai sig (2-tailed) 0,000 sehingga ada pengaruh yang signifikan antara konsentrasi klorokuin terhadap persen parasitemia. Angka koefisien korelasi negatif menunjukkan hubungan yang berlawanan, dalam hal ini semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan klorokuin, maka persen parasitemia semakin rendah (Payadnya, *et al.,* 2018).

5.3.2 Analisis Hubungan Konsentrasi Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dan Klorokuin dengan Persen Hambatan Pertumbuhan

Nilai koefisien korelasi Spearman antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persen parasitemia adalah 0,960. Hal ini menandakan korelasi yang kuat antara kedua variabel tersebut. Nilai sig (2-tailed) 0,000 sehingga menunjukkan hubungan yang signifikan. Nilai koefisien korelasi konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia adalah 0,985. Berdasarkan literatur, hal ini menandakan korelasi yang kuat antara kedua variabel tersebut. Nilai sig (2-tailed) 0,000 sehingga menunjukkan hubungan yang signifikan. Angka positif menunjukkan hubungan yang berbanding lurus, dalam hal ini semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan klorokuin, maka persen hambatan semakin tinggi. (Payadnya, *et al.,* 2018). Tabel analisis korelasi Spearman dapat dilihat pada Lampiran 7.

5.3.3 Perbandingan IC_{50} Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*) dengan Klorokuin

Analisis regresi probit dilakukan untuk mengetahui nilai IC_{50}. Didapatkan hasil rata-rata IC_{50} ekstrak putri malu adalah 0,080 ± 0,045 µg/mL, sedangkan IC_{50} rata-rata klorokuin adalah 0,062 ± 0,08 µg/mL. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun putri malu dan klorokuin memiliki aktivitas antimalaria yang sangat aktif (<5 µg/mL) (Cincilla *et a.,* 2012)

Analisis *Independent sample t test* dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antara rata-rata IC_{50} ekstrak daun putri malu dengan rata-rata IC_{50} klorokuin. Hasil signifikansi uji hommogenitas Levene menunjukkan nilai 0,000 (< 0,05) hal ini berarti kedua kelompok data bersifat tidak homogen. Didapatkan hasil sig (2 tailed) sebesar 0,754. Nilai tersebut lebih dari 0,05 sehingga dapat diartikan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara IC_{50} ekstrak daun putri malu dengan IC_{50} klorokuin (Payadnya, *et al.,* 2018) Tabel analisis probit dan *independent t test* dapat dilihat pada Lampiran 7.

.

BAB 6

PEMBAHASAN

6.1 Ekstrak Daun Putri Malu

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini didapatkan dari penelitian sebelumnya dengan metode maserasi. Hasil KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun putri malu mengandung senyawa yang berpotensi sebagai antimalaria yaitu terpenoid, alkaloid, dan flavonoid (Legyana, 2018).

6.2 Aktivitas Antimalaria

6.2.1 Kutur *P. falciparum*

Pengujian dilakukan secara duplo menggunakan *microplate* 24 sumuran. Tiap sumuran berisi suspensi parasit yang terdiri atas tiga kelompok perlakuan meliputi kelompok uji yang diberi ekstrak, kelompok yang diberi klorokuin, dan kelompok kontrol negatif yang tidak diberi ekstrak maupun klorokuin.

Disiapkan media pertumbuhan *P. falciparum* selama proses pengujian. Selain sumber nutrisi, RBC berfungsi sebagai lokasi perkembangbiakan Plasmodium secara aseksual Parasit dapat pada semua golongan darah, pada penelitian ini digunakan golongan darah O karena merupakan golongan darah dengan prevalensi paling banyak. RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 sebagai media pertumbuhan yang berisi nutrisi untuk perkembangbiakan sel seperti asam amino, vitamin, glukosa. HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid*) dan $NaHCO_3$ berfungsi sebagai buffer untuk menstabilkan pH kultur, hipoxanthin sebagai sumber purin untuk

pembentukan DNA, gentamisin untuk mencegah pertumbuhan bakteri dan jamur pada kultur (Schuster, 2002).

Pada apusan darah tipis yang telah diwarnai dengan Giemsa akan terlihat sel eritrosit yang berwarna merah keunguan. Pada eritrosit yang terinfeksi, dapat ditemukan parasit dengan warna ungu atau merah yang lebih tajam. Parasit yang terlihat umumnya berbentuk seperti cincin atau titik. Jika tropozoid mulai berkembang, dapat terlihat membran dan hemozoin dengan inti sel yang berwarna lebih gelap. Skizon terlihat memiliki inti sel tebal berwarna coklat gelap, dengan ukuran cukup besar hampir memenuhi eritrosit, pada skizon juga ditemukan beberapa merozoit. Tidak ditemukan gametosit, karena proses gametogenesis membutuhkan perlakuan dan media yang lebih kompleks, gametosit akan terbentuk setelah dua minggu kultur (Dhawan, *et al.,* 2017).

Skizon jarang ditemukan karena pada awal penelitian dilakukan penyeragaman fase Plasmodium menggunakan sorbitol sehingga komposisi skizon dan tropozoid yang digunakan dalam penelitian adalah sekitar 3:7. Hal ini bertujuan untuk menyelaraskan laju pertumbuhan dan memudahkan pengamatan secara visual. Sinkronisasi fase didasarkan pada perbedaan permeabilitas membran partikel. Eritrosit terinfeksi dengan parasit fase skizon memiliki membrane yang termodifikasi menjadi lebih permeable terhadap sorbitol. Sorbitol menyebabkan *shock* osmotik sehingga eritrosit tersebut menjadi lisis menyisakan eritrosit yang sehat dan eritrosit yang terinfeksi fase tropozoit (berbentuk ring) (Schuster, 2002).

Eritrosit yang diamati pada kelompok kontrol negatif pada umumnya mengalami multiinfeksi yaitu lebih dari satu parasit menginfeksi eritrosit yang sama. Fase ring pada kontrol negatif terlihat memiliki membran sel yang lebih tebal dibandingkan pada kelompok klorokuin dan kelompok ekstrak. Jumlah ring yang banyak menunjukkan

bahwa skizon pada kontrol negatif telah matur dan pecah sehingga dapat memproduksi merozoit yang kemudian berkembang menjadi ring dalam kurun waktu siklus yang normal yaitu 48 jam. Pada kelompok klorokuin dan kelompok ekstrak terdapat skizon yang belum matang, hal ini menandakan fase perkembangan yang lebih lambat dibandingkan dengan kontrol negatif.

Kultur dimasukkan dalam *candle jar* untuk menyesuaikan kondisi pertumbuhan parasit dalam kondisi mikro-aerob (oksigen 0,5 - 5%), oksigen yang terlalu banyak akan memperpanjang waktu siklus perkembangan tropozoit maupun skizon karena sintesis DNA menjadi semakin lambat (Briolant *et al,.* 2007). Dilakukan inkubasi selama 48 jam dalam suhu 37˚C. Waktu 48 jam adalah waktu yang dibutuhkan bagi parasit untuk melakukan satu kali siklus perkembangbiakan, digunakan suhu 37˚C untuk menyesuaikan kondisi pengujian dengan suhu tubuh manusia yang sesuai untuk pertumbuhan parasit.

6.2.2 Persen Parasitemia

Perhitungan persen parasitemia dilakukan secara visual menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x, minyak emersi digunakan untuk memperjelas objek pengamatan.

Persen parasitemia awal (D0) pada penelitian ini adalah 1,012%. Berdasarkan literatur, persen inisial parasitemia ideal untuk WHO *microtest* adalah 0,5 - 1%. Jika konsentrasi parasitemia awal melebihi 1% dikhawatirkan pertumbuhan parasit selama inkubasi akan terganggu (Basco, 2007). Penelitian yang dilakukan oleh Mutai (2010) mengemukakan bahwa laju pertumbuhan plasmodium dalam kultur secara *in vitro* adalah 3 - 8 kali lipat setelah inkubasi selama 48 jam. Saat melakukan kultur plasmodium menggunakan metode Trager dan Jensen, konsentrasi parasitemia yang melebihi 6% dapat mengurangi jumlah ketersediaan nutrisi bagi parasit terutama saat

fase perkembangan tropozoid menadi skizon. Perubahan ini memicu peningkatan produksi protein *metacaspase* dan akan menyebabkan apoptosis plasmodium. Hal ini tentunya dihindari agar tidak terjadi bias dalam penelitian.

Setelah inkubasi selama 48 jam, kelompok kontrol negatif memiliki nilai persen parasitemia lebih tinggi dibandingkan dua kelompok lainnya yaitu 4,446%, dengan nilai persen pertumbuhan 3,434%. Hal ini dikarenakan tidak ada senyawa antimalaria yang menghambat pertumbuhan pada kelompok tersebut sehingga parasit dapat tumbuh dan berkembang dengan normal.

Korelasi Spearman dilakukan untuk menganalisa hubungan antara dua atau lebih variabel. Analisa dilakukan dengan dengan tarif kepercayaan 95% (α = 0,05). Nilai *sig. (2-tailed*) kurang dari 0,05 menunjukkan hasil penelitian yang signifikan atau memiliki pengaruh yang besar dalam hasil penelitian. Koefisien korelasi (r) yang mendekati 1 atau -1 menandakan hubungan antara variabel bebas dan variabel terikat yang semakin kuat/ erat (Payadnya *et al.,* 2018).

Nilai koefisien korelasi konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persen parasitemia adalah -0,960. Hal ini menandakan korelasi yang kuat. Nilai *sig.* (*2-tailed*) 0,000 menunjukkan terdapat pengaruh yang signifikan antara konsentrasi ekstrak terhadap persen parasitemia. Nilai koefisien korelasi konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia adalah -0,985. Hal ini menandakan korelasi yang tinggi antara kedua variabel tersebut. Nilai *sig (2-tailed)* 0,001 berarti terdapat pengaruh yang signifikan antara konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan klorokuin, maka persen parasitemia semakin rendah (Payadnya, *et al.,* 2018).

6.2.3 Persen Hambatan Pertumbuhan

Persen hambatan pertumbuhan menggambarkan seberapa besar ekstrak daun putri malu dengan berbagai konsentrasi menghambat pertumbuhan *Plasmodium falciparum*. Perhitungan ini didasarkan pada perbandingan persentasi persen pertumbuhan sampel uji dengan persen pertumbuhan kontrol negatif.

Nilai koefisien korelasi Spearman antara konsentrasi ekstrak daun putri malu dengan persen parasitemia adalah 0,960. Angka tersebut memiliki makna korelasi yang kuat. Nilai *sig (2-tailed)* 0,000 menunjukkan hubungan yang signifikan. Nilai koefisien korelasi konsentrasi klorokuin dengan persen parasitemia adalah 0,985. Berdasarkan literatur, hal ini menandakan korelasi yang kuat antara kedua variabel tersebut. Nilai *sig (2-tailed)* 0,000 sehingga menunjukkan hubungan yang signifikan. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak dan klorokuin, maka persen hambatan semakin tinggi (Payadnya, *et al.,* 2018).

6.2.4 IC_{50}

Aktivitas antimalaria dinyatakan dalam IC_{50} atau konsentrasi senyawa yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan parasit sebesar 50%. Semakin kecil nilai IC_{50}, maka aktivitas antimalaria semakin tinggi. Suatu senyawa dikatakan sangat aktif jika IC_{50} < 5 µg/mL, aktif jika IC_{50} = 5 - 50 µg/mL, rendah jika IC_{50} = 50 - 100 µg/mL, dan tidak aktif jika IC_{50} > 100 µg/ml (Chincilla *et al.,* 2012).

Pada penelitian ini didapatkan hasil IC_{50} ekstrak daun putri malu adalah 0,080 ± 0,045 µg/mL, sedangkan IC_{50} klorokuin adalah 0,062 ± 0,008 µg/mL sehingga ekstrak daun putri malu dan klorokuin memiliki aktivitas antimalaria yang sangat aktif.

Penelitian aktivitas antimalaria ekstrak tanaman putri malu oleh Tran (2003) menghasilkan bahwa ekstrak memiliki efek antimalaria yang aktif (IC_{50} < 10µg/mL) terhadap *plasmodium falciparum* FCR3 (resisten klorokuin dan pirimetamin) secara *in*

vitro. Ekstrak methanol, ekstrak methanol air 1:1, dan ekstrak air tanaman putri malu memiliki nilai IC_{50} berturut turut 4,4 µg/mL; 6,2 µg/mL; 4,0 µg/mL. Dibandingkan dengan ekstrak seluruh bagian tanaman putri malu, ekstrak daun putri malu memiliki aktivitas antimalaria yang lebih tinggi karena metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antimalaria lebih banyak terdapat pada bagian daun. Hasil *screening* fitokimia ekstrak daun putri malu menunjukkan adanya senyawa komponen bioaktif seperti terpenoid, flavonoid, glikosida, alkaloid, kuinin, fenol, tannin, saponin, dan kumarin (Joseph *et al.,* 2013).

Independent sample t-test bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan aktivitas antimalaria klorokuin dan ekstrak daun putri malu. Hasil analisa menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan aktivitas antimalaria antara ekstrak daun putri malu dengan klorokuin sehingga tidak menutup kemungkinan untuk melakukan standarisasi klinis daun putri malu sebagai obat herbal terstandar.

6.3 Mekanisme Antimalaria Ekstrak Daun Putri Malu (*Mimosa pudica*)

Ekstrak daun putri malu mengandung flavonoid, alkaloid, dan terpenoid (Legyana, 2018). Hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Aarthi (2011) dan Widyawaruyati (2014) mengemukakan bahwa senyawa terpenoid, alkaloid, dan flavonoid memiliki efek antimalaria. Secara umum, flavonoid bekerja pada jalur permeasi baru sehingga menghambat masuknya nutrisi parasit saat stadium intraeritrositik. Sel eritrosit yang terinfeksi akan mengalami peningkatan permeabilitas terhadap zat yang dibutuhkan parasit, proses ini diperantarai oleh jalur permeasi baru (*New Permeation Pathhway,* NPP). Flavonoid juga bekerja pada vakuola makanan parasit dengan menghambat proses detoksifikasi heme (Widyawaruyanti et al., 2011). Senyawa flavonoid kumarin dapat mengganggu proses sintesis DNA dengan menghambat DNA *gyrase* parasit (Dar, 2007). Terpenoid bekerja dengan menghambat

pertumbuhan fase plasmodium tropozoit dan menghambat masuknya nutrisi ke dalam parasit melalui jalur permeasi.

Alkaloid adalah senyawa basa nitrogen dimana struktur antara alkaloid satu dengan yang lain berbeda-beda meskipun berada dalam satu golongan. Umumnya senyawa alkaloid memiliki prekursor dari asam amino seperti mimosin yang merupakan derivat dari lysin. Penelitian yang dilakukan oleh Naughton (2006) mengemukakan bahwa mimosin dapat digunakan untuk sinkronisasi plasmodium karena memiliki efek penghambatan yang reversibel terhadap proses pembelahan sel pada fase S (replikasi DNA) sehingga pembentukan skizon dari tropozoid terhambat. Mekanisme kuinin dan kuinidin sebagai antimalaria masih belum diketahui dengan pasti namun terdapat penelitian yang menyatakan bahwa efek antimalaria senyawa tersebut disebabkan karena inhibisi proses digesti hemoglobin, mengganggu replikasi DNA, dan mengganggu proses pembentukan hemozoin. Alkaloid golongan 4-aminokuinolin berperan dalam menghambat proses detoksifikasi heme (Pacifici, 2018; Hill, *et al.,* 2018).

6.4 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan dari penelitian yang dilakukan adalah dalam pengamatan secara visual, tidak dapat diketahui apakah tropozoid yang diamati mengalami alterasi pada membran ataupun sitoplasmanya karena hal tersebut tidak tampak ketika menggunakan mikroskop cahaya. Pada penelitian ini, perhitungan persen parasitemia hanya dilakukan oleh satu orang peneliti tanpa dilakukan perhitungan ulang oleh pengamat yang lain. Oleh karena itu, diperlukan kecermatan dan ketelitian dalam melakukan pengamatan di bawah mikroskop.

BAB 7

KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat diambil kesimpulan sebagai berikut:

1. Ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica)* mampu menurunkan persen parasitemia *Plasmodium falciparum* 3D7.
2. Ekstrak etanol 96% daun putri malu (*Mimosa pudica)* mampu meningkatkan persen hambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* 3D7.
3. Tidak terdapat perbedaan aktivitas antimalaria ekstrak daun putri malu dengan klorokuin. Nilai IC_{50} ekstrak etanol daun putri malu adalah 0,080 ± 0,045 µg/mL. Konsentrasi tersebut termasuk kategori aktivitas antimalaria yang sangat aktif.

7.2 Saran

Disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai aktivitas dan mekanisme antimalaria oleh fraksi atau isolat daun putri malu terhadap *Plasmodium falciparum* galur sensitif klorokuin atau *Plasmodium falciparum* galur resisten antimalaria.

repository.ub.ac.id

DAFTAR PUSTAKA

Aarthi N., Murugan K. Antimalarial Ativity and Phytochemical Screening of Ethanolic Leaf Extract of *Phyllanthus niruri and Mimosa pudica. International Journal of Pharmaceutical Research and Development,* 2011, 3(3): 198-205.

Adia MM., Emami SN., Byamukama R., Faye I., Karlson A. Antiplasmodial Activity and Phytochemical Analysis of Extracts from Selected Ugandan Medicinal Plants. *Journal of Etyhnopharmaology,* 2016, 186: 14-19

Agudelo O., Arango E. Prevalence of Gestational, Placental, and Congenital Malaria in North-West Colombia. *Malaria Journal,* 2013, 12:341.

Azwanida NN. A Review on the Extration Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength, and Limitation. *Med Aromat Plants*,2015, 4(3).

Bahtiar A.,Vichitpan K., Han J. Leguminous Plants in the Indonesian Arhipelago: Tradotional Uses and Secondary Metabolites. *Natural Produt Communiation,* 2017, 12(3): 461-472.

Bartoloni A., Zammarchi L. Clinicca Aspet of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Inectious Diseases*,2012, Vol. 4 No. 1.

Basco, L.K. 2007. *Field Application of In Vitro Assays for The Sensitivity of Human Malaria Parasites to Antimalarial Drug*. France: World Helath Organization.

Bridgford J, Xie S , Cobbold S, Pasaje C, Herrmann S, Yang T, *et al.* Artemisinin Kills Malaria Parasites by Damaging Proteins and Inhibiting the Proteasome. *Nature Communications,* 2018, 9:3801.

Briolant S, Parola P,Fusaï T, Torrentin M, Baret E, Mosnier J, *et al.,* Influence of Oxygen on Asexual Blood Cycle and Susceptibility of *Plasmodium falciparum* to Chloroquine: Requirement of A Standardized *In Vitro* Assay.*Malaria Journal,* 2007, Vol. 6:44.

CDC. 2017. Division *of Parasitic Disease and Malaria.Laboratory Identification of Parasitic Diseases of Public Health Concern.* Global Health, USA, (Online), (www.cdc.gov/parasites/, diakses tanggal 20 Oktober 2018).

CDC. 2019. *Treatment of Malaria (Guideline for Clinicians).* Global Health, USA, (Online), (www.cdc.gov/parasites/, diakses tanggal 7 Juli 2019).

Chinchilla, M., Valerio, I., Sanchez, R., Mora, V., Bagnarello, V., Mrtinez, L., Gonzales, A., Vagena, J.C., Apestegui, A. In Vitro Antimalarial Activity of Extracts of Some Plants from A Biological Reserve in Costa Rica. *Rev.Biol.Trop.,* 2012, Vol. 60 (20): 881-891.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Dalimartha, S. 1999. Atlas Tumbuhan Obat Indonesia. Jilid I. Niaga Swadaya. Jakarta.

Dar MA, Sharma A, Mondal N, Dhar KS. Molecular Cloning of Apicoplast-Targeted *P. falciparum* DNA Gyrase Genes. *Eucaryotic Cell*, 2007, 398-412

Dechamps S, Maynadier M,Wein S, Gannoun L, Maréchal E, Vial H. Rodent and Nonrodent Malaria Parasites Differ in Their Phospholipid Metabolic Pathways. *Journal of Lipid Research,*2010, Vol. 51.

DEPKES RI, 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Jakarta.* Departemen Kesehatan Indonesia, Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Direktorat Pengawasa Obat Tradisional.

DEPKES RI, 2014. *Farmakope Indonesia V.* Jakarta. Departemen Kesehatan Indonesia.

Desgrouas C., Chapus C., Desplans J., Travaille C., Pasual A., Baghdikian B.,*et al.,* In Vitro Antipasmodial Activity of Cepharanthine. *Malaria Journal*, 2014, 13 (1):327.

Dhawan R, Pillai C,Mohanty AK, Kumar A. Achieving in vitro gametocytogenesis of Plasmodium falciparum in optimal conditions: A review. *International Journal of Medical and Health Research,* 2017, Vol 3(12): 83-90

Dorokhov Y, Shindyapina A, Sheshukova E, dan Dhorokov T, Metabolic Methanol: Molecular Pathways And Physiological Roles. *Komarova Physiol* , 2015 95: 603–644

Ghatnatti R., Teli A., Bhattacharya S., Sengupta G. Cardiopulmonary Bypass induced Fever and Systemic Inflammatory Response Syndrome in Paediatric Patients: Management Strategy. *International Journal of Biomedical and Advance Research,* 2013, 04(04).

Gupta A., Naraniwal M., Kothari V. Modern Extraction Methods for Preparation of Bioactive Plants Extracts. *IASET,* 2012, 8(26).

Halfadji A., Touabet A., Yacine A. Comparison of Soxhlet Extraction, MAE and Ultrasonic Extraction for the determination of PCBs Congeners in Spiked Soils by Transformer Oil (ASKAREL). *IJAET,* 2013, 5(2):63-75.

Handa SS., Khanuja SPS., Longo G., Rakesh DD. 2008. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, *International Centre for Science and High Technology*.

Hill SR, Sharma GK. 2018. *Antimalarial Medications*. (https://www. ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470158/) Diakses pada 21 Mei 2019.

Joseph B., George J., Mohan J. Pharmacology and Traditional Uses of *Mimosa* pudica. *International Journal of Pharmaceutical Sciences,* 2013, 5(2): 41-44.

Kaur P., Kumar N., Shivanananda T. N., dan Kaur G. Phytochemical screening and antimicrobial activity of the plant extracts of *Mimosa pudica L*. against selected microbes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, 5(22): 5356-5359.

Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. 2013. *Profil Kesehatan Indonesia 2012*. Pusat Data dan Informasi, Jakarta, hal. 101-167.

Kemenkes RI. 2017. *Buku Saku Penatalaksanaan Kasus Malaria.* Ditjen Pencegahan dan Pengendalian Penyakit, Jakarta.

Kemenkes RI. 2017. *Data dan Informasi Profil Kesehatan Indonesia 2016.* Pusat Data dan Informasi Kementerian Kesehatan RI. Jakarta.

Legyana, Amanda, 2018. *Perbandingan Efek Antibakteri Ekstrak Daun Putri Malu (Miosa pudica) dengan Berbagai Metode sebagai Anti-Staphylococcus aureus.* Skripsi. Tidak diterbitkan. Fakultas Kedokteran Universitas Brawiaya. Malang.

Leoni S., Buonrate D., Angheben A., Gobbi F., Bisoffi Z. The Hyper-reactive Malarial Splenomegaly: A Systematic Review of the Literature. *Malaria Journal*, 2015, 14:185.

Lindorfer MA., Cook EM., Taylor RP. Compstatin Cp40 Blocks Hematin-Mediated Deposition of C3b Fragments on Erythrocytes: Implications for Treatment of Malariall Anemia.*Clinical Immuniligy,* 2016, 171:32-35.

Mekonnen KS, Aseffa A, Berhe N, Teklehaymanot T, Clouse RM, Gebru, *et al*., Return of Chlorouine-Sensitive *Plasmodium falciparum* Parasites and Emergence of Chloroquine-Resistant *Plasmodium vivax* in Ethiopia. *Malaria Journal*, 2014, 13: 244.

Muhammad G., Hussain MA., Jantan I., Bukhari SNA. *Mimosa pudica* L. A High Value Mediinal Plant as a Sooure of Bioactives or Pharmaceutials. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2016, Vol 15.

Mukhriani. 2014. *Ekstraksi, Pemisahan Senyawa, dan Identifikasi Senyawa Aktif*. Fakultas Ilmu Kesehatan UIN Alauddin, Makassar.

Mutai dan Waitumbi. Apoptosis Stalks *Plasmodium falciparum* Maintained in Continuous Culture Condition. *Malaria Journal,* 2010, 9(3):S6

Muti'ah R. Penyakit Malaria dan Mekanisme Kerja Obat-obat Antimalaria. *Alchemy,*2012, 2(1): 80-91.

Naughton dan Bell A.Studies on Cell-Cycle Synchronization in The Asexual Erythrocytic Stages of Plasmodium falciparum. *Department of Microbiology*, 2006, 134: 331–337.

Nindatu, M., 2008. *Efek Antimalaria Senyawa Flavonoid Kulit Batang Cempedak (Artocarpus cempeden Spreng) Pada Morfologi dan aktivitas Biokimiawi Parasit Malaria*. Tesis. Tidak diterbitkan. Fakultas Farmasi Universitas Airlangga. Surabaya.

Nugroho S, Akbar S, dan Vusvitasari R. Kajian Hubungan Koefisien Korelasi Pearson (*r*), Spearman-rho (*ρ*), Kendall-Tau (*τ*), Gamma (*G*) , dan Somers (d_{yx}). *Jurnal Gradien*.2008, Vol.4(2): 372-381

Pacifici G. Clinical Pharmacology of the Antimalarial Artemisinin-Based Combination and other Artemisinins in Children. *Int J Pediatric,* 2018, 6(7): 7901-28.

Paloque L., Ramadani AP., Puijalon OM., Augereau JM., Vical FB. *Malaria Journal*, 2016, 15(149).

Payadnya I, Jayantika I. 2018. *Panduan Penelitian Eksperimen beserta Analisis Statistik dengan SPSS.* Deepublish, Yogyakarta.

Schuster FL. Cultivation of *Plasmodium* spp. *American Society for Microbiology*, 2002, Vol 15(3).

Setiani NRW. 2014. *Gambaran Klinis dan Tatalaksana Pasien Rawat Inap Malaria Falcipparum di RSUP DR Kariadi Semarang Pperiode 2009-2013.*Laporan Hasil Karya Tulis Ilmiah. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro, Semarang.

Shorvon D., Andermann F., Guerrini R. 2011. *The Causes of Epilepsy: Common and Uncommon Causes in Adults and Children*. Cambridge University Press. UK.

Sinha S., Sarma P., Sehgal R., Medhi B.Development in Assay Methods for In Vitro Antimalarial Drug Efficacy Testing: A Systematic Review. *Frontiers in Pharmacology,* 2017, 8(24)

Soedarto2012. *Protozoologi Kedokteran.* Karya Putra Darwati, Bandung.

Torres REM., Banegas EI., Mendoza M., Diaz C., Bucheli STM., Fontecha GA., *et al.* Efficacy of Chloroquinr for the Treatment of Unomplicated *Plasmodium falciparum* Malaria in Honduras. *ASTMH,* 2013, 88(5): 850-854.

Tomar N., Singh SV., Jain CL., Verma G., Pal A., Singh V. Synthesis and Antiplasmodial Activity of some Novel Chalcone Derivates. *Asian Journal of Pharmmaceutical and Clinical Research,* 2015, 8(2).

Tran Q, Tezuka Y, Ueda J, Nguyen N, Maruyama Y, Begum K, *et al.* In Vitro Antiplasmodial Activity of Antimalarial Medicinal Plants Used in Vietnamese Traditional Medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 2003, 86 : 249–252.

Ursache FM, Ghinea IO, Turturica M, Aprodu I, Repeanu G, Stanciuc N. Phytochemicals Content and Antioxidant Properties Of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides L*.) As Affected By Heat Treatment – Quantitative Spectroscopic and Kinetic Approaches. *Food Chemistry,*2017, 233: 442-449.

Varnika S., Ashish S., Imran A., A Review on Ethnomedical and Traditional Uses of *Mimosa pudica* (Chui-Miu).*International Research Journal of Pharmacy,* 2012, 3(2): 2230-8407

Vinothapooshan G, Sundar K. 2010. Wound healing effect of various extracts of *Mimosa pudica*. *Pharmacol Online* 1:307–15.

Voight (1994) Voight, R., 1994, Buku Pengantar Teknologi Farmasi, 572-574, diterjemahkan oleh Soedani, N., Edisi V, Yogyakarta, Universitas Gadjah Mada Press.

Wandra. 2015. *Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanolik Putri Malu (Mimosa pudica Linn) terhadap Candida albicans secara In Vitro.* Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

World Health Organization (WHO). 2010. *Basic Malaria Microscopy*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (WHO). 2015. *Guidelines For The Treatment Of Malaria, 3rd ed*. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (WHO). 2017. *World Malaria Report 2017*. Geneva: World Health Organization.

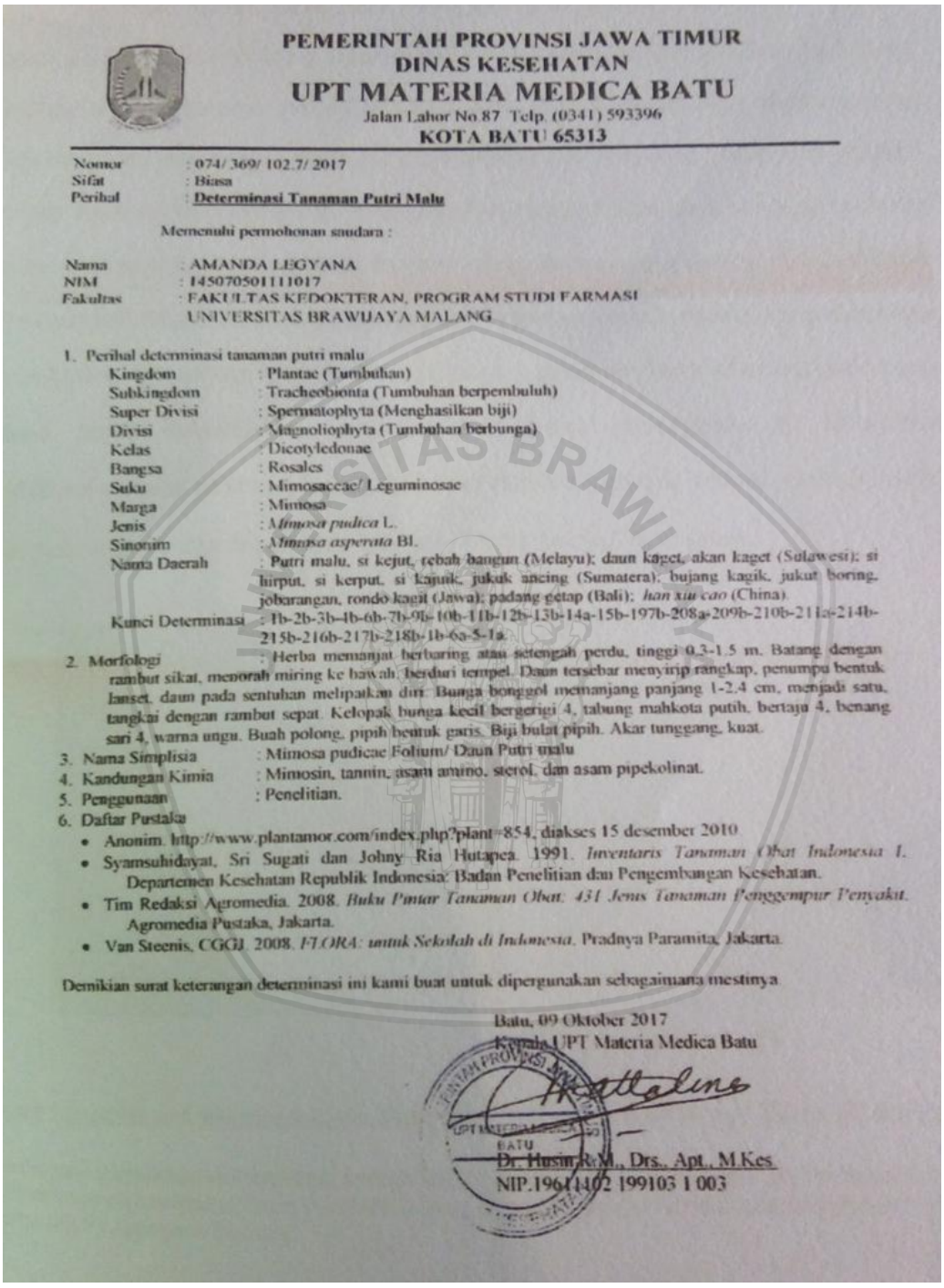
Widyawaruyati A, Zaini N, Syafruddin. Mekanisme dan Aktivitas Antimalaria dari Senyawa Flavonoid yang Diisolasi dari Cempedak (*Artocampus champeden*).*JBP,*2011. Vol. 3(2).

Widyawaruyanti A., Devi A.P., Fatria N., Tumewu L., Tantular I.S., Hafid A.F. In Vitro Antimalarial Activity Screening of Several Indonesian Plants Using Hrp2 Assay. *IJPPS*, 2014, Vol.6: 6-9.

Yusuf, Y., Anti-Malarial Drug Resistance. *MKA*, 2015, 37(1):65-69.

Zeibig E.2013. *Clinical Parasitology – E-book: A Practial Approach*. Missouri.Elsevier Saunders.

Lampiran 1. Sertifikat Determinasi Tanaman Putri Malu



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No 87 Telp. (0341) 593396
KOTA BATU 65313

Nomor : 074/ 369/ 102.7/ 2017
Sifat : Biasa
Perihal : **Determinasi Tanaman Putri Malu**

Memenuhi permohonan saudara :

Nama : AMANDA LEGYANA
NIM : 145070501111017
Fakultas : FAKULTAS KEDOKTERAN, PROGRAM STUDI FARMASI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA MALANG

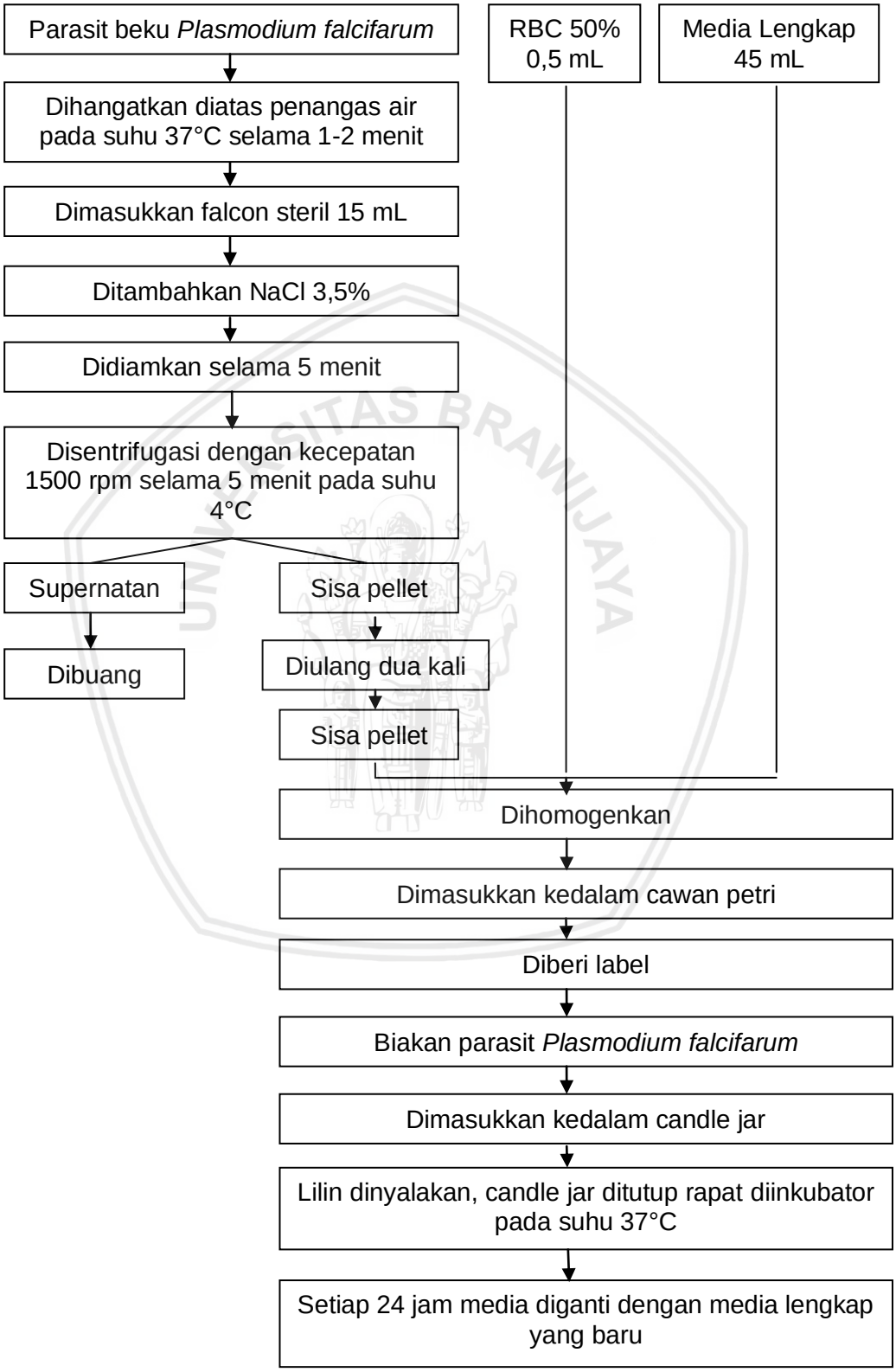
1. Perihal determinasi tanaman putri malu
   - Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
   - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
   - Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
   - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
   - Kelas : Dicotyledonae
   - Bangsa : Rosales
   - Suku : Mimosaceae/ Leguminosae
   - Marga : Mimosa
   - Jenis : *Mimosa pudica* L.
   - Sinonim : *Mimosa asperata* Bl.
   - Nama Daerah : Putri malu, si kejut, cebah bangun (Melayu); daun kaget, akan kaget (Sulawesi); si hirput, si kerput, si kajuik, jukuk ancing (Sumatera); bujang kagik, jukut boring, joharangan, rondo kagit (Jawa); padang getap (Bali); *han xiu cao* (China).
   - Kunci Determinasi : 1b-2b-3b-4b-6b-7b-9b-10b-11b-12b-13b-14a-15b-197b-208a-209b-210b-211a-214b-215b-216b-217b-218b-1b-6a-5-1a.
2. Morfologi : Herba memanjat berbaring atau setengah perdu, tinggi 0,3-1,5 m. Batang dengan rambut sikat, menoreh miring ke bawah, berduri tempel. Daun tersebar menyirip rangkap, penumpu bentuk lanset, daun pada sentuhan melipatkan diri. Bunga bonggol memanjang panjang 1-2,4 cm, menjadi satu, tangkai dengan rambut sepat. Kelopak bunga kecil bergerigi 4, tabung mahkota putih, bertaju 4, benang sari 4, warna ungu. Buah polong, pipih bentuk garis. Biji bulat pipih. Akar tunggang, kuat.
3. Nama Simplisia : Mimosa pudicae Folium/ Daun Putri malu
4. Kandungan Kimia : Mimosin, tannin, asam amino, sterol, dan asam pipekolinat.
5. Penggunaan : Penelitian.
6. Daftar Pustaka
   - Anonim. http://www.plantamor.com/index.php?plant=854, diakses 15 desember 2010
   - Syamsuhidayat, Sri Sugati dan Johny Ria Hutapea. 1991. *Inventaris Tanaman Obat Indonesia I*. Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan.
   - Tim Redaksi Agromedia. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat. 431 Jenis Tanaman Penggempur Penyakit*. Agromedia Pustaka, Jakarta.
   - Van Steenis, CGGJ. 2008. *FLORA: untuk Sekolah di Indonesia*. Pradnya Paramita, Jakarta.

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

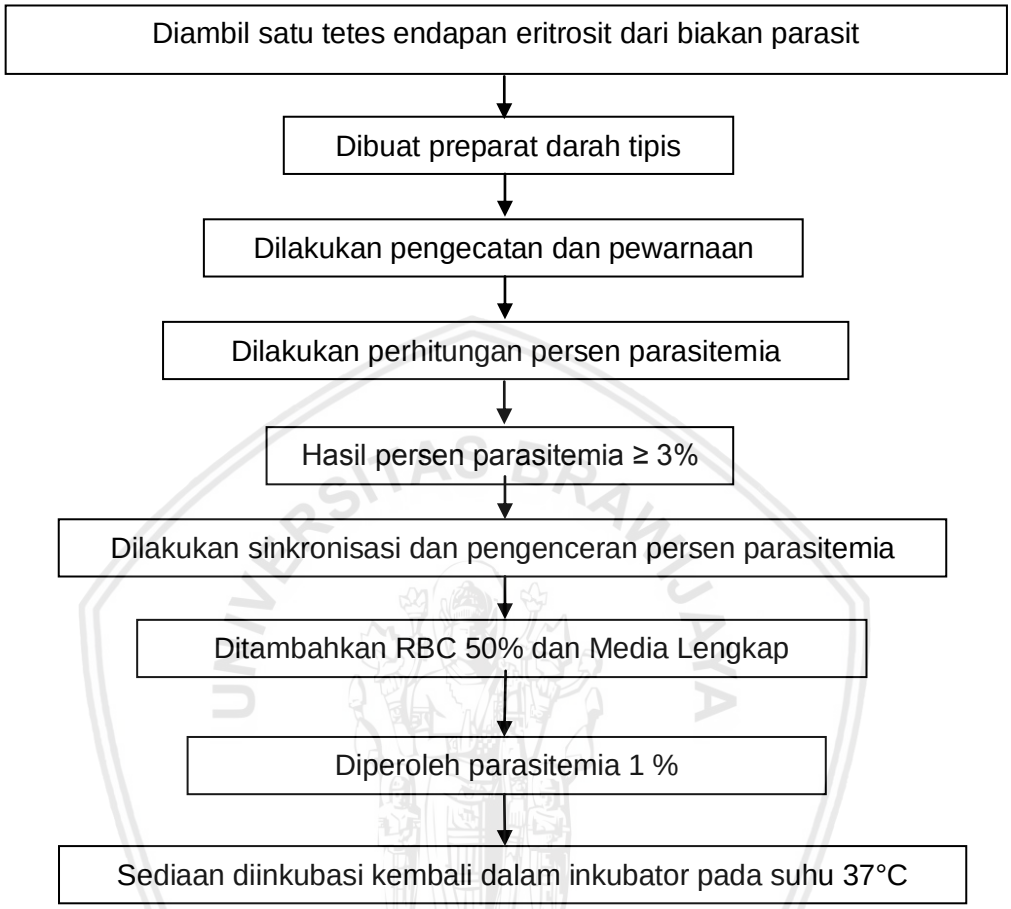
Batu, 09 Oktober 2017
Kepala UPT Materia Medica Batu

Dr. Husin R.M., Drs., Apt., M.Kes.
NIP.19611102 199103 1 003

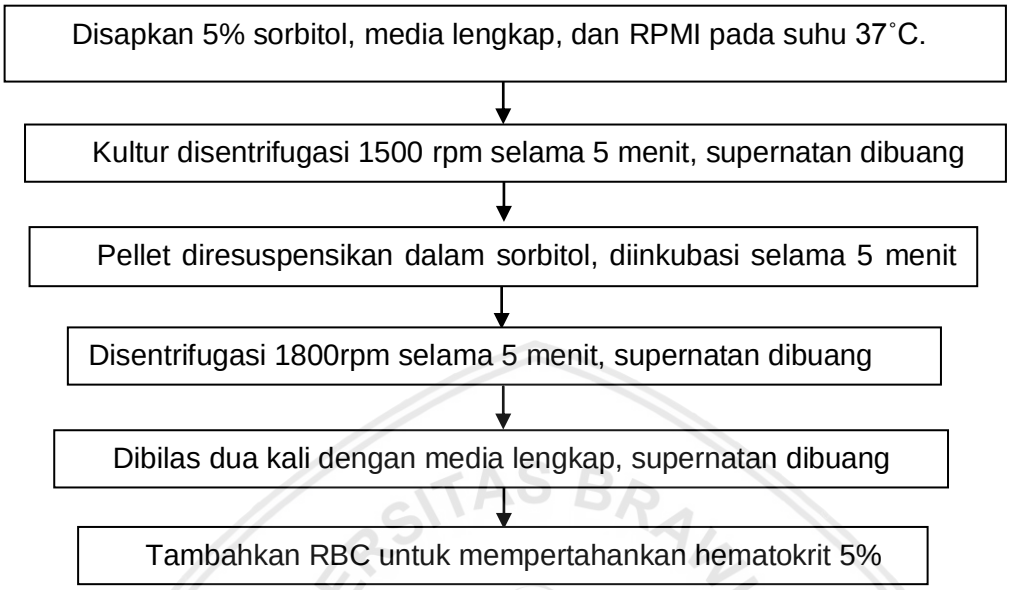
Lampiran 2. Prosedur Thawing dan Pembiakan *P. falciparum*



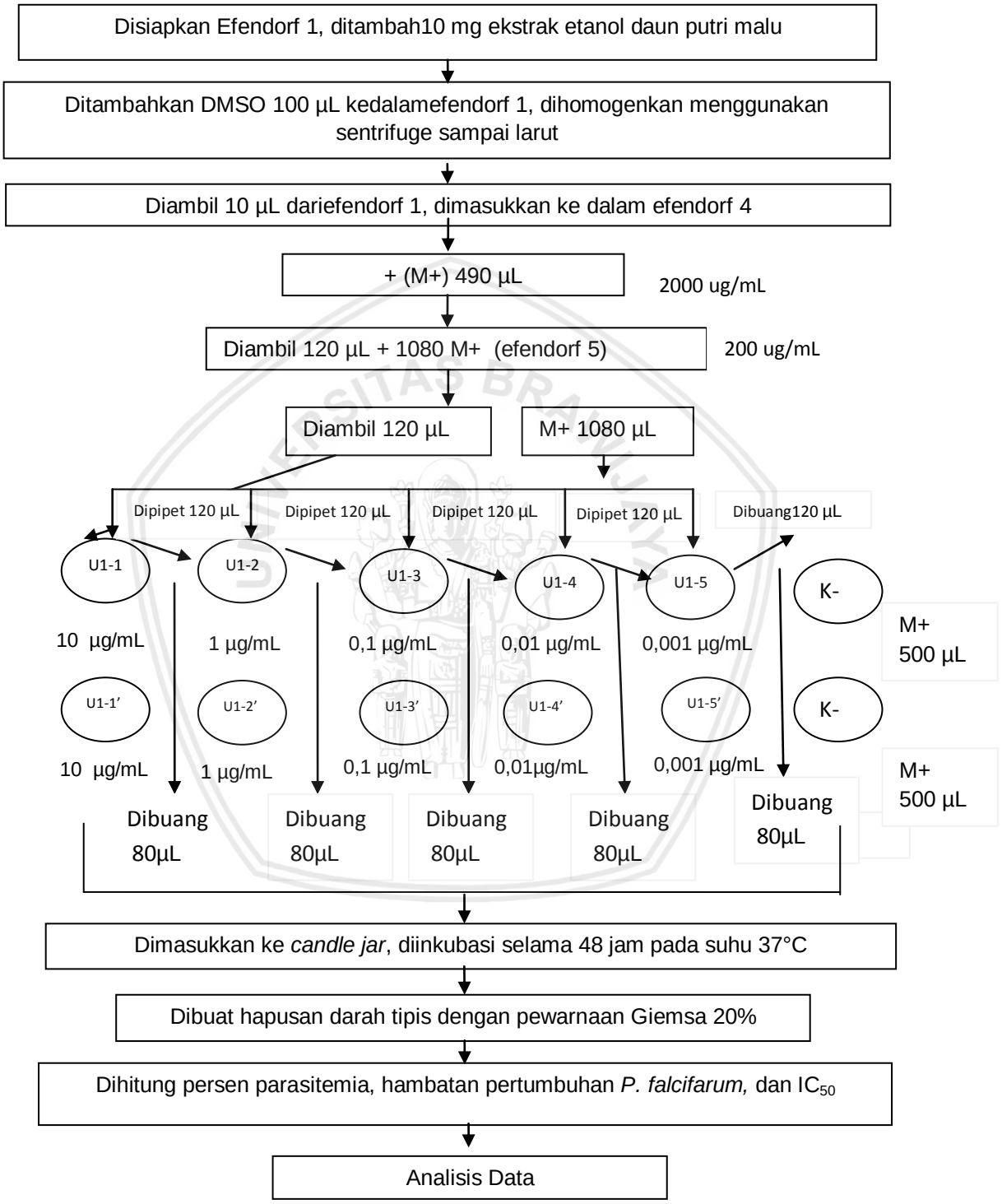
Lampiran 3. Prosedur Sub Kultur



Lampiran 4. Alur Penelitian Sinkronisasi Kultur



Lampiran 5. Alur Penelitian Uji Aktivitas Antimalaria



Lampiran 6. Tabel Hasil Pengamatan

Kelompok	Xe	X	Parasitemia (%)	Pertumbuhan (%)
D0	11	1087	1,012	-
K-1	48	1161	4,134	3,122
K-2	59	1240	4,758	3,746
Rata-rata K-			4,446	3,434

Kelompok	Dosis (µg/Ml)	Eritrosit		% Parasitemia	% Pertumbuhan	% Hambatan	IC_{50} Rata-Rata
		Xe	Total				
Ekstrak P_1	100	15	1244	1,206	0,194	94,356	0,0805 µg/mL
	10	13	1021	1,273	0,261	92,391	
	1	15	1026	1,462	0,45	86,896	
	0,1	27	1002	2,695	1,683	51,004	
	0,01	43	1398	3,076	2,064	39,904	
IC_{50}	0,035 µg/mL						
Ekstrak P_2	100	16	1364	1,173	0,161	95,31	
	10	14	1045	1,34	0,328	90,456	
	1	17	1000	1,7	0,688	79,965	
	0,1	44	1334	3,298	2,286	33,424	
	0,01	35	1019	3,435	2,423	29,453	
IC_{50}	0,126 µg/mL						
Klorkuin P_1	10	16	1382	1,158	0,146	95,755	0,0620 µg/mL
	1	29	1225	2,367	1,355	60,533	
	0,1	33	1255	2,629	1,618	52,9	
	0,01	48	1436	3,343	2,331	32,135	
	0,001	41	1173	3,495	2,483	27,689	
IC_{50}	0,054 µg/mL						
Klorokuin P_2	10	17	1317	1,291	0,279	91,88	
	1	29	1275	2,275	1,263	63,237	
	0,1	33	1150	2,87	1,858	45,91	
	0,01	41	1226	3,344	2,332	32,089	
	0,001	42	1192	3,523	2,512	26,868	
IC_{50}	0,070 µg/mL						

Lampiran 7. Analisis Statistik

1. Korelasi Spearman

a. Satistik Deskriptif Data Ekstrak

Tabel Standard Koefisien Korelasi (Payadnya, *et al.,* 2018)

Nilai r	Korelasi
0	Tidak ada korelasi
0 < r ≤ 0,2	Sangat rendah
0,2 < r ≤ 0,4	Rendah
0,4 < r ≤ 0,7	Cukup berarti
0,7 < r ≤ 0,9	Tinggi/ kuat
0,9 < r < 1	Sangat tinggi/ sangat kuat
1	Sempurna

Kontrol Negatif

K-	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Parasitemia (%)	2	4,134	4,758	4,44600	,441235
Pertimbuhan (%)	2	3,122	3,746	3,43400	,441235
Valid N (listwise)	2				

Persen Parasitemia

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
100	2	1,173	1,206	1,190	0,023
10	2	1,273	1,34	1,307	0,047
1	2	1,462	1,7	1,581	0,168
0.1	2	2,695	3,298	2,997	0,426
0.01	2	3,076	3,435	3,256	0,254
Valid N (listwise)	2				

Persen Hambatan

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
100	2	94,356	95,310	94,833	0,675
10	2	90,456	92,391	91,424	1,368
1	2	79,965	86,896	83,431	4,901
0.1	2	33,424	51,004	42,214	12,431
0.01	2	29,453	39,904	34,679	7,390
Valid N (listwise)	2				

b. Koefisien Korelasi Ekstrak Daun Putri Malu

Ekstrak	Mean	Std. Deviation	N
Konsentrasi	22,22200	41,182315	10
Parasitemia	2,06580	,942778	10
Hambatan	69,31590	27,451355	10

Sampel Ekstrak		Konsentrasi	Parasitemia	Hambatan
Konsentrasi	Correlation Coefficient	1,000	-,960	,960
	Sig. (2-tailed)	.	,000	,000
	N	10	10	10
Parasitemia	Correlation Coefficient	-,960(**)	1,000	-1,000(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	.	,000
	N	10	10	10
Hambatan	Correlation Coefficient	,960(**)	-1,000(**)	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	.
	N	10	10	10

** *Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)*

.Nilai koefisien korelasi (r) tinggi/kuat

b. Satistik Deskripti Data Klorokuin

Persen Parasitemia

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
10	2	1,158	1,291	1,225	0,094
1	2	2,275	2,367	2,321	0,065
0.1	2	2,629	2,870	2,750	0,170
0.01	2	3,343	3,344	3,344	0,001
0.001	2	3,495	3,523	3,509	0,020
Valid N (listwise)	2				

Persen Hambatan

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
10	2	91,880	95,755	93,818	2,740
1	2	60,533	63,237	61,885	1,912
0.1	2	45,910	52,900	49,405	4,943
0.01	2	32,089	32,135	32,112	0,033
0.001	2	26,868	27,689	27,279	0,581
Valid N (listwise)	2				

d. Koefisien Korelasi Klorokuin

Klorokuin	Mean	Std. Deviation	N
Konsentrasi	2,22220	4,118231	10
Parasitemia	2,62950	,867713	10
Hambatan	52,8996	25,27078	10

Sampel Klorokuin		Konsentrasi	Parasitemia	Hambatan
Konsentrasi	Correlation Coefficient	1,000	-,985	,985
	Sig. (2-tailed)	.	,000	,000
	N	10	10	10
Parasitemia	Correlation Coefficient	-,985(**)	1,000	-1,000(**)
	Sig. (2-tailed)	,000	.	,000
	N	10	10	10
Hambatan	Correlation Coefficient	,985(**)	-1,000(**)	1,000
	Sig. (2-tailed)	,000	,000	.
	N	10	10	10

** *Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed)*

Nilai Koefisien korelasi (r) tinggi/kuat

2. Analisis Probit untuk menentukan IC_{50}

a. Analisis Probit Ekstrak Putri Malu Percobaan Kedua

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis)(a)		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
,010	,000	,000	,000	-5,743	-12,810	-3,761
,020	,000	,000	,000	-5,240	-11,643	-3,432
,030	,000	,000	,001	-4,921	-10,903	-3,223
,040	,000	,000	,001	-4,682	-10,347	-3,065
,050	,000	,000	,001	-4,487	-9,896	-2,936
,060	,000	,000	,001	-4,320	-9,512	-2,825
,070	,000	,000	,002	-4,175	-9,175	-2,728
,080	,000	,000	,002	-4,044	-8,875	-2,641
,090	,000	,000	,003	-3,926	-8,601	-2,561
,100	,000	,000	,003	-3,817	-8,350	-2,488
,150	,000	,000	,007	-3,365	-7,312	-2,180
,200	,001	,000	,012	-3,006	-6,493	-1,931
,250	,002	,000	,019	-2,698	-5,794	-1,712
,300	,004	,000	,031	-2,421	-5,172	-1,511
,350	,007	,000	,048	-2,165	-4,602	-1,318
,400	,012	,000	,075	-1,921	-4,069	-1,127
,450	,021	,000	,117	-1,686	-3,563	-,932
,500	,035	,001	,187	-1,454	-3,078	-,727
,550	,060	,002	,314	-1,223	-2,612	-,503
,600	,103	,007	,563	-,987	-2,165	-,250
,650	,180	,018	1,120	-,744	-1,740	,049

,700	,325	,046	2,595	-,488	-1,342	,414
,750	,615	,107	7,376	-,211	-,972	,868
,800	1,251	,238	27,322	,097	-,623	1,437
,850	2,860	,528	144,468	,456	-,278	2,160
,900	8,096	1,264	1334,832	,908	,102	3,125
,910	10,409	1,540	2315,102	1,017	,188	3,365
,920	13,676	1,900	4229,084	1,136	,279	3,626
,930	18,464	2,383	8239,547	1,266	,377	3,916
,940	25,819	3,056	17435,155	1,412	,485	4,241
,950	37,844	4,036	41196,425	1,578	,606	4,615
,960	59,305	5,566	113769,435	1,773	,746	5,056
,970	103,025	8,209	399269,515	2,013	,914	5,601
,980	214,676	13,638	2137310,758	2,332	1,135	6,330
,990	682,832	29,918	30517693,023	2,834	1,476	7,485

b. Analisis Probit Ekstrak Percobaan Kedua

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis)(a)		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
,010	,000	,000	,001	-4,531	-10,191	-2,934
,020	,000	,000	,002	-4,106	-9,198	-2,652
,030	,000	,000	,003	-3,836	-8,569	-2,472
,040	,000	,000	,005	-3,633	-8,098	-2,335
,050	,000	,000	,006	-3,468	-7,714	-2,223
,060	,000	,000	,007	-3,327	-7,389	-2,128
,070	,001	,000	,009	-3,204	-7,104	-2,043
,080	,001	,000	,011	-3,093	-6,849	-1,967
,090	,001	,000	,013	-2,993	-6,618	-1,898
,100	,001	,000	,015	-2,901	-6,406	-1,833
,150	,003	,000	,027	-2,518	-5,531	-1,562
,200	,006	,000	,046	-2,214	-4,844	-1,339
,250	,011	,000	,073	-1,953	-4,261	-1,140
,300	,019	,000	,112	-1,719	-3,747	-,952
,350	,032	,001	,170	-1,502	-3,280	-,768
,400	,051	,001	,262	-1,296	-2,850	-,582
,450	,080	,004	,412	-1,096	-2,450	-,385
,500	,126	,008	,673	-,900	-2,075	-,172
,550	,198	,019	1,165	-,704	-1,726	,066
,600	,313	,040	2,183	-,505	-1,402	,339
,650	,503	,079	4,532	-,299	-1,102	,656
,700	,829	,150	10,674	-,082	-,824	1,028
,750	1,421	,275	29,302	,153	-,560	1,467
,800	2,591	,499	97,706	,413	-,302	1,990
,850	5,218	,928	427,997	,718	-,033	2,631
,900	12,593	1,886	2947,387	1,100	,276	3,469
,910	15,579	2,220	4735,322	1,193	,346	3,675
,920	19,630	2,644	7947,400	1,293	,422	3,900

,930	25,311	3,195	14084,148	1,403	,504	4,149
,940	33,619	3,934	26767,563	1,527	,595	4,428
,950	46,472	4,971	55866,189	1,667	,696	4,747
,960	67,979	6,519	133127,956	1,832	,814	5,124
,970	108,507	9,053	389022,624	2,035	,957	5,590
,980	202,030	13,918	1628898,406	2,305	1,144	6,212
,990	538,151	27,102	15741503,735	2,731	1,433	7,197

c. Analisis Probit Klorokuin Percobaan 1

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis)(a)		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
,010	,000	,000	,000	-6,211	-25,446	-3,830
,020	,000	,000	,000	-5,632	-22,712	-3,490
,030	,000	,000	,001	-5,265	-20,980	-3,271
,040	,000	,000	,001	-4,988	-19,679	-3,105
,050	,000	,000	,001	-4,763	-18,621	-2,969
,060	,000	,000	,001	-4,572	-17,722	-2,852
,070	,000	,000	,002	-4,404	-16,935	-2,749
,080	,000	,000	,002	-4,254	-16,231	-2,655
,090	,000	,000	,003	-4,117	-15,591	-2,569
,100	,000	,000	,003	-3,992	-15,003	-2,489
,150	,000	,000	,007	-3,471	-12,579	-2,149
,200	,001	,000	,014	-3,057	-10,669	-1,862
,250	,002	,000	,025	-2,702	-9,051	-1,595
,300	,004	,000	,047	-2,383	-7,624	-1,329
,350	,008	,000	,090	-2,087	-6,339	-1,045
,400	,016	,000	,190	-1,807	-5,176	-,720
,450	,029	,000	,479	-1,536	-4,137	-,319
,500	,054	,001	1,605	-1,269	-3,244	,205
,550	,100	,003	7,977	-1,002	-2,523	,902
,600	,186	,011	61,448	-,731	-1,970	1,789
,650	,355	,029	709,668	-,450	-1,544	2,851
,700	,700	,063	11829,405	-,155	-1,197	4,073
,750	1,459	,128	288481,399	,164	-,892	5,460
,800	3,305	,252	11284051,795	,519	-,599	7,052
,850	8,572	,508	880166160,998	,933	-,294	8,945
,900	28,435	1,146	227074229975,961	1,454	,059	11,356
,910	37,987	1,383	874946979904,046	1,580	,141	11,942
,920	52,033	1,694	3797419581938,347	1,716	,229	12,579
,930	73,541	2,110	19125552989162,140	1,867	,324	13,282
,940	108,225	2,690	116684422380180,300	2,034	,430	14,067
,950	168,154	3,537	920718860455209,000	2,226	,549	14,964

,960	282,197	4,860	1046377572 7365920,000	2,451	,687	16,020
,970	533,299	7,153	2085880702 26562800,0	2,727	,854	17,319
,980	1242,858	11,882	1120767258 05259100	3,094	1,075	19,050
,990	4715,948	26,168	6041708559 224140	3,674	1,418	21,781

d.Analisis Probit Klorokuin Percobaan 2

Probability	95% Confidence Limits for Dosis			95% Confidence Limits for log(Dosis)(a)		
	Estimate	Lower Bound	Upper Bound	Estimate	Lower Bound	Upper Bound
,010	,000	,000	,000	-6,280	-15,753	-4,136
,020	,000	,000	,000	-5,679	-14,085	-3,757
,030	,000	,000	,000	-5,298	-13,028	-3,514
,040	,000	,000	,000	-5,011	-12,234	-3,330
,050	,000	,000	,001	-4,778	-11,590	-3,179
,060	,000	,000	,001	-4,580	-11,042	-3,050
,070	,000	,000	,001	-4,405	-10,563	-2,936
,080	,000	,000	,001	-4,250	-10,134	-2,833
,090	,000	,000	,002	-4,108	-9,745	-2,739
,100	,000	,000	,002	-3,977	-9,387	-2,652
,150	,000	,000	,005	-3,437	-7,915	-2,283
,200	,001	,000	,011	-3,008	-6,758	-1,976
,250	,002	,000	,020	-2,639	-5,782	-1,696
,300	,005	,000	,038	-2,308	-4,926	-1,424
,350	,010	,000	,072	-2,002	-4,160	-1,145
,400	,019	,000	,144	-1,711	-3,472	-,842
,450	,037	,001	,320	-1,430	-2,859	-,495
,500	,070	,005	,823	-1,153	-2,325	-,085
,550	,133	,013	2,548	-,876	-1,872	,406
,600	,255	,032	9,629	-,594	-1,490	,984
,650	,497	,069	44,251	-,303	-1,161	1,646
,700	1,008	,137	247,618	,003	-,864	2,394
,750	2,158	,263	1728,500	,334	-,580	3,238
,800	5,041	,511	16043,074	,703	-,292	4,205
,850	13,550	1,051	226857,541	1,132	,022	5,356
,900	47,014	2,486	6664646,601	1,672	,396	6,824
,910	63,493	3,045	15157895,212	1,803	,484	7,181
,920	88,002	3,787	37075732,508	1,944	,578	7,569
,930	126,000	4,806	99317219,233	2,100	,682	7,997
,940	188,133	6,258	299114719,263	2,274	,796	8,476
,950	297,179	8,437	1054149463,531	2,473	,926	9,023
,960	508,502	11,954	4642623584,821	2,706	1,078	9,667
,970	984,182	18,288	28820880264,697	2,993	1,262	10,460

,980	2367,568	32,041	3278830745 36,798	3,374	1,506	11,516
,990	9444,166	76,939	1525902719 1907,150	3,975	1,886	13,184

3. Independent T-Test

Tabel Aktivitas Antimalaria (Chincilla *et al.*, 2012)

IC_{50} (µg/mL)	Aktivitas Antimalaria
< 5	Sangat aktif
5-50	Aktif
50-100	Rendah
> 100	Tidak aktif

Satistik Deskriptif

IC_{50}	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Ekstrak	2	,035	,126	,08050	,064347
Kklorokuin	2	,05	,07	,0620	,01131

Independent T Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
									95% Confidence Interval of the Difference	
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	Lower	Upper
Parameter	Equal variances assumed	9E+015	,000	,400	2	,728	,018500	,046198	-,180274	,217274
	Equal variances not assumed			,400	1,062	,754	,018500	,046198	-,493645	,530645

Nilai signifikansi > 0,05 IC_{5p} ekstrak etanol daun putri malu tidak berbeda dengan IC_{5p} klorokuin dengan kategori aktivitas sangat aktif < 5 µg/mL