

**EFEKTIVITAS ANTIMALARIA DAN IDENTIFIKASI
GOLONGAN SENYAWA AKTIF EKSTRAK ETANOL 80 %
AKAR WIDURI (*Calotropis gigantea*) PADA MENCIT
TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

oleh:

FIISYATIRODIYAH

NIM. 10630066



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
2014**

**EFEKTIVITAS ANTIMALARIA DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA AKTIF EKSTRAK ETANOL 80 % AKAR WIDURI (*Calotropis
gigantea*) PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

Diajukan Kepada:

**Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang
Untuk Memenuhi Salah Satu Persyaratan
Dalam Memeroleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)**

Oleh:

Fiisyatirodiyah

10630066

**UNIVERSITAS ISLAM NEGERI
MAULANA MALIK IBRAHIM MALANG
FAKULTAS SAINS DAN TEKNOLOGI
JURUSAN KIMIA
2014**

**SURAT PERNYATAAN
ORISINALITAS PENELITIAN**

Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Fiisyatirodiyah

NIM : 10630066

Fakultas / Jurusan : Sains dan Teknologi / Kimia

Judul Penelitian : Efektivitas Antimalaria dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri (*Calotropis gigantea*) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*

Menyatakan dengan sebenar-benarnya bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan data, tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai hasil tulisan atau pikiran saya sendiri.

Apabila di kemudian hari terbukti terdapat unsur-unsur jiplakan, maka saya bersedia untuk mempertanggungjawabkan, serta diproses sesuai peraturan yang berlaku.

Malang, 15 Juli 2014
Yang Membuat Pernyataan

Fiisyatirodiyah
NIM. 10630066

**EFEKTIVITAS ANTIMALARIA DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA AKTIF EKSTRAK ETANOL 80 % AKAR WIDURI (*Calotropis
gigantea*) PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

Oleh:
FIISYATIRODIYAH
NIM. 10630066

Telah Diperiksa dan Disetujui untuk Diuji :
Tanggal : 3 Juli 2014

Pembimbing I

Pembimbing II

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag
NIP. 19720420 200212 1 003

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

**EFEKTIVITAS ANTIMALARIA DAN IDENTIFIKASI GOLONGAN
SENYAWA AKTIF EKSTRAK ETANOL 80 % AKAR WIDURI (*Calotropis
gigantea*) PADA MENCIT TERINFEKSI *Plasmodium berghei***

SKRIPSI

Oleh:
FIISYATIRODIYAH
NIM. 10630066

Telah Dipertahankan di Depan Dewan Penguji Skripsi
Dan Dinyatakan Diterima Sebagai Salah Satu Persyaratan
Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains (S.Si)
Tanggal : 3 Juli 2014

Penguji Utama : Akyunul Jannah, S.Si, M.P (.....)
NIP. 19750410 200501 2 009

Ketua Penguji : Ahmad Hanapi, M.Sc (.....)
NIPT . 20140201 1 442

Sekretaris Penguji : Elok Kamilah Hayati, M.Si (.....)
NIP. 19790620 200604 2 002

Anggota Penguji : Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag (.....)
NIP. 19720420 200212 1 003

Mengesahkan,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas Sains dan Teknologi
Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang

Elok Kamilah Hayati, M.Si
NIP. 19790620 200604 2 002

HALAMAN PERSEMBAHAN

Puji syukur kepada Allah SWT. Juhan semesta alam. Karya ini kupersembahkan untuk Ibu Sholihah dan Bapak Syaiful Alam tercinta serta adik-adikku Fitrotur Rizkiyah dan Haikalussomadani. Terimakasih atas dukungannya dalam bentuk apapun serta do'a yang senantiasa mengiringi langkahku.

Thanks to:

Bapak/Ibu dosen Kimia UIN Maliki Malang

Jeman-teman PPKH dan PPNF

Jeman-teman Kimia angkatan '10

Laboran Kimia dan Biologi

Mus musculus tercinta (in memoriam)

في عيشة راضية

MOTTO

ذَلِكَ بِأَنَّ اللَّهَ لَمْ يَكُ مُغَيِّرًا نِّعْمَةً أَنْعَمَهَا عَلَىٰ قَوْمٍ حَتَّىٰ يُغَيِّرُوا مَا بِأَنْفُسِهِمْ وَأَنَّ اللَّهَ

—سَمِيعٌ عَلِيمٌ— ٥٣

Yang demikian itu karena sesungguhnya Allah tidak akan mengubah suatu nikmat yang telah Diberikan-Nya kepada suatu kaum, hingga kaum itu mengubah apa yang ada pada diri mereka sendiri. Sungguh, Allah Maha Mendengar, Maha

Mengetahui,

(Q.S. Al-anfal : 53)

KATA PENGANTAR

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

Alhamdulillahirabbil ‘alamiin, segala puji bagi Allah SWT. yang telah memberikan nikmat dan karunia serta limpahan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis mampu menyelesaikan skripsi yang berjudul “Efektivitas Antimalaria dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri (*Calotropis gigantea*) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*” ini dengan baik. Shalawat serta salam semoga tetap tercurahkan kepada sang revolusioner dunia, Rasulullah SAW. Sesungguhnya, Skripsi ini jauh dari sempurna, namun penulis berharap karya ini dapat diambil manfaat dan pelajaran bagi para pembacanya, sehingga amal ini dapat mengalir terus tanpa henti.

Proses penyelesaian skripsi ini, tak lepas dari dukungan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih atas do’a dan bimbingannya kepada :

1. Allah SWT. sebagai pencipta alam semesta beserta isinya, Yang Maha Agung. Atas bantuan yang diberikan oleh-Nya dalam bentuk nikmat berupa kesehatan, kesempatan serta kemampuan yang tiada tara sehingga dapat menyelesaikan Skripsi ini dengan baik.
2. Ibu dan Bapak tercinta sebagai orang tua dan kedua adikku serta keluarga besar, yang senantiasa memberi dukungan baik moril maupun material, teriring doa dan cinta selalu. Terima kasih yang tiada tara, do’a dan dukungan kalian tak dapat terbalaskan oleh apapun.
3. Prof. Dr. Mudjia Raharjo, M.Si selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang yang senantiasa memberikan motivasi dan wejangan kepada mahasiswanya.
4. Prof. Dr. Imam Suprayogo selaku rektor UIN Maulana Malik Ibrahim Malang periode sebelumnya yang juga selalu memberikan motivasi dan semangat serta menjadi teladan dan contoh dalam menapaki tangga kehidupan untuk meraih kesuksesan.

5. Ibu Elok Kamilah Hayati, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia dan dosen pembimbing skripsi kami yang telah membimbing dan memberikan ilmu yang sangat berharga.
6. Bapak Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag selaku pembimbing agama yang telah memberikan banyak ilmu yang berharga.
7. Ibu Roihatul Muthi'ah, M. Kes, Apt. selaku konsultan kami yang senantiasa membimbing kami hingga skripsi ini terselesaikan dengan baik.
8. Bapak dan Ibu guru SMA, SMP, MI dan TK yang telah memberikan banyak sekali pelajaran berharga serta do'a yang selalu teriring untuk kami, sehingga menjadikan kami insan yang berilmu.
9. Ustadz serta ustadzah PP/Madin Miftahul Ulum, PKPBA, PP Khaira Ummah, PPTQ Nurul Furqon yang telah memberikan pelajaran yang sangat berharga serta do'a yang selalu teriring untuk kami.
10. Mas Abi, Mas Taufiq, Mbak Rika, Mbak Mei, Mbak Susi, Mbak Is dan Mbak Ana selaku laboran dan admin Jurusan Kimia yang telah memberikan pelayanan berupa alat, jasa maupun tempat demi tercapainya kelancaran penelitian kami.
11. Mas Basyar, Mas Zulfan dan Mas Mail selaku laboran Jurusan Biologi yang telah memberikan pelayanan berupa alat, jasa maupun tempat demi tercapainya kelancaran penelitian kami.
12. Teman seperjuangan, Asnal El-Muzammil, One-ty, Ucuph Ats-tsiqoh, Dayshine, Onthel, Mbak Desi, Taimin, Qonit, Nadzir, Ujret, Ikho', Qori', Mama, Mbak Lisa, Andre, Choco, Memet, Munaz, Ellya, Widadiyah, Mbak Jazz dan teman-teman lainnya yang tidak bisa penulis sebutkan satu per satu. Terima kasih atas dukungan dan semangatnya serta atas pemberian informasi yang sangat berharga.
13. Teman-teman Jurusan Kimia dan semua jurusan yang ada di Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang yang banyak membantu, berbagi semangat dan dukungan.

Akhir kata, bagi mahasiswa-mahasiswi yang kami cintai, selamat belajar dan menikmati skripsi ini. Selalulah gembira dan antusias dalam belajar. Penulis pun terbuka untuk senantiasa menerima saran dan kritikan untuk perbaikan pembuatan karya selanjutnya.

Malang, Juli 2014

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN ORISINALITAS	ii
LEMBAR PERSETUJUAN	iii
LEMBAR PENGESAHAN	iv
HALAMAN PERSEMBAHAN	v
HALAMAN MOTTO	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xiii
DAFTAR TABEL	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xv
ABSTRAK	xvi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	7
1.3 Tujuan Penelitian	7
1.4 Batasan Masalah	8
1.5 Manfaat Penelitian	8
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Pemanfaatan Tanaman sebagai Obat dalam Islam.....	9
2.2 Tanaman Widuri (<i>Calotropis gigantea</i>).....	12
2.2.1 Morfologi Tanaman Widuri	12
2.2.2 Klasifikasi Umum Tanaman Widuri.....	13
2.3 Penyakit Malaria	13
2.4 Siklus Hidup Parasit Malaria.....	14
2.4.1 Siklus Aseksual	14
2.4.2 Siklus Seksual	15
2.5 <i>Plasmodium berghei</i>	16
2.6 Hewan Uji	18
2.7 Pemisahan Senyawa Aktif Akar Widuri	19
2.7.1 Ekstraksi Senyawa Aktif	19
2.8.2 Kromatografi Lapis Tipis.....	20
2.8 Metabolit Sekunder	21
2.8.1 Alkaloid	21
2.8.2 Flavonoid	24
2.8.3 Terpenoid	26
2.8.4 Saponin	27
2.8.5 Tanin	28
2.9 Analisis Probit	29

BAB III METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat	31
3.2 Alat dan Bahan	31
3.2.1 Alat	31
3.2.2 Bahan	31
3.3 Rancangan Penelitian	32
3.4 Tahapan Penelitian	33
3.5 Pelaksanaan Penelitian	33
3.5.1 Analisis Kadar Air Sampel Basah	33
3.5.2 Preparasi Sampel	34
3.5.3 Analisis Kadar Air Sampel Kering	35
3.5.4 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Metode Maserasi	36
3.5.5 Uji Antimalaria	36
3.5.5.1 Persiapan Hewan Uji	36
3.5.5.2 Perlakuan Hewan Coba	37
3.5.5.3 <i>Freezing</i> dan <i>Thawing</i> Isolat <i>P. berghei</i>	38
3.5.5.4 Pembuatan Donor	39
3.5.5.6 Inokulasi <i>P. berghei</i>	39
3.5.5.7 Pengukuran Derajat Parasitemia	40
3.5.6 Uji Fitokimia	41
3.5.6.1 Uji Flavonoid	41
3.5.6.2 Uji Alkaloid	41
3.5.6.3 Uji Terpenoid	41
3.5.6.4 Uji Tanin	42
3.5.6.5 Uji Saponin	42
3.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan KLT Analitik	42
3.7 Analisis Data	45

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Analisis Kadar Air dan Preparasi Sampel	46
4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif	49
4.3 Efektivitas Antimalaria Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri	52
4.4 Uji Fitokimia Golongan Senyawa Aktif dengan Reagen	69
4.4.1 Terpenoid	70
4.4.2 Saponin	70
4.5 Identifikasi Golongan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis	71
4.5.1 Terpenoid	73
4.5.2 Saponin	76
4.6 Pemanfaatan Tanaman Widuri dalam Perspektif Islam	79

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan	83
5.2 Saran	83

DAFTAR PUSTAKA	85
-----------------------------	----



DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1 Tanaman Widuri (<i>Calotropis gigantea</i>).....	13
Gambar 2.2 Siklus Hidup <i>Plasmodium</i>	16
Gambar 2.3 Mencit (<i>Mus musculus</i>)	18
Gambar 2.4 Contoh Struktur Senyawa Alkaloid	22
Gambar 2.5 Hasil KLT Senyawa Alkaloid pada Ekstrak Etil Asetat	23
Gambar 2.6 Struktur Inti Senyawa Flavonoid	24
Gambar 2.7 Struktur Isoprena	25
Gambar 2.8 Hasil KLT Senyawa Terpenoid	27
Gambar 2.9 Hasil KLT Senyawa Tanin pada Ekstrak Etil Asetat	29
Gambar 4.1 Gambaran Sel Darah Merah Mencit Kelompok Non Infeksi dengan Ekstrak Akar Dengan Dosis 10 Mg/Kg BB Pada Hari ke-0 sampai ke-4	60
Gambar 4.2 Gambaran Sel Darah Merah Mencit Kelompok Kontrol Positif dengan Ekstrak Akar Dengan Dosis 10 Mg/Kg BB Pada Hari ke-0 sampai ke-4	61
Gambar 4.3 Gambaran Sel Darah Merah Mencit Kelompok Kontrol Negatif dengan Ekstrak Akar Dengan Dosis 10 Mg/Kg BB Pada Hari ke-0 sampai ke-4	62
Gambar 4.4 Gambaran Sel Darah Merah Mencit Kelompok Widuri 1 dengan Ekstrak Akar Dengan Dosis 10 Mg/Kg BB Pada Hari ke-0 sampai ke-4	63
Gambar 4.5 Gambaran Sel Darah Merah Mencit Kelompok Widuri 2 dengan Ekstrak Akar Dengan Dosis 10 Mg/Kg BB Pada Hari ke-0 sampai ke-4	64
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	65
Gambar 4.7 Kurva Hubungan Antara log Dosis Dengan Probit % Penghambatan	67
Gambar 4.8 Reaksi Hidrolisis Saponin dalam Air	71
Gambar 4.9 Hasil KLT Golongan Senyawa Terpenoid Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri Dengan Eluen N-Heksana : Etil Asetat (2 : 8) Dengan Pereaksi Liebermann-Burchard	75
Gambar 4.10 Hasil KLT Golongan Senyawa Saponin Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri Dengan Eluen Kloroform : Aseton (4 : 1) Dengan Pereaksi H ₂ SO ₄ 0,1 M	78

DAFTAR TABEL

Tabel 2.1 Kandungan Metabolit Sekunder Tanaman Widuri	13
Tabel 4.1 Hasil Analisis Kadar Air Akar Widuri	48
Tabel 4.2 Rata-rata Derajat Parasitemia Serta Standar Deviasi Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri	58
Tabel 4.3 Persen Penghambatan Pertumbuhan Parasit Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri Pada Hari Ke-4	66
Tabel 4.4 Hasil Uji Fitokimia Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri	70
Tabel 4.5 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Golongan Senyawa Terpenoid	74
Tabel 4.6 Hasil KLT Senyawa Terpenoid Dengan Eluen N-Heksana:Etil Asetat (2 : 8)	75
Tabel 4.7 Hasil Kromatografi Lapis Tipis Golongan Senyawa Saponin	77
Tabel 4.8 Hasil KLT Senyawa Saponin Dengan Eluen Kloroform : Aseton (4 : 1)	78

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Diagram Alir	91
Lampiran 2 Skema Kerja	92
Lampiran 3 Preparasi Reagen	102
Lampiran 4 Perhitungan Pengambilan Parasit	110
Lampiran 5 Pembuatan Ekstrak Uji	112
Lampiran 6 Data dan Perhitungan	116
Lampiran 7 Nilai Transformasi Probit	130
Lampiran 8 Dokumentasi	133



ABSTRAK

Fiisyatirodiyah. 2014. **Efektivitas Antimalaria dan Identifikasi Golongan Senyawa Aktif Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri (*Calotropis gigantea*) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei***. Skripsi. Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pembimbing I: Elok Kamilah Hayati, M.Si; Pembimbing II: Dr. H. Munirul Abidin, M.Ag; Konsultan: Roihatul Muti'ah, M.Kes, Apt.

Kata Kunci: Akar Widuri (*Calotropis gigantea*), antimalaria, fitokimia, Kromatografi Lapis Tipis

Tanaman Widuri mengandung beberapa golongan senyawa aktif, diantaranya flavonoid, alkaloid, terpenoid dan steroid. Senyawa-senyawa tersebut telah terbukti bermanfaat sebagai antimalaria. Selain itu, daun *Calotropis procera* berpotensi antimalaria, sehingga diduga akar *Calotropis gigantea* juga berpotensi sebagai antimalaria karena mempunyai kekerabatan dalam satu genus. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80 % akar Widuri (*Calotropis gigantea*) pada mencit terinfeksi *Plasmodium berghei* dan identifikasi golongan senyawa aktifnya.

Tahapan penelitian ini meliputi analisis kadar air sampel basah, preparasi sampel, analisis kadar air sampel kering, kemudian ekstraksi senyawa aktif dengan maserasi. Setelah itu, dilakukan uji antimalaria dan dilanjutkan dengan uji fitokimia. Senyawa aktif yang positif terhadap uji fitokimia diidentifikasi dengan metode Kromatografi Lapis Tipis.

Hasil kadar air sampel basah sebesar 51,17 %, sedangkan kadar air sampel keringnya sebesar 4,96 %. Isolasi senyawa aktif dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 80 %. Efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80 % akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit adalah sangat baik dengan nilai ED_{50} sebesar 4,26 mg/Kg BB. Golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol 80 % akar Widuri (*Calotropis gigantea*) berdasarkan uji reagen adalah golongan senyawa terpenoid dan saponin. Hasil identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis menunjukkan bahwa eluen terbaik untuk golongan senyawa terpenoid adalah n-heksana : etil asetat (2 : 8) yang menghasilkan penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm dengan pereaksi Lieberman-Burchard, sedangkan eluen terbaik untuk saponin adalah kloroform : aseton (4 : 1) dengan penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm dengan pereaksi H_2SO_4 0,1 M.

ABSTRACT

Fiisyatirodiyah, 2014. ***Calotropis gigantea* Root Extract as an Antimalarial Agent Against *Plasmodium berghei* and Identification of Active Compounds.** Theses. Chemistry Programme Faculty of Science and Technology The State of Islamic University Maulana Malik Ibrahim Malang. Promotor I: Elok Kamilah Hayati, M. Si; Promotor II: Dr. H. MunirulAbidin, M.Ag; Consultant: RoihatulMuti'ah, M.Kes, Apt.

Keywords: *Calotropis gigantea*, antimalarial, phytochemical, Thin Layer Chromatography

Calotropis gigantea contain of bioactive compounds as antimalarial, such as flavonoids, alkaloids, terpenoids and steroids. In addition *Calotropis procera* radix is one of plant which has antimalarial activity, so *Calotropis gigantea* also has potential as an antimalarial because of similarity in one genus. The purpose of these research is to know antimalarial activity of *Calotropis gigantea* root extract against *Plasmodium berghei* and and to know the active compounds that contained from ethanol extract of *Calotropis gigantea* root with reagent test and TLC (Thin Layer Chromatography).

The research consist of water analysis of wet sample, sample preparation, water analysis of dried sample, then extraction that was performed by maseration with 80% ethanol solvent. After that, extract was *in vivo* antimalarial tested to animal model. Identification of active compounds with reagent test and Thin Layer Chromatography method.

The result of water analysis wet sample was 51.17 %, while the water analysis of dried sample was 4.96 %. Isolation of active compounds is done by maseration method with 80 % ethanol solvent. Antimalarial activity of ethanol extract *Calotrpis gigantea* root against *Plasmodium berghei* is very well with ED50 value of 4.26 mg/Kg BW. The phytochemical compounds in 80% ethanol solvent extract are terpenoids and saponins. It is also supported by the results using the TLC separation. The results showed that the best eluent for terpenoid compounds were n-hexane: ethylacetate (2:8) that produce of a purple color at a wavelength of 366 nm with Lieberman-Burchard reagent, while the eluent for saponin were chloroform: acetone (4:1) that produce a purple color at a wavelength of 366 nm with 0.1 M H₂SO₄ reagent.

الملخص

في عيشة راضية، ٢٠١٤. فعالية للمضادة الملاريا وتحديد فئة من المركبات النشطة استخراج الإيتانول ٨٠ % من جذور الشوك في الفئران اصابه بلسموديوم بركي.

القسم الكيمياء. الكلية العلمية و التكنولوجيا. الجامعة الحكيمة الإسلامية مولانا مالك إبراهيم مالانج. مشريف
١: الوك كاملة حياة الماجستير. ٢: دكتور منير العبدین الماجستير. مستشارة: رايحة المطعة.

لكلمات: جذور الشوك، المضادة الملاريا، فيتوكميا، كروماتوكرافي ليس تيبس

الشوك هو احد من النبات تحتوي مركبات النشطة وهي فلافونويد، وتيرفينويد، و ستيرويد. طبقت مركبات النشطة ان تنفع للمضادة ملاريا. وكذلك، الوراقه من كالتروفيس فروجيرا ان تستطيع للمضادة ملاريا، حتى ان تنفع جذوك منها للمضادة ملاريا ايضا، لانها تملك في جنوس واحد. واما مقاصد هذه البحوث يعنى ليعرف فعالية للمضادة الملاريا باستخراج الإيتانول ٨٠ % من جذور الشوك في منع النمو بلسموديوم بركي، وتحديد فئة من المركبات النشطة فيها.

تتضمن المراحل البحوث يعنى تحليل قدر الماء ساميل رطيب، وريسباراسي ساميل، وتحليل قدر الماء في ساميل جفاف، ثم استخراج المركبات النشطة بماسراسي باستخدام مذيب الإيتانول ٨٠ %. ثم يقوم اختبار علي المضادات الملاريا و بيتوكيميا. واما المركبات النشطة الإيجابية علي اختبار بيتوكيميا يحدد فيه من المركبات النشطة بطريقة كروماتوكرافي ليس تيبس.

وكانت نتائج من قدر الماء من العينة الرطبة هي حوالي ١٧,١٧%. واما قدر الماء من العينة الجفاف حوالي ٤,٩٦%. ويتم عزالة إيسولاسي مركبات النشطة باستخدام طريقة ماسيراسي بالمذيبات الإيتانول ٨٠ %. وكان فعالية للمضادة الملاريا باستخراج ايتانول ٨٠ % من جذور الشوك على تمنع النمو بلسموديوم بركي في الفئران ب - إن فيفو هو جيد جدا، مع قيمة ED ٥. كمثل ٤,٢٦ mg/kg BB. كانت فئة من المركبات النشطة الواردة في استخراج الإيتانول ٨٠ % من جذور الشوك على اساس النتائج في تحديد باستخدام اختبار ريباكن هو فئة من المركبات ترفنويد و سفونين. اما كانت نتائج كروماتوكرافي ليس تيبس التحليلي يدل على أفضل ألونين في فئة من المركبات ترفنويد التفصيلي هو آتيل اسيتات (٢:٨). واما أفضل ألونين في سفونين هو كلوروفم اسيطون (٤:١).

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Berkembangnya ilmu pengetahuan dan teknologi berimbas pula pada berkembangnya pola hidup dan pola pikir masyarakat. Pola hidup yang tidak teratur dan lingkungan yang tidak sehat memiliki potensi timbulnya berbagai macam penyakit. Pada kondisi tersebut, manusia mulai berfikir untuk mencari metode penyembuhan baik melalui obat-obatan ataupun merubah pola hidup menjadi lebih baik.

Salah satu penyakit yang sering muncul di tengah-tengah masyarakat adalah penyakit malaria. Malaria adalah penyakit infeksi yang paling luas penyebarannya di dunia dan diperkirakan 1/3 penduduk di dunia terkena penyakit infeksi. Malaria sampai saat ini masih merupakan masalah kesehatan dunia, khususnya di daerah tropis seperti di Indonesia. Pada tahun 1997 sebanyak 93.7 juta penduduk Indonesia terancam terkena penyakit malaria (WHO, 2001). Penyebab penyakit ini adalah parasit *Plasmodium* yang termasuk protozoa (protista mirip hewan). *Plasmodium* merupakan golongan sporozoa yang membutuhkan vektor berupa nyamuk *Anopheles*. Ada empat spesies *Plasmodium*, yaitu *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium falciparum* dan *Plasmodium malariae* (Widjajanti, 1988).

Penyebaran malaria cukup luas di banyak Negara termasuk Indonesia karena angka kematian yang masih tinggi (Widoyono, 2010). Pada periode 20 tahun terakhir infeksi malaria meningkat dua kali lipat. Kejadian Luar Biasa

(KLB) di Indonesia terjadi pada tahun 1998 dengan jumlah penderita 17.076, sedangkan pada KLB 2004 di Sukabumi (Jawa Barat) dan Kepulauan Karimun Riau terdapat 909 penderita. Pada bulan Juni 2005 terdapat 5000 penduduk terserang malaria di Kabupaten Pangkal Pinang (Aryanti, dkk., 2006).

Salah satu faktor utama penyebab peningkatan infeksi tersebut adalah timbulnya strain resisten terhadap obat malaria yang tersedia. Permasalahan resistensi terhadap obat malaria semakin lama semakin bertambah. Di wilayah Amazon dan Asia Tenggara telah ditemukan bahwa *Plasmodium falciparum* telah resisten terhadap klorokuin. *Plasmodium vivax* juga ditemukan telah resisten klorokuin di wilayah Papua Nugini, Papua Barat dan Sumatera (Widoyono, 2010). Selain itu, tanaman Kina yang diketahui efektif dalam mengobati penyakit malaria juga menjadi resisten, sehingga perlu juga dicari alternatif obat malaria baru yang efektif, aman dan mudah diperoleh terutama yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. WHO pada tahun 2008 mencatat 68 % penduduk dunia masih menggantungkan sistem pengobatan yang melibatkan tumbuhan untuk menyembuhkan penyakit dan lebih dari 80 % penduduk dunia menggunakan obat herbal untuk mendukung kesehatan mereka (Saifudin, dkk., 2011).

Indonesia mendapat julukan sebagai *megabiodiversity*, yang berarti memiliki tingkat keanekaragaman hayati yang luar biasa. Indonesia merupakan salah satu Negara dengan kekayaan hayati terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi. Hingga saat ini, tercatat 7000 spesies tanaman telah diketahui khasiatnya (Saifudin, dkk., 2011).

Allah telah memberikan petunjuk melalui firman-Nya dalam surah Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۗ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوَاسِيَ أَن تَمِيدَ بِكُمْ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ ۗ وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (Q.S. Luqman: 10).

Allah memberikan petunjuk-Nya bahwa segala macam yang telah diciptakan merupakan nikmat dan karunia-Nya yang sangat baik dan tidaklah sia-sia. Semuanya patut untuk dieksplorasi dan dimanfaatkan dengan baik demi kebaikan hidup manusia di masa sekarang dan yang akan datang. Dengan ilmu pengetahuan, maka manusia dapat memanfaatkan potensi alam tersebut, salah satunya sebagai obat untuk berbagai macam penyakit.

Pemanfaatan tumbuhan sebagai obat tradisional diharapkan dapat menjadi salah satu alternatif dalam mengatasi penyakit malaria. Pada penelitian ini akan diuji efektivitas antimalaria dari tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*). Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) diketahui memiliki beberapa khasiat, diantaranya kulit akarnya berkhasiat melancarkan aliran empedu (kolagola), dapat memacu kerja enzim pencernaan dan peluruh kencing (diuretik), dapat digunakan untuk pengobatan demam, kaki pegal dan lemas, mengobati gigitan ular beracun, borok kronis, dan penyakit kulit lainnya (Utami, 2008).

Dewasa ini, tanaman Widuri masih belum dimanfaatkan secara maksimal oleh masyarakat. Selain itu, Widuri (*Calotropis gigantea*) yang merupakan famili *Asclepidaceae* ini tergolong tanaman liar, sehingga perlu adanya peningkatan nilai guna yang lebih tinggi.

Uji fitokimia pada akar Widuri (*Calotropis gigantea*) mengandung alkaloid, karbohidrat, glikosida, senyawa fenolik/tanin, flavonoid, saponin, sterol, protein dan asam amino dan senyawa-senyawa asam serta resin (Kumar *et al.*, 2013). Penelitian yang dilakukan Ravi *et al.* (2011), menunjukkan aktivitas sitotoksik dari ekstrak etanol akar *Calotropis gigantea* dengan konsentrasi yang berbeda menggunakan metode BSLT diperoleh nilai LC₅₀ sebesar 62,12 µg/mL.

Ekstrak etanol 95 % akar *Calotropis procera* mengandung senyawa alkaloid, steroid dan glikosida (Mainasara *et al.*, 2012). Selain itu, terdapat aktivitas antimalaria secara *in vitro* pada ekstrak daun *Calotropis procera* menggunakan variasi pelarut etanol, n-heksana, kloroform, metanol, etil asetat dan air. Pada penelitian tersebut menunjukkan adanya penurunan aktivitas plasmodia seiring bertambahnya konsentrasi ekstrak daun *Calotropis procera* (Mudi dan Bukar, 2011).

Calotropis gigantea dan *Calotropis procera* merupakan dua jenis tumbuhan yang berbeda spesies saja. Jika *Calotropis procera* berpotensi sebagai antimalaria, maka dimungkinkan juga bahwa *Calotropis gigantea* memiliki aktivitas yang sama. Hal ini didasarkan kekerabatannya dalam satu genus, maka tumbuhan tersebut dimungkinkan memiliki kandungan kimia yang relatif sama

serta memiliki aktifitas yang mirip. Oleh karena itu perlu dilakukan kajian lebih lanjut untuk membuktikan aktifitas farmakologinya (Marianne, dkk., 2011).

Beberapa senyawa metabolit sekunder telah terbukti bermanfaat sebagai antimalaria, beberapa diantaranya adalah alkaloid, sesquiterpen, triterpenoid dan flavonoid. Senyawa aktif tanin, alkaloid dan steroid menunjukkan bahwa pada ekstrak etil asetat tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada dosis 0,01 mg/g BB sebesar 87,19 %; pada dosis 0,1 mg/g BB sebesar 84,9 %; dan pada dosis 1 mg/g BB sebesar 90,74 % (Hayati, dkk. 2012). Penelitian Kusuma (2011) juga menunjukkan bahwa senyawa aktif alkaloid, flavonoid, triterpenoid dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada ekstrak etanol akar Kayu Kuning (*Cosciniium fenestratum*) pada dosis 3,75 mg/25 gr BB mencit/hari yang diberikan selama 3 hari dapat menghambat pertumbuhan parasitemia sampai 5,281 % pada hari ke-7 setelah pemberian ekstrak. Muti'ah, dkk. (2012) mengidentifikasi senyawa sesquiterpen sebagai antimalaria. Ekstrak diklorometan daun bunga matahari secara *in vivo* dapat membunuh parasit *Plasmodium berghei* pada dosis 0,05 mg/g BB, dosis 0,5 mg/g BB, dosis 5 mg/g BB.

Pada penelitian ini digunakan pelarut etanol dengan konsentrasi 80 %. Pada umumnya metabolit sekunder di alam dalam bentuk glikosida yang cenderung polar, sehingga digunakan pelarut etanol yang polar untuk mengekstraksinya dan diperoleh ekstrak pekat yang maksimal. Etanol juga lebih aman digunakan, tidak beracun dan tidak berbahaya jika dibandingkan pelarut polar lain seperti metanol.

Penggunaan pelarut etanol 80 % merujuk pada penelitian Muti'ah (2010) menggunakan pelarut etanol 80 % dengan sampel batang Talikuning (*Anamirta cocculus*) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* dengan menunjukkan nilai ED₅₀ sebesar 0,043 mg/g BB mencit yang setara dengan 4,7 mg/Kg BB manusia. Hal ini diduga karena ekstrak batang Talikuning mengandung senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan parasit tersebut. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak talikuning adalah alkaloid kuartener (*berberine, palmatine, magnoflorine* dan *columbamine*). Penelitian Ranggaditya (2010) juga menggunakan pelarut etanol 80 %. Diperoleh informasi bahwa ekstrak etanol 80 % daun dan kulit batang tanaman Sukun dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada dosis 100; 10; 1 dan 0,1 mg/Kg BB masing-masing sebesar 82,26% 36,72 %, 51,54 %, 63,18 %.

Etanol 80 % tersusun atas komponen air dan etanol. Tiap-tiap komponen tersebut memiliki peran tersendiri dalam mengekstrak senyawaan metabolit baik primer maupun sekunder yang terkandung dalam akar Widuri. Menurut Sukandar *et al.*, (2011), secara farmakoterapi mengatakan bahwa pembuatan obat herbal secara umum menggunakan pelarut etanol dengan konsentrasi 70 – 80 %. Pernyataan di atas menjadi alasan utama dari penggunaan pelarut etanol 80 % dalam penelitian ini.

Penelitian ini difokuskan pada akar Widuri (*Calotropis gigantea*). Akar berpengaruh terhadap serapan unsur hara dalam tanah dan berfungsi sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan, misalnya karbohidrat (Agustina, 2004), sehingga akar merupakan bagian penting dari tanaman yang mempengaruhi proses

pertumbuhan. Oleh sebab itu, dimungkinkan banyak sekali senyawa aktif di dalamnya sebagai akibat dari pusat aktifitas hidup tumbuhan. Selain itu, belum banyak eksplorasi yang dilakukan terhadap akar tanamannya.

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan kontribusi di bidang pengobatan herbal dan digunakan sebagai alternatif pengobatan malaria yang mudah, murah, aman dan efektif.

1.2. Rumusan Masalah

Rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

1. Bagaimana efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80 % akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit secara *in vivo*?
2. Golongan senyawa aktif apa saja yang terkandung dalam ekstrak etanol 80 % akar Widuri (*Calotropis gigantea*) berdasarkan hasil identifikasi menggunakan uji reagen yang diperkuat dengan Kromatografi Lapis Tipis?

1.3. Tujuan

Tujuan pada penelitian ini adalah:

1. Untuk mengetahui efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80 % akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit secara *in vivo*.
2. Untuk mengetahui golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol 80 % akar Widuri (*Calotropis gigantea*) berdasarkan hasil

identifikasi menggunakan uji reagen yang diperkuat dengan Kromatografi Lapis Tipis.

1.4. Batasan Masalah

Batasan masalah pada penelitian ini antara lain:

1. Sampel akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) diambil di sekitar wilayah Pasuruan.
2. Ekstraksi senyawa aktifnya menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 80 %.
3. Hewan uji yang digunakan adalah mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C umur 8 – 12 minggu, berat badan 15 – 20 g yang diinfeksi *Plasmodium berghei*.

1.5. Manfaat

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi baru bagi masyarakat bahwa akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) memiliki potensi sebagai antimalaria, sehingga dapat dimanfaatkan oleh masyarakat secara mudah, murah dan efektif.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Pemanfaatan Tanaman sebagai Obat dalam Perspektif Islam

Indonesia memiliki tingkat keanekaragaman hayati yang luar biasa. Indonesia merupakan salah satu Negara dengan kekayaan hayati terbesar di dunia yang memiliki lebih dari 30.000 spesies tumbuhan tingkat tinggi (Saifudin, dkk., 2011). Allah SWT. menurunkan air hujan dari langit agar tanaman tumbuh dengan subur, sehingga memberikan banyak manfaat dalam kehidupan makhluk hidup. Hal ini telah dijelaskan oleh Allah SWT. dalam surah Luqman ayat 10:

خَلَقَ السَّمَوَاتِ بِغَيْرِ عَمَدٍ تَرَوْنَهَا ۚ وَأَلْقَىٰ فِي الْأَرْضِ رَوْسِيًّا أَن تَمِيدَ بِكُمْ ۖ وَبَثَّ فِيهَا مِن كُلِّ دَابَّةٍ
 وَأَنْزَلْنَا مِنَ السَّمَاءِ مَاءً فَأَنْبَتْنَا فِيهَا مِن كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿١٠﴾

Artinya: “Dia menciptakan langit tanpa tiang yang kamu melihatnya dan dia meletakkan gunung-gunung (di permukaan) bumi supaya bumi itu tidak menggoyangkan kamu; dan memperkembang biakkan padanya segala macam jenis binatang. dan kami turunkan air hujan dari langit, lalu kami tumbuhkan padanya segala macam tumbuh-tumbuhan yang baik” (Q.S. Luqman: 10).

Berbagai tanaman tumbuh dengan adanya air hujan yang mengalir ke tanah yang gersang. Kemudian, tanah tersebut menjadi subur dan menyebabkan tanaman tersebut menjadi tanaman yang baik yaitu tanaman yang memiliki nilai manfaat yang sangat besar. Allah menumbuhkan berbagai jenis tumbuh-tumbuhan dengan berbagai macam bentuk, ciri morfologi, dan warna tumbuhannya. Ini merupakan salah satu bukti kekuasaan Allah Yang Maha Kuasa. Mulai dari akar, batang, daun dan buahnya bisa dimanfaatkan secara maksimal (Shihab, 2005). Hanya kaum yang memikirkan dan beriman mampu memahami semua itu.

Al Quran juga memberikan isyarat agar memperhatikan dan mempelajari bagaimana tumbuhan itu diciptakan untuk digunakan oleh manusia dengan sebaik-baiknya. Sebagaimana dalam firman Allah surah asy Syu'araa' ayat 7:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

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

Pemanfaatan tumbuh-tumbuhan sebagai obat memiliki sejarah yang cukup panjang. Penggunaan tanaman sebagai obat sudah dilakukan sejak 5000 tahun yang lalu. Pemanfaatan obat dari tanaman diduga dimulai dari penemuan tidak sengaja manusia ketika mencari bahan pangan. Sifat racun tanaman yang ditemui pada akhirnya dapat digunakan dalam proses pengobatan (Raharjo, 2013).

Umat Islam dianjurkan untuk berobat jika sedang sakit, sebagaimana yang telah dicontohkan oleh Rasul. Nabi Muhammad SAW. pernah berobat untuk dirinya sendiri, serta menyuruh keluarga dan sahabatnya yang sakit agar berobat. Hadits Nabi SAW yang diriwayatkan oleh Abu Hurairah (Al Jauziyah, 2002):

عَنْ أَبِي هُرَيْرَةَ رَضِيَ اللَّهُ عَنْهُ عَنِ النَّبِيِّ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ قَالَ مَا أَنْزَلَ اللَّهُ مِنْ دَاءٍ إِلَّا أَنْزَلَ لَهُ شِفَاءً

[رواه البخار]

Artinya: “Diriwayatkan dari Abu Hurairah R.A, dari Nabi Muhammad SAW, bahwasanya beliau bersabda: Allah tidak menurunkan penyakit melainkan menurunkan obat yang menyembuhkannya.” (H.R Bukhari)

Imam Muslim dalam kitab Shahihnya meriwayatkan bahwa Rasulullah SAW. bersabda (Muhammad, 2007):

عَنْ جَابِرٍ عَنْ رَسُولِ اللَّهِ صَلَّى اللَّهُ عَلَيْهِ وَسَلَّمَ أَنَّهُ قَالَ لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ فَإِذَا أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ 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”.

Kedua hadits tersebut menunjukkan bahwa betapa Adilnya Allah SWT. Berbagai jenis penyakit ditimpakan kepada manusia, dan diciptakan pula penawar obatnya. Ada beberapa 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). Pada zaman Rasulullah SAW. telah berkembang metode pengobatan dengan menggunakan obat-obatan herbal, yakni dengan memanfaatkan tumbuh-tumbuhan. Diriwayatkan dari Abu Hurairah bahwa Rasulullah SAW. bersabda:

فِي الْحَبَّةِ السَّوْدَاءِ شِفَاءٌ مِنْ كُلِّ دَاءٍ إِلَّا السَّامَ

Artinya: “Dalam habbah sauda terdapat obat bagi setiap penyakit, kecuali kematian”.

Kaum muslimin meyakini kebenaran sabda Rasul, sehingga mereka pun meyakini bahwa kata *syifa* dalam hadits tersebut bermakna umum, yakni obat penyembuh bagi segala penyakit (Al Najjar, 2010).

Khasiat Habbah Sauda telah dikenal sejak zaman dahulu oleh bangsa Mesir Kuno, Arab dan Persia. Habbah sudah sangat bermanfaat untuk mengobati berbagai penyakit, seperti penyakit saluran pernapasan, asma, hipertensi dan gangguan saluran pencernaan serta penyakit yang diakibatkan oleh virus seperti liver dan hepatitis dan sebagainya (Al Najjar, 2010).

Penggunaan bahan alam sebagai obat herbal lebih aman dibandingkan penggunaan obat kimia yang berbahaya bila dikonsumsi secara terus-menerus. Penggunaan obat-obatan herbal tidak memiliki efek samping karena dibuat dari tumbuhan. Sebagaimana telah disebutkan sebelumnya, bahwa tumbuhan merupakan ciptaan Allah yang baik.

2.2. Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*)

2.2.1 Morfologi Tanaman Widuri

Tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) merupakan semak tegak dengan tinggi 0,5 – 3 m. Batangnya berbentuk bulat, kulit tebal dan beranting. Memiliki ranting muda yang berambut tebal, berwarna putih. Tumbuhan ini mempunyai daun tunggal, berbentuk bulat telur atau bulat panjang, bertangkai pendek, tumbuh berhadapan, ujung tumpul, pangkal berbentuk jantung, tepi rata, pertulangan menyirip, panjang 8 – 30 cm, lebarnya 4 – 15 cm, dan berwarna hijau muda, sedangkan permukaan atas daun muda berambut rapat dan berwarna putih (lambat laun menghilang), sedangkan permukaan bawahnya tetap berambut tebal dan berwarna putih (Utami, 2008).

Struktur bunganya majemuk, tumbuh di ujung atau ketiak daun, tangkai bunga berambut rapat, mahkota berbentuk kemudi kapal, dan berwarna putih.

Tanaman Widuri berbiji kecil, berbentuk lonjong, pipih, berwarna cokelat, berambut pendek dan tebal, serta berambut serupa sutera panjang. Jika salah satu bagian tumbuhan dilukai, akan mengeluarkan getah berwarna putih, encer, rasanya pahit dan kelat, tapi lama-kelamaan terasa manis, baunya sangat menyengat, serta beracun (Utami, 2008).

2.2.2 Klasifikasi Umum Tanaman Widuri

Klasifikasi *Calotropis gigantea* adalah sebagai berikut (Kumar *et al.*, 2013):

Kingdom	: Plantae (Tumbuhan)
Golongan	: Gentianales
Famili	: <i>Asclepiadeceae</i>
Sub Kelas	: <i>Asclepiodoideae</i>
Genus	: <i>Calotropis</i>
Spesies	: <i>gigantea</i>



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

2.3. Penyakit Malaria

Perkataan malaria berasal dari bahasa Italia (*mal* = buruk, *area* = udara), jadi secara bahasa penyakit malaria diartikan sebagai penyakit yang disebabkan oleh udara yang buruk akibat lingkungan yang buruk. Namun, secara istilah penyakit malaria merupakan penyakit infeksi yang disebabkan oleh parasit

Plasmodium (termasuk protozoa) yang ditularkan oleh vektor nyamuk *Anopheles* betina (Zulkoni, 2010).

Malaria sudah dikenal sejak 3000 tahun yang lalu. Hippocrates (400 – 377 SM) telah membedakan jenis-jenis malaria, sedangkan Alphonse Laveran (1880) menemukan *Plasmodium* sebagai penyebab penyakit malaria dan Ross (1897) menemukan nyamuk *Anopheles* sebagai perantaranya (Widoyono, 2001).

Penyakit malaria banyak berkembang di daerah beriklim tropis seperti Indonesia karena erat kaitannya dengan berkembangnya jentik-jentik nyamuk *Anopheles*. Malaria berkembang dengan adanya interaksi seseorang yang sehat dengan penderita, sedangkan infeksi *Plasmodium* pada seseorang dapat diakibatkan oleh adanya gigitan nyamuk *Anopheles*, transfuse darah dari donor penderita dan penggunaan jarum suntik bekas yang terkontaminasi (Zulkoni, 2010).

2.4. Siklus Hidup Parasit Malaria

Dalam siklus hidupnya, plasmodium mengalami dua siklus. Siklus aseksual yang berlangsung pada manusia disebut skizogoni dan siklus seksual yang membentuk sporozoit di dalam nyamuk disebut sporogoni (Widoyono, 2010).

2.4.1. Siklus Seksual

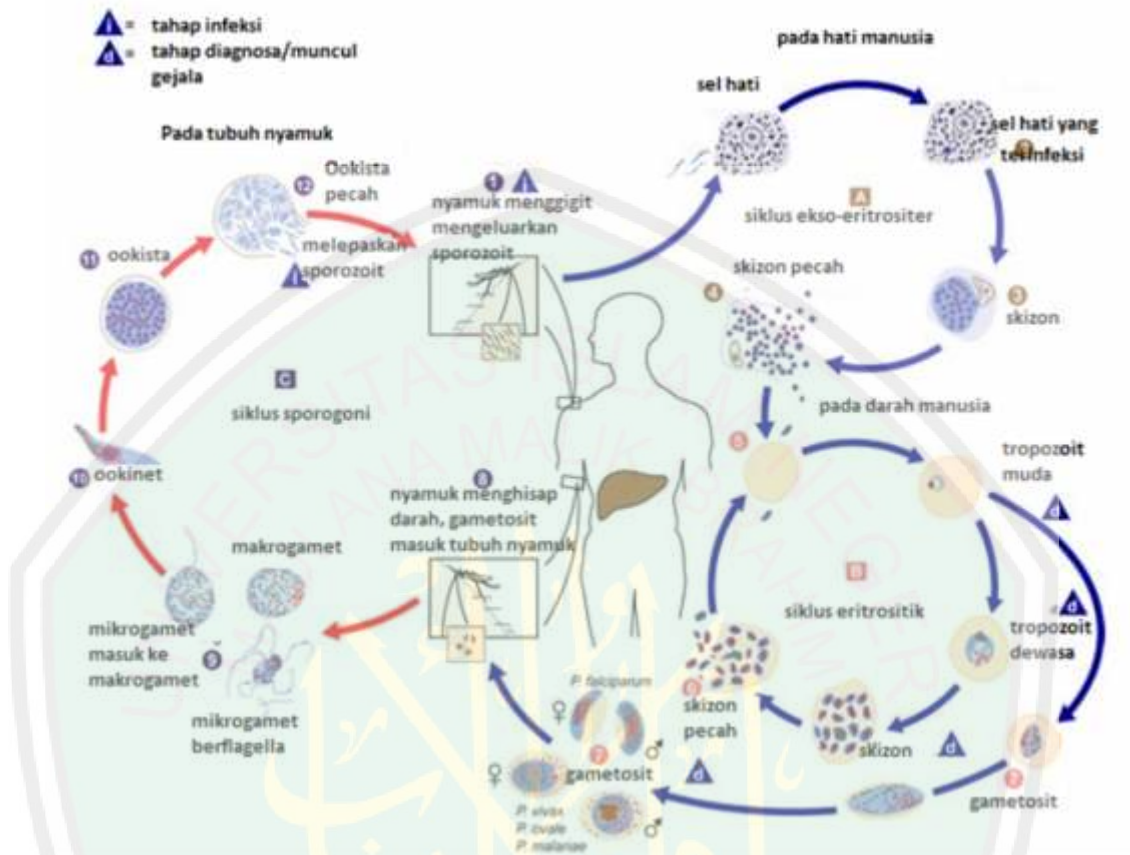
Siklus seksual terjadi dalam tubuh nyamuk. Siklus sporogoni dimulai dengan bersatunya gamet jantan dan betina untuk membentuk ookinet dalam perut nyamuk. Ookinet menembus dinding lambung untuk membentuk ookista di selaput luar lambung nyamuk. Ookista akan membentuk ribuan sporozoit yang terlepas dan akan tersebar ke seluruh organ nyamuk termasuk kelenjar ludahnya.

Pada kelenjar ludah, sporozoit menjadi matang dan akan ditularkan pada manusia yang tergigit nyamuk.

2.4.2. Siklus Aseksual

Sporozoit infeksius dari kelenjar ludah nyamuk *Anopheles* betina masuk dalam darah manusia melalui tusukan nyamuk tersebut. Sporozoit akan memasuki sel-sel parenkim hati dan dimulainya stadium eksoeritrositik. Di dalam sel hati, sporozoit matang tumbuh menjadi skizon yang akan pecah dan berkembang menjadi merozoit. Sel hati yang mengandung parasit pecah dan merozoit memasuki aliran darah dan menginfeksi eritrosit untuk memulai stadium eritrositik. Oleh karena prosesnya terjadi sebelum memasuki eritrosit maka disebut stadium pre-eritrositik (Widoyono, 2010).

Siklus eritrositik dimulai ketika merozoit menerobos masuk sel-sel darah merah. Merozoit akan mengalami perubahan morfologi, yaitu merozoit → bentuk cincin → trophozoit → merozoit. Merozoit-merozoit tersebut ada yang berubah menjadi gametosit untuk memulai kembali siklus seksual menjadi mikrogamet (jantan) dan makrogamet (betina). Eritrosit yang pecah akan menimbulkan gejala penyakit pada tubuh manusia. Jika ada nyamuk yang menggigit manusia yang telah terinfeksi, maka gametosit yang ada pada darah manusia akan terhisap oleh nyamuk. Dengan demikian, siklus seksual pada nyamuk akan dimulai kembali, dan begitulah seterusnya penularan malaria (Widoyono, 2010). Siklus hidup *Plasmodium* ditunjukkan pada gambar 2.2.



Gambar 2.2 Siklus hidup *Plasmodium* (Widoyono, 2010)

2.5. *Plasmodium berghei*

Taksonomi *Plasmodium berghei* adalah sebagai berikut (Baeti, 2010):

Regnum	: Animalia
Subregnum	: Protozoa
Filum	: Sporozoa
Kelas	: Sporozoea
Sub Kelas	: Coccidea
Super Ordo	: Eucoccidea
Ordo	: Haemosporida
Famili	: Haemosporidae
Genus	: Plasmodium
Spesies	: <i>Plasmodium berghei</i>

Plasmodium berghei adalah hemoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia, terutama rodensia kecil. Dasar biologi *Plasmodium* yang

menyerang rodensia sama dengan *Plasmodium* yang menyerang manusia seperti siklus hidup maupun morfologinya, genetik dan pengaturan genomnya, fungsi dan struktur pada kandidat vaksin antigen target sama. Oleh karena itu, *Plasmodium berghei* digunakan sebagai model penelitian untuk mencari dan mengembangkan obat malaria baru (Suryawati dan Suprapti, 2007).

Parasit *Plasmodium berghei* pada hewan rodensia dibuktikan analog dengan parasit malaria pada manusia terutama dalam hal struktur, fisiologis dan siklus hidup. Alasan penggunaan *Plasmodium berghei* sebagai model penelitian dikarenakan, yaitu (Suryawati dan Suprapti, 2007):

- a. Dasar biologis parasit pada manusia dan rodensia mempunyai kesamaan.
- b. Terdapat analogi dari organisasi genom dan genetika antara parasit pada manusia dan pada hewan pengerat.
- c. Terdapat kesamaan karakteristik antara parasit pada manusia dan parasit pada hewan pengerat dalam hal molekuler terhadap sensitivitas dan resistensi obat.
- d. Struktur dan fungsi antigen sebagai target vaksin yang tetap.
- e. Manipulasi terhadap siklus hidup secara keseluruhan lebih mudah dan aman termasuk sejak dimulainya infeksi oleh gigitan nyamuk.
- f. Proses penyusunan gen dan proses biokimiawi antar parasit rodensia dan manusia yang tidak banyak mengalami perubahan.
- g. Modifikasi genetik yang telah tersedia.
- h. Memungkinnya pengamatan terhadap interaksi parasit-inang baik secara *in vivo* dan *in vitro*.

Pada pemeriksaan preparat darah, baik hapusan darah tebal dan tipis banyak dijumpai parasit muda berbentuk cincin (ring form). Pada sedian darah tebal, sporozoit berbentuk cincin, gametosit berbentuk pisang, dan bentuk cincin banyak dijumpai disisi luar gametosit. Pada sediaan hapusan darah tipis tropozoit muda berbentuk tanda seru atau koma dan cincin terbuka, gametosit berbentuk pisang dan terdapat bintik Murer pada sel darah merah (Suryawati dan Suprapti, 2007).

2.6. Hewan Uji

Taksonomi mencit adalah sebagai berikut (Coutrier, 2008):

Kingdom	: Animalia
Filum	: Chordata
Kelas	: Mammalia
Ordo	: Rodentia
Sub Ordo	: Myomorpha
Famili	: Muridae
Subfamili	: Muridane
Genus	: Mus
Spesies	: <i>Mus musculus</i>



Gambar 2.3 Mencit (*Mus musculus*)

Sundari, dkk. (1997) menyatakan beberapa keunggulan hewan pengerat (mencit) dapat dijadikan model penelitian malaria adalah:

1. Pada mencit yang diinfeksi malaria diperoleh derajat parasitemia yang lebih tinggi daripada binatang tikus dan hamster.
2. Cara pemeliharaannya lebih mudah.

Dari penelitian terdahulu didapatkan data bahwa mencit dengan bermacam-macam jenis strain memiliki spesifikasi respon tertentu terhadap macam-macam jenis penelitian. Pada mencit Balb/C lebih rentan terhadap infeksi *Plasmodium berghei* dan memiliki kemampuan bertahan hidup, sehingga untuk mempelajari malaria cerebral dari parasit *Plasmodium berghei* menggunakan mencit Balb/C adalah yang paling sesuai.

2.7. Pemisahan Senyawa Aktif Akar Widuri

2.7.1. Ekstraksi Senyawa Aktif

Ekstraksi adalah proses pemisahan, penarikan atau pengeluaran campuran komponen. Salah satu metode ekstraksi bahan alam yang dikenal adalah maserasi. Maserasi merupakan metode pemisahan senyawa dengan cara perendaman menggunakan pelarut tertentu pada suhu ruang. Keuntungan cara ekstraksi ini adalah cara pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Sedangkan kerugiannya adalah waktu pengerjaannya yang cukup lama.

Maserasi merupakan cara ekstraksi yang paling sederhana. Bahan simplisia yang dihaluskan sesuai dengan syarat farmakope (umunya terpotong-potong atau berupa serbuk kasar) disatukan dengan bahan pengestraksi. Selanjutnya, rendaman tersebut disimpan agar terlindungi dari cahaya langsung (mencegah reaksi yang dikatalis cahaya atau perubahan warna) dan dikocok kembali. Waktu

lamanya maserasi berbeda-beda antara 4 – 10 hari. Semakin besar perbandingan cairan pengestraksi terhadap simplisia, akan semakin banyak hasil yang diperoleh (Sudarmadji, 2003).

Kepolaran suatu pelarut menunjukkan tingkat kelarutan pelarut air ataupun pelarut organik terhadap suatu bahan. Kepolaran ini timbul dari perbedaan dua kutub (*pole*) kelarutan. Kecenderungan suatu bahan yang lebih larut. Dalam air disebut memiliki sifat yang polar dan sebaliknya yang cenderung lebih larut pada pelarut organik disebut nonpolar. Secara fisika, tingkat polaritas ini ditunjukkan lebih pasti dengan pengukuran konstanta dielektrikum (D) suatu pelarut. Semakin besar konstanta dielektrikum suatu pelarut semakin polar (Sudarmadji, 2003).

2.7.2. Kromatografi Lapis Tipis

Kromatografi adalah metode pemisahan komponen berdasarkan perbedaan distribusi antara dua fase, yaitu lapisan stasioner dengan permukaan yang luas, dan fase gerak yang berupa zat alir (fluid) yang mengalir lambat (perkolasi) menembus atau sepanjang lapisan stasioner itu. Metode ini sederhana, cepat dalam pemisahan dan sensitif (Khopkar, 2010).

Pelaksanaan KLT melibatkan dua variabel, yaitu fase diam dan fase gerak. Fase diam dapat berupa gel silika, alumina (aluminium oksida) dan selulosa. Fase diam untuk KLT seringkali juga mengandung substansi yang mana dapat berpendarflour dalam sinar ultraviolet. Fase geraknya merupakan pelarut atau campuran pelarut yang sesuai. Pelarut yang dipilih untuk pengembang disesuaikan dengan sifat kelarutan senyawa yang dianalisis (Gritter, *et al.*, 1991).

Kromatografi Lapis Tipis sering menambahkan indikator berfluoresensi untuk membantu penampakan bercak warna pada lapisan yang telah terelusi. Indikator fluorensensi 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 360 nm yang dapat tampak dengan mudah (Gritter, *et al.*, 1991).

Identifikasi dari senyawa-senyawa yang terpisah dari lapisan tipis menggunakan harga R_f . Harga R_f didefinisikan sebagai berikut (Sastrohamidjojo, 1985):

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh komponen}}{\text{jarak yang ditempuh oleh pelarut}} \dots\dots\dots(2.1)$$

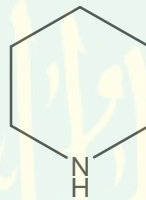
Harga-harga R_f untuk senyawa-senyawa yang murni dapat dibandingkan dengan harga-harga standar. Harga R_f yang diperoleh hanya berlaku untuk campuran tertentu dari pelarut dan penyerap yang digunakan (Sastrohamidjojo, 1985).

2.8. Metabolit Sekunder

2.8.1. Alkaloid

Alkaloid merupakan kelompok senyawa metabolit sekunder yang mempunyai sifat alkali. Sifat inilah yang menyebabkan penamaan golongan senyawa alkaloid. Sifat alkali ini dimungkinkan karena secara kimia alkaloid merupakan senyawa organik yang mengandung nitrogen baik satu ataupun lebih dalam bentuk amina primer, sekunder ataupun tersier (Raharjo, 2013).

Definisi umum untuk alkaloid dalam kimia adalah senyawa organik siklik yang mengandung N dengan tingkat oksidasi negatif yang terdapat secara terbatas dalam makhluk hidup. Alkaloid tidak ditemukan di semua jenis tanaman. Alkaloid juga masih jarang ditemukan pada organisme selain tanaman seperti jamur dan bakteri. Kebanyakan alkaloid ditemukan pada tumbuhan tingkat tinggi terutama pada tanaman dikotil. Alkaloid ditemukan pada berbagai bagian tanaman mulai dari akar, kulit batang, daun maupun buah (Raharjo, 2013).



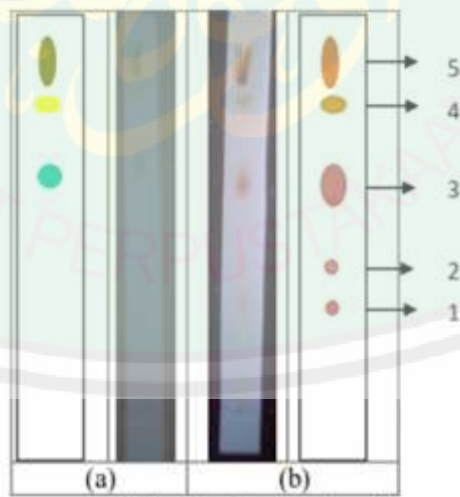
Gambar 2.4 Contoh Struktur Senyawa Alkaloid (Robinson, 1995)

Isolasi alkaloid umbi Bawang Sabrang (*Eleutherinae bulbus*) menggunakan pelarut etanol 80 % dengan ekstraksi maserasi (Purba, 2010). Ekstrak etanol 80 % batang Talikuning (*Anamirta cocculus*) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* dengan menunjukkan nilai ED_{50} sebesar 0,043 mg/g BB mencit yang setara dengan 4,7 mg/Kg BB manusia. Hal ini diduga karena *crude* ekstrak batang talikuning mengandung senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan parasit tersebut. Senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak talikuning adalah alkaloid kuartener (*berberine, palmatine, magnoflorine* dan *columbamine*) (Muti'ah, 2010).

Pengujian alkaloid dengan menggunakan dua reagen yang berbeda yaitu Reagen Mayer dan reagen Dragendroff. Hasil positif pada uji Dragendroff (kalium tetraiodomerkurat) ditandai dengan terbentuknya endapan

jingga. Endapan tersebut diduga adalah kalium alkaloid. Hasil positif golongan alkaloid dengan reagen Mayer ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan. Pereaksi Mayer (kalium tetraiodobismutat) paling banyak digunakan untuk mendeteksi golongan alkaloid karena pereaksi ini dapat mengendapkan hampir semua alkaloid (Robinson,1995).

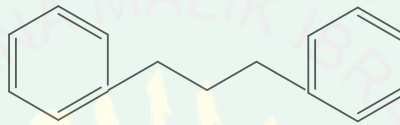
Hayati, dkk (2012) melakukan identifikasi senyawa alkaloid dari tanaman Anting –anting dengan menggunakan KLT. Eluen yang digunakan untuk identifikasi alkaloid metanol:kloroform (0,5:9,5). Pada eluen pertama, terdapat 4 noda dengan Rf antara 0,56-0,8. Noda ke 3 menunjukkan warna jingga kehitaman dan pada eluen yang kedua terdapat 5 noda dengan Rf antara 0,27 – 0,87. Noda ke 4 dan 5 menunjukkan warna jingga kecoklatan sehingga diasumsikan pada ekstrak etil asetat terdapat senyawa alkaloid.



Gambar 2.5 Hasil KLT senyawa alkaloid pada ekstrak etil asetat dengan eluen kloroform-metanol (9,5 : 0,5) setelah disemprot reagen Dregendrof
Keterangan: a. hasil elusi sebelum deteksi dengan lampu UV
b. hasil pengamatan dengan lampu UV 366 nm

2.8.2. Flavonoid

Flavonoid telah dikenal sebagai produk hasil alam dengan efek yang menguntungkan bagi kesehatan jauh sebelum senyawa tersebut diisolasi. Flavonoid merupakan metabolit sekunder yang secara kimia mempunyai struktur dasar dengan dua cincin aromatis dengan tiga atom C di antara cincin ($C_6-C_3-C_6$) (Raharjo, 2013).



Gambar 2.6 Struktur Inti Senyawa Flavonoid (Robinson, 1995)

Flavonoid merupakan kelompok senyawa fenolik terbesar yang terdapat di alam. Flavonoid ditemukan pada berbagai tanaman serta terdistribusi pada bagian-bagian seperti buah, daun, biji, akar, kulit kayu, batang dan bunga (Raharjo, 2013).

Senyawa aktif alkaloid, flavonoid, triterpenoid dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada ekstrak etanol akar Kayu Kuning (*C. fenestratum*) pada dosis 3,75 mg/25 gr BB mencit/hari yang diberikan selama 3 hari dapat menghambat pertumbuhan parasitemia sampai 5,281 % pada hari ke-7 setelah pemberian ekstrak (Kusuma, 2011).

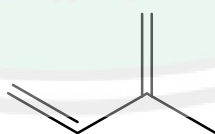
Metode isolasi senyawa flavonoid dari tanaman Ating-ating (*Acalypha indica* Linn.) dilakukan dengan cara maserasi menggunakan pelarut metanol selama 4x24 jam dengan bantuan shaker. Pemisahan senyawa flavonoid dari ekstrak dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT) analitik untuk mencari eluen terbaik dengan variasi eluen yaitu metanol : kloroform dengan variasi

komposisi (5:5), (3:7), (7:3), (1:39), eluen n-butanol : asam asetat : air (6:1:2), (4:1:5), kloroform : etil asetat (6:4), toluen : dietil eter : asam asetat (10:10:2), n-butanol : asam asetat : n-heksana (3:2:2) (Inayah, 2011).

Flavonoid akan menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga ketika direduksi dengan logam Mg dan HCl pekat. Uji flavonoid menunjukkan hasil yang negatif yaitu dengan tidak terbentuknya warna merah atau jingga pada masing-masing ekstrak ketika penambahan Mg dan HCl pekat (Robinson, 1995).

2.8.3. Terpenoid

Terpenoid merupakan senyawa bahan alam yang mempunyai struktur dasar disusun oleh struktur isoprene yang saling bergabung dan mengalami modifikasi sehingga mengandung gugus fungsi dan terkadang juga terjadi siklisasi menghasilkan struktur siklik alifatik. Kerangka terpenoid diklasifikasikan berdasarkan jumlah pengulangan isoprena penyusunnya (Raharjo, 2013). Struktur isoprena sebagai pembangun terpenoid ditunjukkan dalam Gambar 2.7.



Gambar 2.7 Struktur isoprena

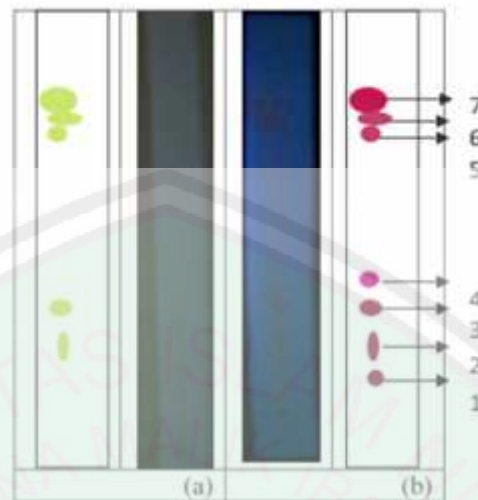
Robinson (1995) menjelaskan bahwa beberapa jenis senyawa terpenoid mempunyai aktifitas fisiologis yang berperan sebagai komponen aktif dari tumbuhan obat yang dapat digunakan untuk mengobati berbagai macam penyakit,

seperti diabetes, gangguan menstruasi, gangguan kulit, kerusakan hati, dan malaria.

Kusuma (2011), senyawa aktif alkaloid, flavonoid, triterpenoid dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada ekstrak etanol akar Kayu Kuning (*C. fenestratum*) pada dosis s 3,75 mg/25 grBB mencit/hari yang diberikan selama 3 hari dapat menghambat pertumbuhan parasitemia sampai 5,281 % pada hari ke-7 setelah pemberian ekstrak.

Senyawa terpenoid akan mengalami dehidrasi dengan penambahan asam kuat dan membentuk garam yang memberikan sejumlah reaksi warna. Perubahan warna ini disebabkan adanya penambahan asam sulfat pekat pada dinding tabung reaksi. Menurut Robinson (1995), terpenoid memberikan reaksi terbentuknya warna cincin kecoklatan ketika senyawa ini ditetesi asam sulfat pekat melalui dindingnya, sedangkan steroid akan menghasilkan warna hijau kebiruan.

Identifikasi senyawa terpenoid menggunakan kromatografi lapis tipis dengan campuran eluen n-heksana-etil asetat (1 : 1). Pereaksi yang digunakan adalah reagen Lieberman-Burchard. Jenis eluen heksana dan etil asetat (1:1) menghasilkan Rf antara 0,12-0,79 dengan 7 noda. Noda ke 1, 2, dan 3 menunjukkan warna ungu tua, noda ke 4 menunjukkan warna ungu, noda ke 5 dan 6 menunjukkan warna merah muda keunguan dan noda ke 7 menunjukkan warna merah tua keunguan. Berdasarkan warna noda yang dihasilkan tersebut diasumsikan pada ekstrak diklorometana terdapat senyawa terpenoid (Sriwahyuni, 2010).



Gambar 2.8 Hasil KLT senyawa terpenoid dengan eluen n-heksana-etil asetat (1 : 1) setelah disemprot reagen Lieberman-Burchard
Keterangan: a. hasil elusi sebelum dideteksi lampu UV
b. hasil pengamatan dengan lampu UV

2.8.4. Saponin

Saponin merupakan senyawa dalam bentuk glikosida yang tersebar luas pada tumbuhan tingkat tinggi. Saponin membentuk larutan koloidal dalam air dan membentuk busa yang mantap jika dikocok dan tidak hilang dengan penambahan asam (Harbrone,1996).

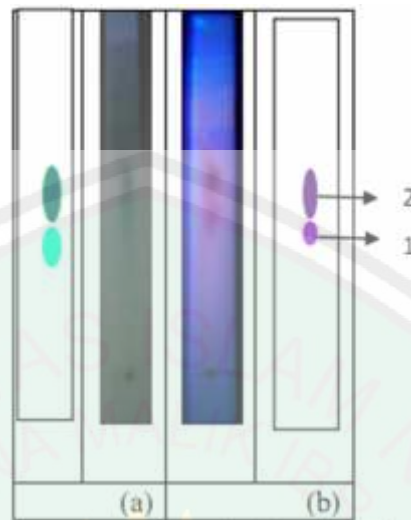
Saponin merupakan golongan senyawa alam yang rumit, yang mempunyai massa dan molekul besar, dengan kegunaan luas. Saponin diberi nama demikian karena sifatnya menyerupai sabun “Sapo” berarti sabun. Saponin adalah senyawa aktif permukaan yang kuat dan menimbulkan busa bila dikocok dengan air. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Dikenal juga jenis saponin yaitu glikosida triterpenoid dan glikosida struktur steroid tertentu yang mempunyai rantai spirotekal. Kedua saponin ini larut dalam air dan etanol, tetapi tidak larut dalam eter. Aglikonnya disebut sapogenin, diperoleh dengan hidrolisis dalam suasana asam atau hidrolisis memakai enzim (Robinson,1995).

2.8.5 Tanin

Tanin merupakan golongan senyawa yang mempunyai struktur bervariasi. Senyawa ini berada dalam jumlah besar di daun, batang maupun buah yang belum masak walaupun fungsi tannin di tanaman belum diketahui. Tanin dapat dikelompokkan menjadi dua golongan, yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terhidrolisis dapat dengan mudah dipecah atau dihidrolisis menjadi molekul yang sederhana yang larut dalam asam. Tanin terkondensasi menghasilkan produk kompleks yang tidak larut dalam asam. Katekin merupakan contoh tannin terkondensasi. Tanin terhidrolisis dapat digolongkan menjadi galotanin yang hasil hidrolisisnya hanya gula dan asam galat, serta elagitanin yang menghasilkan asam elagat selain asam galat dan gula (Raharjo, 2013).

Hayati, dkk. (2012), senyawa aktif tanin, alkaloid dan steroid menunjukkan bahwa pada ekstrak etil asetat tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) dapat menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada dosis 0,01 mg/g BB sebesar 87,19 %; pada dosis 0,1 mg/g BB sebesar 84,9 %; dan pada dosis 1 mg/g BB sebesar 90,74 %.

Hasil identifikasi menggunakan KLT golongan senyawa tanin pada tanaman anting-anting dengan menggunakan eluen asam asetat glasial:air:HCl pekat (30:10:3) ditunjukkan pada Gambar 2.9 (Hayati, dkk., 2012).



Gambar 2.9 Hasil KLT senyawa tanin pada ekstrak etil asetat dengan eluen asam asetat glasial: air: HCl pekat (30:10:3) setelah disemprot FeCl_3
 Keterangan: (a) hasil elusi sebelum dideteksi dengan lampu UV
 (b) hasil pengamatan dengan lampu UV 366 nm

Harborne (1996) dalam Hayati (2012) menyatakan bahwa senyawa tanin jika dideteksi di bawah sinar UV pendek menunjukkan warna lembayung, pada penelitian ini noda yang dihasilkan pada eluen butanol:asam asetat:air dan eluen asam asetat glasial, air dan HCl pekat noda ke 1 menunjukkan warna ungu dan noda ke 2 menunjukkan warna ungu kehitaman, sehingga kedua noda yang dihasilkan pada ekstrak etil asetat diasumsikan mengandung senyawa tanin.

2.9 Analisis Probit

Hasil pengujian antiplasmodial secara *in vivo* dapat diklasifikasikan sebagai berikut (Herintsoa, *et al.*, 2010):

- a. $\text{ED}_{50} < 10 \text{ mg/kg}$, menunjukkan aktifitas antiplasmodial yang sangat bagus.

- b. ED_{50} antara 10 – 100 mg/kg, ekstrak dikatakan masih memberikan aktifitas antiplasmodial.
- c. ED_{50} antara 100 – 1000 mg/kg, aktifitas antiplasmodialnya perlu dilakukan pengujian kembali.
- d. $ED_{50} > 1000$ mg/kg, aktifitas antiplasmodial tidak terdefinisi (tidak memberikan efek).

Analisa dengan model probit merupakan kependekan dari *Probability Unit*, yaitu peluang dari suatu kejadian. model analisa tertua yang pertama kali diperkenalkan oleh Bliss. Selanjutnya model ini dikembangkan dan dipelajari oleh Finney pada tahun 1997. Penggunaan analisis regresi probit sejauh ini sering digunakan untuk menguji daya racun suatu jenis peptisida terhadap hama atau penyakit, sehingga bermanfaat untuk menentukan tingkat dosis terhadap prosentase kematian hama (Lenny, 2006).

Salah satu metode untuk menentukan ED_{50} adalah dengan menggunakan metode probit. Untuk menghitung ED_{50} berdasarkan metode probit, maka dilakukan sesuai tahapan berikut (Priyanto, 2009).

1. Menentukan nilai probit dari % penghambatan tiap kelompok hewan uji.
2. Menentukan log dosis tiap-tiap kelompok.
3. Menentukan persamaan garis lurus hubungan antara nilai probit dengan log dosis, $Y = mX + b$.
4. Memasukkan nilai 5 (probit dari 50% penghambatan) pada persamaan garis lurus pada nilai Y. Nilai ED_{50} dihitung sebagai anti log X pada saat $Y = 5$.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Pelaksanaan Penelitian

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

3.2 Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, ayakan 60 mesh, blender, cawan penguap, desikator, oven, neraca analitik, gelas vial, kertas saring whatman, *shaker*, penyaring *Buchner*, *rotary evaporator*, plat KLT silika gel F₂₅₄, bejana pengembang, lampu UV, pipa kapiler, bola hisap, kandang hewan uji yang terbuat dari bak plastik, kawat, botol minum dan tempat makan mencit. Selain itu, digunakan pula *vacuum tube*, tip, pinset, mikropipet, mikroskop cahaya, gunting steril, spuit 1 mL, jarum steril, kapas dan kaca preparat.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah akar tanaman widuri (*Calotropis gigantea*) yang diambil di daerah sekitar Pasuruan. Bahan-bahan kimia yang digunakan adalah etanol 80 %, reagen Dragendroff, reagen Mayer, metanol 50 %, logam Mg, HCl 2 %, HCl pekat, kloroform, asam asetat

anhidrat, aquades, larutan FeCl_3 1 %, H_2SO_4 pekat, HCN 1N, metanol (p.a), kloroform (p.a), n-heksana (p.a), aseton (p.a), etil asetat (p.a), asam asetat (p.a), reagen Lieberman-Burchard dan H_2SO_4 0,1 M.

Bahan-bahan yang digunakan untuk uji malaria adalah mencit putih jantan galur Balb/C, pakan mencit (pellet), serbuk kayu, air minum, darah jantung dari mencit donor yang terinfeksi parasit, EDTA, larutan Alsever's, gliserol 10 %, aquades, larutan PBS, darah ekor mencit, buffer Giemsa, Giemsa fluka, metanol (p.a). klorokuin dan ekstrak akar tanaman widuri dan larutan CMC-Na 1 %.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratorik. Sampel diambil akarnya, lalu dianalisis kadar air basahnya. Setelah itu, sampel dikeringkan dan dihaluskan dalam bentuk serbuk. Kemudian, sampel yang diperoleh dianalisis kadar air keringnya dan dilakukan pemisahan senyawa aktif dengan ekstraksi maserasi menggunakan pelarut etanol 80 %. Sampel serbuk tersebut diekstraksi secara bertahap. Filtrat yang ada ditampung, maserasi dilakukan secara berulang-ulang sampai filtrat yang tertampung berwarna pucat. Ekstrak etanol yang diperoleh selanjutnya dipisahkan dari pelarutnya menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kasar pekat. Selanjutnya, ekstrak pekat yang diperoleh dilakukan uji antimalaria secara *in vivo* dengan variasi dosis yaitu 0,1 mg/Kg BB sehari secara oral, 1 mg/Kg BB sehari secara oral dan 10 mg/Kg BB sehari secara oral terhadap mencit selama 4 hari untuk mengetahui kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* melalui nilai derajat parasitemia yang diperoleh dengan 6 ulangan pada setiap kelompok. Setelah itu, dilakukan uji

fitokimia. Sampel yang positif uji fitokimia, dipisahkan dengan KLT analitik berdasarkan campuran berbagai eluen.

3.4 Tahapan Penelitian

Penelitian ini dirancang dengan tahapan sebagai berikut:

1. Analisis kadar air sampel basah
2. Preparasi sampel
3. Analisis kadar air sampel kering
4. Ekstraksi senyawa aktif dengan maserasi
5. Uji antimalaria
6. Uji fitokimia dengan uji warna menggunakan reagen peraksi
7. Pemisahan senyawa aktif dengan KLT analitik
8. Analisis data

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Analisis Kadar Air Sampel Basah

Sampel yang digunakan adalah sampel basah (akar Widuri sebelum dikeringkan). Analisa kadar air dilakukan dengan metode termogravi yaitu dengan pemanasan dan penimbangan. Cawan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel akar widuri yang telah menjadi serbuk, dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya. Sampel

ditimbang sekitar 5 g, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama sekitar 1 jam. Sampel kering didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ± 20 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dalam tanaman dihitung menggunakan rumus berikut (Milyasari, 2010):

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

% Kadar air terkoreksi = kadar air – faktor koreksi

3.5.2 Preparasi Sampel

Bagian akar tanaman Widuri diambil sebanyak 2 Kg. Kemudian dicuci dan dikeringkan di udara terbuka, dipotong kecil-kecil. Selanjutnya, dikeringkan dengan oven pada suhu 30 – 37 °C selama 5 – 6 jam. Setelah kering, akar tanaman Widuri diblender sampai terbentuk serbuk (Nadia, 2010).

Dilakukan pemblanderan yang bertujuan untuk lebih memperkecil ukuran partikel dan untuk memperoleh serbuk halus dengan ukuran 60 mesh sehingga terbentuk serbuk yang homogen. Serbuk yang diperoleh merupakan sampel kering yang memiliki kadar air < 10%. Kemudian serbuk halus tersebut tersebut diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 80%.

3.5.1 Analisis Kadar Air Sampel Kering

Sampel yang digunakan adalah sampel kering (akar Widuri yang telah dikeringkan dan menjadi serbuk). Analisa kadar air dilakukan dengan metode termogravi yaitu dengan pemanasan dan penimbangan. Cawan dipanaskan dahulu dalam oven pada suhu 100 – 105 °C sekitar 15 menit untuk menghilangkan kadar airnya, kemudian cawan disimpan dalam desikator sekitar 10 menit. Cawan tersebut selanjutnya ditimbang dan dilakukan perlakuan yang sama sampai diperoleh berat cawan yang konstan. Sampel akar widuri yang telah menjadi serbuk, dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui berat konstannya. Sampel ditimbang sekitar 5 g, selanjutnya dikeringkan di dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama sekitar 1 jam. Sampel kering didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Sampel tersebut dipanaskan kembali dalam oven ± 20 menit, didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan. Kadar air dalam tanaman dihitung menggunakan rumus berikut (Milyasari, 2010):

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100\%$$

Keterangan: a = berat konstan cawan kosong

b = berat cawan + sampel sebelum dikeringkan

c = berat konstan cawan + sampel setelah dikeringkan

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}}$$

% Kadar air terkoreksi = kadar air – faktor koreksi

3.5.4 Ekstraksi Senyawa Aktif dengan Metode Maserasi

Ekstraksi komponen aktif dilakukan dengan cara ekstraksi maserasi atau perendaman dengan pelarut etanol 80 %. Serbuk akar tanaman Widuri ditimbang sebanyak 100 g dan dibagi menjadi dua, masing-masing 50 g untuk proses ekstraksi. Lalu diekstraksi secara maserasi masing-masing menggunakan 250 mL pelarut etanol 80 % selama 24 jam pada suhu kamar dengan pengocokan 120 rpm selama 3 jam menggunakan *shaker*. Selanjutnya, filtrat dan ampas dipisahkan melalui penyaringan, dimana filtratnya ditampung sementara, sedangkan ampas yang diperoleh direndam dengan 150 mL pelarut yang sama sampai diperoleh filtrat yang berwarna pucat. Filtrat yang diperoleh digabungkan dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak pekat. Ekstrak pekat tersebut dioven pada suhu 37 °C untuk menghilangkan residu etanolnya. Kemudian ditimbang sampai diperoleh berat yang konstan. Cara ini akan memberikan hasil maksimal dimana ekstrak pekat yang diperoleh memiliki kandungan residu etanol paling kecil. Ekstrak pekat yang diperoleh selanjutnya dilakukan uji antimalaria *in vivo*, uji fitokimia dan identifikasi golongan senyawa aktif menggunakan Kromatografi Lapis Tipis (Nadia, 2010).

3.5.5 Uji Antimalaria

3.5.5.1 Persiapan Hewan Uji

Penelitian ini menggunakan hewan uji mencit jantan (*Mus musculus*) galur Balb/C, umur 8 – 12 minggu, berat badan 15 – 20 g. Hewan uji diperoleh dari peternak langsung. 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* (secara bebas dan terus-menerus sampai mencit itu berhenti sendiri sesuai keinginannya). Makan yang diberikan berupa pellet ikan, sedangkan minumannya berupa air (Muti'ah, dkk., 2010).

3.5.5.2 Perlakuan Hewan Coba

Penelitian dilakukan dengan enam kelompok perlakuan. Jumlah sampel dari tiap kelompok perlakuan dihitung menggunakan rumus Federer (Felicia, 2009):

Rumus Federer: $(n-1)(t-1) = 15$ dengan $t =$ jumlah kelompok perlakuan $= 6$

$n =$ jumlah sampel pada tiap perlakuan

$$(n-1)(6-1) = 15$$

$$5(n-1) = 15$$

$$5n-5 = 15, \text{ maka } n = 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, jumlah hewan uji yang diperlukan adalah 4 sediaan mencit untuk setiap kelompok perlakuan, sehingga jumlah minimal seluruh sampel yang digunakan adalah 24 ekor mencit. Namun, tiap kelompok diberi tambahan mencit sebanyak 2 ekor, sehingga membutuhkan mencit total sebanyak 36 ekor. Perlakuan dari tiap-tiap kelompok adalah sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol negatif adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dengan pemberian pelarut CMC-Na 1% sekali sehari per oral (Praptiwi dan Chairul, 2008).
2. Kelompok kontrol positif adalah kelompok perlakuan klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB sekali sehari secara per-oral.

3. Kelompok non infeksi adalah kelompok perlakuan tanpa infeksi *Plasmodium berghei* dengan pemberian 0,5 mL larutan CMC-Na 1 % sekali sehari per oral.
4. Kelompok Widuri 1 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dan terapi ekstrak etanol widuri dosis 0,1 mg/Kg BB sekali sehari secara per oral (Hayati, dkk, 2012).
5. Kelompok Widuri 2 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dan terapi ekstrak etanol widuri dosis 1 mg/Kg BB sekali sehari secara per oral (Praptiwi dan Chairul, 2008).
6. Kelompok Widuri 3 adalah kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dan terapi ekstrak etanol widuri dosis 10 mg/Kg BB sekali sehari secara per oral (Praptiwi dan Chairul, 2008).

Pengujian aktivitas antimalaria dilakukan dengan menggunakan metode Peter (Phillipson dan Wright, 1991 dalam Muti'ah, 2010). Terapi dilakukan ketika derajat parasitemia setelah infeksi mencapai 1 – 5 % yang dihitung sebagai hari ke-0. Terapi dilakukan setiap hari selama 4 hari. Pengamatan derajat parasitemia dilakukan setiap hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4.

3.5.5.3 Freezing dan Thawing Isolat *Plasmodium berghei*

Perlakuan *freezing* dan *thawing* isolat parasit dalam penelitian ini merujuk pada penelitian Coutrier (2008). Hal yang dilakukan pada *freezing* isolat parasit adalah dengan mengambil 0,8 mL darah jantung dari mencit donor yang telah terinfeksi, kemudian 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* ditutup dan dimasukkan ke dalam *liquid*

nitrogen tank selama ± 1 menit. Kemudian 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 diinfeksi pada hewan coba. Semua pekerjaan yang berhubungan dengan isolat *Plasmodium berghei* dilakukan dalam *Laminar Air Flow* dan bersifat spesifik.

3.5.5.4 Pembuatan Donor

Dalam membuat sistem donor, sel darah merah yang telah terinfeksi parasit diresuspensikan sampai 200 μL dengan larutan PBS. Kemudian, diinjeksikan pada mencit secara *intraperitoneal* (i.p). Selanjutnya, diukur derajat parasitemia mencit donor. Jika persen derajat parasitemia mencit donor telah mencapai 2,5 %, maka mencit tersebut dapat digunakan untuk menginfeksi mencit yang lain (Muti'ah, 2010).

3.5.5.5 Inokulasi *Plasmodium berghei*

Inokulasi *Plasmodium berghei* dilakukan secara *intraperitoneal* (i.p) dengan jumlah parasit yang diinfeksi sebanyak 1×10^6 . Dalam hal pemeriksaan mencit yang telah terinfeksi parasit ini, diasumsikan pada mencit yang normal nilai hematokritnya (angka yang menunjukkan prosentase zat padat dalam darah terhadap cairan darah) adalah 60 % dan disini mencit donor memiliki 6×10^9 sel darah merah/mL dalam darah. Jika derajat parasitemia mencit donor sebesar 2,5 % maka diambil darah sebesar 6,7 μL , kemudian diresuspensikan sampai 200 μL dengan larutan PBS. Setelah dilakukan infeksi, selanjutnya dilakukan pengamatan

parasitemia setiap hari hingga mencapai 1 – 5 % sebagai hari ke-0 terapi. Kemudian dilakukan terapi obat atau ekstrak uji sampai hari ke-4 (Muti'ah, 2010).

3.5.5.6 Pengukuran Derajat Parasitemia

Mula-mula dibuat hapusan darah yang dilakukan dengan cara mengambil setetes darah dari ekor mencit dengan menggunting ekor mencit dan ditetaskan pada kaca preparat. Tetesan darah tersebut ditipiskan dengan menggunakan tepi kaca preparat dan ditunggu sampai kering. Kemudian, hasil hapusan ditetesi dengan metanol hingga merata dan ditunggu hingga kering. Selanjutnya, dilakukan pewarnaan Giemsa dengan cara mencampurkan Giemsa fluka dan buffer Giemsa dengan perbandingan 1 : 9. Pewarnaan Giemsa ditetaskan pada hapusan dan ditunggu selama 20 menit. Selanjutnya, dibilas dengan air mengalir hingga tidak ada pewarna yang tersisa kemudian dikeringkan. Selanjutnya, dilakukan pemeriksaan di bawah mikroskop menggunakan pembesaran 1000x dengan menghitung jumlah eritrosit yang terinfeksi malaria dari 1000 eritrosit. Parasitemia (%) adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam 1000 eritrosit (Muti'ah, 2010). Persen pertumbuhan parasit (% parasitemia) dihitung dengan rumus sebagai berikut:

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

Sedangkan persen penghambatan pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus berikut (Herintsoa *et al.*, 2005).

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

Selanjutnya ditentukan harga ED₅₀ dengan menggunakan analisa probit dari % penghambatan hari ke-4.

3.5.6 Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan analisis kualitatif yang digunakan untuk mengetahui kandungan golongan senyawa aktif yang terdapat dalam suatu bahan. Uji fitokimia dalam penelitian ini meliputi uji flavonoid, alkaloid, terpenoid, tanin dan saponin.

3.5.6.1 Uji Flavonoid

Ekstrak akar Widuri (*Calotropis gigantea*) dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 500 μ L konsentrasi 10000 ppm, dilarutkan dalam 1 – 2 mL metanol 50 % panas. Setelah itu, ditambahkan logam Mg dan 4 – 5 tetes HCl pekat. Larutan berwarna merah atau jingga yang terbentuk menunjukkan adanya flavonoid.

3.5.6.2 Uji Alkaloid

Ekstrak akar Widuri (*Calotropis gigantea*) diambil sebanyak 500 μ L dengan konsentrasi 10000 ppm kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Selanjutnya, ditambah 0,5 mL HCl 2 % dan larutan dibagi dalam dua tabung. Tabung pertama ditambah 2 – 3 tetes reagen Dragendroff dan tabung kedua ditambah 2 – 2 tetes reagen Mayer. Jika tabung pertama terbentuk endapan jingga dan pada tabung kedua terbentuk endapan kekuningan menunjukkan adanya alkaloid.

3.5.6.3 Uji Terpenoid

Ekstrak akar Widuri (*Calotropis gigantea*) diambil sebanyak 500 μ L konsentrasi 10000 ppm dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform, ditambahkan dengan 0,5 mL asam asetat anhidrat. Selanjutnya, campuran ditetesi dengan 1 – 2 mL H₂SO₄ pekat melalui

dinding tabung tersebut. Jika hasil yang diperoleh berupa cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan dua pelarut menunjukkan adanya terpenoid.

3.5.6.4 Uji Tanin

Sebanyak 500 μ L ekstrak akar tanaman Widuri konsentrasi 10000 ppm dilarutkan dalam 1 – 2 mL air dan ditambahkan 2 tetes pereaksi FeCl_3 . Adanya tanin pada sampel ditunjukkan dengan terjadinya perubahan warna menjadi hijau mengindikasikan adanya tanin katekol atau biru kehitaman yang menunjukkan adanya tanin galat.

3.5.6.5 Uji Saponin

Uji Saponin dilakukan dengan metode Forth. Diambil 500 μ L ekstrak sampel 10000 ppm dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 10 mL akuades lalu dikocok 1 menit, diamati perubahan yang terjadi. Jika menimbulkan busa ditambahkan 2 tetes HCl 1 N. Apabila terbentuk busa yang mantap (tidak hilang selama 30 detik) maka identifikasi menunjukkan adanya saponin.

3.7 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis

Sampel yang dipisahkan dengan Kromatografi Lapis Tipis merupakan sampel yang positif kandungan beberapa senyawa metabolit sekunder pada uji fitokimia. Proses identifikasi merujuk pada sumber literatur Harbone (1987) dan Sastrohamidjojo (1985). Ekstrak pekat akar Widuri sebanyak 1000 mg dilarutkan dalam 1 mL etanol 80 %. Kemudian, disiapkan bejana pengembang sebagai tempat menampung campuran eluen selama proses pemisahan dilakukan.

Dimasukkan campuran eluen ke dalam bejana pengembang dan ditutup bejana pengembang selama 1 jam untuk menjenuhkan uap eluennya.

Pemisahan dengan KLT ini digunakan plat silika gel F₂₅₄. Plat silika diaktivasi terlebih dahulu dengan pemanasan dalam oven pada suhu 60 – 70 °C selama 10 menit. Masing-masing plat dipotong dengan ukuran 1x10² cm. Ekstrak etanol akar Widuri (*Calotropis gigantea*) yang telah disiapkan tadi ditotolkan sebanyak 5 – 10 totolan pada plat KLT pada jarak ± 1 cm dari tepi bawah plat menggunakan pipa kapiler. Kemudian dikeringkan di udara dan dielusi dengan masing-masing fase gerak golongan senyawanya. Setelah pergerakan fase gerak sampai pada garis batas atas, maka elusi dihentikan. Noda disemprot dengan pereaksi dan diperiksa dibawah sinar UV pada panjang gelombang 366 nm. Kemudian diamati noda tersebut dan dihitung nilai R_f untuk mengetahui golongan senyawa antimalaria.

Adapun fase gerak untuk masing-masing golongan senyawa aktif adalah sebagai berikut:

1. **Golongan Alkaloid:** digunakan fase gerak berupa kloroform : metanol (9 : 1) (Barus, dkk., 2010), kloroform : etanol (9 : 1) (Ekasari *et al.*, 2005), metanol:kloroform (0,5:9,5) (Sriwahyuni, 2010), Kloroform : metanol (9 : 1) (Barus, dkk., 2010), etanol : etil asetat : n-heksana (1 : 2 : 30) (Fachriyah, dkk., 2013) dengan pereaksi Dragendroff. Kemudian dilihat pada sinar UV 254 nm dan 366 nm dan bila muncul bercak warna jingga pada lempeng hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat senyawa alkaloid.

2. **Golongan Flavonoid:** eluen yang digunakan adalah metanol-kloroform (1:9) (Milyasari, 2010), etil asetat : metanol (7:3) (Ellizar dan Maaruf, 2009), etil asetat : metanol (8:2) (Ellizar dan Maaruf, 2009), etil asetat : metanol (9:1) (Ellizar dan Maaruf, 2009), n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) (Widyowati dan Rahman, 2010) yang diuapi dengan ammonia dan akan berwarna biru kehijauan. Penampakan noda diamati pada lampu UV 254 nm dengan warna kuning atau merah jingga.
3. **Golongan Tanin:** eluen yang digunakan adalah asam asetat glasial : air : asam klorida (30:10:3) (Hayati, dkk., 2010), butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 5) (Harborne, 1987), asam asetat glasial : air : HCl (30 : 10 : 3) (Nuraini, 2002), kloroform : asam asetat : asam formiat (0,5 : 9 : 0,5) (Widyowati dan Rahman, 2010), n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) (Sa'adah, 2010) dengan pereaksi FeCl_3 . Noda yang terbentuk diperiksa dengan lampu UV-Vis pada panjang gelombang 366 nm menunjukkan warna ungu kehitaman. Pengamatan noda tanpa sinar UV berwarna biru kehijauan.
4. **Golongan Saponin:** jenis eluen yang digunakan adalah kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2) (Harborne, 1987), kloroform : metanol : air (20 : 60 : 10) (Kristianingsih, 2005), kloroform : metanol : air (3 : 1 : 0,1) dan kloroform metanol : air (14 : 6 : 1) (Bogorani *et al.*, 2007), dan kloroform : aseton (4 : 1) (Suryanti, 2005). Ketika ditambahkan H_2SO_4 0,1 M akan menimbulkan warna ungu gelap.
5. **Golongan Terpenoid:** digunakan eluen n-heksana : etil asetat (1 : 1) dan kloroform : asam asetat (10 : 1) (Harborne, 1987), n-heksana : etil asetat (2 : 8)

(Halimah, 2010), n-heksana : etil asetat (4 : 1) (Ekasari *et al.*, 2005), kloroform : asam asetat (4 : 1) (Widyowati dan Rahman, 2010) yang menunjukkan warna ungu dan merah keunguan dengan reagen penyemprot Lieberman-Burchard.

3.8 Analisis Data

Data yang dianalisis adalah prosentase pertumbuhan parasit ekstrak etanol akar widuri dalam kaitannya dengan dosis ekstrak yang diberikan pada perlakuan. Nilai efektivitas dosis 50 % (ED_{50}) dihitung berdasarkan analisa probit % penghambatan parasit selama 4 hari dan ditunjukkan dengan analisis regresi linear dengan program Microsoft Office Excel.

Program lain yang digunakan untuk analisis data adalah MINITAB 16 dengan cara ANOVA *two way*. Hasil pengujian yang diperoleh digunakan untuk menggambarkan pengaruh pemberian perlakuan ekstrak akar *Calotropis gigantea* terhadap derajat parasitemia mencit bermakna atau tidak. Analisis *Post Hoc* dengan uji *Tukey* untuk mengetahui kelompok mana saja yang menunjukkan perbedaan yang signifikan.

Penggolongan senyawa aktif dapat dilakukan dengan identifikasi hasil uji warna dengan kepekatan warna yang dihasilkan pada masing-masing ekstrak dengan tanda berikut +++ (terkandung senyawa lebih banyak / warna pekat); ++ (terkandung senyawa / warna muda); - (tidak terkandung senyawa / tidak terbentuk warna).

Data dari pemisahan dianalisis secara deskriptif, yaitu dengan memperlihatkan pola pemisahan dan kenampakan noda pada plat KLT dengan berbagai eluen yang digunakan.

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 (*Calotropis gigantea*) yang diambil di daerah sekitar Pasuruan. Akar Widuri dianalisis kadar air pada simplisia basah. Kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringanginkan di udara terbuka. Selanjutnya, sampel akar tersebut diserbukkan 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 ekstraksi 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 termogravi. Cawan dipanaskan dalam oven pada suhu 100 – 105 °C selama 15 menit untuk menghilangkan air yang terdapat pada cawan tersebut. Kemudian cawan didinginkan dalam desikator sekitar 10 menit. Pendinginan cawan di dalam desikator bertujuan untuk menghindari adanya air yang menempel kembali pada cawan jika didinginkan 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 \pm 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.

Penentuan kadar air sampel basah bertujuan untuk mengetahui kadar air sampel yang sesungguhnya sebelum dibuat menjadi simplisia. Setelah diperoleh kadar air sampel basah, maka sampel tersebut dipreparasi sampai terbentuk simplisia. Sampel akar Widuri diambil \pm 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 bertujuan untuk memperbanyak luas permukaan, sehingga memperbesar tumbukan antara sampel dan pelarut dan proses ekstraksi lebih maksimal. Selanjutnya, sampel kering 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). Ukuran 60 mesh merupakan ukuran yang cukup efektif agar pelarut dapat mengabsorpsi seluruh bagian sel terutama dinding sel. Dinding sel tumbuhan terbuka pada ukuran serbuk 60 mesh, sehingga memudahkan meresapnya pelarut selama proses ekstraksi (Dewi, 2007).

Serbuk akar Widuri yang telah dipreparasi tersebut dianalisis kadar air keringnya. Hasil analisis kadar air kering ditunjukkan pada Tabel 4.1.

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

Sampel yang dianalisis	Kadar air sampel (%)
Sampel basah	51,17
Sampel kering	4,96

Kadar air sampel kering yang rendah, dapat menghentikan reaksi enzimatik, sehingga dapat mencegah terjadinya penurunan mutu atau perusakan simplisia. Kandungan air dalam bahan dapat mempengaruhi daya tahan sampel terhadap serangan mikroba sehingga dapat disimpan untuk jangka waktu yang lebih lama (Goeswin, 2007).

Kadar air sampel kering yang rendah juga dapat memaksimalkan proses ekstraksi. Karena semakin rendah nilai kadar air bahan maka semakin memudahkan pelarut untuk masuk ke dalam dinding sel tumbuhan yang mengandung senyawaan aktif, sehingga dapat mengekstrak komponen senyawa aktif yang diinginkan secara maksimal (Nurmillah, 2009). Sampel yang memiliki kadar air < 10 % tersebut memiliki kestabilan optimum dan pertumbuhan mikroba dapat dikurangi (Puspita, 2009).

4.2 Ekstraksi Senyawa Aktif

Metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian ini adalah maserasi. Sampel yang diekstraksi adalah sampel akar kering yang telah diserbukkan dengan kadar air 4,96 %. 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, senyawa aktif di dalam sel telah habis. 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 kondensor, *waterbath* dan pompa vakum.

Penggunaan *rotary evaporator* diawali dengan memasukkan filtrat ke dalam labu alas bulat dengan volume $\frac{2}{3}$ 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 (± 60 °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 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. Ekstrak pekat yang diperoleh berwarna kuning kecoklatan sebesar 3,93 gr.

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 (Suryawati 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 diinfeksi 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. EDTA berfungsi sebagai antikoagulan. EDTA merupakan asam protik yang mengandung 4 gugus asam karboksilat dan dua grup amina dengan PEB yang dapat mengikat kalsium dengan menghambat trombin yang diperlukan untuk mengkonversi fibrinogen menjadi fibrin dalam proses pembekuan darah (Banfi, *et al.*, 2007). Setelah itu, ditambahkan dengan 1,6 mL larutan Alsever's yang mengandung 10 % gliserol. Gliserol merupakan senyawa organik golongan karbohidrat yang berfungsi sebagai sumber nutrisi bagi parasit. 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 diinfeksi pada mencit donor.

Penentuan derajat parasitemia mencit donor dilakukan setiap hari dengan membuat hapusan tipis darah ekor mencit. Pada penelitian ini, diperoleh derajat parasitemia mencit donor sebesar 15 %. Ketika derajat parasitemia donor telah mencapai 2,5 %, maka dapat digunakan untuk menginfeksi mencit-mencit yang lainnya melalui proses pembedahan (Coutrier, 2008). Dengan demikian, derajat

parasitemia mencit donor pada penelitian ini telah sesuai sehingga dapat digunakan untuk menginfeksi 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 spuit. Setiap mencit yang sehat, diinjeksikan sebanyak 1,12 μL darah mencit donor yang telah diresuspensikan sampai 200 μL 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 diinjeksikan 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 parasitemia dilakukan setiap hari mulai hari ke-0, sampai dengan hari ke-4. Pemberian bahan uji dilakukan sekali sehari selama 4 hari berturut-turut karena obat malaria pemberiannya cukup sehari sekali dan dalam waktu empat hari sudah dapat menghambat pertumbuhan parasit secara efektif (Kusumawardhani, dkk., 2005).

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 ditetaskan 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 (Coutrier, 2008). Setelah metanol kering, dilakukan pewarnaan Giemsa dengan cara mencampurkan Giemsa fluka dan buffer Giemsa dengan perbandingan 1 : 5. Pewarnaan Giemsa ditetaskan 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:

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

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 4.2.

Tabel 4.2 Rata-rata derajat parasitemia serta standar deviasi ekstrak etanol 80 % akar Widuri

Kelompok Perlakuan	Rerata derajat parasitemia (%) ± Standar Deviasi				
	Hari ke-0	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4
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.

Nilai standar deviasi digunakan untuk mengukur sebaran nilai data derajat parasitemia dari nilai rata-ratanya. Jika nilai standar deviasinya kecil, maka dapat menunjukkan bahwa data tersebut berkumpul dan mengelompok di sekitar nilai

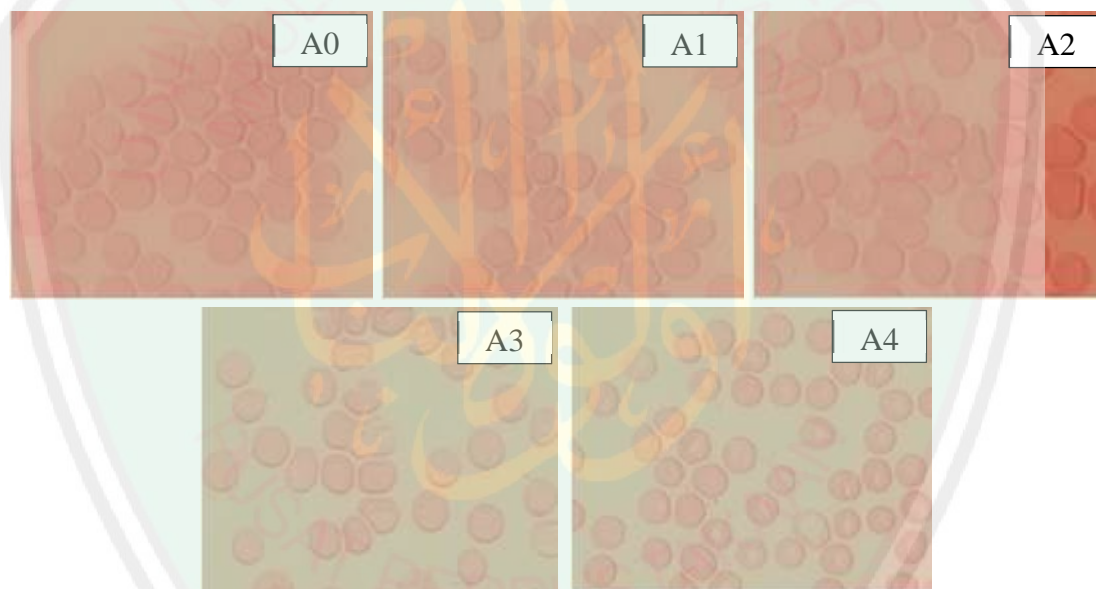
rata-rata hitungnya. Sebaliknya, apabila nilai deviasinya besar, maka penyebarannya akan semakin besar. Standar deviasi yang baik memiliki nilai yang tidak melebihi dari rata-rata dari persen derajat parasitemia. Nilai standar deviasi yang besar menunjukkan adanya perbedaan jauh diantara rata-rata yang digunakan. Nilai standar deviasi yang diperoleh dalam penelitian ini, yang mana dilakukan untuk mengukur bagaimana nilai-nilai data persen derajat parasitemia yang tersebar.

Berdasarkan Tabel 4.2 rata-rata derajat parasitemia kelompok kontrol negatif semakin besar dengan bertambahnya hari terapi, sedangkan kelompok kontrol positif semakin kecil dengan bertambahnya hari terapi. Hal ini disebabkan oleh perbedaan perlakuan dari kedua kelompok tersebut. Kelompok kontrol positif diterapi menggunakan obat klorokuin, sedangkan kontrol negatif tidak. Kelompok dosis menunjukkan adanya perubahan fluktuatif. Hal ini disebabkan oleh perbedaan reaksi tubuh mencit terhadap infeksi yang berbeda-beda, seperti metabolisme dan sistem kekebalan tubuhnya.

Dosis yang digunakan pada penelitian ini merupakan dosis manusia yang telah dikonversi ke dalam dosis mencit dalam satuan mg/g BB seperti pada Lampiran 3. 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).

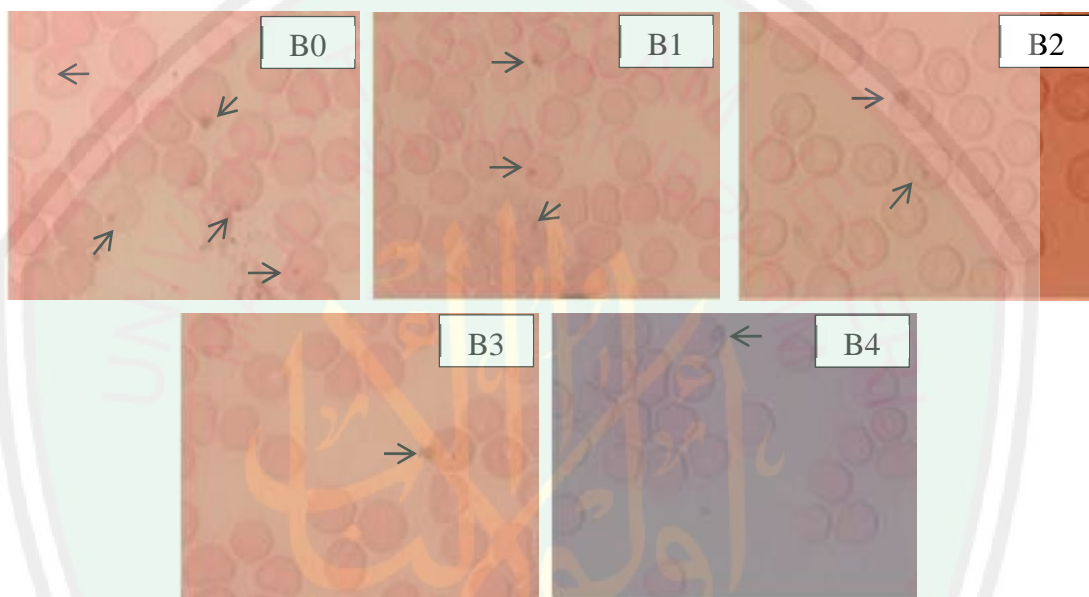
Kelompok non infeksi merupakan kelompok perlakuan tanpa infeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dengan CMC-Na 1 % sekali sehari per oral. Hasil pengamatan sel darah merah menicet kelompok non infeksi seperti Gambar 4.1.



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

Gambar 4.1 menunjukkan bahwa pengukuran derajat parasitemia mulai hari ke-0 sampai hari ke-4 tidak ditemukan adanya infeksi parasit *Plasmodium berghei* pada sel darah merah menicet kelompok non infeksi. Tujuan adanya kelompok non infeksi adalah untuk membuktikan bahwa menicet 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.

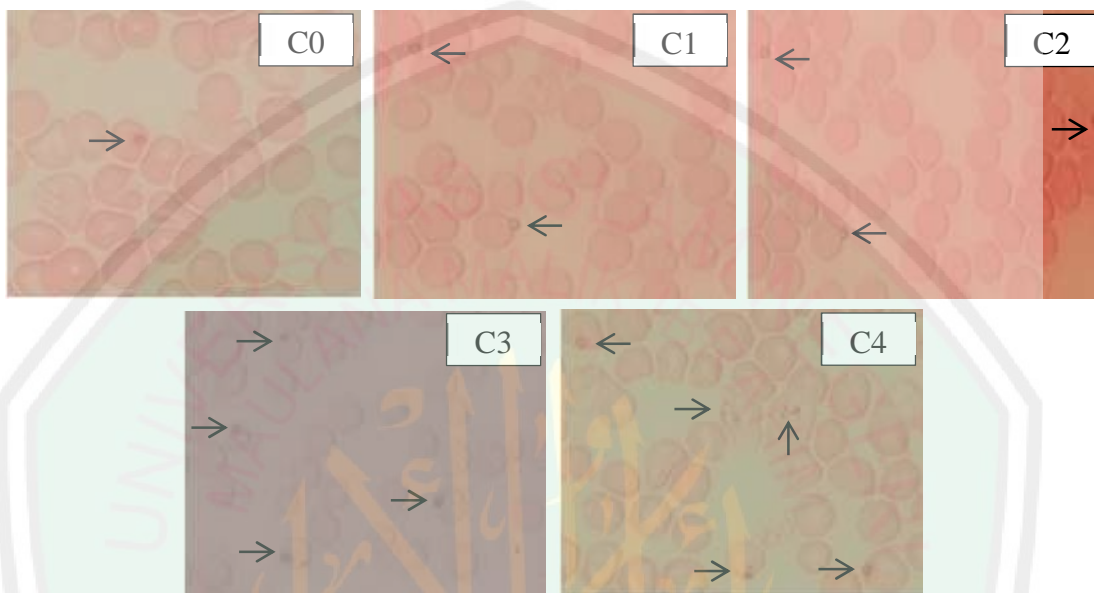


Gambar 4.2 Gambaran sel darah merah mencit kelompok kontrol positif dengan pemberian klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar 4.2 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

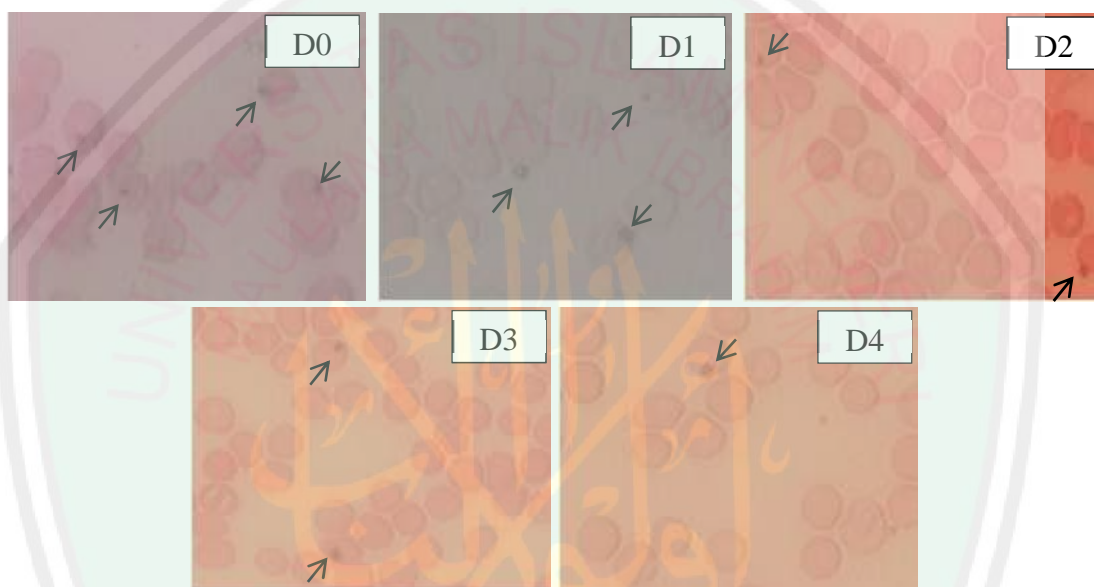
derajat parasitemia mencit kelompok kontrol negatif ditunjukkan pada Gambar 4.3.



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

Gambar 4.3 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 parasit. 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 parasit 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 4.4 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.

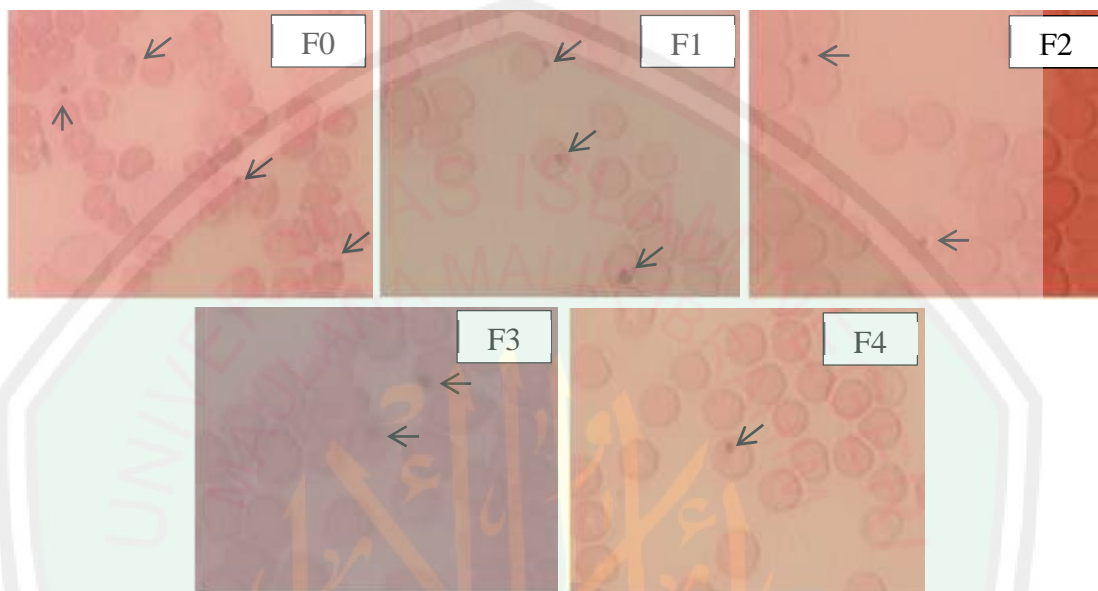


Gambar 4.5 Gambaran sel darah merah mencit kelompok Widuri 2 dengan ekstrak akar dengan dosis 1 mg/Kg BB pada hari ke-0 sampai ke-4

Gambar 4.5 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 4.6 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 fluktuatif. 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.

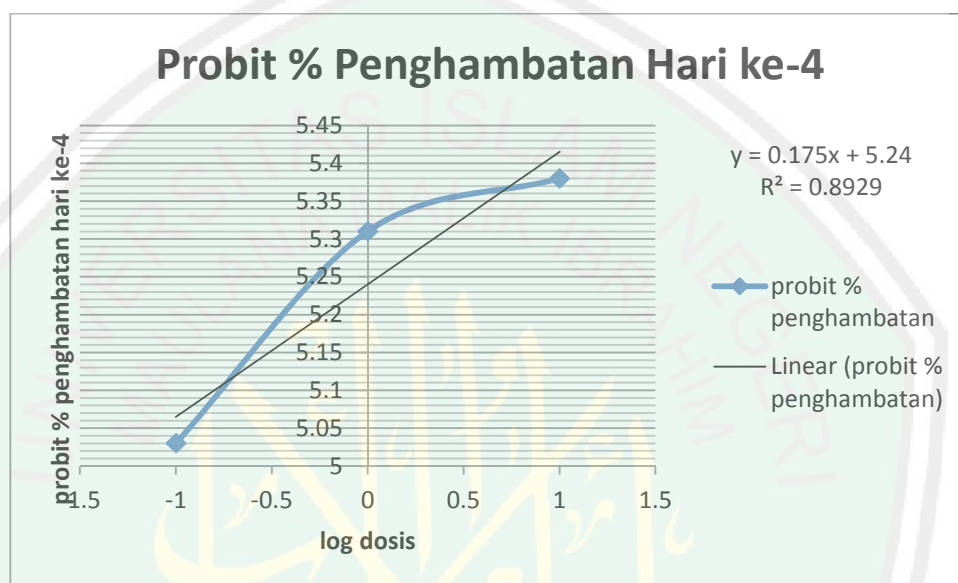
Tabel 4.3 Persen penghambatan pertumbuhan parasit ekstrak etanol 80 % akar Widuri pada hari ke-4

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

Berdasarkan tabel 4.3, 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 ED₅₀ disajikan pada Lampiran 6.



Gambar 4.7 Kurva hubungan antara log dosis dengan probit % penghambatan

Pada kurva tersebut diperoleh persamaan garis liniernya, yaitu $y = 0.175x + 5.24$. Nilai ED₅₀ 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 -1,37. Nilai x ini kemudian di antilogkan sehingga diperoleh ED₅₀ ekstrak etanol 80 % akar Widuri, yaitu sebesar 0,0426 mg/g BB atau 4,26 mg/Kg BB. Nilai ED₅₀ 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

$ED_{50} < 10$ 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 dosis dan hari terapi serta interaksi di antara keduanya.

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

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 variabel 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.

Uji korelasi dosis dilakukan untuk mengetahui hubungan antara pengaruh dosis dengan persen penghambatan. Hasil uji korelasi dosis menunjukkan nilai Pearson sebesar 0,708. Nilai tersebut menunjukkan korelasi yang cukup kuat. Nilai korelasi ini menunjukkan bahwa setiap perlakuan mempunyai keefektifan yang sama, tetapi untuk aplikasi dalam bidang farmasi dosis yang paling baik adalah dosis 10 mg/Kg BB.

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, saponin dan tanin. Hasil uji fitokimia golongan senyawa aktif ekstrak etanol 80 % akar Widuri ditunjukkan pada Tabel 4.4.

Tabel 4.4 Hasil uji fitokimia golongan senyawa aktif ekstrak etanol 80 % akar Widuri

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

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

4.4.1 Terpenoid

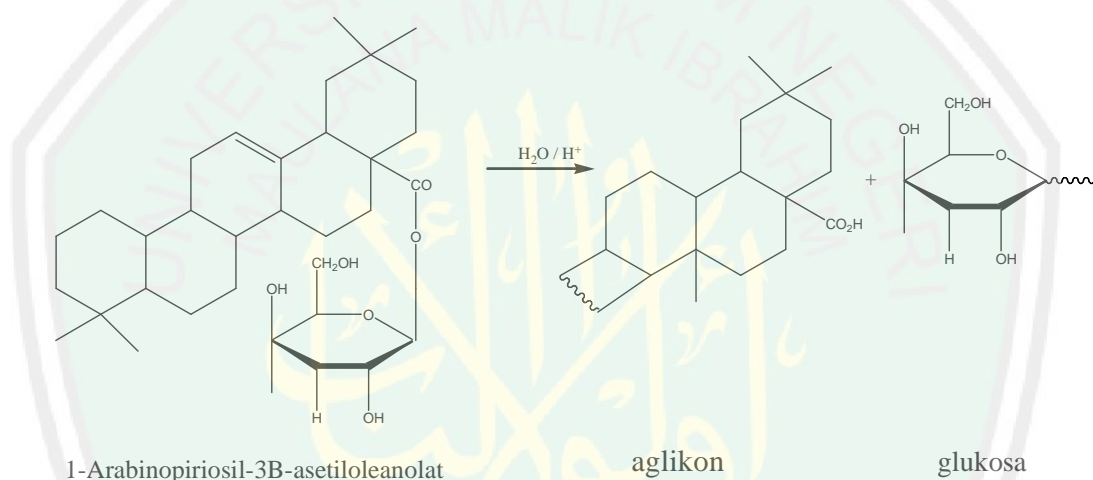
Uji fitokimia golongan terpenoid dilakukan dengan cara membuat larutan ekstrak dengan konsentrasi 1000 ppm. Kemudian, diambil 0,5 mL larutan ekstrak dan dilarutkan dalam 0,5 mL kloroform. Kloroform berfungsi untuk melarutkan senyawa terpenoid karena terpenoid bersifat non polar, sehingga larut di dalam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

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 (Robinson, 1995). Reaksi hidrolisis saponin dalam air ditunjukkan pada Gambar 4.9.



Gambar 4.8 Reaksi hidrolisis saponin dalam air (Marliana, dkk., 2005).

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 F₂₅₄. Plat dipotong dengan ukuran 1 x 10² 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.

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 R_f untuk mengetahui golongan senyawanya.

Noda tidak dapat teramati pada panjang gelombang 254 nm karena plat KLT yang mengalami fluoresensi, sedangkan noda tidak mengalami fluoresensi. Pada panjang gelombang 366 nm, plat KLT tidak mengalami fluoresensi, sedangkan noda mengalami fluoresensi, sehingga penampakan noda dapat teramati dengan jelas (Gandjar dan Rohman, 2012).

Identifikasi dengan Kromatografi Lapis Tipis 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 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 (Sudjadi, 1988 dalam Zahro, 2011).

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).

4.5.1 Terpenoid

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

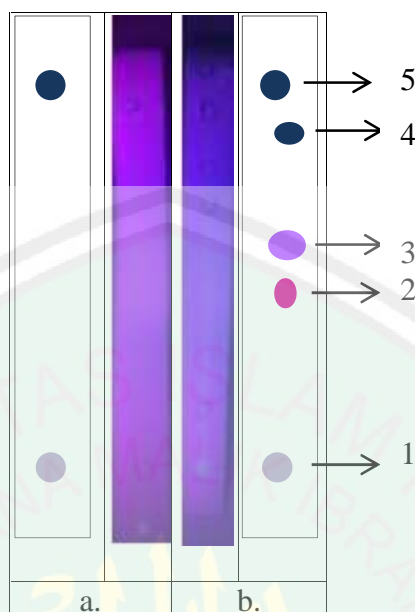
Penggunaan berbagai macam campuran eluen dapat memisahkan senyawa terpenoid yang terkandung dalam akar Widuri. Laju rambat tergantung kepada sifat pelarut (fase gerak) dan struktur lapisan (fase diam). Kemiripan sifat antara fasa gerak dan sampel dapat memberikan pemisahan terbaik (Milyasari, 2010).

Pemisahan terbaik dihasilkan dari eluen yang dapat memisahkan senyawa dengan jumlah yang banyak. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya noda yang tidak berekor dan pemisahan nodanya jelas.

Tabel 4.5 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

Eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) mampu memisahkan senyawa terpenoid yang terkandung dalam akar Widuri. Hal ini ditunjukkan dengan munculnya 5 noda yang tidak berekor. Dilihat dari komposisinya, n-heksana dan etil asetat memiliki sifat kepolaran yang hampir sama. n-heksana bersifat non polar, sedangkan etil asetat bersifat semipolar dan terpenoid bersifat non polar. Kemiripan sifat keduanya menyebabkan senyawa terpenoid mengikuti laju alir dari fase gerak. 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 4.9 Hasil KLT golongan senyawa terpenoid 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 4.6 Hasil KLT senyawa terpenoid dengan eluen n-heksana:etil asetat (2 : 8)

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 memiliki kemiripan sifat kepolaran. n-heksana bersifat non polar dan etil asetat bersifat semipolar. Hal ini dibuktikan dengan nilai konstanta dielektrik etil asetat (6,02) yang lebih besar dibandingkan n-heksana (1,89). 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 gerak cenderung bersifat non polar. Noda dengan nilai Rf yang rendah (0,19) bersifat lebih polar dibandingkan dengan nilai Rf yang tinggi (0,68 – 0,99). Senyawa dengan nilai Rf yang rendah memiliki koefisien distribusi besar karena senyawa tertahan kuat pada fase diamnya (polar) dibandingkan fase gerak (non polar). Dengan kata lain, $C_{stationer} > C_{mobile}$. Begitupun berlaku kebalikannya.

Identifikasi golongan terpenoid menggunakan Kromatografi Lapis Tipis dengan campuran eluen n-heksana : etil asetat (2 : 8) menghasilkan 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.

Noda tidak nampak pada 254 nm karena pada tersebut hanya menyerap golongan khas dari aromatik, dan karbonil tak jenuh dan sistem terkojugasi (Kvangarsnes, 2009). Sedangkan senyawa terpenoid bukan merupakan hidrokarbon aromatik dan bukan merupakan sistem terkonjugasi.

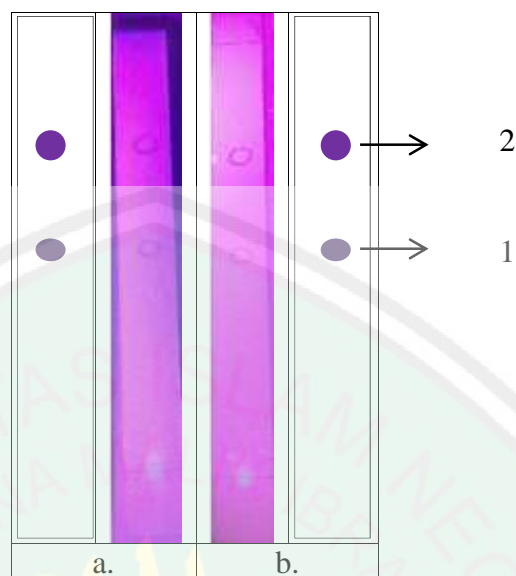
4.5.1 Saponin

Hasil identifikasi golongan senyawa saponin dengan Kromatografi Lapis Tipis menggunakan 5 variasi campuran eluen. Tiap-tiap campuran eluen memberikan pola pemisahan dan penampakan noda yang berbeda-beda ditunjukkan pada Tabel 4.7.

Tabel 4.7 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

Campuran eluen kloroform : aseton (4 : 1) menghasilkan 2 buah noda yang terpisah dengan sangat baik. Pola noda yang terbentuk berbentuk bundar dan tidak berekor. Dilihat dari komposisinya, kloroform dan aseton memiliki sifat kepolaran yang berbeda. Kloroform bersifat non polar, sedangkan aseton bersifat polar. Perbandingan kloroform yang lebih besar menyebabkan fase gerak cenderung bersifat non polar. Senyawa saponin dapat terpisah karena memiliki kesamaan sifat dengan fase geraknya, sehingga mengikuti laju alir dari fase gerak. Penampakan noda pada panjang gelombang 366 nm adalah warna ungu. Hasil pemisahan dengan eluen kloroform : aseton (4 : 1) ditunjukkan pada Gambar 4.10.



Gambar 4.10 Hasil KLT golongan senyawa saponin 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 4.8 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. Hal ini dapat dilihat dari nilai konstanta dielektrik aseton (20,7) yang lebih besar daripada kloroform (4,81). 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 gerak bersifat non polar. Noda dengan nilai Rf yang rendah (0,5) bersifat lebih polar dibandingkan dengan nilai Rf yang tinggi (0,75). Senyawa dengan nilai Rf yang rendah memiliki koefisien distribusi besar karena senyawa tertahan kuat pada fase diamnya (polar) dibandingkan fase gerak (non polar). Dengan kata lain, $C_{stationer} > C_{mobile}$. 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.

4.6 Pemanfaatan Tanaman Widuri dalam Perspektif Islam

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

إِنَّ فِي خَلْقِ السَّمَوَاتِ وَالْأَرْضِ وَاخْتِلَافِ اللَّيْلِ وَالنَّهَارِ لَآيَاتٍ لِّأُولِي الْأَلْبَابِ ﴿١٩٠﴾

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:

أَوَلَمْ يَرَوْا إِلَى الْأَرْضِ كَمْ أَنْبَتْنَا فِيهَا مِنْ كُلِّ زَوْجٍ كَرِيمٍ ﴿٧﴾

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 beserta 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 أُصِيبَ دَوَاءُ الدَّاءِ بَرَأَ 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 *لِكُلِّ دَاءٍ دَوَاءٌ* tersebut bisa 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 itupun tak akan sembuh (Al Jauziyah, 2002).

Pada penelitian ini diperoleh dosis efektif untuk dapat menghambat pertumbuhan parasit malaria, yaitu sebesar 4,26 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 ED₅₀ sebesar 4,45 mg/Kg BB dimana pada dosis tersebut dapat menghambat pertumbuhan parasit *Plasmodium berghei*.

BAB V

PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah:

1. Efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80 % akar tanaman Widuri (*Calotropis gigantea*) dalam menghambat pertumbuhan *Plasmodium berghei* pada mencit secara *in vivo* adalah sangat baik dengan nilai ED₅₀ sebesar 4,26 mg/Kg BB.
2. Golongan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak etanol 80 % akar Widuri (*Calotropis gigantea*) berdasarkan hasil identifikasi menggunakan uji reagen adalah golongan senyawa terpenoid dan saponin. Hasil identifikasi menggunakan Kromatografi Lapis Tipis menunjukkan bahwa eluen terbaik golongan senyawa terpenoid adalah n-heksana : etil asetat (2 : 8) yang menghasilkan penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm dengan pereaksi Lieberman-Burchard, sedangkan eluen terbaik senyawa saponin dengan eluen terbaik kloroform : aseton (4 : 1) dengan penampakan warna ungu pada panjang gelombang 366 nm dengan pereaksi H₂SO₄ 0,1 M.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80% akar Widuri (*Calotropis gigantea*), seperti:

1. Penentuan efektivitas antimalaria ekstrak etanol 80% akar Widuri (*Calotropis gigantea*) dengan meningkatkan dosis ekstrak atau menggunakan kombinasi

dengan obat malaria (klorokuin atau artemisin) atau dengan tumbuhan lain yang diketahui efektif sebagai antimalaria.

2. Pemisahan dan identifikasi senyawa aktif menggunakan instrumen UV-Vis, FTIR, LC-MS dan NMR.



DAFTAR PUSTAKA

- Agustina, L. 2004. *Dasar Nutrisi Tanaman*. Jakarta: Rineka Cipta
- Al Jauziyah, I. Q. 2002. *Praktek Kedokteran Nabi*. Yogyakarta: Hikam Pustaka
- Al Najjar, Z. R. 2010. *Buku Induk Mukjizat Ilmiah Hadits Nabi*. Jakarta: Zaman
- Aryanti, T.M. Ermayanti, K.I. Prinadi dan R.M. Dewi. 2006. Uji Daya Antimalaria *Artemisia* spp. Terhadap *Plasmodium falciparum*. *Majalah Farmasi Indonesia* 7 (2): 81 – 84
- Baeti, D.N. 2010. Efek Terapi Kombinasi Klorokuin dan Serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap Ekspresi Gen ICAM-1 pada Mencit Swiss Yang Diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret
- Banfi, G., Salvaqno, G.L. dan Lippi, G. 2007. The Role Of Ethylenediamine Tetraacetic Acid (EDTA) As *In Vitro* Anticoagulant For Diagnostic Purposes. Italy: IRCCS Galeazzi and Chair of Clinical Biochemistry, School of Medicine, University of Milan, Milano
- Barus, T., Lenny, S. dan Sitopu, E.Y. 2010. Isolasi Senyawa Alkaloid dari Daun Sidaguri (*Sida rhombifolia* L.). *Jurnal Kimia Mulawarman*. Vol. 8. No. 1. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Bogoriani, N.W., Santi S.R. dan Asih, R.A. 2007. Isolasi Senyawa Sitotoksik Dari Daun Andong (*Cordyline terminalis* Kunth). *Jurnal Kimia*. Volume 1, Nomor 1: 1 – 6
- Brown, S.H. 2010. *Calotropis gigantea*. Florida: Department of Agriculture, Cooperative Extension Service, University of Florida.
- Coutrier, F. 2008. *Propagasi Malaria in vivo Penggunaan Hewan Coba dalam Penelitian Malaria*. Eijkman: Lembaga Biologi Molekul
- Dewi, K.L. 2007. Kajian Ekstrak Umbi Gadung (*Dioscorea hispida*), Biji Rerak (*Sapindus rarak*) dan Biji Sirsak (*Annona muricata* L.) Sebagai Bahan Pengawet Alami Kayu. *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Fakultas Kehutana Institut Pertanian Bogor.
- Ekasari, W., Widyawaruyanti, A. dan Hafid, A.F. 2005. Uji Antimalaria Hasil Fraksinasi Ekstrak Kloroform Daun *Siamea* pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Laporan Penelitian* Tidak Diterbitkan. Surabaya: Fakultas Farmasi Universitas Airlangga

- Ellizar dan Maaruf., Y. 2009. Isolasi Flavonoid dan Uji Bioaktivitas dari Terung Pirus (*Chypomandra betacea* (Cav.) Sendtn). *Sainstek Vol. XII, Nomor 1*
- Fachriyah, E., Titis, M. dan Kusriani, D. 2013. Isolasi, Identifikasi dan Uji Aktivitas Senyawa Alkaloid Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis). *Chem Info*. Vol. 1. No. 1. Semarang: Universitas Diponegoro
- Felicia. 2009. Efek Neuroterapi Ekstrak Akar *Acalypha indica* L. Terhadap Katak Bufo Dosis 20 mg dan 25 mg. *Skripsi* Diterbitkan. Jakarta: Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia
- Gandjar, I.G. dan Rohman, A. 2012. *Analisis Obat Secara Spektrofotometri dan Kromatografi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Goeswin, A. 2007. *Teknologi Bahan Alam*. Bandung: ITB Press
- Gritter, R.J., Bobbitt, J.M. dan Schwarting, A.E. 1991. *Pengantar Kromatografi Edisi Kedua*. Bandung: Penerbit ITB
- Halimah, N. 2010. Uji Fitokimia dan Uji Toksisitas Ekstrak Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) Terhadap Larva Udang (*Artemia salina* Leach). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Harborne, J. B. 1996. *Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan*. Bandung: Penerbit ITB
- Hayati, E.K., Jannah, A. dan Ningsih R. 2012. Identifikasi Senyawa dan Aktivitas Antimalaria *In Vivo* Ekstrak Etil Asetat Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.). *Molekul* Vol. 7 No.1. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Herintsoa, R., Robijaona RB, R.A.S., Rasoamahanina AM., R.E.K.F., Rakotoarimanana, H., Rakotondrabe. MH., Raminosoa, M., Rakotozafy, A., Ranaivoravo, J., Rajanoarison, JF., Ratsimamanga, S., Gatson, LT., Gauthier, KM., Solomon, D. dan Jacob, O.M. 2005. *Screening of Plant Extracts for Searching Antiplasmodial Activity*. 11th Madagascar: NAPRECA Symposium Book of Proceedings, Antananarivo
- Inayah, F. 2011. Isolasi Dan Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Ekstrak Metanol Tanaman Anting-Anting (*Acalypha indica* Linn.). *Skripsi* Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Lenny, S. 2006. Uji Bioaktivitas Kandungan Kimia Utama Puding Merah dengan Metode *Brine Shrimp*. Medan: Universitas Sumatera Utara
- Khopkar, S.M. 2010. *Konsep Dasar Kimia Analitik*. Jakarta: UI Press

- Kristianingsih. 2005. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Terpenoid dari Akar Tanaman Kedondong Laut (*Polyscias frut icosia*). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: FMIPA Universitas Brawijaya
- Kumar, S.P., Suresh dan Kalvathy, S. 2013. *Review on a Potential Herb Calotropis gigantea* Linn. Annamalai University
- Kusuma. 2011. Uji Efektivitas Akar Kayu Kuning (*Coscinium fenestratum* Colebr) sebagai Antimalaria pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Tesis* Tidak Diterbitkan. Bandung: ITB
- Kusumawardhani, D., Widyawaruyanti, A. dan Kusumawati, I. 2005. Efek Antimalaria Ekstrak Sambiloto Terstandar (Parameter Kadar Aandrografolida) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*. *Majalah Farmasi Airlangga*. Vol.5. No.1. Surabaya: Ilmu Bahan Alam Fakultas Farmasi Universitas Airlangga
- Kvangarsnes, S.K. 2009. Phytochemical Observations on European Mistletoe (*Viscum album* L.). *Thesis*. Norway: University of Bergen
- Mainasara, M.M., Aliero, B.L. dan Yakubu, M. 2012. *Phytochemical and Antibacterial Properties of Root and Leaf Extract of Calotropis gigantea*. Nigeria: Usmanu Danfodiyo University
- Marianne, Y. dan Rosnani. 2011. Antidiabetic Activity From Ethanol Extract of Kluwih's Leaf (*Artocarpus camansi*). *Jurnal Natural*. Universitas Syiah Kuala, Darussalam, Banda Aceh
- Marliana, S.D., Suryanti, V. dan Suyono. 2005. Skrinning Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*. Vol. 3. No.1. Surakarta: FMIPA Universitas Sebelas Maret
- Milyasari, C. 2010. Isolasi Senyawa Antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *E. coli* dari Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi* L.). *Skripsi* Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Mudi, S.Y. dan Bukar, A. 2011. *Antiplasmodia Activity of Leaf Extracts of Calotropis procera* Linn. Nigeria: Biochemistry Vol. 23, No. 1
- Muhammad, M.H.M. 2007. *Mukjizat Kedokteran Nabi Berobat dengan Rempah dan Buah-buahan*. Jakarta: Qultum Media
- Muti'ah, R., Enggar, L., Winarsih, S., Soemarmo dan Simamora, D. 2010. Kombinasi Ekstrak Batang Talikuning (*Anamirta cocculus*) dan Artemisin sebagai Obat Antimalaria Terhadap *Plasmodium berghei*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*

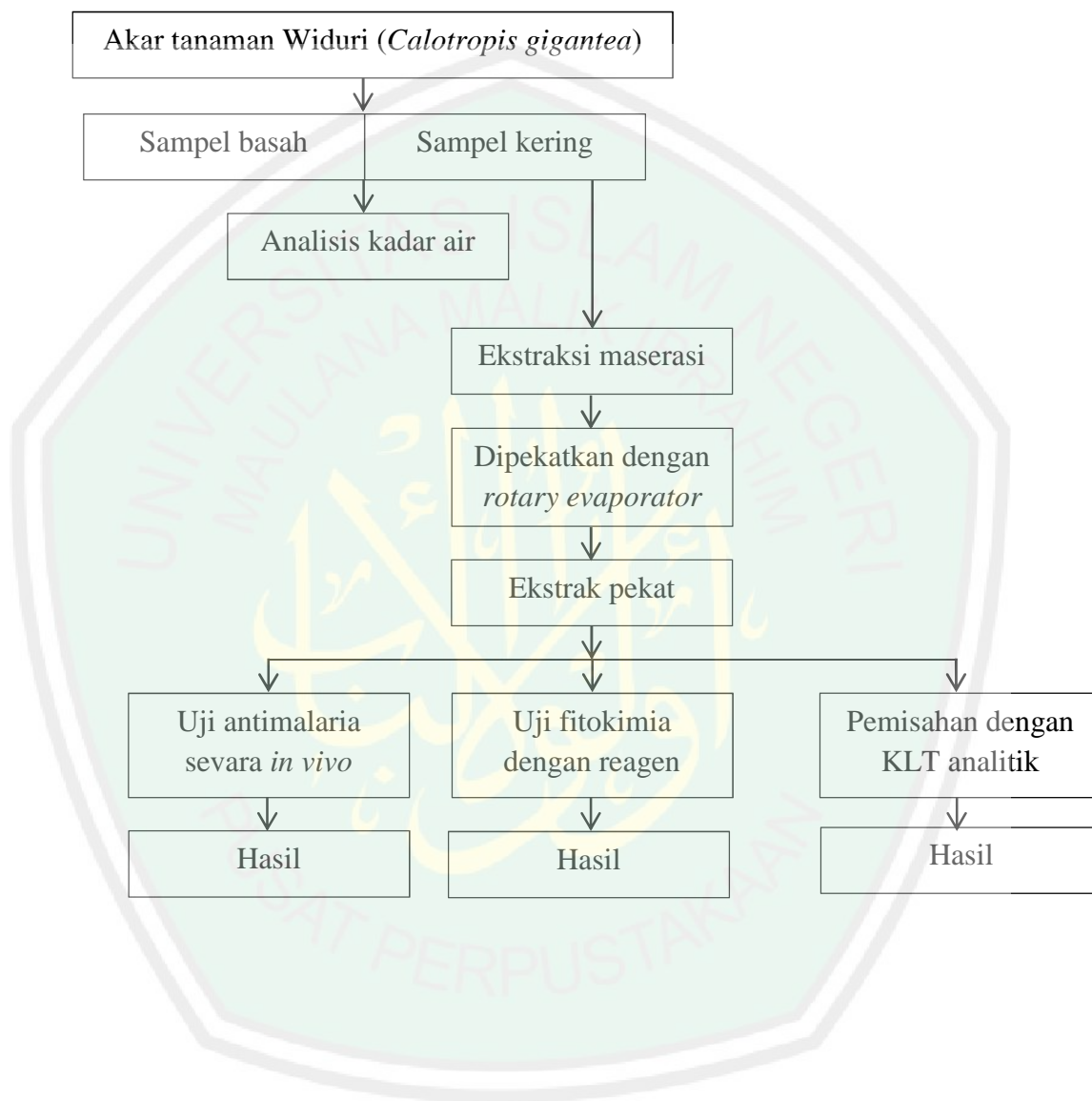
- Muti'ah, R. 2010. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Batang Talikuning (*Anamirta cocculus*) dan Kombinasinya dengan Artemisin pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 10. No. 26. Malang: Program Pascasarjana FKUB
- Muti'ah, R., Hayati, E. K. dan Bayyinah, I. 2012. Potensi Antimalaria Ekstrak Diklorometana Daun Bunga Matahari (*Helianthus annuus* L.) Secara *In Vivo* Pada Hewan Coba. *Saintis*. Vol. 1. No. 2. Malang: UIN Maliki Malang
- Nadia. 2010. Aktivitas Antimalaria secara *In Vivo* dari Senyawa Triterpenoid Ekstrak Diklorometan Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) dan Identifikasinya menggunakan Spektrofotometer UVVis dan IR. *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Nuraini, F. 2002. Isolasi dan Identifikasi Tanaman Daun Gamal (*Gliricidia selum* (jackquin) Kunth ex Walp.). *Skripsi* Tidak Diterbitkan. Malang: FMIPA Universitas Brawijaya
- Nurmillah, O.Y. 2009. Kajian Aktivitas Antioksidan dan Antimikroba Ekstrak Biji, Kulit Buah, Batang dan Daun Tanaman Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L.). *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor
- Octavia, D.R. 2009. Uji Aktivitas Penangkap Radikal Ekstrak Petroleum Eter, Etil Asetat, dan Etanol Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen) Dengan Metode DPPH (2,2-difenil-1-pikrihidrazil). *Skripsi* Diterbitkan. Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta
- Pangestu, A. dan Handayani, S.W. 2011. *Rotary Evaporator dan Ultraviolet Lamp*. Bogor: Institut Pertanian Bogor
- Praptiwi dan Chairul. 2008. *Pengaruh Pemberian Ekstrak Pauh Kijang (Irvingia malayana Oliv ex. A. Benn) terhadap Tingkat Penurunan Parasitemia pada Mencit Yang Diinfeksi Plasmodium berghei*. Surakarta: FMIPA UNS
- Purba, D.M. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Alkaloid dari Umbi Bawang Sabrang (*Eleutherinae bulbos*). *Skripsi* Diterbitkan. Medan: Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara
- Puspita, M.D.A. 2009. Pengoptimuman Fase Gerak KLT Menggunakan Desain Campuran untuk Pemisahan Komponen Ekstrak Meniran (*Phyllanthus niruri*). *Skripsi* Diterbitkan. Bogor: FMIPA IPB
- Priyanto. 2009. *Toksikologi*. Depok: Leskon
- Raharjo, T.J. 2013. *Kimia Hasil Alam*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar

- Ranggaditya, D. 2010. Aktivitas Antimalaria Ekstrak Etanol 80% Kulit Batang dan Daun *Artocarpus Altilis* (Park.) Fosberg (Sukun) pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium Berghei* Secara *In Vivo*. *Skripsi* Diterbitkan. Surabaya: Universitas Airlangga
- Ravi, R.G., Harikesh D., Chandrasehar, T.R., Pramod, Y.G. dan Angad, P.M. 2011. Cytotoxic Activity of Ethanolic Root Extract of *Calotropis gigantean* Linn. *International Journal of Drug Development and Research*. Netherland
- Robinson, T. 1995. *Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi*. Bandung: Penerbit ITB
- Sa'adah. L. 2010. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Tanin dari Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa blimbi* L.). *Skripsi* Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim
- Saifudin, A., Rahayu, V. dan Teruna, H.Y. 2011. *Standarisasi Bahan Obat Alam*. Yogyakarta: Graha Ilmu
- Sastrohamidjojo, H. 1985. *Kromatografi*. Yogyakarta: UGM Press
- Savitri, E.S. 2008. *Rahasia Tumbuhan Berkhasiat Obat Perspektif Islam*. Malang: UIN Press
- Shihab, Q. 2005. *Tafsir al Mishbah Pesan, Kesan dan Keserasian al Quran Vol. 10*. Jakarta: Penerbit Lentera Hati
- Sirait, M. 2007. *Penuntun Fitokimia Dalam Farmasi*. Bandung: Penerbit ITB
- Sriwahyuni, I. 2010. Uji Fitokimia Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* L.) dengan Variasi Pelarut dan Uji Toksisitas Menggunakan *Brine Shrimp* (*Artemia salina* Leach.). *Tugas Akhir* Diterbitkan. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim Malang
- Sudarmadji, S. 2003. *Teknik Analisis Biokimia*. Yogyakarta: Liberty Yogyakarta
- Sukandar, E.Y., Afriyanti, L.H., Adnyana, I.K dan Ibrahim, S. 2011. Aktivitas Antihiperurikemia Ekstrak Etil Asetat dan Etanol Buah Salak Varietas Bangkok (*Salacca edulis* Reinw) Pada Tikus Galur Wistar. *Jurnal Teknologi. dan Industri Pangan*. Volume 27, Nomor 1: 7 – 10
- Sundari, S., Sulaksono, E., Yekti, R.P. dan Subahagio. 1997. *Inokulasi Plasmodium berghei pada Beberapa Strain Mencit*. Jakarta: Cermin Dunia Kedokteran
- Suryanti, V., Martiana, S.M. dan Kristinawati, D. 2005. Komponen Kimia Buah Pare Belut (*Trichosanthes anguina* L.). *Jurnal Alchemy*. Volume 4, Nomor 2: 28–34

- Suryawati, S. dan Suprapti, H. 2007. Efek Antimalaria Ekstrak Brotowali (*Tinospora crispa*) pada Mencit Yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*. *Wijaya Kusuma*. Vol. 1. No. 1
- Utami, P. 2008. *Buku Pintar Tanaman Obat*. Jakarta: Agromedia Pustaka
- Utami, T. S., Arbianti, R., Hermansyah, H. dan Reza, A. 2009. Perbandingan Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Simpur (*Dillenia indica*) dari Berbagai Metode Ekstraksi dengan Uji ANOVA. *Seminar Nasional Teknik Kimia*. Bandung: Universitas Indonesia
- WHO. 2001. *Guidlines for The Treatment of Malaria*.
- Widjajanti, N. 1998. *Obat-obatan*. Yogyakarta: Kanisius
- Widoyono. 2011. *Penyakit Tropis: Epidemiologi, Penularan, Pencegahan dan Pemberantasannya Edisi Kedua*. Jakarta: Erlangga
- Widyowati R. dan Rahman, A. 2010. Kandungan Kimia dan Aktivitas Antimikroba Ekstrak *Garcinia celebica* I. terhadap *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* dan *Candida albicans*. *Majalah Farmasi Airlangga*. Vol. 8 No.2
- Winarno, F.G. 2004. *Kimia Pangan dan Gizi*. Jakarta: Gramedia Pustaka Utama
- Zahro, I. M. 2011. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Triterpenoid Ekstrak n-heksana Tanaman Anting-anting (*Acalypha indica* Linn) Menggunakan Spektrofotometer UV-Vis dan FTIR. *Skripsi Tidak Diterbitkan*. Malang: UIN Maulana Malik Ibrahim
- Zulkoni, A. 2010. *Parasitologi*. Yogyakarta: Nuha Medika

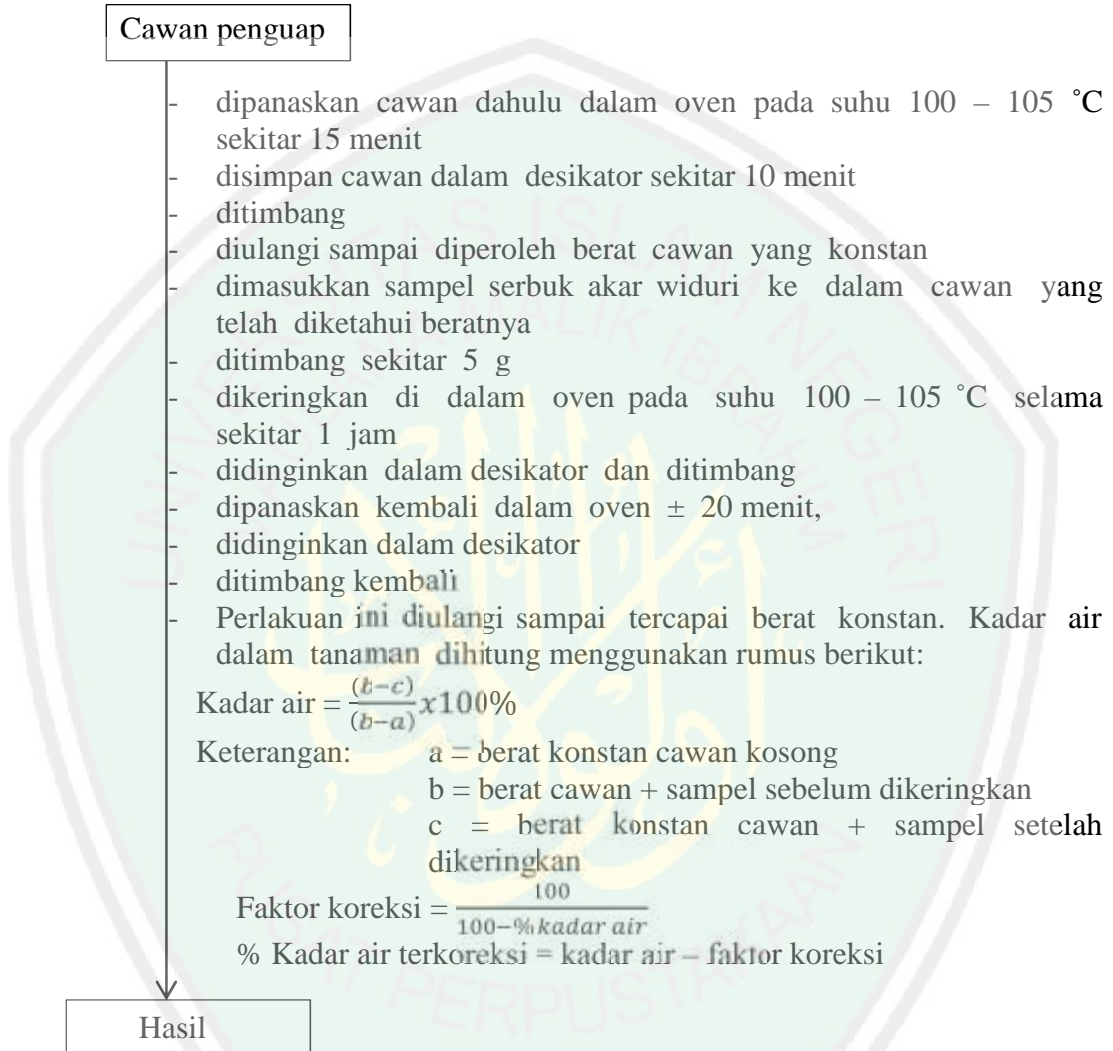
Lampiran 1. Diagram Alir

1.1 Tahapan Penelitian

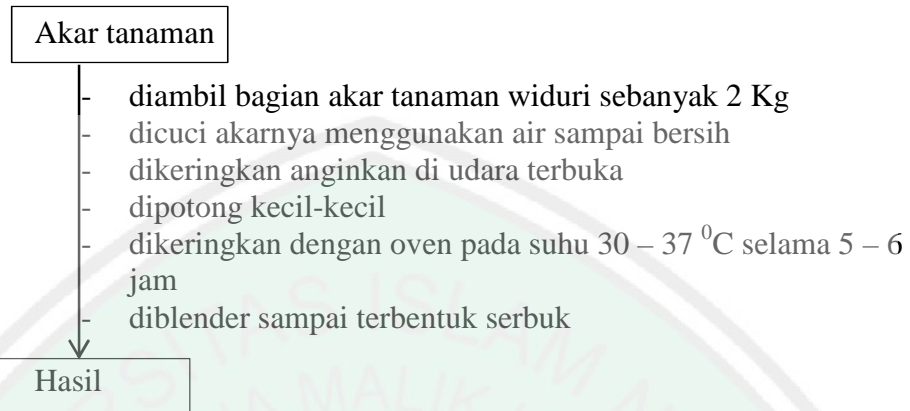


Lampiran 2. Skema Kerja

2.2.1 Analisis Kadar Air

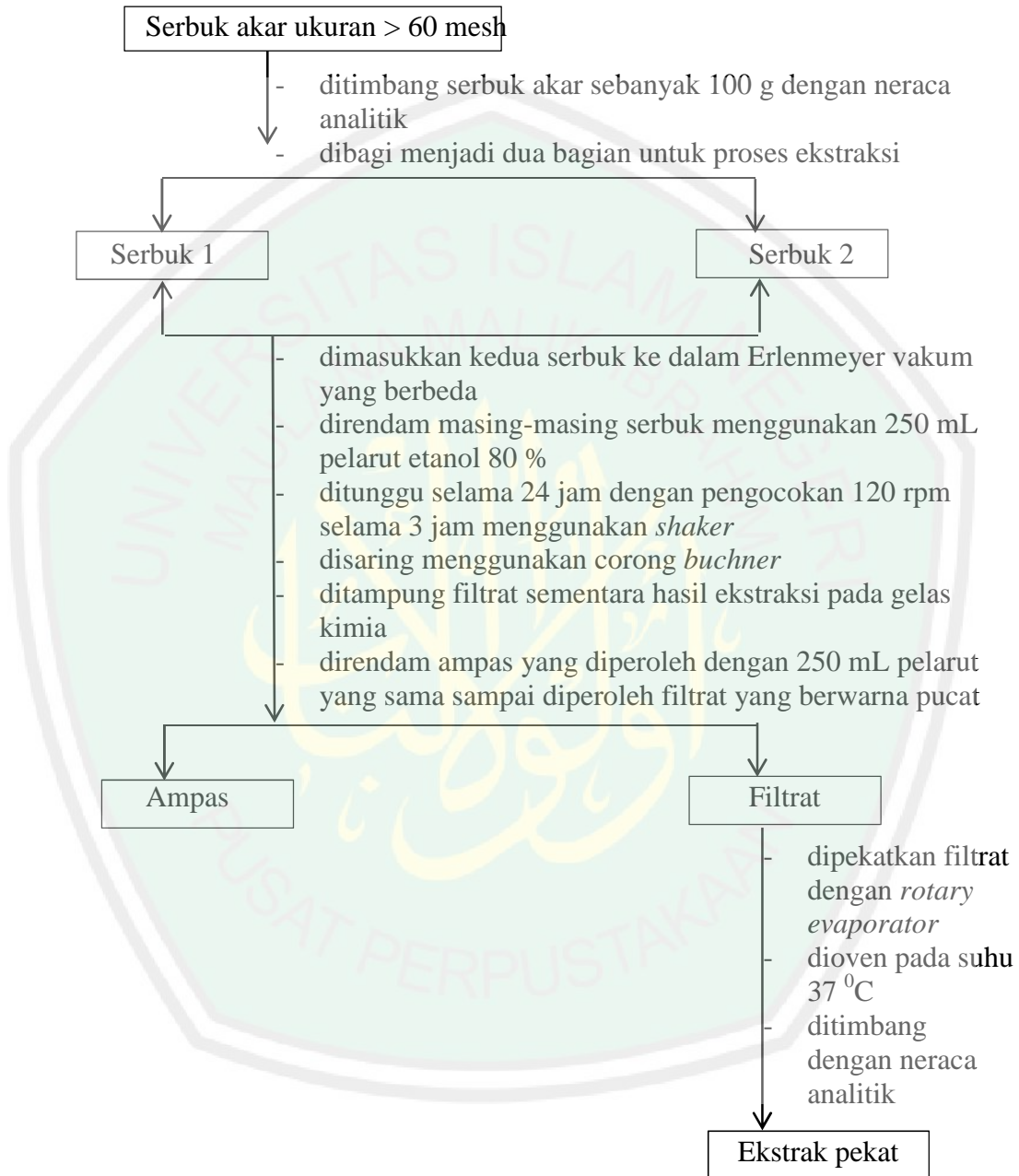


2.2.2 Preparasi Sampel



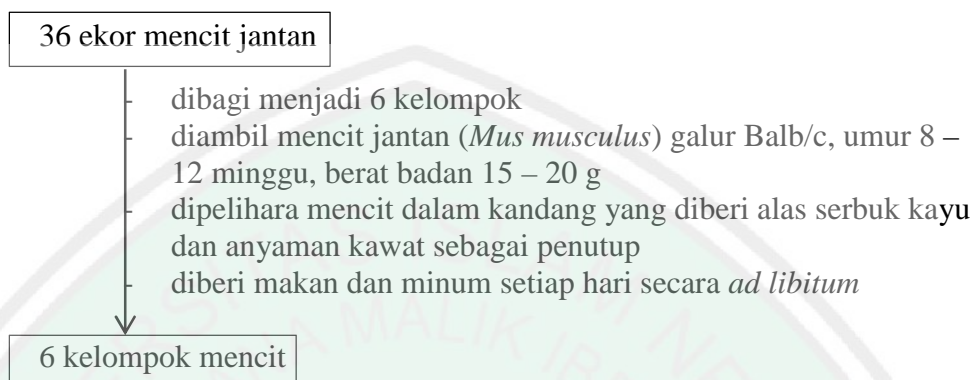
Dilakukan pemblanderan yang bertujuan untuk lebih memperkecil ukuran partikel dan untuk memperoleh serbuk halus dengan ukuran > 60 mesh (dilakukan pengayakan dengan ayakan 60 mesh) sehingga terbentuk serbuk yang homogen. Kemudian serbuk halus tersebut tersebut diekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 80%.

2.2.3 Ekstraksi Senyawa Aktif

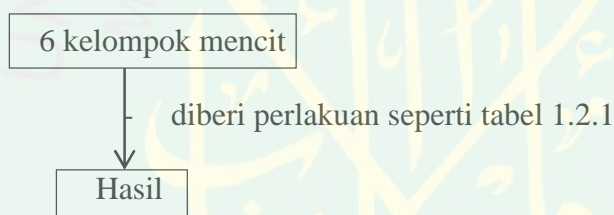


2.2.4 Uji Antimalaria

2.2.4.1 Persiapan Hewan Uji



2.2.4.2 Perlakuan Hewan Coba

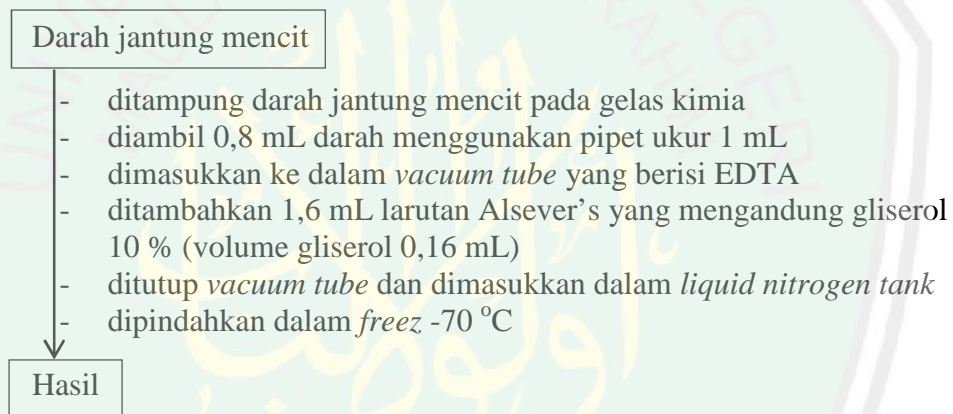


Tabel L.2.1. Perlakuan masing-masing Kelompok

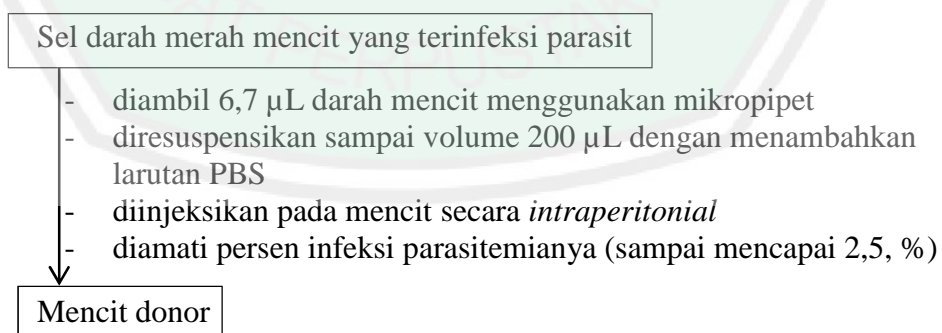
Kelompok	Perlakuan
Kelompok kontrol negatif	Diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dengan pemberian pelarut 0,5 mL CMC-Na 1% sekali sehari per oral.
Kelompok kontrol positif	Kelompok perlakuan klorokuin dosis 5,71 mg/Kg BB sekali sehari secara per-oral.
Kelompok non infeksi	Tanpa diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dengan pemberian pelarut 0,5 mL CMC-Na 1% sekali sehari per oral.
Kelompok widuri 1	Diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dan terapi ekstrak etanol widuri dosis 0,1 mg/Kg BB sekali sehari secara per oral.
Kelompok widuri 2	Diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dan terapi ekstrak etanol widuri dosis 1 mg/Kg BB sekali sehari secara per oral.
Kelompok widuri 3	Diinfeksi <i>Plasmodium berghei</i> dan terapi ekstrak etanol widuri dosis 10 mg/Kg BB sekali sehari secara per oral.

Pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* dilakukan dengan menggunakan metode Peter (Phillipson dan Wright, 1991 dalam Muti'ah, 2010). Terapi dilakukan ketika derajat parasitemia setelah infeksi mencapai 1 – 5 % yang dihitung sebagai hari ke-0. Terapi dilakukan setiap hari selama 4 hari. Pengamatan derajat parasitemia dilakukan setiap hari ke-0, hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4.

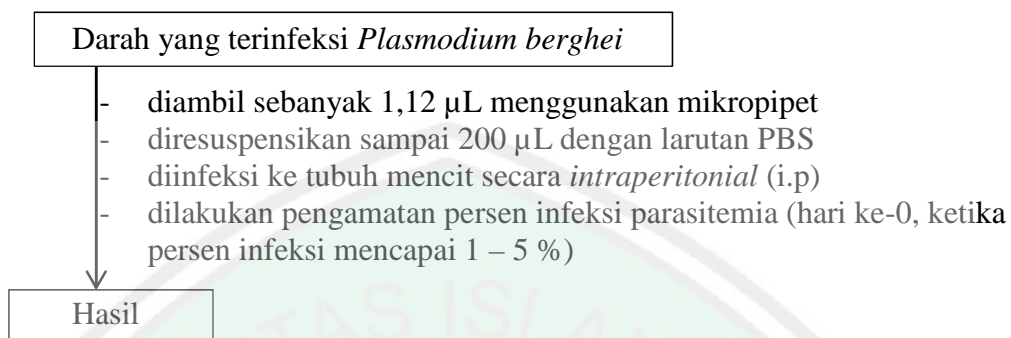
2.2.4.3 Freezing dan Thawing Isolat *Plasmodium berghei*



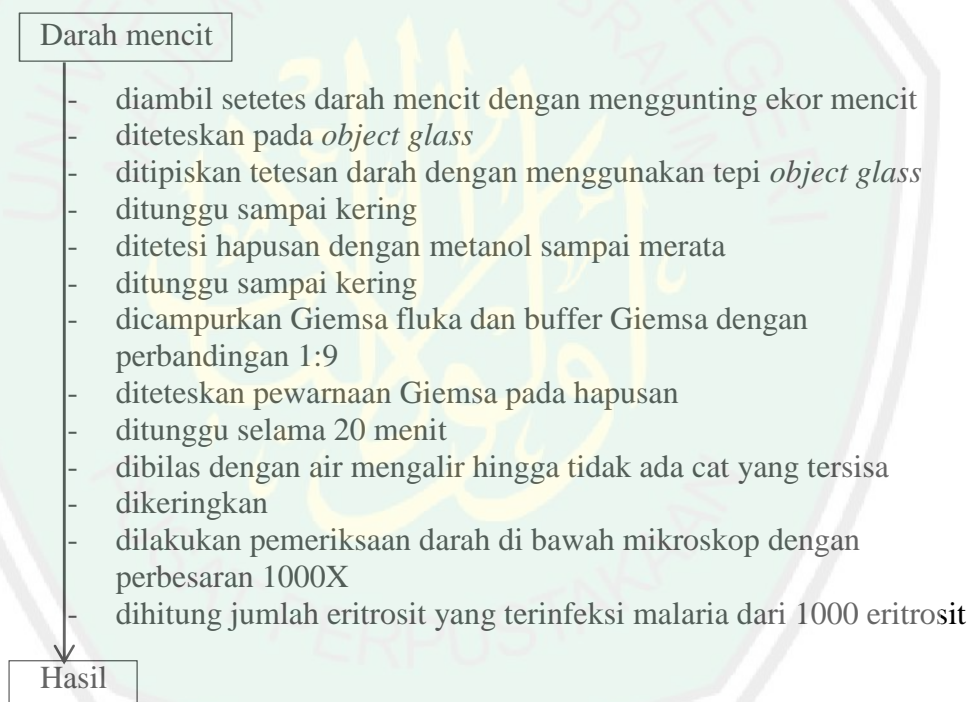
2.2.4.4 Pembuatan Donor



2.2.4.5 Inokulasi *Plasmodium berghei*



2.2.4.6 Pengukuran Derajat Parasitemia

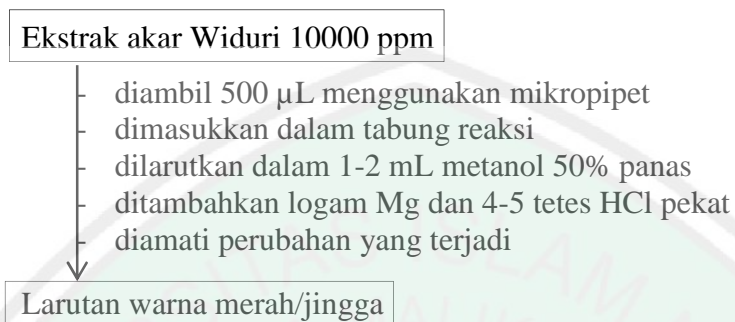


Persen penghambatan pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus berikut:

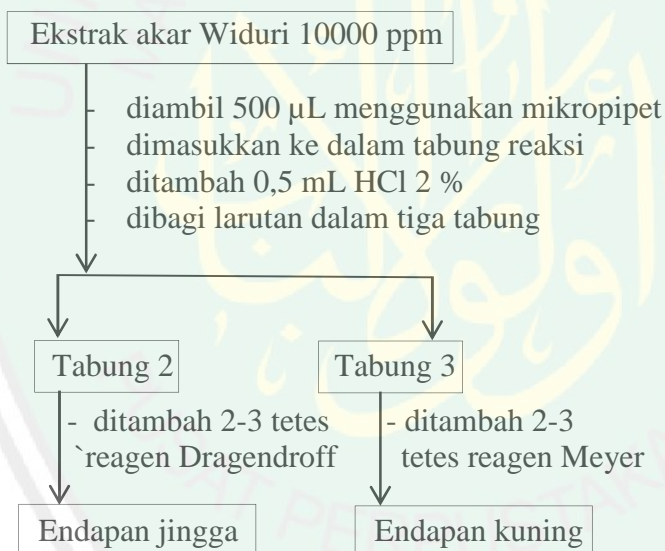
$$\% \text{ penghambatan} = \frac{(\text{parasitemia kontrol negatif} - \text{parasitemia obat ekstrak})}{\text{parasitemia kontrol negatif}} \times 100\%$$

2.2.5 Uji Fitokimia

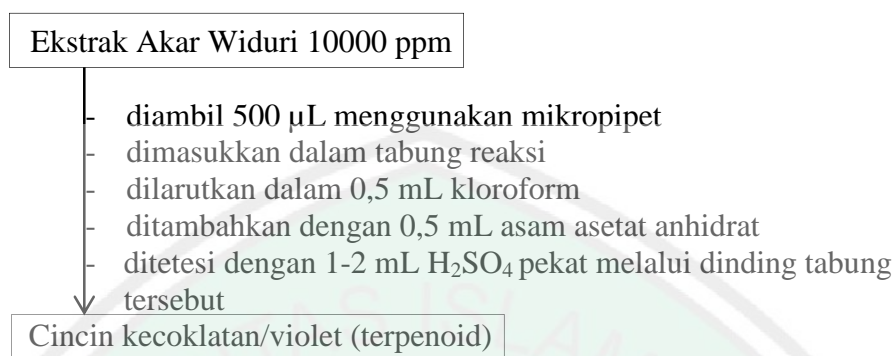
2.2.5.1 Flavonoid



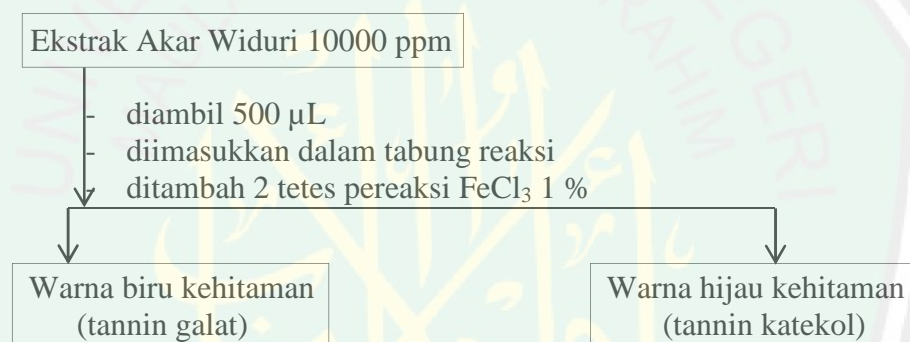
2.2.5.2 Alkaloid



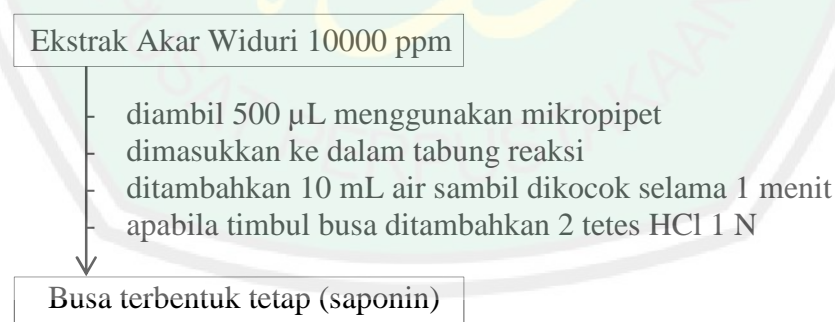
2.2.5.3 Uji Terpenoid



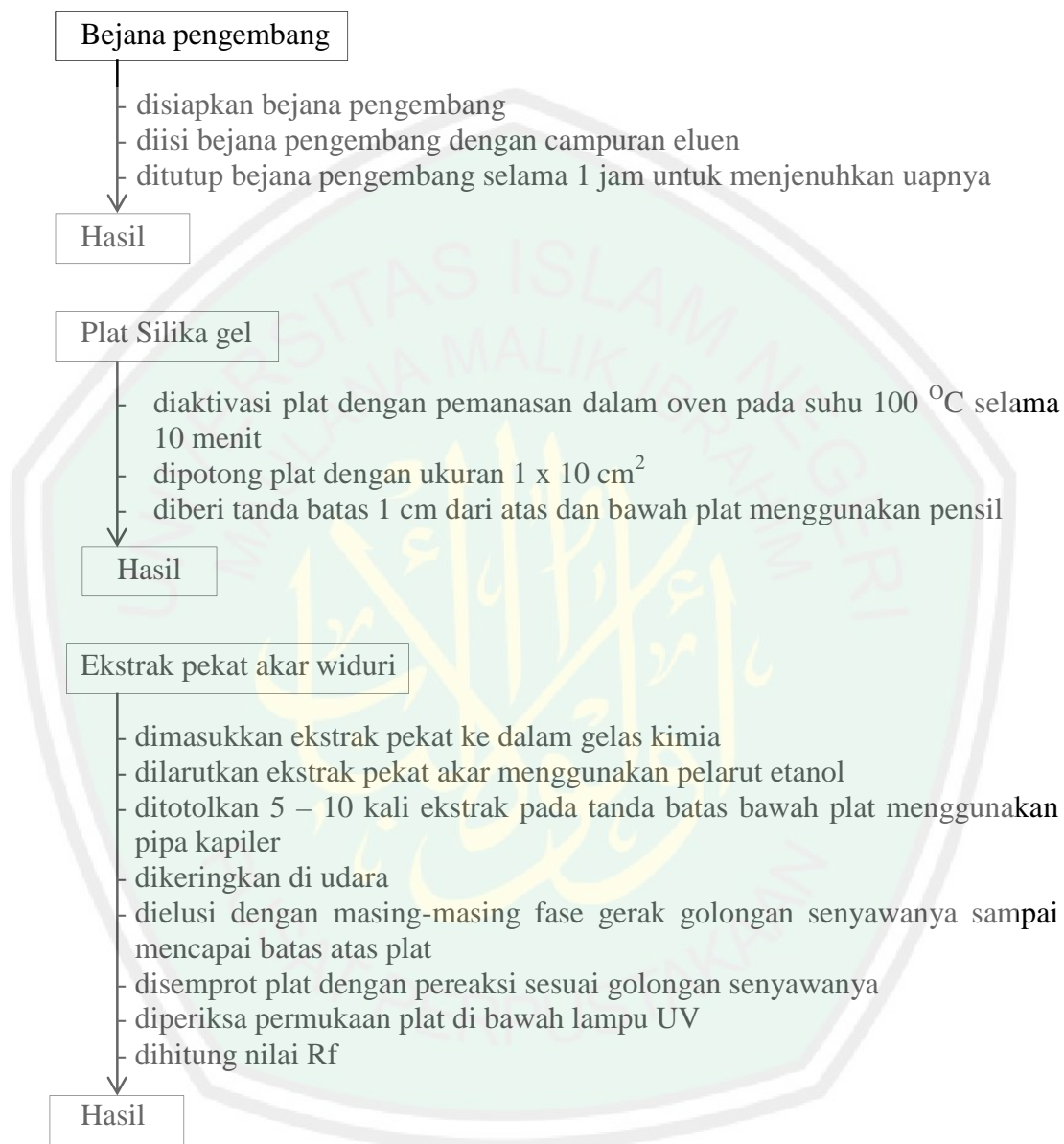
2.2.5.4 Uji Tanin



2.2.5.5 Uji Saponin



2.2.6 Pemisahan Senyawa Aktif dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Tabel L.2.2. Jenis fase gerak dan pendeteksi uji KLT untuk metabolit sekunder

Golongan Senyawa	Fase Gerak	Pendeteksi	Hasil Warna Noda
Flavonoid	metanol-kloroform (1:9) (Milyasari, 2010), etil asetat : metanol (7:3) (Ellizar dan Maaruf, 2009), etil asetat : metanol (8:2) (Ellizar dan Maaruf, 2009), etil asetat : metanol (9:1) (Ellizar dan Maaruf, 2009), n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) (Widyowati dan Rahman, 2010)	Uap amoniak	Biru kehijauan
Alkaloid	kloroform : metanol (9 : 1) (Barus, dkk., 2010), kloroform : etanol (9 : 1) (Ekasari <i>et al.</i> , 2005), metanol:kloroform (0,5:9,5) (Sriwahyuni, 2010), Kloroform : metanol (9 : 1) (Barus, dkk., 2010), etanol : etil asetat : n-heksana (1 : 2 : 30) (Fachriyah, dkk., 2013)	Reagen Dragendrof	Jingga
Terpenoid	n-heksana : etil asetat (1 : 1) dan kloroform : asam asetat (10 : 1) (Harborne, 1987), n-heksana : etil asetat (2 : 8) (Halimah, 2010), n-heksana : etil asetat (4 : 1) (Ekasari <i>et al.</i> , 2005), kloroform : asam asetat (4 : 1) (Widyowati dan Rahman, 2010)	Reagen Lieberman-Burchard	Ungu dan merah keunguan
Tanin	asam asetat glasial : air : asam klorida (30:10:3) (Hayati, dkk., 2010), butanol : asam asetat : air (14 : 1 : 5) (Harborne, 1987), asam asetat glasial : air : HCl (30 : 10 : 3) (Nuraini, 2002), kloroform : asam asetat : asam formiat (0,5 : 9 : 0,5) (Widyowati dan Rahman, 2010), n-butanol : asam asetat : air (4 : 1 : 5) (Sa'adah, 2010)	Penyemprot FeCl ₃ 1 %	Lembayung
Saponin	kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2) (Harborne, 1987), kloroform : metanol : air (20 : 60 : 10) (Kristianingsih, 2005), kloroform : metanol : air (3 : 1 : 0,1) dan kloroform metanol : air (14 : 6 : 1) (Bogoriani <i>et al.</i> , 2007), dan kloroform : aseton (4 : 1) (Suryanti, 2005)	H ₂ SO ₄ 0,1 M	Ungu gelap

Lampiran 3. Preparasi Reagen

3.1 Pembuatan Reagen Dragendorff

Pembuatan pereaksi Dragendorff untuk pereaksi penyemprot, dilakukan dalam 2 bagian larutan yang berbeda. Pada larutan A, ditimbang sebanyak 0,85 gr bismuth nitrat menggunakan neraca analitik. Kemudian, dilarutkan dalam campuran 40 mL aquades dengan 10 mL HCl dalam gelas kimia 100 mL (dilakukan dalam lemari asam). Pada larutan B, ditimbang sebanyak 8 gr kalium iodida menggunakan neraca analitik. Selanjutnya, dilarutkan dalam 20 mL aquades dalam gelas kimia 100 mL. Kemudian, dipipet masing-masing dari larutan A dan larutan B sebanyak 5 mL menggunakan pipet volume. Selanjutnya, dicampurkan dengan 20 mL HCl (dilakukan dalam lemari asam) dan di tandakan dengan aquades hingga 100 mL dalam labu ukur 100 mL (Depkes, 1989).

3.2 Pembuatan Reagen Mayer

Larutan I. HgCl_2 1,358 gr dalam aquades 60 mL

Larutan II. KI 5 gr dalam aquades 10 mL

Cara pembuatannya adalah larutan I dibuat dengan menimbang HgCl_2 1,358 gr dengan neraca analitik kemudian dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan menambahkan aquades 60 mL. Larutan II dibuat dengan menimbang KI 5 gr dengan neraca analitik kemudian dimasukkan dalam gelas kimia 250 mL dan dilarutkan dengan menambahkan aquades 10 mL. Masing-masing dilakukan pengadukan dengan pengadul gelas sampai larut sempurna. Selanjutnya larutan I dituangkan ke dalam larutan II dan dihomogenkan dengan

pengadukan dengan menggunakan pengaduk gelas. Setelah kedua larutan homogen, campuran larutan tersebut dipindahkan dalam labu takar 100 mL dan diencerkan dengan aquades sampai tanda batas (Manan, 2006).

3.3 Pembuatan Larutan Limberman-burchard

Asam sulfat pekat	5 mL
Anhidridat asetat	5 mL
Etanol absolut	50 mL

Cara pembuatannya adalah disiapkan 5 mL anhidrida asetat dan 5 mL asam sulfat pekat masing-masing dalam gelas kimia 50 mL (dilakukan dalam lemari asam). Kemudian ditambahkan secara hati-hati melalui dinding erlenmeyer yang berisi etanol absolut 50 mL, kemudian didinginkan dalam lemari pendingin. Penggunaan reagen ini digunakan langsung setelah pembuatan (Wagner, 2001).

3.4 Pembuatan Larutan CMC-Na 1%

Serbuk CMC-Na ditimbang sebanyak 1 gr dengan neraca analitik, dimasukkan dalam gelas kimia 100 mL dan dilarutkan dengan aquades hangat \pm 25 mL (dilakukan pengadukan dengan pengaduk gelas sampai larut sempurna). Setelah larut semua, dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan ditandabatkan dengan menambahkan pelarut aquades, sehingga diperoleh larutan CMC-Na 100 mL.

3.5 Pembuatan Larutan Buffer Giemsa

Pembuatan larutan buffer giemsa ini pertama-tama ditimbang bubuk giemsa sebanyak 1 g dengan menggunakan neraca analitik. Kemudian, 1 g bubuk giemsa

ini dicampurkan dengan 66 mL gliserin dalam gelas kimia 250 mL yang selanjutnya dimasukkan ke dalam oven selama 2 jam pada suhu 60 °C. Setelah inkubasi, campuran larutan tersebut kemudian ditambahkan dengan 66 mL metanol absolut dan diaduk (R.D Lilie dalam McLaughlin, 2004).

3.6 Pembuatan Larutan PBS (Phosphate Buffered Saline)

Pembuatan larutan PBS dilakukan dengan menimbang sebanyak 14,4 g natrium difosfat, 80 g natrium klorida, 2 g kalium klorida, 2,4 g kalium monofosfat dengan menggunakan neraca analitik. Kemudian, keseluruhan padatan tersebut dicampurkan yang selanjutnya dilarutkan dalam 800 mL aquades pada gelas kimia 1000 mL hingga tercampur dan larut secara keseluruhan sambil dilakukan pengadukan dengan batang pengaduk. Kemudian, campuran larutan tersebut ditambahkan asam klorida tetes per tetes untuk membuat pH 7,4 yang diukur menggunakan alat pH meter dan selanjutnya disterilkan (Harlow dan Lane, 2007).

3.7 Pembuatan Etanol 80 %

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$99 \% \times V_1 = 80 \% \times 500 \text{ mL}$$

$$V_1 = 404 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan etanol 99 % sebanyak 404 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 500 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.8 Pembuatan HCl 2 %

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$37 \% \times V_1 = 2 \% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl 37% sebanyak 0,5 mL dengan pipet ukur 1 mL (dilakukan dalam lemari asam), kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.9 Pembuatan Metanol 50 %

$$\%_1 \times V_1 = \%_2 \times V_2$$

$$99,8\% \times V_1 = 50\% \times 10 \text{ mL}$$

$$V_1 = 5 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan metanol 99,8% sebanyak 5 mL dengan pipet volum 5 mL (dilakukan dalam lemari asam), kemudian dimasukkan dalam labu ukur 10 mL yang berisi ± 5 mL aquades. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.10 Pembuatan FeCl₃ 1 %

$$\text{BM FeCl}_3 = 162,2 \text{ g/mol}$$

$$\text{Massa FeCl}_3 = \frac{1\% \times \text{BM FeCl}_3 \times V}{22,4}$$

$$= \frac{1\% \times 162,2 \frac{\text{gr}}{\text{mol}} \times 0,01 \text{ L}}{22,4}$$

$$= 0,072 \text{ gr} = 72 \text{ mg}$$

Jadi, untuk membuat larutan FeCl_3 1% adalah ditimbang sebanyak 72 mg serbuk FeCl_3 dengan neraca analitik, dimasukkan dalam gelas kimia 50 mL untuk dilarutkan dengan ± 3 mL aquades. Dilakukan pengadukan dengan pengaduk gelas sampai larut sempurna. Setelah larut, dipindahkan dalam labu takar 10 mL dan ditandabatkan dengan pelarut aquades.

3.11 Pembuatan H_2SO_4 0,1 M

$$\text{BJ H}_2\text{SO}_4 \text{ pekat} = 1,8 \text{ g/mL} = 1800 \text{ g/L}$$

$$\% \text{ Volume} = 98 \% (0,98)$$

$$\text{BM H}_2\text{SO}_4 = 98 \text{ g/mol}$$

Molaritas H_2SO_4 (M) :

$$\begin{aligned} \text{Massa H}_2\text{SO}_4 &= \text{BJ H}_2\text{SO}_4 \text{ pekat} \times \% \\ &= 1800 \text{ g/L} \times 0,98 \\ &= 1764 \text{ gr} \end{aligned}$$

$$\text{Mol H}_2\text{SO}_4 = \frac{\text{Massa H}_2\text{SO}_4}{\text{BM H}_2\text{SO}_4} = \frac{1764 \text{ gr}}{98 \text{ gr/mol}} = 18 \text{ mol}$$

$$\text{Konsentrasi H}_2\text{SO}_4 \text{ (M)} = \frac{\text{Mol H}_2\text{SO}_4}{\text{Volume H}_2\text{SO}_4} = \frac{18 \text{ mol}}{1 \text{ L}} = 18 \text{ M}$$

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$18 \text{ M} \times V_1 = 0,1 \text{ M} \times 50 \text{ mL}$$

$$V_1 = 0,27 \text{ mL} = 0,3 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan H_2SO_4 pekat 98% sebanyak 0,3 mL dengan pipet ukur 1 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 50 mL yang telah berisi ± 15 mL aquades melalui dinding labu ukur. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.12 Pembuatan Larutan HCl 1 N

$$\text{BJ HCl pekat} = 1,19 \text{ g/mL} = 1190 \text{ g/L}$$

$$\% \text{ Volume} = 37\% (0,37)$$

$$\text{BM HCl} = 36,42 \text{ g/mol}$$

$$n = 1 \text{ (jumlah mol ion H}^{\text{+}}\text{)}$$

Molaritas HCl (M) :

$$\text{Massa HCl} = \text{BJ HCl pekat} \times \%$$

$$= 1190 \text{ g/L} \times 0,37$$

$$= 440,3 \text{ gr}$$

$$\text{Mol HCl} = \frac{\text{Massa HCl}}{\text{BM HCl}} = \frac{440,3 \text{ gr}}{36,42 \text{ gr/mol}} = 12,09 \text{ mol}$$

$$\text{Konsentrasi HCl (M)} = \frac{\text{Mol HCl}}{\text{Volume HCl}} = \frac{12,09 \text{ mol}}{1 \text{ L}} = 12,09 \text{ M}$$

$$\text{Normalitas HCl} = n \times \text{Molaritas HCl}$$

$$= 1 \times 12,09 \text{ M}$$

$$= 12,09 \text{ N}$$

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

$$12,09 \text{ N} \times V_1 = 1 \text{ N} \times 100 \text{ mL}$$

$$V_1 = 8,27 \text{ mL} = 8,3 \text{ mL}$$

Cara pembuatannya adalah diambil larutan HCl pekat 37% sebanyak 8,3 mL dengan pipet ukur 10 mL, kemudian dimasukkan dalam labu ukur 100 mL yang telah berisi \pm 15 mL aquades melalui dinding labu ukur. Selanjutnya ditambahkan aquades sampai tanda batas dan dihomogenkan.

3.13 Pembuatan Larutan Alsever's (dalam g/100 mL)

NaCl	0,42 gr
Asam Sitrat 3Na.2H ₂ O	0,80 gr
Asam Sitrat H ₂ O	0,06 gr
Glukosa	2,05 gr

Keempat bahan tersebut dicampur dalam beaker glass 50 mL dan dilarutkan dengan sedikit aquades melalui proses pengadukan menggunakan pengaduk gelas. Setelah larut dimasukkan dalam labu takar 100 mL dan ditandabatkan dengan menambah aquades. Kemudian dihomogenkan sehingga diperoleh larutan alsever's 3,33 g/100 mL.

3.14 Penentuan 1,6 mL Alsever's yang Mengandung 10% Gliserol

$$\begin{aligned}
 10\% \text{ gliserol} \times 1,6 \text{ mL (alsever,s)} &= \frac{10}{100} \times 1,6 \text{ mL} \\
 &= 0,16 \text{ mL gliserol}
 \end{aligned}$$

Larutan gliserol sediaan, dipipet sebanyak 0,16 mL (160 μ L) dengan menggunakan pipet mikro (100 – 500 μ L). Kemudian dimasukkan dalam beaker glass 50 mL dan ditambahkan 1,44 mL larutan alsever's. Selanjutnya, kedua larutan dihomogenkan dan diperoleh larutan alsever's sebanyak 1,6 mL dan mengandung 10% gliserol.

3.15 Penentuan dan Perhitungan Dosis Ekstrak/Obat

3.15.1 Dosis Ekstrak Etanol Akar Widuri

Penentuan dosis ekstrak etanol akar widuri untuk mencit adalah sebagai berikut: Misalnya berat badan manusia 70 kg, maka dosis mencit adalah:

$$\text{Dosis 1} = 0,1 \text{ mg/Kg BB} \times 70 \text{ Kg} = 7 \text{ mg}$$

$$= 7 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,0182 \text{ mg/20 g BB}$$

$$= 0,00091 \text{ mg/g BB} = 0,001 \text{ mg/g BB}$$

$$\text{Dosis 2} = 1 \text{ mg/Kg BB} \times 70 \text{ Kg} = 70 \text{ mg}$$

$$= 70 \text{ mg} \times 0,0026 = 0,182 \text{ mg/20 g BB}$$

$$= 0,0091 \text{ mg/g BB} = 0,01 \text{ mg/g BB}$$

$$\text{Dosis 3} = 10 \text{ mg/Kg BB} \times 70 \text{ Kg} = 700 \text{ mg}$$

$$= 700 \text{ mg} \times 0,0026 = 1,82 \text{ mg/20 g BB}$$

$$= 0,091 \text{ mg/g BB} = 0,1 \text{ mg/g BB}$$

3.15.2 Dosis Klorokuin

Penentuan dosis klorokuin adalah sebagai berikut:

Dosis klorokuin untuk manusia adalah 400 mg. Penentuan dosis klorokuin dari sediaan obat *Resochin*, dimana tiap tablet mengandung 250 mg klorokuin fosfat sebagai berikut:

$$\text{Berat seluruh tablet klorokuin} = 303 \text{ mg}$$

$$\text{Dosis untuk manusia} = 400 \text{ mg/70Kg} = 5,71 \text{ mg/kg BB}$$

$$\text{Dosis untuk mencit dari sediaan obat} = \frac{250}{303} \times 5,71 \text{ mg/Kg BB} \times 0,0026$$

$$= 0,013 \text{ mg/20 g BB}$$

$$= 0,0006 \text{ mg/g BB}$$

Keterangan:

0,0026 diperoleh dari tabel perbandingan luas permukaan antara manusia dengan berat badan 70 kg dan mencit dengan berat badan 20 g.

Lampiran 4. Perhitungan Pengambilan Parasit

4.1 Pengambilan Parasit Dalam Darah Donor

Parasit yang akan diambil untuk diinjeksikan pada mencit yang lainnya adalah dengan mengasumsikan hematokrit pada mencit sebesar 60 % yang memiliki 6×10^9 sel darah merah/mL pada darahnya.

Ketika derajat parasitemia telah mencapai 2,5 %, maka darah mencit tersebut dapat diinjeksikan kepada mencit-mencit yang lain. Artinya, dalam 100 sel darah merah mengandung 2,5 parasit, sehingga 1×10^6 parasit terdapat 40×10^6 sel darah merah.

$$\frac{1 \times 10^6}{2,5} \times 100 = \frac{100 \times 10^6}{2,5} = 40 \times 10^6 \text{ sel darah merah}$$

Darah pada donor diketahui memiliki 6×10^9 sel darah merah/mL pada darahnya, maka untuk mengambil 1×10^6 parasit pada setiap mencit dengan cara mengambil darahnya adalah:

$$\begin{aligned} \frac{40 \times 10^6 \text{ RBC}}{6 \times 10^9 \text{ RBC/mL}} \times 1 \text{ mL darah} &= 6,7 \times 10^{-6} \text{ L} \\ &= 6,7 \mu\text{L (untuk setiap mencit)} \end{aligned}$$

Sehingga untuk mengambil 1×10^6 parasit, dapat dilakukan dengan mengambil darah sebanyak $6,7 \mu\text{L}$ (untuk setiap mencit) dengan menggunakan mikropipet.

4.2 Penginjeksian Darah yang Terinfeksi Pada Setiap Mencit

$$\% \text{ infeksi} = \frac{150}{1000} \times 100 \% = 15 \%$$

Ketika derajat parasitemia mencit donor telah mencapai 2,5 % maka harus mengandung 1×10^6 parasit dalam $6,7 \mu\text{L}$ darah. Pada penelitian ini diperoleh derajat parasitemia sebesar 15 %, maka setiap mencit diinjeksikan darah sebanyak:

$$\frac{2,5\%}{15\%} \times 6,7 \mu L = 1,12 \mu L \text{ untuk satu mencit}$$

Jumlah mencit yang akan diinfeksi parasit sebanyak 30 ekor, sehingga $1,12 \mu L \times 30 = 30,6 \mu L$.

Darah mencit yang digunakan untuk menginfeksi mencit yang lainnya diperoleh dari darah jantung yang diresuspensikan dalam $200 \mu L$ larutan PBS (untuk $6,7 \mu L$ darah), sehingga larutan PBS yang dibutuhkan untuk meresuspensikan $30,6 \mu L$ darah adalah:

$$\frac{30,6 \mu L}{6,7 \mu L} \times 200 \mu L = 913,43 \mu L = 0,9 \text{ mL}$$

Dengan demikian, $30,6 \mu L$ darah mencit donor yang terinfeksi parasit dilarutkan dalam $0,9 \text{ mL}$ larutan PBS. Untuk mempermudah skala pengambilan maka dinaikkan 10x lipat, sehingga darah yang diambil dari mencit donor sebanyak $306 \mu L$ ($0,306 \text{ mL}$) yang kemudian dilarutkan dalam 9 mL larutan PBS.

$$\frac{9 \text{ mL}}{30} = 0,3 \text{ mL}$$

Maka setiap mencit diinjeksikan darah yang telah dilarutkan dengan PBS sebanyak $0,3 \text{ mL}$.

Lampiran 5. Pembuatan Ekstrak Uji

5.1 Perhitungan Dosis dan Jumlah Ekstrak Larutan Uji

Rumus: Dosis x berat badan mencit

Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan x dosis x 4 hari

Keterangan: rata-rata berat badan mencit = 17 gram

Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan = 6

Dosis Klorokuin: = 0,0006 mg/g BB

$$= 0,0006 \text{ mg/g BB} \times 17 \text{ gr} = 0,011 \text{ mg}$$

$$= 6 \times 0,011 \text{ mg} \times 4 = 0,25 \text{ mg}$$

Maka, klorokuin ditimbang sebanyak 0,25 mg kemudian dilarutkan dalam 12 mL

CMC-Na 1%.

Dosis 1 = 0,001 mg/g BB

$$= 0,001 \text{ mg/g BB} \times 17 \text{ gr} = 0,017 \text{ mg}$$

$$= 6 \times 0,017 \text{ mg} \times 4 = 0,408 \text{ mg}$$

Maka, ekstrak ditimbang sebanyak 0,408 mg kemudian dilarutkan dalam 12 mL

CMC-Na 1%.

Dosis 2 = 0,01 mg/g BB

$$= 0,01 \text{ mg/g BB} \times 17 \text{ gr} = 0,17 \text{ mg}$$

$$= 6 \times 0,2 \text{ mg} \times 4 = 4,08 \text{ mg}$$

Maka, ekstrak ditimbang sebanyak 4,08 mg kemudian dilarutkan dalam 12 mL

CMC-Na 1%.

Dosis 3 = 0,1 mg/g BB

$$= 0,1 \text{ mg/g BB} \times 17 \text{ gr} = 1,7 \text{ mg}$$

$$= 6 \times 2 \text{ mg} \times 4 = 40,8 \text{ mg}$$

Maka, ekstrak ditimbang sebanyak 40,8 mg kemudian dilarutkan dalam 12 mL CMC-Na 1%.

Keterangan:

Angka 6 : Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan

Angka 4 : Jumlah hari terapi

Angka 12 : Jumlah sampel tiap kelompok perlakuan x jumlah hari terapi x 0,5 mL

Proses pembuatan dosis ekstrak dengan penimbangan ekstrak pekat dalam satuan mg dan dengan angka relatif yang kecil (seperti pada dosis 0,001 mg/g BB), menimbulkan banyak error. Karena neraca analitik yang ada, minimal penimbangannya adalah 1 mg. Sehingga digunakan proses pengenceran dari dosis 10 mg/kg BB dengan pengenceran 1/10x dari dosis sebelumnya.

1. Dosis 10 mg/Kg BB

Ekstrak pekat 40,8 mg dilarutkan dalam 12 mL CMC-Na 1%. Akan tetapi untuk memperbanyak stok (karena akan berkurang untuk pengenceran) maka dilakukan 2x dosis, yaitu 81,6 mg (40,8 mg x 2) ekstrak pekat dilarutkan dalam 24 mL (12 mL x 2) CMC-Na 1%. Sehingga diperoleh ekstrak dosis 10 mg/kg BB sebanyak 24 mL.

2. Dosis 1 mg/Kg BB

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$\frac{40,8 \text{ mg}}{12 \text{ mL}} \times V_1 = \frac{4,08 \text{ mg}}{12 \text{ mL}} \times 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{120 \text{ mg}}{12 \text{ mL}} \times \frac{12 \text{ mL}}{48 \text{ mg}} = 2,5 \text{ mL}$$

3. Dosis 0,1 mg/Kg BB

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$\frac{4,08 \text{ mg}}{12 \text{ mL}} \times V_1 = \frac{0,408 \text{ mg}}{12 \text{ mL}} \times 25 \text{ mL}$$

$$V_1 = \frac{12 \text{ mg}}{12 \text{ mL}} \times \frac{12 \text{ mL}}{4,8 \text{ mg}} = 2,5 \text{ mL}$$

5.2 Pembuatan Ekstrak Tanaman Widuri 10.000 ppm pada Uji Fitokimia

$$10.000 \text{ ppm} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{10.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{100 \text{ mg}}{10 \text{ mL}}$$

Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang sebanyak 100 mg menggunakan neraca analitik. Kemudian diencerkan dengan 10 mL pelarut etanol 80%. Kemudian dihomogenkan dengan pengadukan menggunakan pengaduk gelas, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 10.000 ppm (ekstrak yang lebih encer sehingga mempermudah dalam identifikasi kualitatif dengan reagen tertentu). Perbandingan (100 mg : 10 mL) digunakan apabila menggunakan (10 mg : 1) mL banyak terdapat error dalam proses penimbangan dengan neraca analitik dimana menggunakan satuan mg yang merupakan nilai yang sangat kecil.

1. Uji Alkaloid = 0,5 mL
2. Uji Flavonoid = 0,5 mL
3. Uji Tanin = 0,5 mL
4. Uji Saponin = 0,5 mL
5. Uji Triterpenoid = 0,5 mL

5.3 Pembuatan Ekstrak Tanaman Widuri 1.000.000 ppm pada Uji KLT

$$1.000.000 \text{ ppm} = \frac{1.000.000 \text{ mg}}{1 \text{ L}} = \frac{1.000.000 \text{ mg}}{1000 \text{ mL}} = \frac{1000 \text{ mg}}{1 \text{ mL}}$$

Ekstrak pekat yang diperoleh ditimbang sebanyak 1000 mg dengan neraca analitik. Kemudian diencerkan dengan 1 mL pelarut etanol 80%. Kemudian

dihomogenkan dengan pengadukan menggunakan pengaduk gelas, sehingga diperoleh ekstrak dengan konsentrasi 1.000.000 ppm (ekstrak yang lebih encer sehingga lebih mempermudah dalam identifikasi kualitatif dengan penotolan). Kemudian ekstrak diletakkan diatas plat tetes untuk mempermudah pengambilan dengan pipa kapiler ketika akan ditotolkan.



Lampiran 6. Data dan Perhitungan

6.1 Perhitungan Randemen Ekstrak Etanol 80 % Akar Widuri

- a. Berat sampel yang di maserasi : 100 gr
- b. Berat gelas vial kosong : 86,4637 gr
Berat konstan gelas vial+ekstrak : 89,1435 gr
Berat ekstrak : 2,6798 gr
- c. Berat gelas vial kosong : 84,3942 gr
Berat konstan gelas vial+ekstrak : 85,6466 gr
Berat ekstrak : 1,2524 gr

$$\begin{aligned}\text{Randemen ekstrak} &= \frac{\text{berat total ekstrak pekat}}{\text{berat sampel}} \times 100 \% \\ &= \frac{3,9322 \text{ gr}}{100 \text{ gr}} \times 100 \% \\ &= 3,9322 \%\end{aligned}$$

6.2 Analisis Kadar Air

6.2.1 Analisis Kadar Air Sampel Basah

Cawan ke-	Berat konstan cawan kosong (a)	Berat cawan+sampel sebelum dikeringkan (b)	Berat konstan cawan+sampel setelah dikeringkan (c)	Kadar air sampel basah (%)
1	55,3518	60,3527	57,5974	55,0961
2	58,1502	63,1569	60,4875	53,3166
3	58,4514	63,4533	60,8804	51,1745

Perhitungan kadar air sampel basah:

a. Cawan ke-1

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% = \frac{60,3527-57,5974}{60,3527-55,3518} \times 100 \% = 55,0961 \%$$

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100-\% \text{kadar air}} = \frac{100}{100-55,0961} = 2,2269 \%$$

$$\begin{aligned}\% \text{ Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 55,0961 \% - 2,2269 \% = 52,8692 \%\end{aligned}$$

b. Cawan ke-2

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% = \frac{63,1569-60,4875}{63,1569-58,1502} \times 100 \% = 53,3166 \%$$

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100-\% \text{kadar air}} = \frac{100}{100-53,3166} = 2,1421 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 53,3166 \% - 2,1421 \% = 51,1745 \% \end{aligned}$$

c. Cawan ke-3

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% = \frac{63,4533-60,8804}{63,4533-58,4514} \times 100 \% = 51,4385 \%$$

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100-\% \text{kadar air}} = \frac{100}{100-51,4385} = 2,0592 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 51,4385 \% - 2,0592 \% = 49,3793 \% \end{aligned}$$

6.2.2 Analisis Kadar Air Sampel Kering

Cawan ke-	Berat konstan cawan kosong (a)	Berat cawan+sampel sebelum dikeringkan (b)	Berat konstan cawan+sampel setelah dikeringkan (c)	Kadar air sampel kering (%)
1	58,4468	63,4156	63,1494	5,3574
2	53,4839	58,4845	58,2309	5,0714
3	65,3924	70,4021	70,1536	4,9604

Perhitungan kadar air sampel kering:

d. Cawan ke-1

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% = \frac{63,4156-63,1494}{63,4156-58,4468} \times 100 \% = 5,3574 \%$$

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100-\% \text{kadar air}} = \frac{100}{100-5,3574} = 1,0566 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 5,3574 \% - 1,0566 \% = 4,3008 \% \end{aligned}$$

e. Cawan ke-2

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% = \frac{58,4845 - 58,2309}{58,4845 - 53,4839} \times 100 \% = 5,0714 \%$$

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} = \frac{100}{100 - 5,0714} = 1,0534 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 5,0714 \% - 1,0534 \% = 4,018 \% \end{aligned}$$

f. Cawan ke-3

$$\text{Kadar air} = \frac{(b-c)}{(b-a)} \times 100 \% = \frac{70,4021 - 70,1536}{70,4021 - 65,3924} \times 100 \% = 4,9604 \%$$

$$\text{Faktor koreksi} = \frac{100}{100 - \% \text{ kadar air}} = \frac{100}{100 - 4,9604} = 1,0522 \%$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Kadar air terkoreksi} &= \text{kadar air} - \text{faktor koreksi} \\ &= 4,9604 \% - 1,0522 \% = 3,9082 \% \end{aligned}$$

6.3 Hasil Uji Antimalaria

6.3.1 Pengamatan Derajat Parasitemia

Perlakuan	Mencit ke-	Eritrosit total	Pengamatan Parasit									
			Hari ke-0		Hari ke-1		Hari ke-2		Hari ke-3		Hari ke-4	
			Terinfeksi	% Infeksi	Terinfeksi	% Infeksi	Terinfeksi	% Infeksi	Terinfeksi	% Infeksi	Terinfeksi	% Infeksi
Non infeksi	1	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	1000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kontrol negative	1	1000	18	1,8	24	2,4	36	3,6	39	3,9	48	4,8
	2	1000	15	1,5	18	1,8	28	2,8	33	3,3	34	3,4
	3	1000	26	2,6	33	3,3	34	3,4	42	4,2	43	4,3
	4	1000	23	2,3	33	3,3	33	3,3	37	3,7	52	5,2
	5	1000	21	2,1	27	2,7	32	3,2	32	3,2	38	3,8
	6	1000	15	1,5	Mati	Mati	Mati	Mati	mati	Mati	Mati	Mati
Kontrol positif	1	1000	11	1,1	27	2,7	18	1,8	16	1,6	14	1,4
	2	1000	19	1,9	14	1,4	11	1,1	13	1,3	10	1,0
	3	1000	25	2,5	12	1,2	12	1,2	8	0,8	7	0,7
	4	1000	47	4,7	18	1,8	10	1,0	10	1,0	10	1,0
	5	1000	16	1,6	15	1,5	14	1,4	13	1,3	10	1,0

	6	1000	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati
Dosis 1	1	1000	14	1,4	24	2,4	19	1,9	19	1,9	26	2,6
	2	1000	13	1,3	27	2,7	15	1,5	18	1,8	26	2,6
	3	1000	17	1,7	20	2,0	17	1,7	12	1,2	10	1,0
	4	1000	29	2,9	33	3,3	21	2,1	16	1,6	19	1,9
	5	1000	18	1,8	19	1,9	18	1,8	17	1,7	20	2,0
	6	1000	21	2,1	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati
Dosis 2	1	1000	17	1,7	20	2,0	14	1,4	19	1,9	16	1,6
	2	1000	17	1,7	18	1,8	16	1,6	20	2,0	22	2,2
	3	1000	14	1,4	23	2,3	13	1,3	15	1,5	10	1,0
	4	1000	14	1,4	15	1,5	25	2,5	28	2,8	16	1,6
	5	1000	43	4,3	26	2,6	25	2,5	13	1,3	15	1,5
	6	1000	15	1,5	24	2,4	28	2,8	Mati	Mati	Mati	Mati
Dosis 3	1	1000	16	1,6	21	2,1	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati	Mati
	2	1000	32	3,2	24	2,4	20	2,0	18	1,8	23	2,3
	3	1000	15	1,5	17	1,7	14	1,4	19	1,9	18	1,8
	4	1000	13	1,3	28	2,8	15	1,5	22	2,2	13	1,3
	5	1000	16	1,6	16	1,6	17	1,7	22	2,2	13	1,3
	6	1000	19	1,9	14	1,4	18	1,8	15	1,5	9	0,9

Keterangan:

Non infeksi: kelompok perlakuan tanpa infeksi *Plasmodium berghei* dengan pemberian 0,5 mL larutan CMC-Na 1%.

Kontrol negatif: kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dengan pemberian pelarut CMC-Na 1%.

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

Dosis 1: kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dan terapi ekstrak etanol akar widuri dosis 0,1 mg/Kg.

Dosis 2: kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dan terapi ekstrak etanol akar widuri dosis 1 mg/Kg BB.

Dosis 3: kelompok perlakuan infeksi *Plasmodium berghei* dan terapi ekstrak etanol akar widuri dosis 10 mg/Kg BB.

6.3.2 Hasil Pengujian Aktivitas Antimalaria

No.	Perlakuan	Ulangan ke-	% Infeksi				
			Hari ke-0	Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4
1.	Kontrol Negatif	1	1,8	2,4	3,6	3,9	4,8
		2	1,5	1,8	2,8	3,3	3,4
		3	2,6	3,3	3,4	4,2	4,3
		4	2,3	3,3	3,3	3,7	5,2
		5	2,1	2,7	3,2	3,2	3,8
	Rata-rata	2,1	2,7	3,3	3,7	4,3	
2.	Kontrol Positif	1	2,5	1,2	1,2	0,8	0,7
		2	1,9	1,4	1,1	1,3	1,0
		3	1,1	2,7	1,8	1,6	1,4
		4	4,7	1,8	1,0	1,0	1,0
		5	1,6	1,5	1,4	1,3	1,0
	Rata-rata	2,4	1,7	1,3	1,2	1,0	
3.	Dosis 1	1	1,4	2,4	1,9	1,9	2,6
		2	1,3	2,7	1,5	1,8	2,6
		3	1,7	2,0	1,7	1,2	1,0
		4	2,9	3,3	2,1	1,6	1,9
		5	1,8	1,9	1,8	1,7	2,0
	Rata-rata	1,8	2,5	1,8	1,6	2,0	
4.	Dosis 2	1	1,7	2,0	1,4	1,9	1,6
		2	1,7	1,8	1,6	2,0	2,2
		3	1,4	2,3	1,3	1,5	1,0
		4	1,4	1,5	2,5	2,8	1,6
		5	4,3	2,6	2,5	1,3	1,5
	Rata-rata	2,1	2,0	1,9	1,9	1,6	
5.	Dosis 3	1	3,2	2,4	2,0	1,8	2,3
		2	1,5	1,7	1,4	1,9	1,8
		3	1,3	2,8	1,5	2,2	1,3
		4	1,6	1,6	1,7	2,2	1,3
		5	1,9	1,4	1,8	1,5	0,9
	Rata-rata	1,9	2,0	1,7	1,9	1,5	

6.3.3 Perhitungan Penghambatan Parasit

Parasitemia (%) adalah jumlah eritrosit yang terinfeksi *Plasmodium berghei* dalam 1000 eritrosit. Persen penghambatan pertumbuhan parasit dihitung dengan rumus berikut:

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

No.	Perlakuan	Ulangan ke-	Pengamatan Parasitemia (%)			
			Hari ke-1	Hari ke-2	Hari ke-3	Hari ke-4
1.	Kontrol Negatif	1	2,4	3,6	3,9	4,8
		2	1,8	2,8	3,3	3,4
		3	3,3	3,4	4,2	4,3
		4	3,3	3,3	3,7	5,2
		5	2,7	3,2	3,2	3,8
	Rata-rata		2,7	3,3	3,7	4,3
2.	Kontrol Positif	1	1,2	1,2	0,8	0,7
		2	1,4	1,1	1,3	1,0
		3	2,7	1,8	1,6	1,4
		4	1,8	1,0	1,0	1,0
		5	1,5	1,4	1,3	1,0
	Rata-rata		1,7	1,3	1,2	1,0
	Penghambatan	1	50	66,7	79,5	85,4
		2	22,2	60,7	60,6	70,6
		3	18,2	47,1	61,9	67,4
		4	45,5	69,7	73	80,8
		5	44,4	56,3	59,4	73,7
Rata-rata		36,1	60,1	66,9	75,6	
3.	Dosis 1	1	2,4	1,9	1,9	2,6
		2	2,7	1,5	1,8	2,6
		3	2,0	1,7	1,2	1,0
		4	3,3	2,1	1,6	1,9
		5	1,9	1,8	1,7	2,0
	Rata-rata		2,5	1,8	1,6	2,0
	Penghambatan	1	0	47,2	51,3	45,8
		2	-50	46,4	45,5	23,5
		3	39,4	50	71,4	76,7
		4	0	36,4	56,8	63,5
		5	29,6	43,8	46,9	47,4
Rata-rata		3,8	44,8	54,4	51,4	

4.	Dosis 2	1	2,0	1,4	1,9	1,6
		2	1,8	1,6	2,0	2,2
		3	2,3	1,3	1,5	1,0
		4	1,5	2,5	2,8	1,6
		5	2,6	2,5	1,3	1,5
	Rata-rata		2,0	1,9	1,9	1,6
	Penghambatan	1	16,7	61,1	51,3	66,7
		2	0	42,9	39,4	35,3
		3	30,3	61,8	64,3	76,7
		4	54,5	24,2	24,3	69,2
		5	3,7	21,2	59,4	60,5
Rata-rata		21,0	42,2	47,7	61,7	
5.	Dosis 3	1	2,4	2,0	1,8	2,3
		2	1,7	1,4	1,9	1,8
		3	2,8	1,5	2,2	1,3
		4	1,6	1,7	2,2	1,3
		5	1,4	1,8	1,5	0,9
	Rata-rata		2,0	1,7	1,9	1,5
	Penghambatan	1	0	44,4	53,8	52,1
		2	5,6	50	42,4	47,1
		3	15,2	55,9	47,6	69,8
		4	51,5	48,5	40,5	75
		5	48,1	43,8	53,1	76,3
Rata-rata		24,1	48,5	47,5	64,1	

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 akar widuri dosis 0,1 mg/Kg.

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

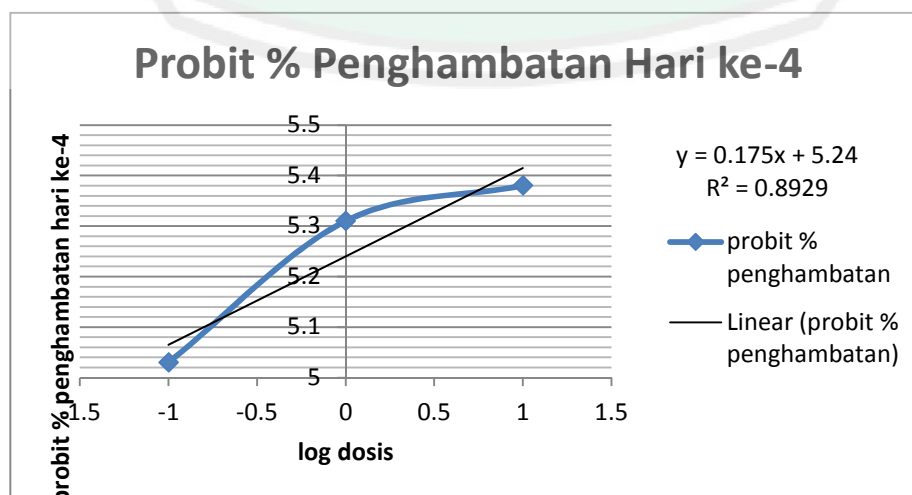
Dosis 3 : terapi ekstrak etanol akar widuri dosis 10 mg/Kg BB.

6.3.4 Probit Penghambatan Pertumbuhan Parasit Hari ke-4

No.	Perlakuan	Ulangan ke-	% Penghambatan	Probit Penghambatan
1.	Dosis 1	1	45,8	4,89
		2	23,5	4,28
		3	76,7	5,73
		4	63,5	5,34
		5	47,4	4,93
	Rata-rata			5,03
2.	Dosis 2	1	66,7	5,43
		2	35,3	4,62
		3	76,7	5,73
		4	69,2	5,50
		5	60,5	5,27
	Rata-rata			5,31
3.	Dosis 3	1	52,1	5,05
		2	47,1	4,93
		3	69,8	5,52
		4	75	5,67
		5	76,3	5,72
	Rata-rata			5,38

6.3.5 Perhitungan ED₅₀

Dosis	Log dosis	probit % penghambatan
0.1	-1	5.03
1	0	5.31
10	1	5.38



Diketahui : $y = 0,175 x + 5,24$

Ditanya : nilai dosis x

Jawab :

$$y = 0,175 x + 5,24$$

$$5 = 0,175 x + 5,24$$

$$-0,24 = 0,175 x$$

$$X = \frac{-0,24}{0,175} = -1,37$$

Jika x adalah log dosis, maka antilog x = antilog -1,37 = 0,0426. Dengan demikian, nilai ED₅₀ adalah 0,0426 mg/g BB = 4,26 mg/Kg BB

6.3.6 Analisa Statistika *Two-way* ANOVA

Two-way ANOVA: hasil versus perlakuan, hari

Source	DF	SS	MS	F	P
Dosis	3	4930.6	1643.54	5.99	0.001
hari	3	19583.9	6527.98	23.79	0.000
Interaction	9	1382.8	153.64	0.56	0.825
Error	64	17559.8	274.37		
Total	79	43457.1			

S = 16.56 R-Sq = 59.59% R-Sq(adj) = 50.12%

General Linear Model: hasil versus perlakuan, hari

Factor	Type	Levels	Values
Dosis	fixed	4	1, 2, 3, 4
hari	fixed	4	1, 2, 3, 4

Analysis of Variance for hasil, using Adjusted SS for Tests

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Dosis	3	4930.6	4930.6	1643.5	5.99	0.001
hari	3	19583.9	19583.9	6528.0	23.79	0.000
perlakuan*hari	9	1382.8	1382.8	153.6	0.56	0.825
Error	64	17559.8	17559.8	274.4		
Total	79	43457.1				

S = 16.5642 R-Sq = 59.59% R-Sq(adj) = 50.12%

Unusual Observations for hasil

Obs	hasil	Fit	SE Fit	Residual	St Resid
22	-50.0000	3.8000	7.4077	-53.8000	-3.63 R
23	39.4000	3.8000	7.4077	35.6000	2.40 R
44	54.5000	21.0400	7.4077	33.4600	2.26 R

R denotes an observation with a large standardized residual.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Dosis	N	Mean	Grouping
1	20	59.655	A
4	20	46.035	A B
3	20	43.175	B
2	20	38.580	B

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

hari	N	Mean	Grouping
4	20	63.175	A
3	20	54.120	A B
2	20	48.905	B
1	20	21.245	C

Means that do not share a letter are significantly different.

Grouping Information Using Tukey Method and 95.0% Confidence

Dosis	hari	N	Mean	Grouping
1	4	5	75.580	A
1	3	5	66.880	A B
4	4	5	64.060	A B
3	4	5	61.680	A B
1	2	5	60.100	A B C
2	3	5	54.380	A B C D
2	4	5	51.380	A B C D
4	2	5	48.520	A B C D
3	3	5	47.740	A B C D
4	3	5	47.480	A B C D
2	2	5	44.760	A B C D
3	2	5	42.240	A B C D
1	1	5	36.060	B C D E
4	1	5	24.080	C D E
3	1	5	21.040	D E
2	1	5	3.800	E

Means that do not share a letter are significantly different.

6.3.7 Perhitungan Nilai Rf

No.	Golongan Senyawa Aktif	Campuran Eluen	Jarak Tempuh Eluen (cm)	Jarak Tempuh Senyawa (cm)	Rf
1.	Terpenoid	n-heksana : etil asetat (1 : 1)	8	0,9	0,11
		n-heksana : etil asetat (1 : 4)	8	1,5	0,19
				5,4	0,68
				6,1	0,76
				7,2	0,9
		n-heksana : etil asetat (4 : 1)	8	1,5	0,19
				3,6	0,45
		Kloroform : asam asetat (4 : 1)	8	1	0,12
				4,2	0,52
		Kloroform : asam asetat (4,5 : 0,5)	8	7,9	0,99
2,2	0,28				
5,4	0,68				
6,2	0,78				
6,8	0,85				
2.	Saponin	Kloroform : aseton (4 : 1)	8	4	0,5
				6	0,75
		Kloroform : metanol : air (2 : 6 : 1)	8	7	0,88
				7,6	0,95
		Kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2)	8	7	0,88
				7,5	0,94
		Kloroform : metanol : air (14 : 6 : 1)	8	7,9	0,99
				1,5	0,19
		Kloroform : metanol : air (3 : 1 : 1)	8	7,5	0,94

$$R_f = \frac{\text{jarak yang ditempuh oleh senyawa}}{\text{jarak yang ditempuh oleh eluen}}$$

1. Terpenoid

- a. Eluen n-heksana : etil asetat (1 : 1)

$$R_f = \frac{0,9}{8} \approx 0,11$$

- b. Eluen n-heksana : etil asetat (1 : 4)

$$R_f = \frac{1,5}{8} \approx 0,19$$

$$R_f = \frac{5,4}{8} \approx 0,68$$

$$R_f = \frac{6,1}{8} \approx 0,76$$

$$R_f = \frac{7,2}{8} \approx 0,9$$

$$R_f = \frac{7,9}{8} \approx 0,99$$

- c. Eluen n-heksana : etil asetat (4 : 1)

$$R_f = \frac{1,5}{8} \approx 0,19$$

$$R_f = \frac{3,6}{8} \approx 0,45$$

- d. Eluen Kloroform : asam asetat (4 : 1)

$$R_f = \frac{1}{8} = 0,12$$

$$R_f = \frac{4,2}{8} \approx 0,52$$

$$R_f = \frac{7,9}{8} \approx 0,99$$

- e. Eluen Kloroform : asam asetat (4,5 : 0,5)

$$R_f = \frac{2,2}{8} \approx 0,28$$

$$R_f = \frac{5,4}{8} \approx 0,68$$

$$R_f = \frac{6,2}{8} \approx 0,78$$

$$R_f = \frac{6,8}{8} \approx 0,85$$

$$R_f = \frac{8}{8} = 1$$

$$R_f = \frac{8,1}{8} \approx 1,01$$

2. Saponin

- a. Eluen Kloroform : aseton (4 : 1)

$$R_f = \frac{4}{8} = 0,5$$

$$R_f = \frac{6}{8} = 0,75$$

- b. Eluen Kloroform : metanol : air (2 : 6 : 1)

$$R_f = \frac{7}{8} = 0,88$$

$$R_f = \frac{7,6}{8} \approx 0,95$$

- c. Eluen Kloroform : metanol : air (13 : 7 : 2)

$$R_f = \frac{7}{8} = 0,88$$

$$R_f = \frac{7,5}{8} \approx 0,94$$

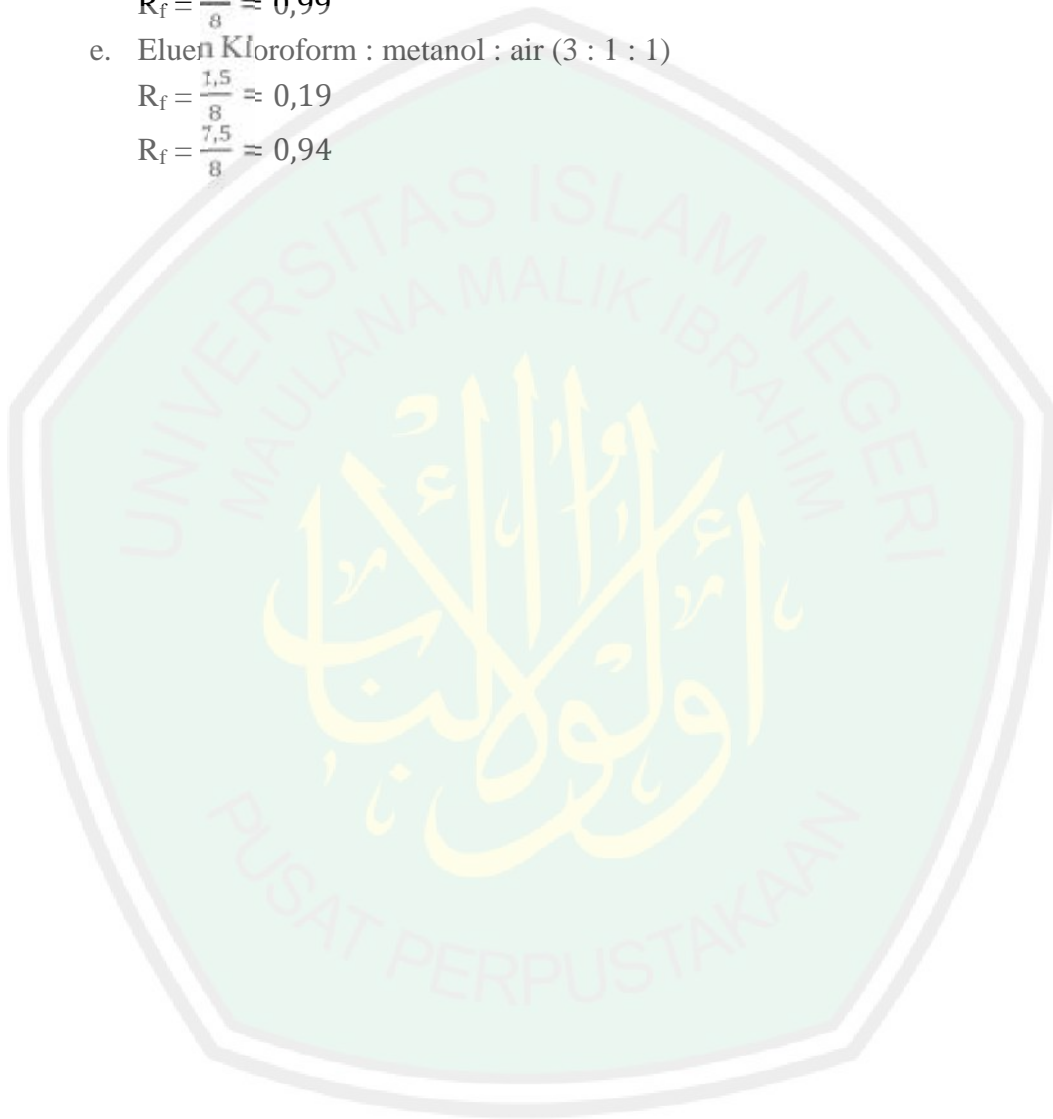
d. Eluen Kloroform : metanol : air (14 : 6 : 1)

$$R_f = \frac{7,9}{8} \approx 0,99$$

e. Eluen Kloroform : metanol : air (3 : 1 : 1)

$$R_f = \frac{1,5}{8} \approx 0,19$$

$$R_f = \frac{7,5}{8} \approx 0,94$$



Lampiran 7 Nilai Transformasi Probit

%	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9
0	-	1.0098	2.1218	2.2522	2.3479	2.4242	2.4879	2.5427	2.5911	2.6344
1	2.6737	2.7096	2.7429	2.7736	2.8027	2.8299	2.8556	2.8799	2.9031	2.9251
2	2.9463	2.9965	2.3859	3.0046	3.02266	3.04	3.0569	3.0732	3.089	3.1043
3	3.1192	3.1337	3.1478	3.1616	3.175	3.1681	3.2009	3.2134	3.2256	3.2376
4	3.2493	3.2008	3.2721	3.2831	3.294	3.3046	3.3151	3.3253	3.3354	3.3454
5	3.3551	3.3648	3.3742	3.3836	3.3928	3.4018	3.4107	3.4195	3.4282	3.4368
6	3.4452	3.4536	3.4618	3.4699	3.478	3.4859	3.4937	3.5051	3.5001	3.5167
7	3.5242	3.5316	3.5389	3.5462	3.5534	3.5605	3.5675	3.5745	3.5813	3.55882
8	3.5949	3.6016	3.6083	3.6148	3.6213	3.6278	3.6342	3.6405	3.6468	3.6531
9	3.6502	3.6654	3.6715	3.6775	3.6835	3.6894	3.6953	3.7012	3.707	3.7127
10	3.7184	3.7241	3.7296	3.7354	3.7409	3.7464	3.7519	3.7574	3.7628	3.7281
11	3.7735	3.7788	3.764	3.7893	3.7945	3.7996	3.0048	3.6099	3.815	3.82
12	3.825	3.83	3.835	3.8395	3.8448	3.8497	3.8545	3.8593	3.8641	3.8689
13	3.8736	3.8783	3.883	3.6817	3.8923	3.8969	3.9015	3.9061	3.9107	3.9152
14	3.9197	3.9242	3.9266	3.9331	3.9375	3.9419	3.9463	3.95	3.955	3.9593
15	3.9636	3.9678	3.9721	3.9763	3.9806	3.9848	3.969	3.9931	3.9973	4.0014
16	4.0055	4.0096	4.0137	4.0178	4.0218	4.0259	4.0299	4.0039	4.0379	4.0419
17	4.0458	4.0498	4.0537	4.0576	4.0615	4.0654	4.0093	4.0731	4.077	4.0808
18	4.0846	4.0084	4.0922	4.096	4.0998	4.1035	4.1073	4.111	4.1147	4.1184
19	4.1221	4.1258	4.1295	4.1331	4.1367	4.1404	4.144	4.1476	4.1512	4.1546
20	4.1584	4.1619	4.1655	4.169	4.1726	4.1761	4.1796	4.1831	4.1866	4.1901
21	4.1936	4.197	4.2005	4.2039	4.2074	4.2108	4.2142	4.2176	4.221	4.2244
22	4.2278	4.2312	4.2345	4.2379	4.2412	4.2446	4.2479	4.2512	4.2546	4.2579
23	4.2612	4.2644	4.2677	4.271	4.2743	4.2775	4.2808	4.284	4.2872	4.29
24	4.2937	4.2969	4.3001	4.3033	4.3065	4.3097	4.3129	4.316	4.3192	4.3224
25	4.3255	4.3287	4.3318	4.3349	4.338	4.3412	4.3443	4.3474	4.3505	4.3536
26	4.3567	4.3597	4.3628	4.3659	4.3689	4.372	4.375	4.3781	4.3811	4.3842
27	4.3872	4.3902	4.3932	4.3962	4.3992	4.01022	4.4052	4.4082	4.4112	4.4142
28	4.4172	4.4201	4.4231	4.426	4.429	4.4319	4.4349	4.4378	4.44	4.4437
29	4.4466	4.4495	4.4524	4.4554	4.4583	4.4612	4.4641	4.467	4.4696	4.4727
30	4.04756	4.4785	4.4813	4.4842	4.4871	4.4899	4.4928	4.4956	4.4985	4.5013
31	4.5041	4.507	4.5098	4.5126	4.5155	4.5183	4.5211	4.5239	4.5267	4.5295
32	4.5323	4.5354	4.5379	4.5407	4.5436	4.5467	4.549	4.5518	4.5546	4.5573
33	4.5601	4.5628	4.5656	4.5684	4.5711	4.5738	4.5766	4.5793	4.5821	4.5848
34	4.5875	4.5903	4.593	4.5957	4.5984	4.6011	4.6039	4.6006	4.6093	4.612
35	4.6147	4.6174	4.6201	4.6288	4.6255	4.6281	4.6308	4.6335	4.8362	4.6389
36	4.6415	4.6442	4.6469	4.6495	4.6522	4.6549	4.6575	4.6602	4.6628	4.6865
37	4.6681	4.6708	4.6734	4.6761	4.6787	4.6814	4.684	4.6866	4.6893	4.6919
38	0.6945	4.6971	4.6998	4.7024	4.705	4.7076	4.7102	4.1129	4.1155	4.7181
39	4.7207	4.7233	4.7259	4.7285	4.7311	4.7337	4.7363	4.7389	4.7415	4.7441
40	4.7467	4.7492	4.7518	4.7544	4.757	4.7596	4.7622	4.7647	4.7673	4.1009
41	4.7725	4.775	4.7776	4.7802	4.7827	4.7853	4.7879	4.7904	4.193	4.7955
42	4.7981	4.8007	4.8032	4.8058	4.8083	4.8109	4.8134	4.816	4.8185	4.8211
43	4.8236	4.6262	4.8287	4.8313	4.8338	4.8363	4.8389	4.8414	4.844	4.8465
44	4.849	4.8516	4.8541	4.8566	4.8592	4.8617	4.8642	4.8568	4.8693	4.8718
45	4.8743	4.8769	4.8794	4.8819	4.8844	4.687	4.8895	4.692	4.8945	4.897
46	4.8996	4.9021	4.9046	4.9071	4.9096	4.9122	4.9147	4.9172	4.9197	4.9222

47	4.9247	4.09272	4.9298	4.9323	4.9348	4.9373	4.9398	4.9423	4.9448	4.9473
48	4.9498	4.9524	4.9549	4.9574	4.9599	4.9624	4.9649	4.9674	4.9699	4.9724
49	4.9749	4.9774	4.9799	4.9825	4.985	4.9875	4.99	4.9925	4.995	4.9975
50	5	5.0025	5.005	5.0075	5.01	5.0125	5.015	5.0175	50,201	5.0226
51	5.0251	5.0276	5.0301	5.0326	5.0351	5.0376	5.0401	5.0426	5.0451	5.0476
52	5.0502	5.0527	5.0552	5.0577	5.0602	5.0627	5.0652	5.0677	5.0702	5.0728
53	50753	5.0778	5.0803	5.0828	5.0853	5.0878	5.0904	5.0929	5.0954	5.0979
54	5.1004	5.103	5.1055	5.108	5.1105	5.113	5.1156	5.1181	5.1206	5.1231
55	5.1257	5.1282	5.1301	5.1331	5.1358	5.1383	5.1408	5.1434	5.1459	5.1484
56	5.151	5.1535	5.156	5.1586	5.1611	5.1637	5.1662	5.1689	5.1713	5.1738
57	5.1764	5.1789	5.1815	5.184	5.1866	5.1891	5.1917	5.1942	5.1968	5.1993
58	5.2019	5.2045	5.207	5.2096	5.2121	5.2147	5.2173	5.2198	5.2224	5.225
59	5.2275	5.2301	5.2327	5.2353	5.2378	5.2404	5.243	5.2456	5.2482	5.2508
60	5.2533	5.2559	5.2585	5.2611	5.2637	5.2666	5.2689	5.2715	5.2741	5.2767
61	5.2793	52,819	5.2845	5.2871	5.2898	5.2924	5.295	5.2976	5.3002	5.3029
62	5.3055	5.3081	5.3107	5.3134	5.316	5.3186	5.3213	5.3239	5.3266	5.3292
63	5.3319	5.3345	5.3372	5.3398	5.3425	5.3451	5.3478	5.3505	5.3531	5.3558
64	5.3565	5.3611	5.363&	5.3665	5.3692	5.3719	5.3745	5.3772	5.3799	5.3826
65	5.3853	5.388	5.3007	5.3934	5.3961	5.3989	5.4016	5.4043	5.407	5.4097
66	5.4125	5.4152	5.4179	5.4207	5.4234	5.4261	5.4289	5.4316	5.4344	5.4372
67	5.4399	5.4427	5.4454	5.4482	5.451	5.4538	5.4565	5.4693	5.4621	5.4649
68	5.4677	5.4705	5.4733	5.4761	5.4789	5.4817	5.4845	5.4874	5.4902	5.493
69	5.4959	5.4987	5.5015	5.5044	5.5072	5.5101	5.5129	5.5158	5.5187	5.5215
70	5.5244	5.5273	5.5302	5.533	5.5359	5.5388	5.5417	5.5446	5.5476	5.5505
71	5.5534	5.5563	5.5592	5.5622	5.5651	5.5681	5.571	5.574	5.5769	5.5799
72	5.5828	5.5858	5.5888	5.5918	5.5948	5.5978	5.0008	5.6038	5.6068	5.6096
73	5.6128	5.6158	5.6189	5.6219	5.625	5.628	5.6311	5.6341	5.6372	5.6403
74	5.6433	5.6464	5.6495	5.6526	5.6557	5.6568	5.662	5.6651	5.6682	5.6713
75	5.6745	5.6776	5.6808	5.684	5.6871	5.6903	5.6935	5.6967	5.6999	5.7031
76	5.7063	5.7095	5.7128	5.716	5.7192	5.7225	5.7257	5.729	5.7323	5.7356
77	5.7388	5.7421	5.7454	5.7488	5.7521	5.7554	5.7588	5.7621	5.7655	5.7688
78	5.7722	5.7756	5.779	5.7824	5.7858	5.7892	5.7926	5.7961	5.7995	5.803
79	5.8064	5.8099	5.8134	5.8169	5.8204	5.8239	5.8274	5.831	5.8345	5.8381
80	5.8416	5.8452	5.8488	5.8524	5.856	5.8596	5.8633	5.8669	5.8705	5.8742
81	5.8779	5.8816	5.8853	5.889	5.8927	58,965	5.9002	5.904	5.9078	5.9116
82	5.9154	5.9192	5,923	5.9269	5.9307	5.9346	5.9385	5.9424	5.9463	5.9502
83	5.9542	5.9581	5.9621	5.9661	5.9701	5.9741	5.9782	5.9822	5.9863	5.9904
84	5.9945	5.9986	6.0027	6.0069	6.011	6.0152	6.0194	6.0237	6.0279	6.0322
85	6.0364	6.0407	6.045	6.0494	6.0537	6.0581	6.0625	6.0669	6.0714	6.0758
86	6.0803	60,848	6.9893	6.0939	6.0985	6.1031	6.1077	6.1123	6.117	6.1217
87	6.1264	6.1311	6.1359	6.1407	6.1455	6.1503	6.1552	6.1601	6.165	6,17
88	6.175	6.18	6.185	6.1901	6.1952	6.2004	6.2055	6.2107	6,216	61,212
89	6.2265	6.2319	6.2372	6.2428	6.2481	6.2536	6.2591	6.2646	6.2702	62,759
90	6.2816	6.2873	6.293	6.2988	6.3047	6.3106	6.3165	63,225	6.3285	6.3346
91	6.3408	6.3469	6.3532	6.3595	6.3658	6.3722	6.3787	6.3852	6.3917	6.3984
92	6.4001	6.4118	6.4187	6.4255	6.4325	6.4395	6.4466	6.4538	6.4611	6.4684
93	6.4758	6.4833	6.49	6.4985	6.5063	6.5141	6.522	6.5301	6.5382	6.5464
94	6.5648	6.5632	6.5718	6.5805	6.5893	6.5982	6.6072	6.6164	6.6256	6.6352
95	6.6449	6.6546	6.6646	6.6747	6.6849	6.6954	6.706	6.7169	6.7279	6.7392
96	6.7507	6.7624	6.7744	6.7866	6.7991	6.8119	6.825	6.8384	6.8522	6.8663
97	6.8808	6.8957	6.911	6.9268	6.9431	6.96	6.9774	6.9954	7.0741	7.0335

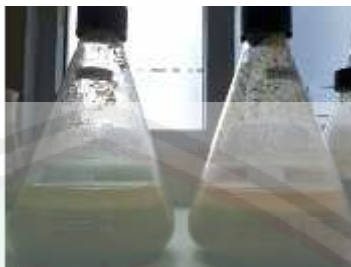
98	7.2537	7.0749	7.096S	7.1201	7.1444	7.1707	7.1973	7.2262	7.2571	7.2904
99	7.3263	7.3656	7.4087	7.4571	7.512	7.5758	7.652	7.7478	7.8782	8.0902



Lampiran 8. Dokumentasi



Analisis Kadar air



Ekstraksi maserari



Filtrat hasil maserasi



Pembedahan mencit donor



Pengambilan darah jantung mencit donor



Darah jantung mencit donor



Penginjeksian parasit



Pembuatan hapusan darah



Pewarnaan darah



Preparat darah yang siap diamati dengan mikroskop



Uji alkaloid dengan reagen Dragendroff



Uji alkaloid dengan Mayer



Uji terpenoid



Uji saponin



Uji flavonoid



Uji tannin



Penotolan ekstrak pada plat



Proses elusi KLT

