

**LAPORAN PENELITIAN KOMPETITIF DOSEN**  
**TAHUN ANGGARAN 2016**

**PENELUSURAN EFIKASI KOMBINASI EKSTRAK *Calotropis gigantea* DENGAN  
ARTEMISIN PADA PARASIT *Plasmodium berghei*  
SEBAGAI ANTIMALARIA**

Nomor DIPA	:	DIPA BLU: DIPA-025.04.2.423812/2016
Tanggal	:	7 Desember 2015
Satker	:	(423812) UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
Kode Kegiatan	:	(2132) Peningkatan Akses, Mutu, Kesejahteraan dan Subsidi Pendidikan Tinggi Islam
Kode Sub Kegiatan	:	(008) Penelitian Yang Bermutu
Kegiatan	:	(004) Dukungan Operasional penyelenggaraan Pendidikan

**Oleh:**

Roihatul Muti'ah, S.F, M.Kes, Apt      198002032009122003  
Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt      1988112420160801 2805



**KEMENTERIAN AGAMA**  
**LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGABDIAN KEPADA MASYARAKAT (LP2M)**  
**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG**  
**2016**

**HALAMAN PENGESAHAN**

Laporan penelitian ini disahkan oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat  
Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang  
Pada tanggal 13 September 2016

Peneliti

Ketua : Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP.198002032009122003

Anggota : .....  
Anggota : Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIP. 1988112420160801 2805

KETUA LP2M  
UIN Maulana Malik Ibrahim Malang

Dr. Hj.Mufidah Ch., M.Ag  
NIP. 196009101989032001

## **PERNYATAAN ORISINALITAS PENELITIAN**

Kami yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP : 198002032009122003  
Pangkat/Gol.Ruang : Lektor/IIIId  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan dalam penelitian : Ketua Peneliti

Nama : Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIPT : 1988112420160801 2805  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIIb  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan Dalam Penelitian : Anggota Peneliti

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa dalam penelitian ini tidak terdapat unsur-unsur penjiplakan karya penelitian atau karya ilmiah yang pernah dilakukan atau dibuat oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis disebutkan dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka. Apabila dikemudian hari ternyata dalam penelitian ini terbukti terdapat unsur-unsur penjiplakan dan pelanggaran etika akademik, maka kami bersedia mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima dan diproses sesuai aturan perundang-undangan yang berlaku.

Malang 13 September 2016

**Ketua peneliti**

Materai 6000

Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP.198002032009122003

**Anggota Peneliti**

Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIDT. 1988112420160801 2805

## **PERNYATAAN KESANGGUPAN MENYELESAIKAN PENELITIAN**

**Kami yang bertanda tangan di bawah ini:**

Nama : Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP : 198002032009122003  
Pangkat/Gol.Ruang : Lektor/IIIId  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan dalam penelitian : Ketua Peneliti

Nama : Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIP : 1988112420160801 2805  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIId  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan Dalam Penelitian : Anggota Peneliti

Dengan ini menyataan bahwa:

1. Kami sanggup menyelesaikan dan menyerahkan laporan hasil penelitian sesuai dengan batas waktu yang telah ditetapkan (20 Desember 2016)
2. Apabila sampai dengan batas waktu yang telah ditetapkan kami belum menyerahkan laporan hasil, maka kami sanggup mengembalikan dana penelitian yang telah kami terima

Malang 13 September 2016

**Ketua peneliti**

Materai 6000

Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP.198002032009122003

**Anggota Peneliti**

Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIP. 1988112420160801 2805

## **PERNYATAAN TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR**

**Kami yang bertanda tangan di bawah ini:**

Nama : Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP : 198002032009122003  
Pangkat/Gol.Ruang : Lektor/IIIid  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan dalam penelitian : Ketua Peneliti

Nama : Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIP : 1988112420160801 2805  
Pangkat/Gol.Ruang : Asisten Ahli/IIib  
Fakultas/Jurusan : SAINTEK/Farmasi  
Jabatan Dalam Penelitian : Anggota Peneliti

Dengan ini menyataan bahwa:

1. Kami TIDAK SEDANG TUGAS BELAJAR
2. Apabila diemudian hari terbukti bahwa saya sedang tugas belajar, maka secara langsung saya akan mengembalikan dana yang telah saya terima dari Program Penelitian Dosen tahun 2016  
Demikian surat pernyataan ini saya buat sebagaimana mestinya

Malang 13 September 2016

**Ketua peneliti**

Materai 6000

Roihatul Muti'ah, M.Kes., Apt  
NIP.198002032009122003

**Anggota Peneliti**

Weka Sidha Bagawan, M.Farm, Apt  
NIDT. 1988112420160801 2805

## DAFTAR ISI

<b>HALAMAN SAMPUL.....</b>	<b>i</b>
<b>HALAMAN PENGESAHAN.....</b>	<b>ii</b>
<b>DAFTAR ISI.....</b>	<b>iii</b>
<b>RINGKASAN .....</b>	<b>iv</b>
<b>BAB I. PENDAHULUAN.....</b>	<b>1</b>
A. Latar Belakang.....	1
B. Rumusan Masalah.....	3
C. Tujuan Penelitian.....	3
D. Manfaat Penelitian.....	3
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>	<b>4</b>
A. Deskripsi Widuri ( <i>Calotropis gigantean</i> ).....	4
1. Gambar Tanaman Widuri.....	4
2. Kandungan Senyawa Kimia Daun Widuri.....	5
<b>BAB III. METODE PENILITIAN.....</b>	<b>7</b>
A. Tahapan Penelitian.....	7
1. Road Map Penelitian.....	7
2. Tempat Penelitian.....	9
3. Bahan Penelitian.....	9
4. Alat Penelitian.....	9
B. Rancangan Penelitian.....	10
1. Determinasi Tanaman.....	10
2. Persiapan Sampel.....	10
3. Ekstraksi.....	10
4. Pengujian Aktivitas Antimalaria pada Hewan Coba.....	10
C. Pembuatan Donor.....	11
D. Inokulasi Parasit.....	11
E. Pengukuran Derajat Parasitemia.....	12
5. Analisis Data.....	12
<b>BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>17</b>
<b>BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>56</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA</b>	
<b>LAMPIRANLAMPIRAN</b>	

## RINGKASAN

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang tersebar diseluruh dunia dan menyebabkan kematian yang tinggi. Kesulitan pemberantasan penyakit malaria terkait erat dengan kemampuan parasit malaria membentuk pertahanan diri terhadap obat-obat antimalaria, sehingga parasit menjadi resisten terhadap obat malaria. Baru-baru ini telah dilaporkan bahwa *Plasmodium falciparum* juga resisten terhadap artemisinin. Uji sensitifitas dehydroartemisinin terhadap *Plasmodium falciparum* secara *in vitro* menunjukkan adanya peningkatan IC<sub>50</sub>. Sehingga sampai saat ini masih perlu dikembangkan obat antimalaria baru untuk mengatasi masalah tersebut di atas. Salah satu alternatif bahan obat yang bisa digunakan adalah dari bahan alam. Bahan alam merupakan sumber yang potensial untuk pengembangan obat antimalaria baru. Kelebihan bahan alam sebagai bahan baku obat adalah karena efikasi obat malaria bahan alam lebih stabil dibandingkan dengan bahan sintetis serta efek samping yang ditimbulkan lebih rendah dibanding bahan sintetis. Salah satu bahan alam yang menarik untuk diteliti adalah *Calotropis gigantea*.

Secara ilmiah tanaman tersebut telah terbukti mempunyai beberapa efek farmakologi khususnya pada bagian akar. Pada bagian akar tanaman ini telah terbukti aktif sebagai antipiretik (Chitme dkk, 2005), sitotoksik (Wang dkk, 2008), antimikroba (Alam dkk, 2008), insektisida (Alam dkk, 2009), CNS (Argal dan Pathak, 2006), kontrasepsi (Srivastava, 2007). Dari beberapa efek farmakologi tersebut masih belum diketahui efek farmakologi bagian akar tanaman ini sebagai antimalaria. Namun penelitian terbaru pada bagian daun menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Calotropis gigantea* efektif sebagai antimalaria secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 dengan nilai EC<sub>50</sub> 3,29 µg/ml (Wong *et al*, 2011). Bagian daun dan bagian akar tanaman C.gigantea ini telah diketahui mengandung senyawa aktif Calotropon yang diduga bertanggung jawab terhadap aktifitas farmakologi tersebut (Habib, 2010). Dengan pendekatan kesamaan kandungan kimia antara bagian daun dan bagian akar tersebut peneliti ingin membuktikan efek antimalaria pada bagian akar. Peneliti memilih bagian akar dikarenakan bagian tersebut adalah bagian yang paling melimpah (akar gada), sehingga diharapkan ketersediaan bahan baku juga melimpah. Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa Dosis efektif ekstrak akar *Calotropis gigantea* yang dapat mengambat pertumbuhan parasit yaitu sebesar 4,45 mg/Kg BB. Ekstrak akar *Calotropis gigantea* diketahui dapat bekerja secara sinergis dengan Artemisinin. Dari hasil Kromatografi Lapis Tipis diketahui bahwa Senyawa yang terdapat pada ekstrak akar *Calotropis gigantea* adalah senyawa golongan Glikosida cardenolid dan senyawa terpenoid

## **BAB I**

### **PENDAHULUAN**

#### **A. Latar belakang**

Malaria merupakan salah satu penyakit infeksi yang tersebar diseluruh dunia. Sekitar 2,57 miliar atau 41% dari jumlah penduduk dunia tinggal di daerah transmisi infeksi *Plasmodium falciparum* yang berisiko terkena malaria termasuk Indonesia (Gething *et al*, 2011; WHO, 2011). Menurut data dari WHO tahun 2010, 37% penduduk Indonesia tinggal di daerah endemis malaria dengan tingkat transmisi infeksi tinggi yang meliputi seluruh wilayah provinsi Bengkulu, Kepulauan Bangka Belitung, Kalimantan Tengah, Sulawesi Utara, Gotontalo, Sulawesi Tengah, Maluku, Nusa Tenggara Barat, Nusa Tenggara Timur, Papua Barat dan Papua. Sedangkan provinsi lainnya merupakan daerah endemis malaria dengan tingkat transmisi infeksi rendah. Jumlah kasus malaria yang ditemukan pada tahun 2010 di Indonesia mencapai 229.829 kasus dengan angka kematian akibat malaria sebesar 432 orang (WHO, 2010).

Kesulitan pemberantasan penyakit malaria terkait erat dengan kemampuan parasit malaria membentuk pertahanan diri terhadap obat-obat antimalaria, sehingga parasit menjadi resisten terhadap obat malaria. *Plasmodium falciparum*, yang merupakan spesies terbanyak di Indonesia (53%) (WHO, 2011), telah ditemukan resisten terhadap klorokuin. Pada tahun 1993, telah dilaporkan bahwa *Plasmodium falciparum* resisten klorokuin di 22 provinsi dan 11 provinsi ternyata resisten terhadap obat antimalaria multidrug (Tjitra, 2004; Fidock *et al*, 2004).

Baru-baru ini telah dilaporkan bahwa *Plasmodium falciparum* juga resisten terhadap artemisin. Uji sensitifitas dehydroartemisinin terhadap *Plasmodium falciparum* secara *in vitro* menunjukkan adanya peningkatan IC<sub>50</sub> (Noedl, 2008; Pilai *et al*, 2012; Dondorp, 2009). Disamping itu artemisin mempunyai waktu paruh yang sangat singkat sehingga sering timbul rekrudesensi setelah terapi (Sardjono dan Fitri, 2007). Sehingga sampai saat ini masih perlu dikembangkan obat antimalaria baru untuk mengatasi masalah tersebut di atas. Salah satu alternative sumber bahan obat antimalaria yang bisa digunakan adalah dari bahan alam. Dalam hal ini peneliti akan menguji potensi antimalaria menggunakan bahan alam sebagai bahan baku obat dengan alasan karena efikasi

obat malaria bahan alam lebih stabil dibandingkan dengan bahan sintetis. Selain itu efek samping bahan alam jauh lebih kecil dibandingkan dengan obat sintesis (Yeung *et al*, 2008). Salah satu bahan alam yang menarik untuk di teliti adalah *Calotrophis gigantea*.

*Calotrophis gigantea* merupakan tanaman obat tradisional yang tumbuh di, Bangladesh, Burma, China, India, Indonesia, Malaysia, Pakistan, Philippina, Thailand dan Srilanka. Di Indonesia secara turun temurun tanaman ini telah dimanfaatkan untuk obat gatal-gatal, kudis,bisul, batuk, trachoma, konstipasi (daunnya), asma, mual, nyeri lambung (bunganya), rajasinga, digigit ular berbisa (akarnya), sakit gigi, Bengkak-bengkak, radang telinga, cacingan dan disentri (Mardisiswojo dan Radjakmanugunsudarso, 1968). Secara ilmiah tanaman tersebut telah terbukti mempunyai beberapa efek farmakologi khususnya pada bagian akar.. Pada bagian akar tanaman ini telah terbukti aktif sebagai antipiretik (Chitme dkk, 2005), sitotoksik (Wang dkk, 2008), antimikroba (Alam dkk, 2008), insektisida (Alam dkk, 2009), CNS (Argal dan Pathak, 2006), kontrasepsi (Srivastava, 2007). Dari beberapa efek farmakologi tersebut masih belum diketahui efek farmakologi bagian akar tanaman ini sebagai antimalaria.

Namun penelitian terbaru pada bagian daun menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun *Calotrophis gigantea* efektif sebagai antimalaria secara *in vitro* terhadap *Plasmodium falciparum* 3D7 dengan nilai EC<sub>50</sub> 3,29 µg/ml (Wong *et al*, 2011). Bagian daun dan bagian akar tanaman C.gigantea ini telah diketahui mengandung senyawa aktif Calotropon yang diduga bertanggung jawab terhadap aktifitas farmakologi tersebut (Habib, 2010). Dengan pendekatan kesamaan kandungan kimia antara bagian daun dan bagian akar tersebut peneliti ingin membuktikan efek antimalaria pada bagian akar. Peneliti memilih bagian akar dikarenakan bagian tersebut adalah bagian yang paling melimpah (akar gada), sehingga diharapkan ketersediaan bahan baku juga melimpah.

Pada penelitian ini akan dilakukan pengujian efek antimalaria ekstrak etanolik pada bagian akar tanaman *C.gigantea* dalam bentuk tunggal (monoterapi) dan dalam bentuk kombinasinya dengan artemisin. Hasil yang akan diperoleh dari penelitian ini adalah efek antimalaria dalam bentuk sediaan tunggal (monoterapi) dan dalam bentuk kombinasi dengan artemisin. Pengujian dalam bentuk

kombinasi ini penting untuk dilakukan dengan harapan pemberian kombinasi ekstrak *C. gigantea* dengan artemisin dapat bekerja secara sinergis sehingga efeknya jauh lebih tinggi dari pada penggunaan secara monoterapi. Selain itu penggunaan kombinasi ekstrak tersebut diharapkan dapat meningkatkan sensitifitas artemisin sehingga kerja artemisin menjadi lebih efektif. Kedepannya peneliti akan mengembangkan ekstrak akar *C. gigantea* menjadi produk Obat Herbal Terstandar (OHT).

## **B. Rumusan Masalah**

1. Bagaimana efektifitas antimalaria ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA?
2. Bagaimanakah efektifitas antimalaria kombinasi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan artemisin pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA?

## **C. Tujuan Penelitian**

1. Untuk mengetahui efektifitas antimalaria ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA
2. Untuk membuktikan efektifitas antimalaria kombinasi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan artemisin pada mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA

## **D. Manfaat penelitian**

1. Manfaat teoritis:

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi ilmiah tentang efektifitas antimalari ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan kombinasinya dengan artemisin.

2. Manfaat Praktis:

- a. Mendapat obat antimalaria baru yang efektif
- b. Mendapat data efektifitas antimalaria dari akar *Calotropis gigantea* sebagai langkah awal uji praklinik untuk dikembangkan menjadi produk Obat Herbal Terstandar (OHT) maupun sebagai Fitofarmaka.
- c. Untuk memacu penelitian yang berasal dari tanaman obat tradisional (jamu) beserta pengembangannya terutama yang berhasiat sebagai antimalaria.

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### A. Deskripsi Widuri (*Calotropis gigantea*)

Tanaman widuri banyak ditemukan di daerah bermusim kemarau panjang, seperti padang rumput yang kering, lereng-lereng gunung yang rendah dan pantai berpasir (Dalimarta, 2003).

Widuri (*Calotropis gigantea*) merupakan tanaman perdu, berumur menahun (perennial) dengan tinggi  $\pm 2$  m. Akar tanaman widuri adalah tunggang. Batang aerial, berkayu, silindris, warna putih kotor, permukaan halus, percabangan simpodial (batang utama tidak tampak jelas). Tanaman ini memiliki daun tunggal, tidak bertangkai (sesilis), tersusun berhadapan (folia oposita), warna hijau keputih-putihan, panjang 8-20 cm, lebar 4-15 cm, helaian daun agak tebal - tegar, bentuk bulat telur, ujung tumpul (obtusus), pangkal berlekuk (emarginatus), tepi rata, pertulangan menyirip (pinnate) dan permukaan kasap (scaber). Bunga majemuk, bentuk payung (umbella), muncul dari ketiak daun (axillaris), bertangkai panjang, kelopak berwarna hijau, mahkota berwarna putih sedikit keunguan, panjang mahkota  $\pm 4$  mm. Buah bumbung (folliculus), bulat telur, warna hijau, bentuk dengan biji lonjong, kecil - berwarna cokelat. Bijinya kecil, lonjong, pipih, berwarna cokelat, berambut pendek dan tebal, umbai rambut serpa sutera panjang. Perbanyakan secara generatif (biji) (Ditjenbun, 2010).



Gambar 2.1 Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) (Brown SH, 2010)

Klasifikasi tanaman widuri adalah sebagai berikut (Ditjenbun, 2010):

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
- Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
- Super Divisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
- Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
- Kelas : Magnoliopsida (berkeping dua/dikotil)
- Sub Kelas : Asteridae
- Ordo : Gentianales
- Famili : *Asclepiadaceae*
- Genus : *Calotropis*
- Spesies : *Calotropis gigantea* Willd

Khasiat tanaman widuri antara lain: kulit akar widuri berkhasiat sebagai kolagoga, peluruh keringat (diaforetik), perangsang muntah (emetik), memacu kerja enzim pencernaan (alternatif), dan peluruh kencing (diuretik). Kulit kayu widuri berkhasiat sebagai obat muntah (emetik), bunga sebagai tonik dan penambah nafsu makan (stomakik).

Daun berkhasiat *rubifasien* dan menghilangkan gatal. Getahnya beracun dan dapat menyebabkan muntah. Namun berkhasiat sebagai obat pencahar (Dalimarta, 2003).

## 2.2 Kandungan Senyawa Kimia Daun Widuri (*Calotropis gigantea*)

Daun widuri mengandung saponin, flavonoid, polifenol, tanin, dan kalsium oksalat. Getah mengandung racun jantung yang menyerupai digitalis (Dalimarta, 2003).

Hasil uji fitokimia ekstrak hidroalkohol daun widuri menunjukkan adanya karbohidrat, alkaloid, flavonoid, steroid, protein, asam amino dan tanin. Ekstrak ini menunjukkan aktivitas antioksidan (Singh; Jain; Kannoja; Garud; Pathak and Mehta, 2010). Sedangkan kandungan fitokimia ekstrak etanol 80% daun widuri menunjukkan adanya alkaloid, *cardiac glycosides*, flavonoid, tanin, triterpenoid, karbohidrat dan saponin (Yaligar, tanpa tahun). Senyawa kelompok *cardenolic*

*glycoside* dalam daun widuri meliputi *coroglaucigenin*, *frugoside* dan *4-o-beta-D-glukopyranosylfrugoside* (Ahmed, Kumar and Robbins, 2005)

Hasil uji secara *in vitro* menunjukkan bahwa ekstrak daun widuri (*Calotropis gigantea*) memiliki aktivitas antiproliferatif dalam menghambat 6 sel kanker manusia yaitu, MCF-7, MDA-MB-231, Hela, HT-29, SKOV-3 dan HepG2 (Wong; Lim; Abdullah and Nordin, 2011).

Flavonoid, polifenol dan tanin merupakan senyawa yang berfungsi sebagai antioksidan karena ketiga senyawa tersebut adalah senyawa-senyawa fenol, yaitu senyawa dengan gugs -OH yang terikat pada karbon cincin aromatik. Flavonoid berfungsi sebagai antioksidan yang efektif dengan memberikan atom hidrogen pada radikal bebas sehingga terbentuk produk radikal bebas sehingga terbentuk produk radikal bebas sendiri pada senyawa ini. Produk radikal bebas senyawa-senyawa ini terstabilkan secara resonansi akibat adanya ikatan rangkap terkonjugasi dan oleh karena itu tidak reaktif dibandingkan dengan kebanyakan radikal bebas lain (Fessenden dan Fessenden, 1982).

## BAB III

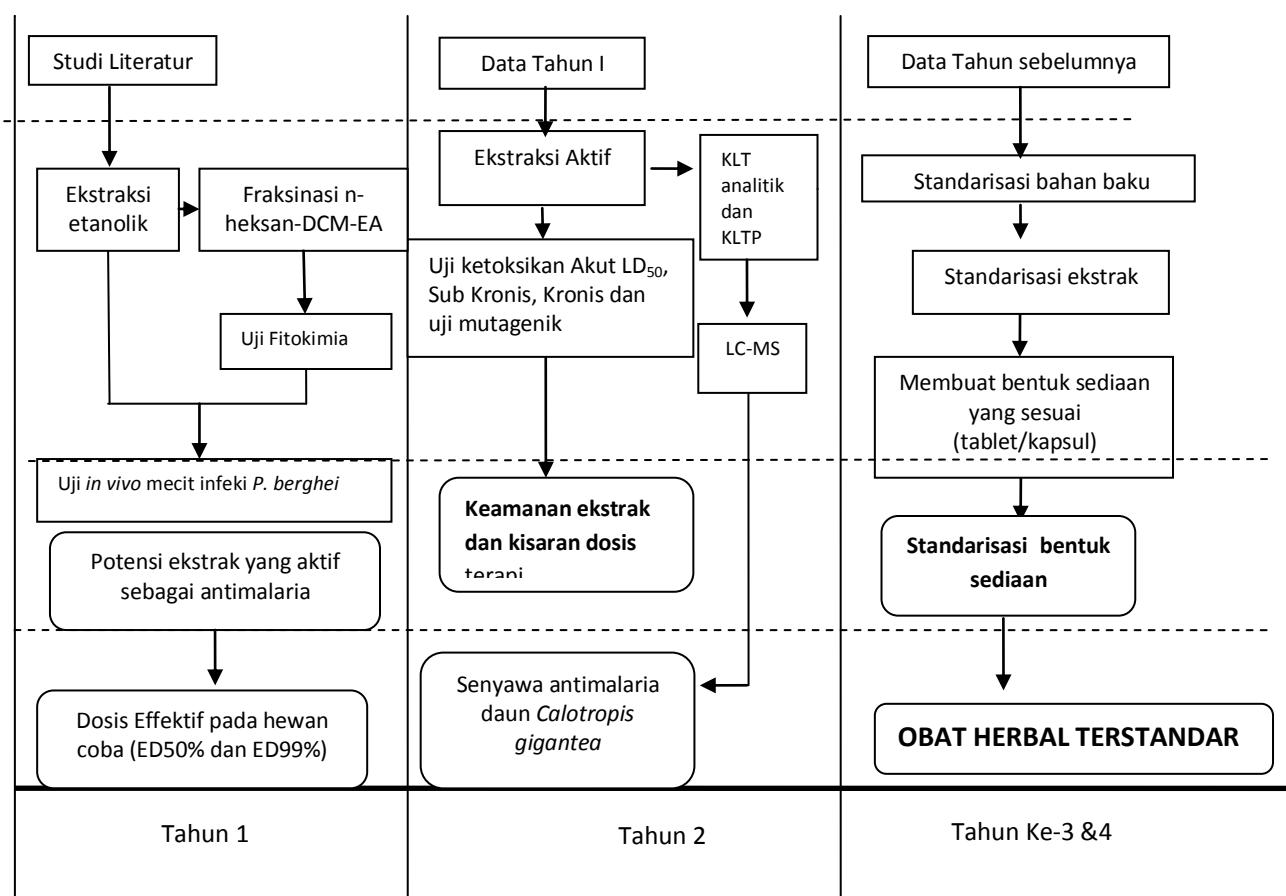
### METODE DAN *ROAD MAP* PENELITIAN

#### A. Tahapan Penelitian

##### 1. *Road Map* Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang berkelanjutan. Paket penelitian ini akan dikerjakan 3-4 tahun berturut-turut dengan tujuan akhir mendapatkan sediaan Obat Herbal Terstandar untuk Malaria. Adapun *road map* penelitian yang akan dilakukan oleh peneliti disajikan pada diagram di bawah ini:

***Road Map* Penelitian**



Gambar 3. *Road map* penelitian daun *Calotropis gigantea* sebagai obat antimalaria

Pada penelitian tahun pertama ini akan dilakukan ekstraksi akar *Calotropis gigantea* dengan pelarut etanol 70%. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode maserasi. Selanjutnya dilakukan pengujian aktivitas antimalaria secara *in vivo* pada hewan coba mencit galur balb/c yang telah diinfeksi dengan parasit *Plasmodium berghei* ANKA. Parameter potensi antimalaria yang di dapatkan pada pengujian ini adalah dosis efektif 50% ( $ED_{50\%}$ ) dan dosis efektif 99% ( $ED_{99\%}$ ). Selanjutnya ekstrak akar *Calotropis gigantea* yang menunjukkan aktivitas tertinggi akan dilanjutkan pengujian pengujian efektifitas kombinasi ekstrak akar *Calotropis gigantea* dengan obat yang digunakan pada terapi malaria saat ini yaitu artemisinin dengan menggunakan beberapa kombinasi. Selanjutnya dipilih kombinasi yang paling efektif.

Pada tahun ke-2 akan dilakukan penelitian lanjutan dengan berdasar pada data-data yang diperoleh dari tahun sebelumnya. pada penelitian lanjutan ini ada beberapa pengujian yang penting untuk dilakukan yaitu uji ketoksikan akut, ketoksikan sub kronis, kronis dan uji antimutagenik. Tujuan pengujian ini adalah untuk mengetahui keamanan ekstrak tanaman pada organ atau tubuh manusia jika dikonsumsi sebagai obat baik dalam jangka waktu singkat, sedang maupun dalam jangka panjang. Pengujian dilakukan dengan menggunakan model hewan coba mencit dan tikus, jantan dam betina. Dari pengujian ini akan diperoleh parameter keamanan, ekstrak berupa kisaran dosis letal  $LD_{50}$ , (*Lethal Dose 50%*), SGOT-SGPT (fungsi faal hati), gambaran histologi organ ginjal, jantung, lambung dan hati. Selain itu pada penelitian tahun ke-2 ini juga akan dilakukan identifikasi ekstrak aktif dengan kromatografi lapis tipis, isolat yang diduga dari tanaman terkait akan dilakukan identifikasi lebih lanjut dengan LC-MS untuk mengetahui jenis senyawa aktifnya.

Pada tahun selanjutnya akan dilakukan standarisasi bahan baku, ekstrak dan bentuk sediaan Obat. Tujuan standarisasi bahan baku dan ekstrak adalah agar sediaan herbal yang akan dibuat mempunyai kualitas/mutu yang konstan dan sesuai dengan standar yang telah ditetapkan dalam Farmakope herbal Indonesia dan atau materia Medika. Pemilihan bentuk sediaan penting untuk dilakukan dengan tujuan untuk mencari bentuk sediaan yang sesuai dengan sifat bahan baku

dan tujuan penggunaanya sehingga bentuk sediaaan tersebut memberikan keamanan, khasiat dan mutu yang paling tinggi. Setelah dilakukan beberapa tahapan di atas maka produk obat antimalaria siap untuk didaftarkan menjadi Obat herbal Terstandar.

## **2. Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang dan di Laboratorium Fakultas Saintek UIN Maulana Malik Ibrahim Malang.

## **3. Bahan Penelitian**

Bahan yang akan di uji pada penelitian ini adalah akar *Calotropis gigantea* yang diperoleh dari daerah Malang, parasit *Plasmodium berghei ANKA* dari universitas Brawijaya. Bahan yang diperlukan untuk proses ekstraksi adalah etanol dan aquadest. Semua bahan yang digunakan untuk proses ekstraksi berderajat teknis.

Bahan obat sebagai pembanding (standar) adalah obat klorokuin dan artemisin yang diperoleh dari RSUD Syaiful Anwar Malang.

Bahan yang diperlukan untuk pertumbuhan dan penyimpanan parasit *Plasmodium berghei ANKA* adalah RPMI, PBS, larutan Alsever. Bahan untuk pengecatan hapusan darah adalah *Methanol* absolut (Merck), *Giemsa* (Sigma) dan PBS. Bahan kimia digunakan untuk keperluan analisis adalah pelarut diklorometan, etanol, methanol, asam klorida, Plat KLT, kaca preparat, amil alkohol, koroform, ammonia, asam sulfat, reagen wagner, mayer, dragendorf, anhidrida asetat,  $\text{FeCl}_3$  1%, KBr.

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini adalah mencit jantan albino galur Balb/c jantan, umur 8-12 minggu, berat 28-32, diambil dari Pusat Veterinaria Farma Surabaya (PUSVETMA) sejumlah 200 ekor. Mencit diberi pakan standar untuk hewan coba berupa *comfeed* dan minum *ad libitum*.

## **4. Alat Penelitian**

Alat untuk keperluan ekstraksi diperlukan seperangkat alat gelas, *rotary evaporator*, lemari asam, desikator vakum.

Alat untuk keperluan identifikasi senyawa aktif digunakan chamber pengembangandan lampu UV. Alat untuk keperluan untuk thawing parasit *Plasmodium berghei* ANKA dan uji antimalaria diperlukan: *Vertikal laminar airflow*, mikroskop *inverted/phase contrast*, centrifus biasa, botol biakan, *Laboratory bottle* 100 ml, *spuit* 2,5 ml, spuit 1 ml, gelas obyek, *Nitrogen liquid tank*, sonde lambung, kandang mencit, tempat minum mencit.

## **B. Rancangan penelitian**

### **1. Determinasi Tanaman**

Tanaman yang akan digunakan di determinasi di Materia Medika batu malang dengan tujuan untuk memastikan kebenaran bahan tanaman yang akan digunakan.

### **2. Persiapan Sampel**

Akar *Calotropis gigantea* diambil dari daerah Malang sebanyak 5 kg. Akar dikeringkan dibawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam sampai didapat simplisia kering, kemudian diserbuk sampai derajat halus.

### **3. Ekstraksi**

Di masukkan 10 bagian simplisia atau campuran simplisia dengan derajat halus kedalam sebuah bejana, dituangi dengan 75 bagian cairan penyari, ditutup, biarkan selama 5 hari terlindung dari cahaya sambil sering diaduk, diserkai, diperas, ampas dicuci dengan cairan penyari secukupnya hingga diperoleh 100 bagian. Dipindahkan kedalam bejana tertutup, dibiarkan ditempat sejuk, terlindung dari cahaya selama 2 hari. Di endapkan tuangkan dan di saring. Filtrat yang diperoleh dikumpulkan lalu diuapkan dalam *rotary evaporator* pada suhu 50°C. ekstrak kental yang diperoleh kemudian dikeringkan di desikator vakum dan selanjutnya dialiri gas N<sub>2</sub> untuk menghilangkan semua sisa pelarut pada ekstrak (BPOM, 2010).

### **4. Pengujian aktivitas antimalaria pada hewan coba**

#### **a. Pembuatan sediaan uji**

Suspensi ekstrak akar *Calotropis gigantea* ini akan dibuat dengan menggunakan pelarut CMC-Na 0,5% (CMCNa 0,5% dibuat dengan melarutkan 0,5 gram CMC-Na ke dalam aquadest sampai 100 ml dan diaduk dengan magnetik stirer.

**b. Pengelompokan hewan uji**

Pengelompokan hewan uji dilakukan secara acak (random). Ekstrak etanolik yang diperoleh diujikan pada 10 kelompok hewan uji. Tiap kelompok terdiri dari 6 ekor mencit, dengan pembagian kelompok sebagai berikut:

1. Kelompok I adalah kontrol negatif yaitu kelompok perlakuan diinfeksi *P. berghei* tanpa terapi dan hanya dengan pemberian 0,5mL CMC-Na 1%.
2. Kelompok II adalah kontrol positif yaitu kelompok Artemisin dosis 4 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral .
3. Kelompok III adalah non infeksi yaitu kelompok perlakuan tanpa infeksi *P. berghei* dengan pemberian 0,5 mL CMC-Na 1%.
4. Kelompok IV adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dosis 1 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral.
5. Kelompok V adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dosis 10 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral.
6. Kelompok VI adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dosis 100 mg/kg BB sekali sehari secara per-oral.
7. Kelompok VII adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi kombinasi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan artemisin dengan perbandingan (1 : ½)
8. Kelompok VIII adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi kombinasi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan artemisin dengan perbandingan (½ : ½)
9. Kelompok XI adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi kombinasi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan artemisin dengan perbandingan (1/4 : ½)

10. Kelompok X adalah kelompok perlakuan infeksi *P. berghei* dan diterapi kombinasi ekstrak etanolik akar *Calotropis gigantea* dan artemisin dengan perbandingan (1/8 : ½)

Pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* dilakukan dengan menggunakan metode Peter (Phillipson dan Wright, 1991 dalam Muti'ah, 2012). Terapi dilakukan ketika derajat parasitemia setelah infeksi mencapai 1 – 5 % yang dihitung sebagai hari ke-0. Terapi dilakukan setiap hari (pagi/siang/sore tergantung pada perolehan % infeksi 1- 5% pada hari ke-0) selama 4 hari. Pengamatan derajat parasitemia dilakukan mulai hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4 (sebagai pengujian secara kuratif).

#### **C. Pembuatan Donor (Blazquez *et al*, 2008)**

Eritrosit yang terinfeksi par寄s di resuspensiakan dalam 200 $\mu$ l RPMI, kemudian diinjeksikan pada mencit secara intra-peritoneal. Dilakukan pengamatan parasitemia. Ketika parasitemia mencit donor telah mencapai 2,5% maka digunakan untuk menginfeksi mencit yang lain.

#### **D. Inokulasi Par寄s (Blazquez *et al*, 2008)**

Inokulasi Plasmodium berghei dilakukan secara intera peritoneal sebanyak  $1 \times 10^6$ , jika derajat parasitemia mencit donor sebesar 2,5% maka diambil darah sebesar 6,7  $\mu$ l, kemudian di resuspensiakan dalam 200  $\mu$ l RPMI. Setelah dilakukan infeksi selanjutnya dilakukan pengamatan parasitemia setiap hari hingga parasitemia mencapai 5-15%. kemudian dilakukan terapi obat/ekstrak uji selama 7 hari.

#### **E. Pengukuran derajat parasitemia (Sardjono dan Fitri, 2007)**

Mula-mula dibuat hapusan darah yang dilakukan dengan cara mengambil setetes darah dari ekor mencit dengan menggunting ekor mencit dan diteteskan pada kaca benda Tetesan darah tersebut ditipiskan dengan menggunakan tepi kaca benda yang lain dan ditunggu sampai kering. Kemudian hasil hapusan ditetes dengan methanol hingga merata dan ditunggu hingga kering. Selanjutnya dilakukan pewarnaan Giemsa dengan cara mencampurkan pewarna Giemsa dan Buffer Giemsa dengan perbandingan 1 : 9 dan diteteskan pada hapusan, ditunggu selama 20 menit, selanjutnya dibilas dengan air mengalir hingga tidak ada cat

yang tersisa dan kemudian dikeringkan. Selanjutnya hapusan darah yang sudah dicat dilakukan pemeriksaan parasitemia di bawah mikroskop menggunakan pembesaran 1000x dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi malaria dari 1000 eritrosit. Parasitemia merupakan jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam 1000 eritrosit.

Persentase penghambatan pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus (**Sardjono dan Fitri, 2007**):

$$\text{Inhibition(%)} = \frac{\text{Parasitemia of control positif} - \text{Parasitemia of drug}}{\text{Parasitemia of control positif}} \times 100\%$$

*Parasitemia of control “Positif”* diperoleh dari derajat parasitemia kelompok perlakuan yang diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa perlakuan terapi antimalaria.

*Parasitemia of drug* diperoleh dari derajat parasitemia kelompok perlakuan yang diinfeksi *Plasmodium berghei* dan diterapi obat antimalaria dan atau ekstrak tanaman percobaan.

## 5. Analisis Data

Data yang diperoleh dibuat dalam bentuk tabel dan grafik, kemudian dideskripsikan hasilnya. Sedangkan untuk mengetahui tingkat efektivitas dosis ED<sub>50</sub> dan uji ketoksikan dilakukan dengan analisis probit menggunakan program SPSS. Untuk mengetahui efektifitas kombinasi ekstrak Calotropis gigantean dan obat artemisin dilakukan perhitungan *Combination index* (CI).

## BAB IV

### HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari sampai dengan Maret 2014 di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia, laboratorium Fisiologi Hewan dan Optik Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah akar Widuri (*Calotrops gigantea*) yang diambil di daerah sekitar Pasuruan. Akar Widuri dianalisis kadar air pada simplisia basah. Kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringangkan di udara terbuka. Selanjutnya, sampel akar tersebut diserbuukkan dan dianalisis kadar air— simplisia kering. Simplisia yang memiliki kadar air kurang dari 10 % diekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 80 % selama 24 jam pada suhu ruang dan dilakukan pengocokan selama 3 jam dengan kecepatan 120 rpm. Filtrat yang diperoleh dari proses ekstrasi dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk mendapatkan ekstrak pekat. Selanjutnya, ekstrak pekat yang diperoleh tersebut dilakukan uji antimalaria pada hewan coba. Kemudian, dilakukan identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan reagen. Golongan senyawa aktif yang positif terhadap uji reagen diidentifikasi dengan KLT analitik menggunakan campuran berbagai eluen.

#### 4.1 Analisis Kadar Air dan Preparasi Sampel

Analisis kadar air dilakukan pada sampel basah (akar Widuri sebelum dikeringkan) dan kering (akar Widuri setelah dikeringkan) dengan menggunakan metode *thermogravi*. Cawan dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C

selama 15 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada cawan tersebut. Kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit untuk mendinginkan cawan. Selain itu, penyimpanan cawan di dalam desikator bertujuan untuk menghindari adanya air yang menempel kembali pada cawan jika disimpan pada ruangan terbuka. Silika yang terdapat pada desikator sebaiknya diaktivasi terlebih dahulu sebelum menggunakan desikator. Selanjutnya, cawan ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan kosong yang konstan.

Tahap selanjutnya adalah sampel ditimbang sekitar 5 g dan dimasukkan ke dalam cawan, lalu dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama sekitar 1 jam untuk menghilangkan kadar airnya. Kemudian, sampel didinginkan di dalam desikator dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ± 20 menit dan didinginkan dalam desikator serta ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat konstan. Hasil analisis kadar air basah ditunjukkan pada tabel 4.1.

Tabel 4.1 Hasil analisis kadar air sampel basah akar Widuri (*Calotropis gigantea*)

Berat konstan cawan kosong (gr)	Berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan (gr)	Berat konstan cawan dan sampel setelah dikeringkan (gr)	Kadar air sampel basah (%)
58,4514	63,4533	60,8804	51,1745

Setelah diperoleh kadar air sampel basah, maka sampel tersebut dipreparasi sampai terbentuk simplisia. Sampel akar Widuri diambil ± 2 Kg. Kemudian akar-akar tersebut dibersihkan dan dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan kotoran yang menempel berupa tanah maupun debu yang dapat mengganggu proses ekstraksi. Selanjutnya, sampel dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan di udara

terbuka untuk mengurangi kadar air. Namun, pengeringan dilakukan terlindung dari sinar matahari dengan harapan tidak merusak kandungan senyawa metabolit sekunder yang terkandung dalam sampel (Goeswin, 2007). Kemudian, sampel diblender untuk memperkecil ukuran partikel sehingga diperoleh serbuk akar widuri (simplisia). Penyerbukan sampel ini bertujuan untuk memperbanyak luas permukaan, sehingga memperbesar tumbukan antara sampel dan pelarut dan proses ekstraksi lebih maksimal. Selanjutnya, diayak menggunakan ukuran < 60 mesh yang bertujuan untuk menyeragamkan ukuran partikel. Sampel yang akan diekstrak sebaiknya berukuran seragam untuk mempermudah kontak antara bahan dengan pelarut (Nurmillah, 2009).

Serbuk akar Widuri yang telah dipreparasi tersebut dianalisis kadar air keringnya. Hasil analisis kadar air kering ditunjukkan pada tabel 4.2.

Tabel 4.2 Hasil analisis kadar air sampel kering akar Widuri (*Calotropis gigantea*)

Berat konstan cawan kosong (gr)	Berat cawan dan sampel sebelum dikeringkan (gr)	Berat konstan cawan dan sampel setelah dikeringkan (gr)	Kadar air sampel kering (%)
65,3924	70,4021	70,1536	4,9604

Dengan menurunnya kadar air sampel maka dapat menghentikan reaksi enzimatis, sehingga dapat mencegah terjadinya penurunan mutu atau perusakan simplisia. Kandungan air dalam bahan dapat memengaruhi daya tahan sampel terhadap serangan mikroba sehingga dapat disimpan untuk jangka waktu yang lebih lama (Goeswin, 2007).

Kadar air yang rendah dapat memaksimalkan proses ekstraksi. Karena semakin rendah nilai kadar air bahan maka semakin memudahkan pelarut untuk masuk ke dalam dinding sel tumbuhan yang mengandung senyawa kimia,

sehingga dapat mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan secara maksimal (Nurmillah, 2009). Sampel yang memiliki kadar air < 10 % tersebut dapat digunakan untuk ekstraksi maserasi.

#### **4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif**

Ekstraksi merupakan proses pemisahan, penarikan atau pengeluaran suatu komponen dari campurannya. Prinsip dasar ekstraksi adalah berdasarkan perbedaan kelarutan. Tujuan dilakukannya ekstraksi senyawa aktif adalah untuk memisahkan atau mengeluarkan komponen senyawa yang diinginkan (mengisolasi) dari sel-sel tanaman (Nurmillah, 2009). Untuk mencapai hal tersebut, maka fase padat (sampel) dikontakkan dengan fase cair (pelarut). Pada kontak dua fasa tersebut, pelarut terdifusi dari fasa padat ke fasa cair sehingga terjadi pemisahan dari komponen padat (Utami, dkk., 2009).

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Ekstraksi maserasi merupakan proses pemisahan senyawa aktif dari campurannya dengan cara merendam zat padat di dalam pelarut tertentu. Perendaman dapat memecah dinding sel dan membran plasma karena perbedaan tekanan antara di dalam dan di luar sel, sehingga senyawa aktif yang terdapat di dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut berdasarkan perbedaan kepolarannya dan karena adanya perbedaan konsentrasi antara larutan di dalam sel dengan yang di luar sel, maka larutan yang terpekat didesak keluar (Octavia, 2009).

Dalam proses ekstraksi, terjadi peristiwa difusi pelarut ke dalam sel bahan. Pelarut yang masuk ke dalam sel bahan akan melarutkan senyawa yang memiliki kelarutan sama dengan pelarut. Dengan cara tersebut akan tercapai kesetimbangan antara bahan dan pelarut (Nurmillah, 2009).

Sampel yang diekstraksi adalah sampel akar kering yang telah diserbukkan dengan kadar air < 10 %. Dengan meningkatnya tingkat kehalusan sampel, maka luas permukaan sampel yang kontak dengan pelarut semakin besar. Serbuk dengan tingkat kehalusan yang tinggi akan meningkatkan kerusakan sel tanaman yang semakin besar, sehingga memudahkan pengambilan senyawa aktif oleh pelarut (Octavia, 2009).

Serbuk akar Widuri ditimbang sebanyak 100 g dan dibagi menjadi dua bagian, masing-masing 50 g. Lalu diekstraksi secara maserasi dengan menggunakan 250 mL pelarut etanol 80 %. Ketika sampel ditambah dengan pelarut, warnanya berubah menjadi kuning. Proses ekstraksi ini dilakukan selama 24 jam dengan pengocokan 120 rpm selama 3 jam menggunakan *shaker*. Pengadukan atau pengocokan akan meratakan kontak antara pelarut dan sampel. Selanjutnya, filtrat dan ampas dipisahkan melalui penyaringan menggunakan corong *Buchner*, yaitu dengan pengisapan menggunakan pompa vakum. Penyaringan ini dapat memisahkan filtrat dan ampas dalam waktu yang tidak terlalu lama. Prinsip penggunaan corong *Buchner* ini adalah memperkecil tekanan di dalam corong daripada di luar, sehingga proses penyaringan dapat berlangsung cepat karena pengisapan vakum.

Filtrat yang telah terpisah dari ampasnya ditampung sementara, sedangkan ampas yang diperoleh direndam dengan 150 mL pelarut. Perlakuan ini dilakukan berulang kali sampai diperoleh filtrat yang berwarna pucat. Pada pengulangan ekstraksi yang keenam, warna filtrat sudah berwarna pucat, sehingga proses ekstraksi maserasi harus dihentikan. Ketika filtrat telah berwarna pucat, keseimbangan konsentrasi antara larutan di luar sel dan di dalam sel telah tercapai

(Octavia, 2009). Pada tiap-tiap proses ekstraksi maserasi yang kedua sampai kelima digunakan pelarut etanol 80 % sebanyak 150 mL. Dengan demikian, total pelarut etanol 80 % yang dibutuhkan untuk mengekstraksi 100 gr akar Widuri sebanyak 1000 mL.

Filtrat yang diperoleh dari ekstraksi maserasi selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* untuk memperoleh ekstrak pekat akar Widuri yang terbebas dari pelarutnya. *Rotary evaporator* merupakan alat yang digunakan untuk mempercepat proses pemisahan pelarut dari campuran larutan. Prinsip kerjanya seperti vakum destilasi yang dapat menguapkan pelarut di bawah titik didihnya. Bagian-bagian alat pada *rotary evaporator* antara lain pendingin, kondensor, *waterbath* dan pompa vakum.

Penggunaan *rotary evaporator* diawali dengan memasukkan filtrat ke dalam labu alas bulat dengan volume 2/3 bagian dari volume labu alas bulat yang digunakan, Kemudian labu alas bulat tersebut dipasangkan pada bagian ujung rotor yang terhubung dengan kondensor. Selanjutnya, *waterbath* dipanaskan dengan suhu di bawah titik didih pelarut yang digunakan ( $\pm 60^{\circ}\text{C}$ ). Aliran air pendingin dan pompa vakum dijalankan, kemudian tombol rotor diputar dengan kecepatan tertentu (5 putaran) dan labu alas bulat akan berputar sehingga pemanasan lebih merata. Pada saat labu berputar, penurunan tekanan yang diberikan dapat menyebabkan penguapan pelarut lebih cepat, artinya pelarut dapat menguap di bawah titik didihnya. Pompa vakum digunakan untuk menguapkan larutan agar naik ke kondensor yang selanjutnya didinginkan sehingga akan diubah kembali ke dalam bentuk cair (Pangestu, 2011).

Proses penguapan pelarut dilakukan sampai diperoleh ekstrak pekat akar Widuri yang ditandai dengan tidak ada lagi pelarut yang menetes pada bagian alas bulat penampung destilat pelarut. Setelah proses pemekatan selesai, maka aliran air pendingin dan pompa vakum dimatikan serta membuka kran pengatur tekanan di ujung kondensor. Selain itu, mengembalikan putaran rotor ke angka nol dan menurunkan suhu *waterbath* menjadi nol. Selanjutnya, mengeluarkan labu alas bulat yang sebelumnya terpasang pada ujung rotor.

Ekstrak pekat yang berada di dalam labu alas bulat dipindahkan ke dalam gelas vial untuk ditimbang beratnya. Ekstrak yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan, Pada penelitian ini, digunakan dua buah gelas vial untuk menampung ekstrak pekat karena proses pemekatan menggunakan *rotary evaporator* dilakukan sebanyak dua kali. Ekstrak pekat yang diperoleh ini belum sepenuhnya terbebas dari pelarut (ekstrak masih lembek dan basah). Untuk lebih memekatkannya lagi, maka ekstrak di oven pada suhu 37 °C dan ditimbang. Perlakuan ini diulangi sampai diperoleh berat ekstrak yang konstan. Hasil ekstraksi ditunjukkan pada tabel 4.3 dengan perhitungan nilai randemen pada Lampiran 6.

Tabel 4.3 Hasil ekstraksi maserasi akar Widuri dengan pelarut etanol 80 %

<b>Warna ekstrak pekat</b>	<b>Berat sampel</b>	<b>Total berat ekstrak pekat</b>	<b>Randemen ekstrak</b>
Kuning kecoklatan	100 gr	3,9322 gr	3,9322 %

Ekstrak pekat akar Widuri yang diperoleh ini selanjutnya digunakan untuk uji antimalaria secara *in vivo* pada mencit jantan galur Balb/C, uji golongan senyawa aktif dengan reagen dan identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan variasi berbagai eluen.

#### **4.3 Efektivitas Antimalaria Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri**

Pada tahapan ini, ekstrak pekat akar Widuri diujikan ke hewan coba mencit jantan untuk diketahui efektivitasnya dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Penggunaan parasit *Plasmodium berghei* pada penelitian ini dikarenakan kemiripan sifat morfologisnya dengan parasit malaria pada manusia. *Plasmodium berghei* merupakan parasit malaria yang tidak akan menular pada manusia dan hanya akan menular pada hewan pengerat saja, seperti tikus, hamster atau mencit yang lainnya. Parasit *Plasmodium berghei* pada hewan rodensia dibuktikan analog dengan parasit malaria pada manusia terutama dalam hal struktur, fisiologis dan siklus hidup. (Suryati dan Suprapti, 2007).

Sebelum digunakan sebagai hewan uji, mencit jantan terlebih dahulu melewati fase adaptasi atau aklimasi agar dapat menyesuaikan dengan lingkungannya (kandang dan mencit lainnya). Sebelum perlakuan, mencit ditempatkan dalam kandang kotak yang terbuat dari plastik. Kandang tersebut diberi alas serbuk kayu dan penutup kawat serta tempat makan dan minum. Pemberian makan dan minum dilakukan setiap hari secara *ad libitum*. Makan yang diberikan berupa pellet ikan, sedangkan minumannya berupa air (Muti'ah, dkk., 2010).

Penggunaan hewan uji mencit pada penelitian ini dikarenakan mencit memiliki kemiripan secara fisiologis dengan manusia. Selain itu, mencit juga memiliki kesetaraan taksonomi dengan manusia dalam hal reaksi terhadap obat dan penyakit (Coutrier, 2008). Pada mencit yang diinfeksi malaria diperoleh derajat parasitemia yang lebih tinggi daripada binatang tikus dan hamster dan cara pemeliharaannya lebih mudah (Sundari, dkk., 1997).

Penggunaan mencit jantan (*Mus musculus*) dikarenakan kestabilan kondisi mencit jantan lebih tinggi karena tidak dipengaruhi oleh siklus estrus dibandingkan mencit betina yang dipengaruhi oleh siklus estrus. Apabila menggunakan mencit betina pada penelitian ini, maka besar kemungkinan akan terjadi pemutusan rantai reproduksi, sedangkan penggunaan mencit jantan tidak. Penggunaan galur Balb/C dikarenakan mencit jenis ini memiliki kemampuan bertahan hidup yang cukup lama karena lebih tahan terhadap *Plasmodium berghei*, sehingga mudah untuk mempelajari malaria dari infeksi parasit *Plasmodium berghei* (Sundari, dkk., 1997).

Hewan coba yang digunakan pada penelitian ini berjumlah 36 ekor yang dibagi ke dalam 6 kelompok perlakuan. Berdasarkan rumus Federer, jumlah mencit yang digunakan tiap kelompok perlakuan minimal 4 ekor. Namun, untuk mengantisipasi adanya mencit yang mati selama masa aklimasi ataupun masa terapi, maka hewan uji tiap kelompok perlakuan dibuat lebih menjadi 6 ekor.

Kelompok perlakuan hewan uji meliputi kelompok non infeksi, kontrol positif, kontrol negatif, kelompok Widuri 1, Widuri 2 dan Widuri 3. Kelompok non infeksi merupakan kelompok perlakuan tanpa infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan CMC-Na 1 % sekali sehari per oral. Kelompok kontrol positif adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB sekali sehari per oral, sedangkan kelompok kontrol negatif adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan CMC-Na 1 % sekali sehari per oral. Kelompok Widuri 1 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan ekstrak akar Widuri dosis 0,1 mg/Kg BB sekali sehari per oral (Hayati, dkk,

2012). Kelompok Widuri 2 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan ekstrak akar Widuri dosis 1 mg/Kg BB sekali sehari per oral, sedangkan kelompok Widuri 3 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan ekstrak akar Widuri dosis 10 mg/Kg BB sekali sehari per oral (Praptiwi dan Chairul, 2008).

Pembuatan larutan dosis sesuai dengan perhitungan dosis larutan uji pada Lampiran 5. Pelarut yang digunakan untuk melarutkan ekstrak akar Widuri adalah CMC-Na 1 %. CMC-Na dipakai dalam makanan untuk mendapatkan tekstur yang baik (Winarno, 2004). Artinya, ekstrak yang dilarutkan dalam CMC-Na akan berbentuk agak kental menyerupai gel yang lebih mudah dicerna oleh hewan uji mencit dibandingkan dengan larutan yang berbentuk cair. Selain itu, penggunaan pelarut ini relatif tidak berbahaya dan tidak memberikan efek samping terhadap mencit karena sifatnya yang netral dan tergolong karbohidrat.

Sebelum dilakukan uji antimalaria, terlebih dahulu dibuat mencit donor. Mencit donor diinfeksikan parasit terlebih dahulu yang diambil dari dalam *freezer* -70 °C. Parasit yang telah digunakan dapat disimpan kembali untuk kebutuhan selanjutnya. Penyimpanan parasit dilakukan dengan mengambil 0,8 mL darah jantung dari mencit donor yang telah terinfeksi dan dimasukkan ke dalam *vacuum tube* yang telah berisi EDTA. Setelah itu, ditambahkan dengan 1,6 mL larutan Alsever's yang mengandung 10 % gliserol. Selanjutnya, *vacuum tube* dimasukkan ke dalam *liquid nitrogen tank* dan dipindahkan dalam *freez* -70 °C. Ketika akan digunakan untuk perlakuan infeksi, *vacuum tube* tersebut dikeluarkan dari *freezer* (proses thawing). Dengan demikian, parasit memungkinkan untuk mencair dan siap untuk diinfeksikan pada mencit donor.

Penentuan derajat parasitemia mencit donor dilakukan setiap hari dengan membuat hapisan tipis darah ekor mencit. Perlakuan ini untuk mengetahui bahwa % infeksi mencit donor telah mencapai 2,5 %. Pada penelitian ini, derajat parasitemia mencit donor yang digunakan sebesar 15 %. Mencit donor ini dapat digunakan untuk menginfeksi mencit-mencit yang lainnya melalui proses pembedahan.

Mencit donor dibius terlebih dahulu menggunakan kloroform sampai mati. Kemudian, mencit diletakkan di meja bedah dan diambil darah jantungnya menggunakan sputit. Setiap mencit yang sehat, diinjeksikan sebanyak 1,12  $\mu\text{L}$  darah mencit donor yang telah diresuspensi sampai 200  $\mu\text{L}$  dengan larutan PBS secara *intraperitoneal*. Suntikan *intraperitoneal* dilakukan dengan cara memegang mencit pada bagian tengkuk. Kemudian, mencit dibalikkan sehingga terlihat bagian perutnya dimana posisi kepala lebih rendah daripada badannya. Dibersihkan bagian perut yang akan disuntik dengan alkohol untuk mencegah terjadinya infeksi. Jarum steril diinjekkan pada bagian rongga perut. Setelah proses injeksi selesai, jarum dicabut dan bagian yang telah diinjeksi dibersihkan dengan alkohol kembali. Setelah dilakukan infeksi, selanjutnya dilakukan pengukuran derajat parasitemia setiap hari (Coutrier, 2008). Terapi obat atau ekstrak uji dilakukan ketika derajat parasitemia telah mencapai 1 – 5 % yang dihitung sebagai hari ke-0. Terapi dilakukan setiap hari selama 4 hari. Pengamatan derajat parasetemia dilakukan setiap hari mulai hari ke-0, sampai dengan hari ke-4.

Pemberian obat atau ekstrak secara oral pada mencit dilakukan dengan bantuan sonde lambung. Sonde lambung merupakan alat suntik yang dilengkapi

dengan kanula (ujungnya tumpul dan dilengkapi dengan manik-manik). Mencit dipegang pada bagian tengkuk dan ekornya dijepit antara jari-jari tangan sehingga mencit menjadi tegang. Kemudian, kanula dimasukkan ke dalam mulut secara cepat dan perlahan-lahan diluncurkan ke langit-langit arah belakang sampai esophagus dan selanjutnya masuk ke dalam lambung. Penyondean yang salah dapat menyebabkan gangguan pernafasan dan kematian hewan uji karena kanula masuk ke saluran pernafasan.

Pengukuran derajat parasitemia dilakukan dengan membuat hapusan tipis darah ekor mencit. Tujuannya, untuk mengkonfirmasi diagnosis dan untuk melihat dengan jelas bentuk morfologi parasit serta untuk menghitung derajat parasitemia (Coutrier, 2008). Ekor mencit digunting menggunakan gunting steril dan ditetesan pada kaca preparat. Setelah dipotong, ekor mencit diberi alkohol untuk mencegah terjadinya infeksi. Kemudian, tetesan darah tersebut ditipiskan menggunakan tepi kaca preparat dan ditunggu sampai kering. Selanjutnya, hasil hapusan difiksasi dengan metanol untuk mencegah terjadinya hemolisis. Setelah metanol kering, dilakukan pewarnaan Giemsa dengan cara mencampurkan Giemsa fluka dan buffer Giemsa dengan perbandingan 1 : 5. Pewarnaan Giemsa ditetesan pada hapusan dan ditunggu sampai kering. Setelah itu, dibilas hapusan tersebut dengan air mengalir sampai tidak ada pewarnaan giemsa yang menempel kemudian dikeringkan. Selanjutnya, hapusan darah yang sudah dicat diamati di bawah mikroskop menggunakan pembesaran 1000x dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi malaria dari 1000 eritrosit (Muti'ah, 2010). Persen derajat parasitemia dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ derajat parasitemia} = \frac{\text{jumlah h eritrosit terinfeksi}}{1000 \text{ eritrosit}} \times 100 \%$$

Pengamatan derajat parasitemia dilakukan pada hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4. Penentuan derajat parasitemia pada hari ke-0 bertujuan untuk menentukan derajat parasitemia semua mencit telah berada pada range sekitar 1 – 5 % pada hari dilakukannya terapi. Pemeriksaan derajat parasitemia pada hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4 bertujuan untuk mengetahui profil perkembangan dan pertumbuhan parasit selama dilakukan terapi. Seiring dengan bertambahnya hari terapi, diharapkan terjadi penurunan aktivitas *Plasmodium berghei* yang ditandai dengan menurunnya nilai derajat parasitemia. Hasil pemeriksaan derajat parasitemia dari hari ke-0 hingga hari ke-4 dapat ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Rata-rata derajat parasitemia serta standar deviasi ekstrak etanol 80 % akar Widuri

<b>Kelompok Perlakuan</b>	<b>Rerata derajat parasitemia (%) ± Standar Deviasi</b>				
	<b>Hari ke-0</b>	<b>Hari ke-1</b>	<b>Hari ke-2</b>	<b>Hari ke-3</b>	<b>Hari ke-4</b>
Kontrol negatif	2,1 ± 0,43	2,7 ± 0,64	3,3 ± 0,30	3,7 ± 0,42	4,3 ± 0,73
Kontrol positif	2,4 ± 1,40	1,7 ± 0,60	1,3 ± 0,32	1,2 ± 0,31	1,0 ± 0,25
Dosis 1	1,8 ± 0,64	2,5 ± 0,57	1,8 ± 0,22	1,6 ± 0,27	2,0 ± 0,66
Dosis 2	2,1 ± 1,24	2,0 ± 0,43	1,9 ± 0,59	1,9 ± 0,59	1,6 ± 0,43
Dosis 3	1,9 ± 0,76	2,0 ± 0,59	1,7 ± 0,24	1,9 ± 0,29	1,5 ± 0,54

**Keterangan:**

Kontrol negatif : pemberian pelarut CMC-Na 1% yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Kontrol positif : kelompok perlakuan klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB.

Dosis 1 : terapi ekstrak etanol 80 % akar widuri dosis 0,1 mg/Kg.

Dosis 2 : terapi ekstrak etanol 80 % akar widuri dosis 1 mg/Kg BB.

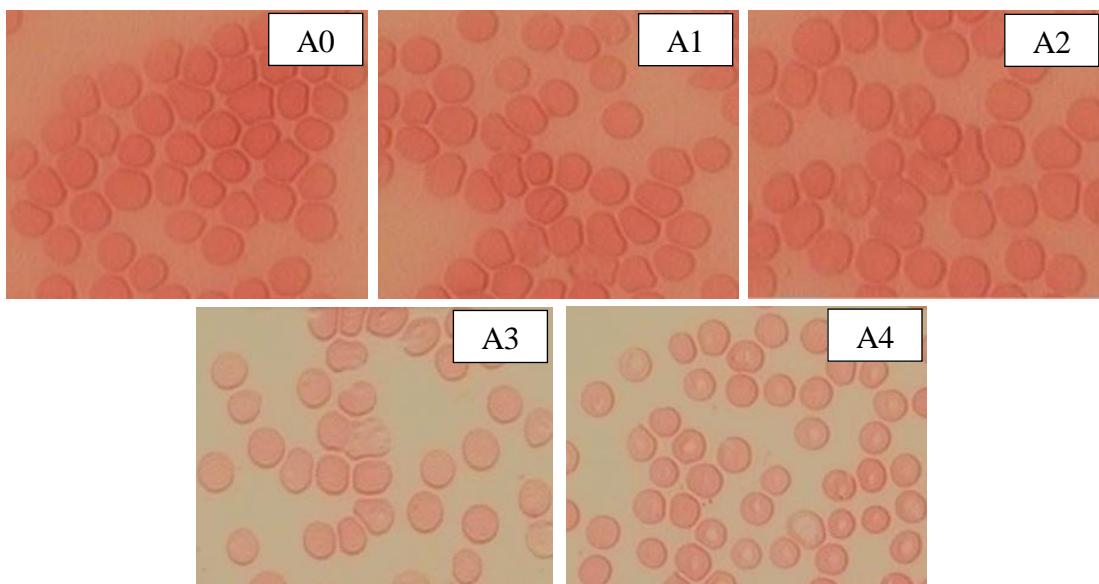
Dosis 3 : terapi ekstrak etanol 80 % akar widuri dosis 10 mg/Kg BB.

Dosis yang digunakan pada penelitian ini merupakan dosis manusia yang telah dikonversi ke dalam dosis mencit dalam satuan mg/g BB seperti pada Lampiran 5. Penggunaan dosis manusia ini bertujuan agar dapat langsung diaplikasikan secara langsung kepada manusia. Dosis klorokuin yang digunakan telah disesuaikan dengan dosis klorokuin yang dibutuhkan oleh manusia, yaitu

sekitar 400 mg per hari. Dengan demikian, dosis klorokuin yang digunakan setelah dikonversi ke dosis manusia adalah 5,71 mg/Kg BB.

Eritrosit yang terinfeksi parasit dimulai dengan merozoit yang masuk ke aliran darah dan menginfeksi eritrosit. Kemudian, merozoit akan mengalami perubahan morfologi menjadi tropozoit (Widoyono, 2010).

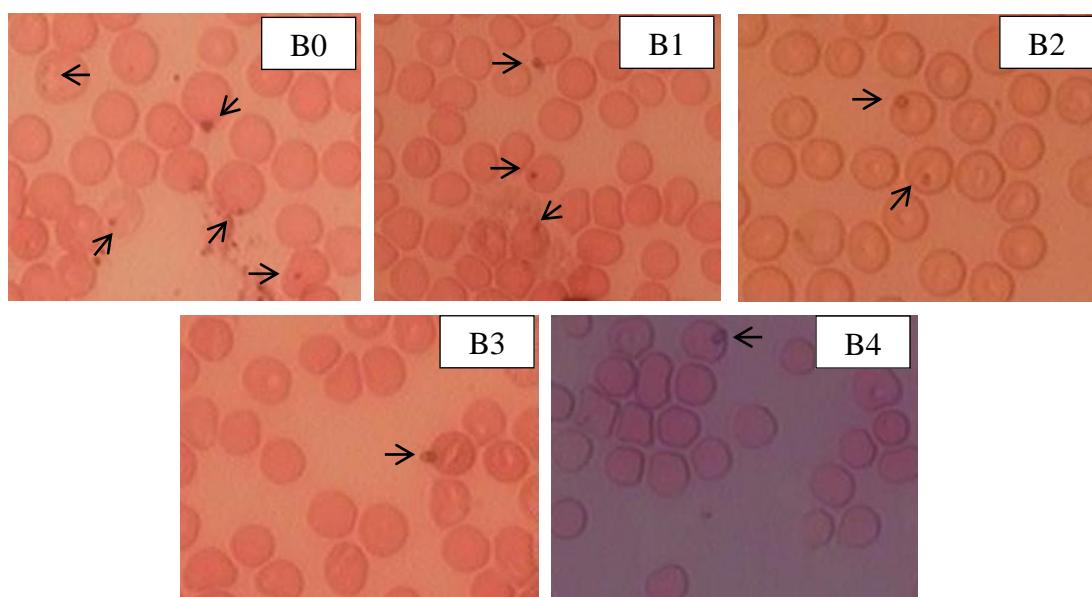
Kelompok non infeksi merupakan kelompok perlakuan tanpa infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan CMC-Na 1 % sekali sehari per oral. Hasil pengamatan sel darah merah menict kelompok non infeksi seperti Gambar 4.1.



Gambar 4.1 Gambaran sel darah merah mencit kelompok non infeksi dengan pemberian CMC-Na 1 % pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar di atas menunjukkan bahwa pengukuran derajat parasitemia mulai hari ke-0 sampai hari ke-4 tidak ditemukan adanya infeksi parasit *Plasmodium berghei* pada sel darah merah mencit kelompok non infeksi. Tujuan adanya kelompok non infeksi adalah untuk membuktikan bahwa mencit pada kelompok ini tidak terinfeksi oleh parasit sebagaimana gambar di atas.

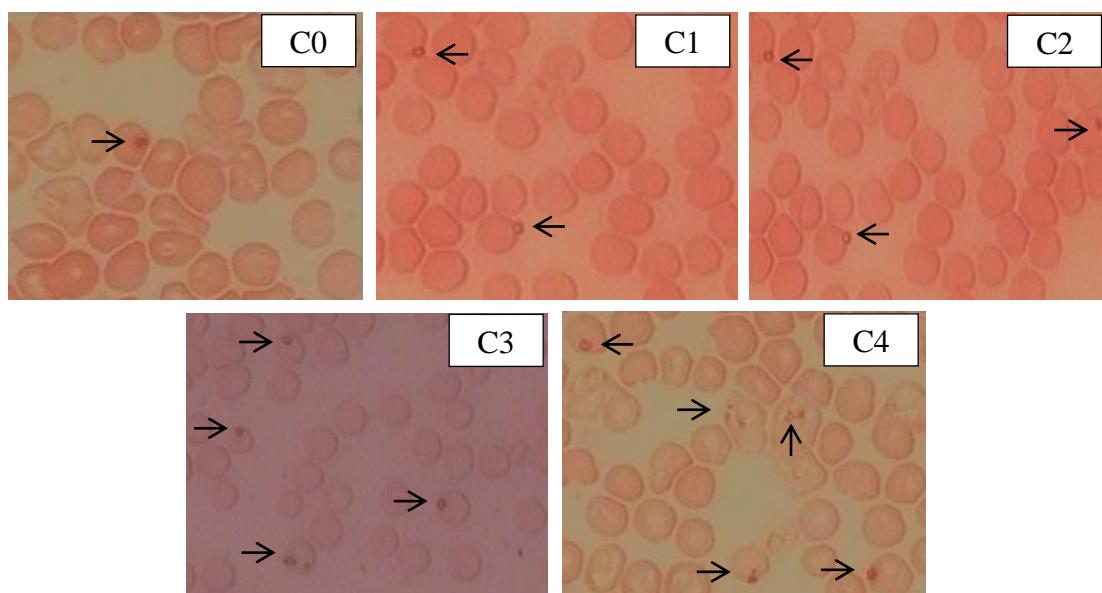
Kelompok kontrol positif adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB sekali sehari per oral. Hasil pengamatan derajat parasitemia mencit kelompok kontrol positif ditunjukkan pada Gambar 4.2.



Gambar 4.2 Gambaran sel darah merah mencit kelompok kontrol positif dengan pemberian klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar diatas menunjukkan adanya penurunan aktivitas *Plasmodium berghei* pada sel darah merah mencit kelompok kontrol positif yang diterapi dengan klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB. Pada hari sebelum terapi (B0) diperoleh rata-rata derajat parasitemia sebesar 2,4 % yang lebih besar dibandingkan dengan hari setelah dilakukan terapi. Rata-rata derajat parasitemia hari ke-1 sebesar 1,7 %, hari ke-2 sebesar 1,3 %, hari ke-3 sebesar 1,2 % dan hari ke-4 sebesar 1 %.

Kelompok kontrol negatif adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi CMC-Na 1 % sekali sehari per oral. Hasil pengamatan derajat parasitemia mencit kelompok kontrol negatif ditunjukkan pada Gambar 4.3.

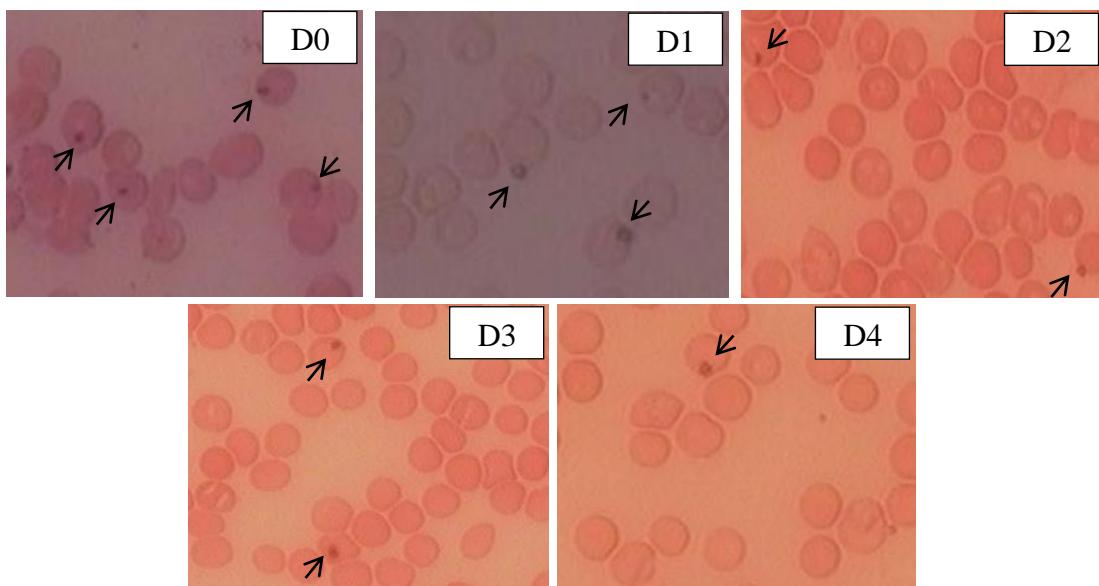


Gambar 4.3 Gambaran sel darah merah mencit kelompok kontrol negatif dengan pemberian CMC-Na 1 % pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar di atas merupakan hapusan darah tipis ekor mencit kelompok kontrol negatif yang diterapi dengan pelarut CMC-Na 1 %. Gambar tersebut menunjukkan adanya peningkatan aktivitas *Plasmodium berghei* dibandingkan dengan kontrol negatif yang ditandai dengan semakin banyak jumlah eritrosit yang terinfeksi parosit. Hal ini menyebabkan meningkatnya jumlah eritrosit yang mengalami kerusakan. Rata-rata derajat parasitemia hari ke-0 sebesar 2,1 %, hari ke-1 sebesar 2,7 %, hari ke-2 sebesar 3,2 %, hari ke-3 sebesar 3,2 % dan hari ke-4 sebesar 3,8 %. Terjadi peningkatan pertumbuhan parosit dari hari ke hari. Hal ini

disebabkan oleh berubahnya tropozoit menjadi skizon muda, yang kemudian berkembang menjadi skizon matang dan membelah diri menjadi merozoid kembali, sehingga semakin banyak parasit yang menginfeksi eritrosit.

Kelompok Widuri 1 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan ekstrak akar Widuri dosis 0,1 mg/Kg BB sekali sehari per oral. Hasil pengamatan derajat parasitemia mencit kelompok Widuri 1 ditunjukkan pada Gambar 4.4.

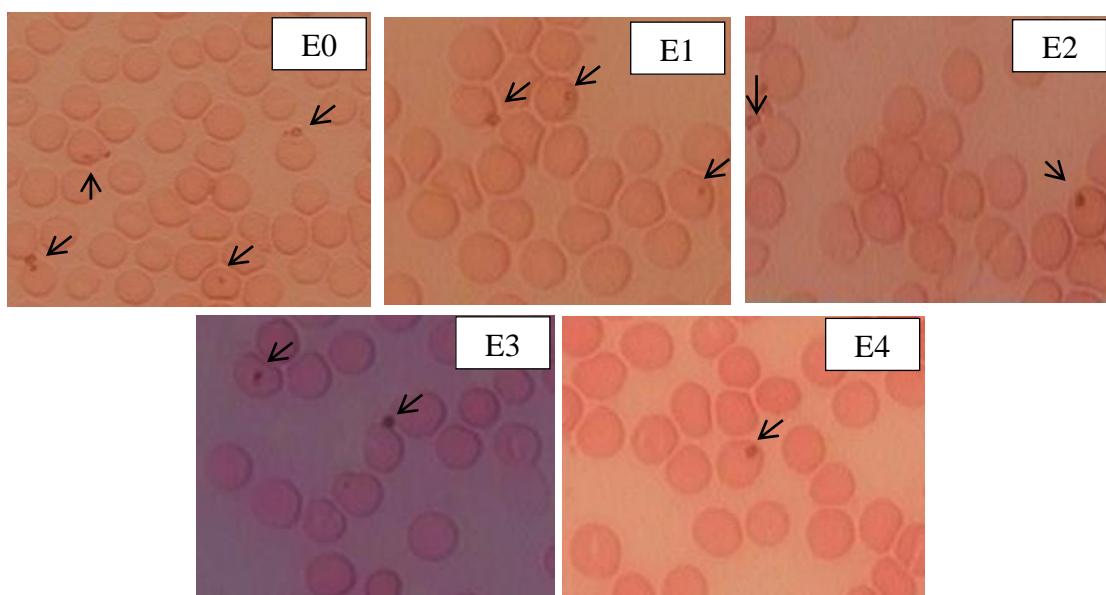


Gambar 4.4 Gambaran sel darah merah mencit kelompok Widuri 1 dengan ekstrak akar dengan dosis 0,1 mg/Kg BB pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar di atas merupakan hapusan darah tipis ekor mencit kelompok Widuri 1 dengan ekstrak akar dengan dosis 0,1 mg/Kg BB. Rata-rata derajat parasitemia kelompok Widuri 1 pada hari ke-0 sebesar 1,8 %, hari ke-1 sebesar 2,5 %, hari ke-2 sebesar 1,8%, hari ke-3 sebesar 1,6 % dan hari ke-4 sebesar 2 %. Derajat parasitemia kelompok Widuri 1 ini mengalami aktivitas yang tidak menentu, terkadang naik dan terkadang turun. Meskipun demikian, derajat

parasitemia kelompok Widuri 1 ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

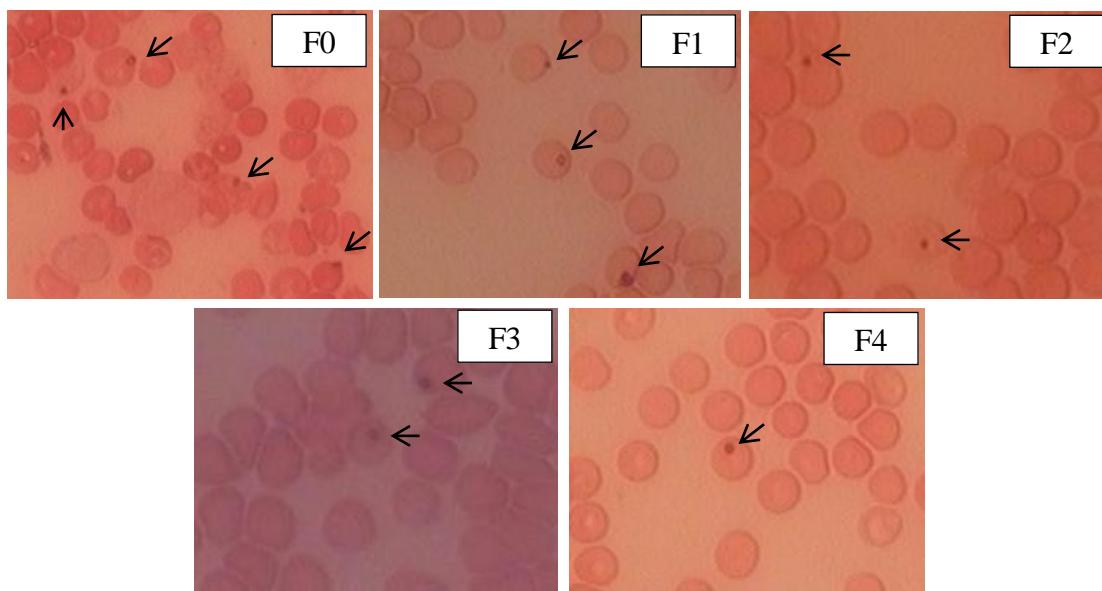
Kelompok Widuri 2 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan ekstrak akar Widuri dosis 1 mg/Kg BB sekali sehari per oral. Hasil pengamatan derajat parasitemia mencit kelompok Widuri 2 ditunjukkan pada Gambar 4.5.



Gambar 4.5 Gambaran sel darah merah mencit kelompok Widuri 2 dengan ekstrak akar dengan dosis 1 mg/Kg BB pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar di atas merupakan hapusan darah tipis ekor mencit kelompok Widuri 2 dengan ekstrak akar dengan dosis 1 mg/Kg BB. Rata-rata derajat parasitemia kelompok Widuri 1 pada hari ke-0 sebesar 2,1 %, hari ke-1 sebesar 2 %, hari ke-2 sebesar 1,9 %, hari ke-3 sebesar 1,9 % dan hari ke-4 sebesar 1,6 %. Kelompok Widuri 2 ini mengalami penurunan aktivitas seiring dengan berkurangan nilai derajat parasitemia. Meskipun demikian, derajat parasitemia kelompok Widuri 2 ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

Kelompok Widuri 3 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan ekstrak akar Widuri dosis 10 mg/Kg BB sekali sehari per oral. Hasil pengamatan derajat parasitemia mencit kelompok Widuri 3 ditunjukkan pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Gambaran sel darah merah mencit kelompok Widuri 3 dengan ekstrak akar dengan dosis 10 mg/Kg BB pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar di atas merupakan hapusan darah tipis ekor mencit kelompok Widuri 3 dengan ekstrak akar dengan dosis 10 mg/Kg BB. Rata-rata derajat parasitemia kelompok Widuri 3 pada hari ke-0 sebesar 1,9 %, hari ke-1 sebesar 2 %, hari ke-2 sebesar 1,7%, hari ke-3 sebesar 1,9 % dan hari ke-4 sebesar 1,5 %. Derajat parasitemia kelompok Widuri 3 ini mengalami aktivitas yang tidak menentu, terkadang naik dan terkadang turun. Meskipun demikian, derajat parasitemia kelompok Widuri 3 ini masih lebih rendah jika dibandingkan dengan kontrol negatif.

Berdasarkan pengukuran derajat parasitemia pada setiap kelompok perlakuan menunjukkan adanya perubahan nilai yang tidak menentu. Nilai derajat

parasitemia yang digunakan adalah pada hari ke-4 atau hari terakhir pascaterapi. Setelah ditentukan derajat parasitemia masing-masing kelompok perlakuan, selanjutnya dihitung persen penghambatan parasit dengan menggunakan rumus berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{parasitemia kontrol negatif} - \text{parasitemia obat / ekstrak}}{\text{parasitemia kontrol negatif}} \times 100 \%$$

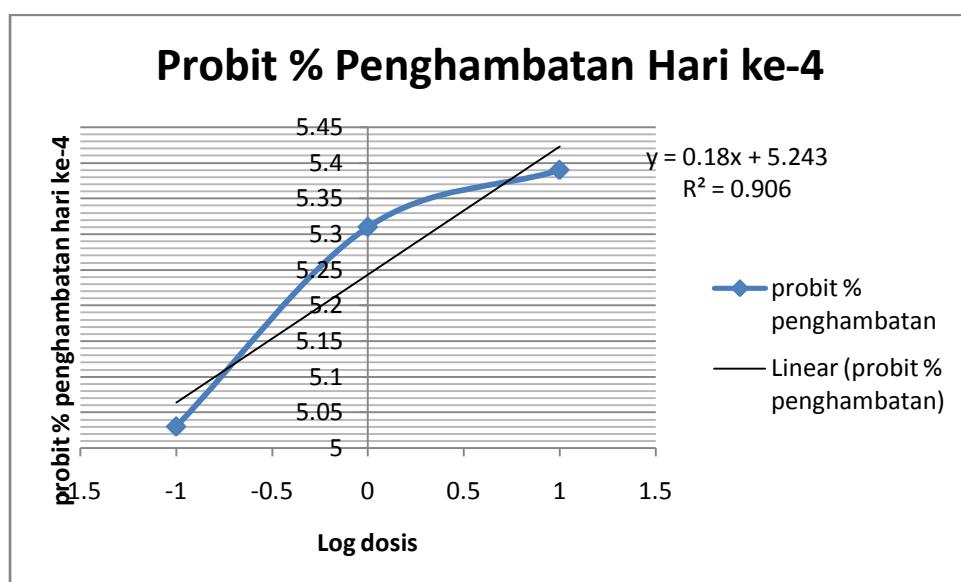
Prosentase penghambatan pertumbuhan parasit dengan menggunakan rumus di atas pada hari ke-4 pascaterapi ditunjukkan pada tabel 4.3 di bawah ini.

Tabel 4.5 Persen penghambatan pertumbuhan parasit ekstrak etanol 80 % akar Widuri pada hari ke-4

Dosis (mg/Kg BB)	Persen penghambatan pertumbuhan parasit (%)
0,1	51,4
1	61,7
10	64,1

Berdasarkan tabel 4.5 di atas, persen penghambatan pertumbuhan parasit mengalami kenaikan dengan bertambahnya dosis ekstrak yang diberikan. Hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan, maka efektivitas ekstrak dalam menghambat pertumbuhan parasit semakin besar. Namun, perbandingan antara persen penghambatan pertumbuhan parasit ekstrak etanol 80 % akar Widuri dengan kontrol positif klorokuin memiliki perbedaan yang jauh. Persen penghambatan kontrol positif klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB pada hari ke-4 sebesar 75,6 %. Klorokuin merupakan salah satu obat yang digunakan untuk mengobati penyakit malaria. Keefektivan dalam menghambat pertumbuhan parasit jauh lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etanol 80 % akar Widuri.

Penentuan dosis efektif dalam menghambat 50 % pertumbuhan parasit dengan menggunakan analisis probit % penghambatan. Selanjutnya, dilakukan analisis regresi linier dengan menggunakan Microsoft Excel. Kurva yang diperoleh menghubungkan antara respon dengan dosis. Hasil analisis dan perhitungan ED<sub>50</sub> disajikan pada Lampiran 8.



Gambar 4.7 Kurva hubungan antara log dosis dengan probit % panghambatan

Pada kurva tersebut diperoleh persamaan garis liniernya, yaitu  $y = 0.18 x + 5,2433$ . Nilai ED<sub>50</sub> ditentukan dengan cara mensubstitusi nilai penghambatan 50 % yang telah dikonversi ke dalam nilai probit sebesar 5 ke dalam variabel y. Kemudian, diperoleh nilai x sebesar -1,352. Nilai x ini kemudian di antilogkan sehingga diperoleh ED<sub>50</sub> ekstrak etanol 80 % akar Widuri, yaitu sebesar 0,0445 mg/g BB atau 4,45 mg/Kg BB. Nilai ED<sub>50</sub> ekstrak etanol 80 % akar Widuri kurang dari 10 mg/Kg BB. Artinya, ekstrak etanol 80 % akar Widuri dapat memiliki aktivitas antiplasmodial yang sangat bagus (Herintsoa, *et al.*, 2010).

Efektivitas ekstrak etanol 80 % akar Widuri dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* sangat baik yang ditunjukkan dengan nilai ED<sub>50</sub> < 10 mg/Kg BB. Hal ini juga diperjelas dengan kemampuan hidup mencit selama hari perlakuan terapi dan pascaterapi. Mencit yang diterapi dengan ekstrak etanol 80 % akar Widuri dapat bertahan hidup selama ± 14 hari, sedangkan mencit kelompok kontrol positif yang diterapi dengan klorokuin memiliki waktu hidup > 14 hari. Mencit kelompok kontrol negatif memiliki waktu hidup yang lebih pendek (< 14 hari) karena diterapi hanya menggunakan pelarut CMC-Na 1 %.

Efektivitas ekstrak etanol 80 % akar Widuri dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* juga dapat dilihat dari hasil analisis statistika persen penghambatan menggunakan uji Twoway ANOVA dengan MINITAB 16. Uji ini dilakukan untuk mengetahui signifikansi persen penghambatan tiap-tiap kelompok perlakuan. Selain itu, dilakukan juga uji Tukey untuk mengetahui signifikansi perbedaan tiap-tiap perlakuan dan hari terapi serta interaksi di antara keduanya.

Tabel 4.6 Hasil uji Twoway ANOVA

Variabel	Nilai p	Keterangan
Perlakuan	0,001	Ada perbedaan
Hari terapi	0,000	Ada perbedaan
Interaksi perlakuan dan hari	0,825	Tidak ada perbedaan

**Keterangan:** p merupakan signifikansi. Jika nilai p > 0,05 artinya tidak ada perbedaan; nilai p < 0,05 artinya ada perbedaan.

Hasil analisis statistika di atas menunjukkan bahwa variabel perlakuan dan hari memiliki perbedaan yang bermakna, yakni perbandingan antara tiap-tiap kelompok perlakuan dan waktu terapi menunjukkan nilai p < 0,05. Hal ini

menunjukkan adanya penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* yang bermakna terhadap tiap-tiap kelompok perlakuan dan waktu terapi.

Analisis statistika terhadap tiap-tiap kelompok perlakuan menunjukkan aktivitas yang berbeda-beda. Kontrol positif memiliki pengaruh yang paling besar dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*, yaitu dengan nilai rata-rata sebesar 59,655. Kemudian, diikuti oleh dosis 10 mg/Kg BB dengan nilai rata-rata sebesar 46,035; dosis 1 mg/Kg BB dengan nilai rata-rata sebesar 43,175; dan dosis 0,1 mg/Kg BB dengan nilai rata-rata sebesar 38,580. Berdasarkan data tersebut, maka aktivitas penghambatan pertumbuhan *Plasmodium berghei* yang terbaik adalah kelompok kontrol positif (klorokuin). Urutan selanjutnya adalah dosis 10 mg/Kg BB, dosis 1 mg/Kg BB dan dosis 0,1 mg/Kg BB.

Analisis statistika terhadap hari terapi menunjukkan hasil yang berbeda-beda. Terapi hari ke-4 memiliki pengaruh yang paling besar dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei*. Kemudian, diikuti oleh hari terapi ke-3, hari ke-2 dan hari ke-1. Hal ini ditunjukkan oleh nilai rata-rata hari terapi.

Interaksi antara kelompok perlakuan dan hari terapi menunjukkan bahwa tidak ada perbedaan yang signifikan. Artinya, dengan bertambahnya hari dan dengan bertambahnya dosis ekstrak, keduanya menunjukkan aktivitas yang dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* semakin baik. Dengan demikian, dosis terbaik dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* adalah dosis 10 mg/Kg BB pada hari terapi ke-4.

Uji korelasi dosis dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pengaruh dosis dengan persen penghambatan. Hasil uji korelasi dosis menunjukkan nilai Pearson sebesar 0,708. Hal ini mengindikasikan bahwa hubungan antara pengaruh

dosis cukup signifikan dengan persen penghambatan. Artinya, pada dosis rendah, nilai persen penghambatan bisa jadi rendah ataupun tinggi. Demikian pula pada dosis tinggi yang tidak diikuti dengan menurunnya persen penghambatan.

#### 4.4 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Aktif dengan Reagen

Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak etanol 80 % akar Widuri secara kualitatif. Uji fitokimia pada akar Widuri (*Calotropis gigantea*) mengandung alkaloid, tanin, flavonoid, saponin (Kumar *et al.*, 2013). Ekstrak etanol 95 % akar *Calotropis procera* mengandung senyawa alkaloid dan steroid (Mainasara *et al.*, 2012). Berdasarkan data tersebut, maka golongan senyawa aktif yang diuji pada penelitian ini meliputi alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid, saponin dan tanin. Hasil uji fitokimia golongan senyawa aktif ekstrak etanol 80 % akar Widuri ditunjukkan pada tabel 4.7.

Tabel 4.7 Hasil uji fitokimia golongan senyawa aktif ekstrak etanol 80 % akar Widuri

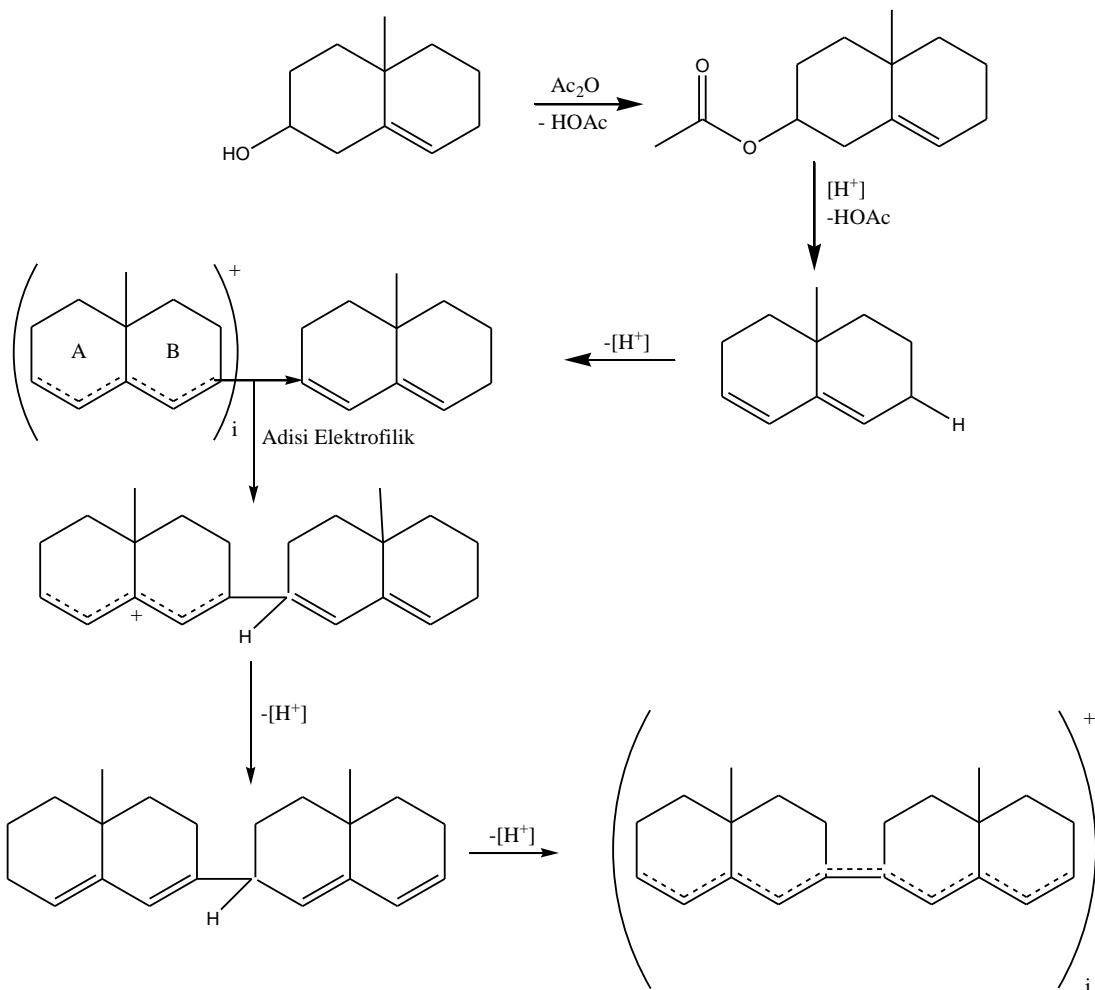
No.	Golongan senyawa aktif	Hasil kualitatif
1.	Alkaloid	-
2.	Flavonoid	-
3.	Terpenoid	++
4.	Steroid	-
5.	Saponin	++
6.	Tanin	-

Keterangan: +++ →(terkandung senyawa lebih banyak / warna pekat);  
++ →(terkandung senyawa / warna muda);  
- →(tidak terkandung senyawa / tidak terbentuk warna).

##### 4.4.1 Terpenoid

Uji fitokimia golongan terpenoid dilakukan dengan cara membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, diambil 0,5 mL larutan ekstrak dan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Kloroform berfungsi untuk melarutkan senyawa terpenoid karena terpenoid bersifat non polar, sehingga larut di dalam kloroform. Selanjutnya, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Penambahan ini berfungsi untuk membentuk turunan asetil setelah di dalam kloroform. Setelah itu, ditetesi dengan  $H_2SO_4$  pekat sebanyak 1 – 2 mL melalui dinding tabung reaksi. Terbentuk cincin kecoklatan di antara dua pelarut yang tidak saling bercampur yang menandakan positif terhadap senyawa terpenoid.

Senyawa terpenoid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna (Inayah, dkk., 2012). Terpenoid memberikan reaksi dengan terbentuknya warna cincin kecoklatan ketika senyawa ini ditetesi asam sulfat pekat melalui dindingnya (Robinson, 1995). Reaksi terpenoid dengan pereaksi Liebermann-Burchard dapat dilihat pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Dugaan reaksi senyawa terpenoid dengan pereaksi Liebermann-

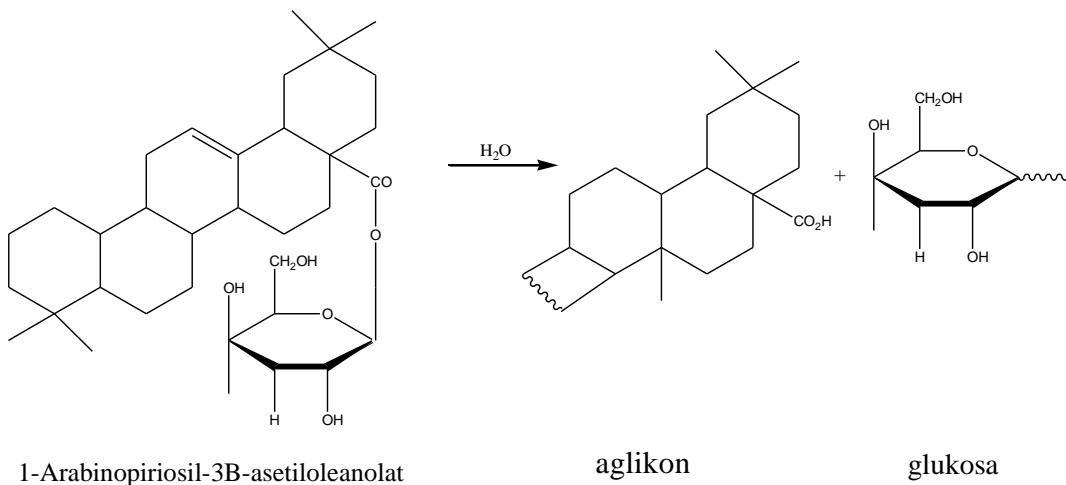
Burchard

#### 4.4.2 Saponin

Uji fitokimia golongan terpenoid dilakukan dengan metode Forth. Dibuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, diambil 0,5 mL larutan ekstrak dan ditambahkan 10 mL air sambil dikocok selama 1 menit. Timbul busa setelah dilakukan pengocokan. Selanjutnya, ditambahkan dengan 2 tetes HCl 1 N. Terbentuk busa lagi yang tidak hilang selama 30 detik, maka identifikasi menunjukkan adanya saponin.

Timbulnya busa pada uji Forth menunjukkan adanya glikosida yang mempunyai kemampuan membentuk buih dalam air yang terhidrolisis menjadi

glukosa dan senyawa lainnya (Rusdi, 1990). Reaksi hidrolisis saponin dalam air ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.9 Reaksi hidrolisis saponin dalam air

Saponin terdapat pada tumbuhan tingkat tinggi. Dapat membentuk larutan koloid dalam air dan akan membuih jika dikocok. Kemampuan menurunkan tegangan permukaan ini disebabkan molekul saponin terdiri dari hidrofob dan hidrofil. Bagian hidrofobnya adalah aglikon. Aglikonnya disebut sapogenin sedangkan bagian hidrofilnya adalah glikonnya (Sirait, 2007).

#### 4.5 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis

Sampel yang diidentifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis merupakan golongan senyawa aktif yang positif terhadap uji fitokimia. Dilarutkan ekstrak pekat akar Widuri sebanyak 1000 mg dalam 1 mL etanol 80 %. Identifikasi dengan KLT ini menggunakan plat silika gel F<sub>254</sub>. Plat dipotong dengan ukuran 1 x 10<sup>2</sup> cm dan diberi tanda tepi atas dan tepi bawah masing-masing 1 cm dengan menggunakan pensil. Plat silika diaktivasi terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu 60 – 70 °C selama 10 menit.

Fase gerak merupakan campuran beberapa eluen. Sistem paling sederhana adalah campuran pelarut organik karena daya elusi campuran pelarut ini dapat mudah diatur, sehingga pemisahan dapat terjadi secara optimal. Fase gerak juga harus berupa pelarut dengan kemurnian yang tinggi (Gandjar dan Rohman, 2012). Bejana pengembang disiapkan sebagai tempat menampung fase gerak selama proses pemisahan dilakukan. Dimasukkan campuran eluen ke dalam bejana pengembang dan ditutup bejana pengembang selama 1 jam untuk menjenuhkan uap eluennya. Ini bertujuan agar campuran eluen dapat mengelusi ekstrak dengan baik.

Ekstrak ditotolkan sebanyak 5 – 10 totolan menggunakan pipa kapiler pada tepi bawah plat. Perlu diperhatikan bahwa setelah mentotolkan sekali, sebaiknya ditunggu sampai totolan kering. Jika sudah kering, ekstrak dapat ditotolkan kembali, begitu seterusnya. Selanjutnya, dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setelah pergerakan fase gerak sampai pada garis batas atas, maka elusi dihentikan. Kemudian, ditunggu sampai kering dan diamati di bawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Jika tampak noda, maka ditandai noda tersebut menggunakan pensil. Setelah itu, noda disemprot dengan pereaksi dan diperiksa kembali dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Kemudian, diamati noda tersebut. Jika tampak noda yang baru, maka ditandai noda tersebut menggunakan pensil. Diukur jarak tempuh tiap-tiap spot dan dihitung nilai Rf untuk mengetahui golongan senyawanya.

Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis sering menggunakan pereaksi penyemprot atau biasa disebut dengan indikator berfluoresensi untuk membantu penampakan bercak berpendar (memancarkan cahaya) pada lapisan yang telah

terelusi. Indikator fluoresensi adalah senyawa yang memancarkan sinar tampak jika disinari dengan sinar yang berpanjang gelombang seperti sinar UV. Beberapa senyawa organik bersinar dan berfluoresensi jika disinari pada 254 nm atau 366 nm yang dapat tampak dengan mudah (Gritter, *et al.*, 1991).

Penampakan warna pada panjang gelombang 366 nm tersebut disebabkan adanya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi dan kemudian kembali sambil melepaskan energi (Sudadjii, 1988).

Identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis Analitik ini bertujuan untuk menentukan eluen terbaik yang dapat memisahkan komponen senyawa. Pemisahan dikatakan baik jika menghasilkan komponen senyawa berupa noda yang banyak, noda yang terbentuk bulat, tidak berekor dan pemisahan nodanya jelas (Gandjar dan Rohman, 2012).

#### **4.4.1 Identifikasi Golongan Senyawa Terpenoid**

Hasil identifikasi golongan senyawa terpenoid dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan 5 variasi campuran eluen ditunjukkan pada tabel 4.5.

Tabel 4.8 Hasil Kromatografi Lapis Tipis golongan senyawa terpenoid

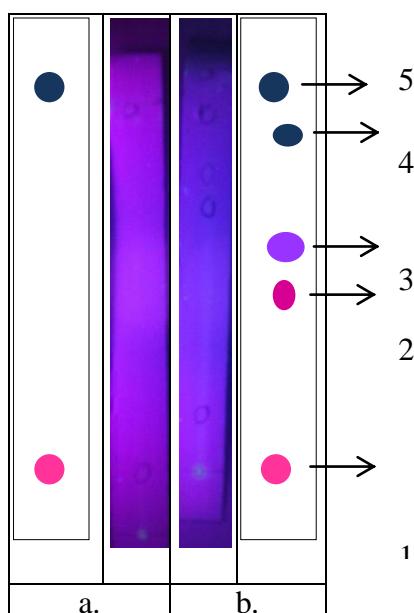
No.	Eluen	Jumlah Noda Pada Plat	Rf	Keterangan
1.	n-heksana : etil asetat (1 : 1)	1	0,11	Terpisah
2.	n-heksana : etil asetat (2 : 8)	5	0,19; 0,68; 0,76; 0,9; 0,99	Terpisah sangat baik, noda tidak

				berekor
3.	n-heksana : etil asetat (4 : 1)	2	0,19; 0,45	Terpisah
4.	Kloroform : asam asetat (4 : 1)	3	0,12; 0,52; 0,99	Terpisah
5.	Kloroform : asam asetat (4,5 : 0,5)	6	0,28; 0,68; 0,78; 0,85; 1; 1,01	Terpisah baik, noda berekor

Identifikasi golongan senyawa terpenoid menggunakan 5 variasi campuran eluen menghasilkan pola pemisahan yang berbeda-beda. Pada campuran eluen n-heksana : etil asetat (1 : 1) dihasilkan 1 buah noda dengan nilai Rf sebesar 0,11. Campuran eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) dihasilkan 5 buah noda yang terpisah dengan sangat baik. Noda yang diperoleh dari elusi campuran eluen ini tidak berekor dan didapatkan nilai Rf sebesar 0,19; 0,68; 0,76; 0,9; 0,99. Pada campuran n-heksana : etil asetat (4 : 1) dihasilkan 2 buah noda yang terpisah dengan nilai Rf 0,19; 0,45. Campuran eluen kloroform : asam asetat (4 : 1) diperoleh 3 buah noda yang terpisah dengan nilai Rf sebesar 0,12; 0,52; 0,99. Pada campuran eluen kloroform : asam asetat (4,5 : 0,5) diperoleh 6 buah noda yang terpisah dengan baik. Namun, noda yang dihasilkan pada campuran eluen ini ada yang berekor. Nilai Rf yang diperoleh dari elusi campuran eluen ini adalah 0,28; 0,68; 0,78; 0,85; 1; 1,01.

Eluen terbaik yang dihasilkan dari identifikasi golongan senyawa terpenoid menggunakan Kromtografi Lapis Tipis adalah n-heksana : etil asetat (2 : 8). Pemisahan dengan campuran eluen ini sangat baik, dimana semua noda yang diperoleh tidak ada yang berekor. Berbeda dengan campuran eluen kloroform : asam asetat (4,5 : 0,5). Meskipun jumlah noda yang dihasilkan dari eluen kloroform : asam asetat (4,5 : 0,5) lebih banyak, namun noda yang diperoleh

berekor. Penampakan noda pada panjang gelombang 366 nm adalah warna ungu. Hasil pemisahan dengan eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) ditunjukkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Hasil KLT golongan senyawa terpenoid pada ekstrak etanol 80 % akar Widuri dengan eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) dengan pereaksi Liebermann-Burchard

Keterangan: a. hasil elusi sebelum disemprot (pengamatan dengan lampu UV 366nm)  
b. hasil elusi setelah disemprot (pengamatan dengan lampu UV 366 nm)

Tabel 4.9 Hasil KLT senyawa saponin dengan eluen kloroform : aseton (4 : 1)

Noda ke-	Rf Tiap Noda	Warna noda dengan sinar UV 366 nm sebelum disemprot	Warna noda dengan sinar UV 366 nm setelah disemprot
1	0,19	Ungu muda	Ungu muda
2	0,68	-	Ungu
3	0,76	-	Ungu kebiruan
4	0,9	-	Biru
5	0,99	Biru	Biru

Campuran eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) memiliki sifat kepolaran yang hampir sama. Keduanya bersifat non polar, namun etil asetat lebih non polar daripada n-heksana. Hal ini dibuktikan dengan nilai konstanta dielektrik etil asetat yang lebih besar dibandingkan n-heksana. Senyawa dengan nilai Rf yang rendah cenderung terdistribusi pada fase diamnya, sedangkan nilai Rf yang tinggi lebih terdistribusi pada fase geraknya. Sistem pemisahan yang terjadi pada campuran eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) adalah fase diam silika bersifat polar, sedangkan fase geraknya bersifat non polar. Noda dengan nilai Rf yang rendah bersifat lebih polar dibandingkan dengan nilai Rf yang tinggi. Senyawa dengan nilai Rf yang rendah memiliki koefisien distribusi besar karena senyawa tertahan kuat pada fase diamnya (polar) dibandingkan fase geraknya (non polar). Dengan kata lain,  $C_{stasioner} > C_{mobile}$ . Begitupun berlaku kebalikannya.

Identifikasi golongan terpenoid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan campuran eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) menghasilkan nilai Rf sebesar 0,19; 0,68; 0,76; 0,9; 0,99 dengan penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm (Halimah, 2010). Senyawa terpenoid diduga teridentifikasi pada Rf 0,19; 0,68; 0,76 karena memiliki penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm.

#### **4.4.1 Identifikasi Golongan Senyawa Saponin**

Hasil identifikasi golongan senyawa saponin dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan 5 variasi campuran eluen ditunjukkan pada tabel 4.5.

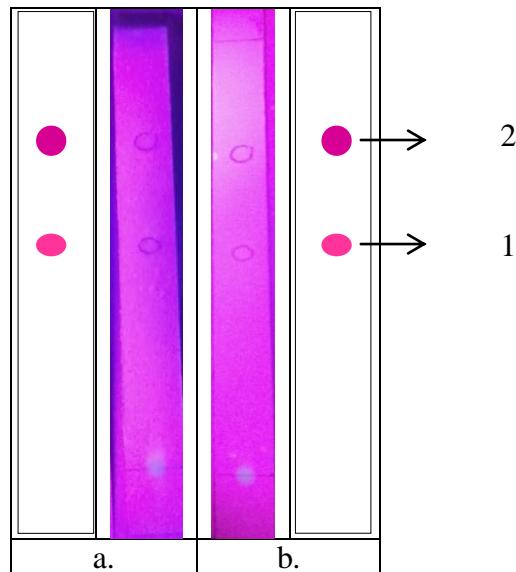
Tabel 4.10 Hasil Kromatografi Lapis Tipis golongan senyawa saponin

No.	Eluen	Jumlah Noda Pada Plat	Rf	Keterangan
1.	Kloroform : aseton (4 : 1)	2	0,5; 0,75	Terpisah sangat baik

2.	Kloroform : metanol : air (2 : 6 : 1)	2	0,88; 0,95	Terpisah baik
3.	Kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2)	2	0,88; 0,94	Terpisah baik
4.	Kloroform : metanol : air (14 : 6 : 1)	1	0,99	Terpisah
5.	Kloroform : metanol : air (3 : 1 : 1)	2	0,19; 0,94	Terpisah baik

Identifikasi golongan senyawa terpenoid menggunakan 5 variasi campuran eluen menghasilkan pola pemisahan yang berbeda-beda. Pada campuran eluen kloroform : aseton (4 : 1) dihasilkan 2 buah noda yang terpisah dengan sangat baik. Noda yang diperoleh dari elusi campuran eluen ini tidak berekor dan didapatkan ~~nilai~~-nilai Rf masing-masing sebesar 0,5 dan 0,75. Campuran eluen kloroform : metanol : air (2 : 6 : 1) dihasilkan 2 buah noda yang terpisah dengan sangat baik dan didapatkan nilai Rf sebesar 0,88; 0,95. Pada campuran eluen kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2) dihasilkan 2 buah noda yang terpisah baik dengan nilai Rf 0,88; 0,94. Campuran eluen kloroform : metanol : air (14 : 6 : 1) diperoleh 1 buah noda yang terpisah dengan nilai Rf sebesar 0,99. Pada campuran eluen kloroform : metanol : air (3 : 1 : 1) diperoleh 2 buah noda yang terpisah dengan baik. Nilai Rf yang diperoleh dari elusi campuran eluen ini adalah 0,19; 0,94.

Eluen terbaik yang diperoleh berdasarkan identifikasi golongan senyawa saponin dengan Kromatografi Lapis Tipis adalah campuran eluen kloroform : aseton (4 : 1). Pemisahan dengan eluen ini menghasilkan dua buah spot yang terpisah dengan sangat baik. Pola noda yang terbentuk berbentuk bundar dan tidak berekor. Penampakan noda pada panjang gelombang 366 nm adalah warna ungu. Hasil pemisahan dengan eluen kloroform : aseton (4 : 1) ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.11 Hasil KLT golongan senyawa saponin pada ekstrak etanol 80 % akar

Widuri dengan eluen kloroform : aseton (4 : 1) dengan pereaksi  $H_2SO_4$  0,1 M

Keterangan: a. hasil elusi sebelum disemprot (pengamatan dengan lampu UV 366nm)

b. hasil elusi setelah disemprot (pengamatan dengan lampu UV 366 nm)

Tabel 4.10 Hasil KLT senyawa saponin dengan eluen kloroform : aseton (4 : 1)

Noda ke-	Rf Tiap Noda	Warna noda dengan sinar UV 366 nm sebelum disemprot	Warna noda dengan sinar UV 366 nm setelah disemprot
1	0,5	Ungu muda	Ungu
2	0,75	Ungu muda	Ungu

Campuran eluen kloroform : aseton (4 : 1). memiliki sifat kepolaran yang berbeda. Kloroform bersifat non polar, sedangkan aseton bersifat polar. Namun, karena perbandingan kloroform lebih besar dibandingkan aseton, maka campuran eluen ini cenderung bersifat non polar. Senyawa dengan nilai Rf yang rendah lebih terdistribusi pada fase diamnya, sedangkan nilai Rf yang tinggi akan terdistribusi pada fase geraknya. Sistem pemisahan yang terjadi pada campuran eluen kloroform : aseton (4 : 1). adalah fase diam silika bersifat polar, sedangkan fase geraknya bersifat non polar. Noda dengan nilai Rf yang rendah bersifat lebih

polar dibandingkan dengan nilai Rf yang tinggi. Senyawa dengan nilai Rf yang rendah memiliki koefisien distribusi besar karena senyawa tertahan kuat pada fase diamnya (polar) dibandingkan fase geraknya (non polar). Dengan kata lain,  $C_{stasioner} > C_{mobile}$ . Begitupun berlaku kebalikannya.

Identifikasi saponin menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan campuran eluen kloroform : aseton (4 : 1) menghasilkan nilai Rf sebesar 0,77 (Suryanti, 2005). Senyawa saponin diduga teridentifikasi pada kedua noda tersebut karena menunjukkan penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm.

#### **4.5 Pemanfataan Tanaman Widuri Dalam Perspektif Islam**

Allah SWT. berfirman dalam surah Ali ‘Imran ayat 190 yang berbunyi:

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَاوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاحْتِلَافِ الَّيلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولَئِكَ الَّذِينَ يَسْمَعُونَ

*Artinya: Sesungguhnya dalam penciptaan langit dan bumi, dan silih bergantinya malam dan siang terdapat tanda-tanda bagi orang-orang yang berakal. (Q.S. Ali ‘Imran: 190).*

Menurut tafsir al Kalam, surah Ali ‘Imran ayat 190 ini menjelaskan bahwa sesungguhnya dalam penciptaan segala makhluk yang ada di langit, yaitu malaikat, matahari, bulan, bintang, dan awan; dan dalam penciptaan bumi beserta segala sesuatu yang ada padanya berupa gunung, lautan, pepohonan, dan hewan; dan juga dalam pertukaran malam dan siang; terdapat tanda-tanda yang menunjukkan Keesaan-Nya, yakni bagi manusia yang memiliki pikiran.

Allah menciptakan alam beserta isinya tidaklah sia-sia. Semua ciptaan Allah dapat dimanfaatkan dan dieksplorasi jika manusia mau berfikir. Salah satu ciptaan yang memiliki banyak manfaat yang juga disebutkan dalam tafsir di atas adalah tumbuh-tumbuhan, baik yang ada di darat maupun di laut. Al Quran banyak

menjelaskan tentang tumbuh-tumbuhan. Allah berfirman dalam surah asy Syu'araa' ayat 7 yang berbunyi:

أَوْلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتَنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٌ  
©

Artinya: *Dan Apakah mereka tidak memperhatikan bumi, berapakah banyaknya Kami tumbuhkan di bumi itu berbagai macam tumbuh-tumbuhan yang baik? (Q.S. asy Syu'araa: 7).*

Menurut tafsir al Kalam, makna kata *kariim* adalah baik. Tumbuhan yang baik ditafsirkan sebagai tumbuhan yang indah dipandang. Tumbuhan yang baik adalah tumbuhan yang tumbuh dengan subur dan memberikan banyak bermanfaat (Shihab, 2005). Tumbuhan yang bermanfaat merupakan tumbuhan yang dapat digunakan sebagai pengobatan bagi makhluk hidup (Savitri, 2008).

Al Quran menjadi pedoman bagi manusia untuk mencari jawaban atas penciptaan langit dan bumi dengan menggunakan akal pikirannya. Upaya manusia untuk mencari jawaban yang dimaksud merupakan awal mula timbulnya studi eksperimen dan penelitian terhadap alam sekitar agar mengetahui berbagai potensi dan manfaat penciptaan alam semesta, karena sesungguhnya penciptaan alam berserta isinya tidaklah sia-sia.

Eksplorasi berbagai macam tumbuhan dilakukan oleh manusia, diantaranya untuk menemukan khasiat obat dalam menyembuhkan penyakit. Rasulullah SAW. bersabda (Muhammad, 2007):

عَنْ جَابِرٍ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُحْسِنَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأً بِإِذْنِ اللَّهِ عَزَّ وَجَلَّ

Artinya: "Dari Jabir, bahwa Rasulullah SAW bersabda, Setiap penyakit ada obatnya, jika benar obat yang digunakan dapat melawan penyakit yang dimaksud, maka dengan izin Allah akan sembuh".

Pada kalimat ﴿كُلْ دَاءٍ دَوَّا﴾ tersebut bisa bersifat bersifat umum, termasuk obat-obat penyakit mematikan yang belum bisa disembuhkan oleh para dokter. Hal ini disebabkan Allah SWT. yang menghalangi manusia untuk dapat menemukan cara penyembuhannya. Hanya Allah Yang Maha Mengetahui (Al Jauziyah, 2002).

Keimanan dan ilmu pengetahuanlah yang dapat menuntun manusia untuk berfikir sehingga dapat memanfaatkan berbagai jenis tumbuhan sebagai obat bagi makhluk hidup, salah satunya adalah akar tanaman Widuri. Studi eksperimen yang telah dilakukan berusaha untuk dapat menemukan khasiat dari tanaman tersebut sebagai obat penyakit malaria. Ekstrak etanol 80 % akar Widuri mampu memberikan efektivitas sebagai antimalaria dengan baik dalam menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei* di dalam sel eritrosit.

Penyakit dapat sembuh melalui pengobatan yang tepat. Ketika penyakit bertemu obat yang tepat, maka penyakit dapat disembuhkan. Sebaliknya, ketika obat yang diberikan tidak tepat seperti melebihi dosis atau tidak sesuai dengan penyakitnya, maka dapat menimbulkan penyakit yang lain. Jika dosis yang diberikan kurang dari yang dibutuhkan, maka penyakit itu pun tak akan sembuh (Al Jauziyah, 2002).

Pada penelitian ini diperoleh dosis efektif untuk dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria, yaitu sebesar 4,45 mg/Kg BB. Dengan demikian, diharapkan manusia dapat sembuh dari penyakit-penyakit lain dengan memperhatikan banyak aspek, mulai dari obatnya, dosisnya, cara merawat orang yang sakit dan lain sebagainya.

Pemanfaatan akar tanaman Widuri ini merupakan suatu usaha untuk mengamalkan sunnah Rasulluah SAW. Jika dikorelasikan dengan surah asy

Syu'araa' yang menyebutkan tentang tumbuhan yang baik, maka dapat diasumsikan bahwa dalam penelitian ini, akar tanaman Widuri memiliki kriteria sebagai tanaman yang baik karena memiliki potensi dapat menyembuhkan penyakit malaria. Hal ini ditunjukkan dengan nilai ED<sub>50</sub> sebesar 4,45 mg/Kg BB dimana pada dosis tersebut dapat menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei*.

## **BAB V**

### **SARAN DAN KESIMPULAN**

#### 1. Kesimpulan

Berdasarkan uraian tersebut di atas didapatkan hasil bahwa :

1. Dosis efektif ekstrak akar *Calotropis gigantea* yang dapat mengambat pertumbuhan parasit yaitu sebesar 4,45 mg/Kg BB
2. Ekstrak akar *Calotropis gigantea* diketahui dapat bekerja secara sinergis dengan Artemisinin.
3. Dari hasil Kromatografi Lapis Tipis diketahui bahwa Senyawa yang terdapat pada ekstrak akar *Calotropis gigantea* adalah senyawa golongan Glikosida cardenolid dan senyawa terpenoid

#### 2. Saran

1. Perlu dilakukan isolasi dan elusidasi struktur senyawa aktif yang berperan sebagai antimalaria
2. Perlu dilakukan uji lebih lanjut terkait mekanisme kerja kombinasi akar *Calotropis gigantea* dan artemisinin

## DAFTAR PUSTAKA

- Alam MA, Habib MR, Nikkon R, Rahman M, Karim MR,. 2008. Antimicrobial activity of akanda (*Calotropis gigantea* L.) on some pathogenic bacteria. *Bangladesh J Sci Ind Res* ;Vol 3 No 43 hal:397-404.
- Alam MA, Habib MR, Nikkon F, Khalequzzaman M, Karim MR,. 2009. Insecticidal activity of root bark of *Calotropis gigantea* L. against *Tribolium castaneum* (Herbst). *World Journal of Zoology*, Vol 2 No 4 hal:90-95.
- Argal A, Pathak AK,. 2006. CNS activity of *Calotropis gigantea* roots. *J. Ethnopharmacol.* Vol 1 No 106 hal:142-145.
- Chitme HR, Chandra R, Kaushik S. 2005. Evaluation of antipyretic activity of *Calotropis gigantea*(Asclepiadaceae) in experimental animals. *Phototherapy Research*;Vol 5 No 19 hal:454-456.
- Dondorp AM, Das D, Lwin KM, Lee SJ, Imwong M, Herdman T, Singhasivanon P, dan Socheat D. 2009. Artemisinin Resistance in Plasmodium falciparum Malaria. NEJM Vol 5 No 361 hal: 455-467.
- Ditjenbun, 2010. Data Statistik Luas dan Produktivitas Kelapa Sawit.
- Fidock DA, Rosenthal PJ, Croft SL, Brun R dan Nwaka S. 2004. Antimalarial Drug Discovery: Efficacy Models For Compound Screening. *Nature Review*, Vol.3 hal: 509-520.
- Fessenden, R.J., and Fessenden, J.S. 1982. *Organik Chemistry*. London. John Willy & Son's
- Gething PW, Patil AP, Smith DL, Guerra CA, Elyazar IRF, Johnston, Tatem AJ dan Hay SI: A new world malaria map: *Plasmodium falciparum* endemicity in 2010. *Malaria Journal* 2011, Vol 10 hal: 378.
- Habib MR; Karim MR. 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. *Mycobiology* Vol 1 No 37 hal:31-36.
- Habib MR, Nikkon F, Rahman M, Haque ME, Karim MR. 2007. Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from methanolic extract of root bark of *Calotropis gigantea* (Linn). *Pak. J. Biol. Sci.* Vol 22 No 10 hal: 4174-4176.
- Habib dan Karim. 2009. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Anhydrosophoradiol-3-acetate Isolated from *Calotropis gigantea* (Linn.) Flower. *Mycobiology*, Vol 1 No 37:31-36
- Mardisiswojo dan Radjakmanugunsudarso, 1968, Cabe Puyang Warisan Nenek Moyang, Jilid II, hal 4-5
- Noedl H, Se Y, Schaecher K, Smith B, Socheat D, dan Fukuda M.2008.Evidence of Artemisinin-Resistant Malaria in Western Cambodia. *NEJM* Vol 359 hal : 2619-2620
- Pillai DR, Lau R, Khairnar K, Via A, Staines HM, Krishna S. 2012. Artemether resistance in vitro is linked to mutations in PfATP6 that also interact with mutations in PfMDR1 in travellers returning with Plasmodium falciparum infection. *Malaria Journal* Vol 11 hal:131.
- Sardjono TW, dan Fitri LE. 2007. Malaria, Mekanisme Terjadinya Penyakit dan Pedoman Penanganannya, Malang.FKUB hal

- Srivastava SR, Keshri G, Bhargavan B, Singh C, Singh MM,.2007. Pregnancy interceptive activity of the roots of *Calotropis gigantea* Linn. in rats. Contraception. Vol 43 No 75 hal 4318-322.
- Tjitra E. 2004. Pengobatan malaria Dengan Kombinasi Artemisin. Dalam Simponsium Nasional Pengendalian Malaria, Jakarta. Puslitbang pemberantasn Penyakit badan Litbangkes Dep kes RI,
- Wang Z, Wang M, Mei W, Han Z, Dai H,. 2008. A new cytotoxic pregnanone from *Calotropis gigantea*. Molecules. Vol 12 No 13 hal:3033-3039.
- WHO.2010. *Malaria Situation in Indonesia, : At a Glance*.  
[http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section340\\_4022.htm](http://www.searo.who.int/en/Section10/Section21/Section340_4022.htm)
- WHO. 2011. World Malaria Report.  
<http://www.searo.who.int/LinkFiles/Malaria in the SEAR profile ino e n.pdf>
- Wong SK, Lim YY, Abdullah NR, Nordin FJ. 2011. Assessment of antiproliferative and antiplasmodial activities of five selected Apocynaceae species, BMC Complementary & alternative Medicine 11:3  
<http://www.biomedcentral.com/1472-6882/11/3>
- Yeung S, Damme WV, Socheat D, White NJ dan Mills A. 2008. Access to Artemisin Combination Therapy For Malaria In Remote malaria areas Of Cambodia. Malaria Journal, 7:96

### 1. Analisis Kadar Air Akar Widuri (*Calotropis gigantea*)



Gambar 1. Sampel Akar widuri  
(dalam desikator)



Gambar 2. Analisis kadar air

### 2. Ekstraksi Maserasi Akar Widuri (*Calotropis gigantea*)



Gambar 3. Maserasi dengan pelarut etanol



Gambar 3. Proses penyaringan



Gambar 4. Filtrat hasil maserasi dengan metanol

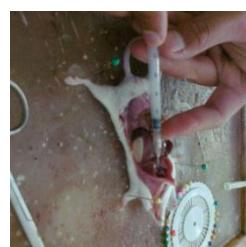


Gambar 5. Pemekatan filtrat dengan rotary evaporator



Gambar 6. Ekstrak pekat

### 3. Antimalaria pada Mencit *Mus musculus*



Gambar 7. Pembiusan  
mencit donor

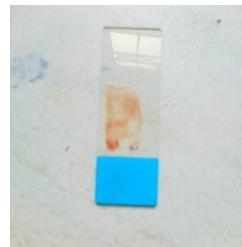


Gambar 8. Pengambilan  
darah jantung mencit donor

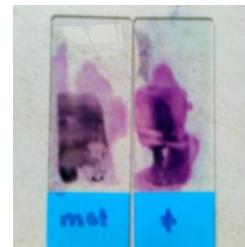


Gambar 9. Darah jantung  
mencit donor

Gambar 10. Resuspensi darah infeksi  
*Plasmodium berghei* pada larutan PBS



Gambar 11. Penginfeksian parasit  
pada mencit kontrol



Gambar 12. Hapusan  
darah mencit



Gambar 13. Pewarnaan  
hapusan dengan giemsa

Gambar 14. Pencucian  
setelah pewarnaan

#### 4. Uji Fitokimia dengan Reagen



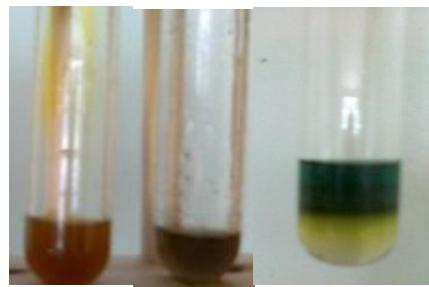
Gambar 15. Ekstrak etanol  
Sebelum diuji



Gambar 16. Uji saponin  
(-)



Gambar 17. Uji  
favonoid (-)



Gambar 18. Uji  
alkaloid dragendorff  
(-)

Gambar 19. Uji  
alkaloid mayer (-)

Gambar 20. Uji  
steroid (+)



Gambar 21. Uji  
tanin (+)

## 5. Identifikasi Senyawa Aktif dengan KLT



Gambar 22. Pemisahan golongan  
senyawa steroid



Gambar 23. Pemisahan golongan  
senyawa tanin



Gambar 24. Spot hasil pemisahan senyawa steroid

Gambar 25. Spot hasil pemisahan senyawa tanin