



LAPORAN AKHIR PENELITIAN RISBINKES

**Uji Toksisitas Akut dan Antimalaria
Kombinasi Ekstrak Kulit Batang Pulai (*Alstonia scholaris*) dan
Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Histopatologi Limpa pada
Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei***

TIM PELAKSANA:

drh. Putri Reno Intan

Tri Wahyuni L, S.Farm

Nita Prihartini, SKM

Kardiyanto Nugroho

**PUSAT BIOMEDIS DAN TEKNOLOGI DASAR KESEHATAN
BADAN PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN KESEHATAN
KEMENTERIAN KESEHATAN RI**

2015

SUSUNAN TIM PENELITI

Nama		NIP / Gol	Tugas
drh. Putri Reno Intan	Peneliti	19840510201012200 2/IIIb	Mengikuti jalannya penelitian dari awal hingga akhir Penanggung jawab penulisan laporan
Tri Wahyuni L, S.Farm	Peneliti	19770529200003200 1/IIIa	Melakukan uji antimalaria
Nita Prihartini, SKM	Calon Peneliti	19800103200501200 2/IIIa	Melakukan uji toksisitas
Nugroho Kardiyanto	Pembantu peneliti		Membantu peneliti melakukan karakterisasi kimia

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Tuhan Yang Maha Esa karena dengan Karunia-Nya kami menyelesaikan penelitian mengenai Uji Toksisitas Akut dan Antimalaria Kombinasi Ekstrak Kulit Batang Pulai (*Alstonia scholaris*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Histopatologi Limpa pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*.

Tidak lupa kami sampaikan terimakasih kepada panitia dan tim teknis RISBINKES 2015 yang telah membantu membimbing kami dalam mengerjakan penelitian ini. Kami juga mengucapkan terimakasih kepada teman-teman di laboratorium hewan coba dan laboratorium farmasi Pusat biomedis dan teknologi dasar kesehatan Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementrian Kesehatan.

Kami berharap Penelitian ini dapat menjadi sesuatu yang berguna bagi institusi, rekan-rekan peneliti seminat serta masyarakat umum. Peneliti menyadari bahwa penelitian ini masih jauh dari kesempurnaan, untuk itu peneliti sangat mengharapkan kritik dan saran yang bersifat membangun guna kesempurnaan laporan akhir ini.

Jakarta, November 2015

Penyusun

RINGKASAN EKSEKUTIF

Judul Penelitian : Uji Toksisitas Akut dan Antimalaria Kombinasi Ekstrak Kulit Batang Pulai (*Alstonia scholaris*) dan Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Histopatologi Limpa pada Mencit yang Diinfeksi *Plasmodium berghei*

Tim Penyusun : drh. Putri Reno Intan
Tri Wahyuni L, S.Farm
Nita Prihartini, SKM

Malaria masih merupakan penyakit endemis di sebagian besar wilayah Indonesia. Pengendalian malaria selalu mengalami perkembangan, terutama dalam hal pengobatan. Resistensi parasit terhadap obat-obatan malaria yang sudah ada seperti: kina, klorokuin, dll membuat penelitian terhadap obat-obat tradisional semakin berkembang. Kulit batang pulai dan meniran merupakan salah satu tanaman obat yang telah diteliti dan berpotensi sebagai obat antimalaria. Tanaman pulai (*Alstonia scholaris*) termasuk dalam famili *Apocynaceae* yang secara luas digunakan sebagai obat anti malaria. Bagian tanaman berupa kulit kayu dapat mengatasi demam, malaria, dan limpa membesar. Meniran (*Phyllanthus niruri*) adalah salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas imunomodulator, dan dapat membantu tubuh untuk mengoptimalkan sistem imun yang berperan dalam pertahanan tubuh.

Pada penelitian ini akan diketahui apakah pemberian kombinasi ekstrak kulit batang pulai dan meniran memberikan pengaruh pada mencit yang di infeksi *Plasmodium berghei* jika dilihat dari histopatologi limpa, diferensiasi leukosit dan derajat parasitemianya. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan formula herbal untuk antimalaria yang aman dan berkhasiat.

Penelitian ini menggunakan dua macam ekstrak yang simplisianya didapat dari Balitro Bogor. Kedua simplisia dibuat ekstrak menggunakan alkohol 70% dengan metode maserasi. Dari uji identifikasi kualitatif dan kuantitatif kulit batang pulai mengandung tanin, saponin, flavanoid dan terpenoid dan alkaloid, sedangkan meniran mengandung tanin, terpenoid dan glikosida kadenoid. Dan

dari uji kuantitatif kadar air kulit batang pulai lebih rendah dibanding meniran, sedangkan kadar quercetin kulit batang pulai lebih tinggi dibandingkan meniran. Hasil penelitian LD50 oral, ramuan ekstrak kulit batang pulai dan meniran menunjukkan pada dosis 14285 mg/kg bb, tidak terjadi kematian pada hewan coba, sehingga LD50 semu untuk ekstrak kulit batang pulai dan meniran adalah lebih besar dari 14285 mg/kg bb.

Dari uji antimalaria yang dilakukan, menunjukkan bahwa DHP dapat menekan jumlah parasitemia pada mencit terinfeksi. Dari hasil analisa statistik menunjukkan bahwa dosis sedang lebih baik dalam menurunkan jumlah parasitemia diantara semua kelompok percobaan. Data parasitemia pada hari ke-7 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara DHP dengan dosis besar, sedang, kecil dan dosis pulai. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian herbal dengan berbagai dosis dapat menurunkan jumlah parasitemia. Semua kelompok percobaan kecuali CMC nilai parasitemianya sebesar 0%. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan telah mengalami kesembuhan.

Hasil penghitungan hemozoin limpa, semua kelompok perlakuan terlihat kecenderungan kenaikan hemozoin kecuali pada kelompok DBC terjadi kecenderungan penurunan hemozoin.

Dari penelitian yang telah dilakukan, disimpulkan bahwa ekstrak kulit batang pulai mengandung tanin, saponin, flavanoid dan terpenoid dan alkaloid, sedangkan meniran mengandung tanin, terpenoid dan glikosida kadenoid. Berdasarkan uji toksisitas akut kombinasi kulit batang pulai dan meniran, LD50 semu untuk ekstrak kulit batang pulai dan meniran adalah lebih besar dari 14285 mg/kg bb.

Kombinasi kulit batang pulai dan meniran dosis sedang campuran memberikan hasil yang bermakna dalam menekan angka parasitemia pada puncak infeksi dan nilai diferensial leukosit baik itu limfosit, monosit dan neutrofil memperlihatkan nilai yang hampir sama dengan kelompok DHP.

Pemberian kombinasi kulit batang pulai dosis sedang campuran dapat menurunkan nilai hemozoin pada limpa secara bermakna bila dibandingkan kelompok perlakuannya pada hari ke-7 setelah infeksi.

Beberapa hal yang bisa dijadikan saran setelah penelitian ini dilakukan adalah perlunya dilakukan pengambilan data nilai eritrosit dan hemoglobin sehingga dapat diketahui tingkat anemia mencit percobaan, perlu dilakukan penelitian kearah respon imun yang terlibat dalam eliminasi parasit dan perlu penelitian toksisitas subkronik untuk mengetahui keamanan kombinasi ekstrak.

ABSTRAK

Malaria masih merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian. Malaria adalah penyakit infeksi parasit pada manusia dan menjadi masalah kesehatan masyarakat, terutama di daerah endemis malaria. Pengendalian malaria selalu mengalami perkembangan, salahsatunya dalam hal pengobatan. Resistensi parasit terhadap obat-obatan malaria membuat penelitian terhadap obat-obat tradisional semakin berkembang. Kulit batang pulai dan meniran merupakan salah satu tanaman obat yang telah diteliti kemungkinannya sebagai obat antimalaria. Pada penelitian ini akan diuji kombinasi kulit batang pulai yang berperan sebagai antimalaria dengan meniran sebagai imunomodulator.

Penelitian ini menggunakan hewan coba, yaitu mencit galur *Swiss webster*. dan merupakan penelitian eksperimen laboratorium menggunakan desain penelitian *post-test only control*. Penelitian dilakukan dari bulan maret sampai dengan oktober 2015 yang bertempat di Laboratorium Hewan Coba dan Laboratorium Farmasi, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Badan Litbangkes Kemenkes RI.

Hasil penelitian fitokimia menunjukkan bahan ekstrak kulit batang pulai mengandung tanin, saponin, flavanoid dan terpenoid dan alkaloid, sedangkan meniran mengandung tanin, terpenoid dan glikosida kadenoid. Berdasarkan uji toksisitas akut kombinasi kulit batang pulai dan meniran (perbandingan 1:1) LD50 semu untuk ekstrak kulit batang pulai dan meniran adalah lebih besar dari 14285 mg/kg bb (practically non toxic), kombinasi kulit batang pulai dan meniran dosis campuran 443,34 mg/kgbb kulit batang pulai dan 443,34 mg/kgbb meniran memberikan hasil yang bermakna dalam menekan angka parasitemia pada puncak infeksi dan nilai diferensial leukosit baik itu limfosit, monosit dan neutrofil memperlihatkan nilai yang hampir sama dibandingkan kelompok DHP. Dan pada dosis ini juga dapat menekan jumlah hemozoin diawal infeksi pada limpa secara bermakna bila dibandingkan kelompok perlakuan lainnya, dan memiliki jumlah hemozoin yang lebih rendah pada hari ke-7 dan ke-14 pasca infeksi dibanding kelompok lainnya.

Key words: pulai, meniran, *plasmodium berghei*, limpa

DAFTAR ISI

I.	PENDAHULUAN	1
1.1.	Latar Belakang	1
1.2.	Rumusan masalah	4
II.	TINJAUAN PUSTAKA	4
III.	TUJUAN DAN MANFAAT	12
3.1.	Tujuan umum	12
3.2.	Tujuan khusus.....	12
3.3.	Manfaat	12
IV.	METODE PENELITIAN	12
4.1.	Kerangka Teori Penelitian.....	12
4.2.	Kerangka Konsep Penelitian	13
4.3.	Desain dan Jenis penelitian	13
4.4.	Tempat dan Waktu Penelitian	14
4.5.	Populasi dan Sampel	14
4.6.	Kriteria inklusi dan eksklusi.....	14
4.7.	Variabel.....	15
4.8.	Cara Pengumpulan Data.....	15
4.9.	Alur Kerja.....	17
4.10.	Prosedur Kerja	18
4.11.	Analisis data	26
V.	HASIL	27
VI.	PEMBAHASAN	33
VII.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
7.1.	KESIMPULAN	41
7.2.	SARAN.....	41
VIII.	UCAPAN TERIMAKASIH	41
IX.	DAFTAR KEPUSTAKAAN.....	42

DAFTAR TABEL

Tabel 1	Nilai normal diferensial leukosit	7
Tabel 2	Rendemen ekstrak kulit batang pulai dan meniran	27
Tabel 3	Identifikasi kualitatif ekstrak kulit batang pulai dan meniran	27
Tabel 4	Penetapan kadar air dan kadar quercetin pada ekstrak kulit batang pulai dan meniran	28
Tabel 5	Rata-rata berat badan tikus pada uji toksisitas akut (LD50	28
Tabel 6	Persen parasitemia mencit selama infeksi <i>P. berghei</i>	29

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1.	Siklus hidup plasmodium penyebab malaria	5
Gambar 2.	Grafik persen parasitemia mencit selama infeksi <i>P. berghei</i>	30
Gambar 3.	Perubahan persentase limfosit mencit selama infeksi <i>P. berghei</i>	31
Gambar 4.	Perubahan persentase monosit mencit selama infeksi <i>P. berghei</i>	31
Gambar 5.	Perubahan persentase neutrofil mencit selama infeksi <i>P. berghei</i>	32
Gambar 6.	Nilai rata-rata hemozoin mencit selama infeksi plasmodium <i>P. berghei</i>	33

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Pemeriksaan Chromatography ekstrak kulit batang pulai dan meniran	48
Lampiran 2	Tabel Berat Badan LD50 oral tikus ekstrak kulit batang pulai dan meniran	55
Lampiran 3	Uji statistik persen parasitemia	57
Lampiran 4	Uji statistik persen limfosit	61
Lampiran 5	Uji statistik persen monosit	65
Lampiran 6	Uji statistik persen neutrofil	69
Lampiran 7	Uji statistik hemozoin	74
Lampiran 8	Gambar pengamatan mikroskopis pada ulas darah dan histopatologi limpa mencit	77

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Malaria masih merupakan salah satu masalah kesehatan masyarakat yang dapat menyebabkan kematian terutama pada kelompok risiko tinggi yaitu bayi, anak balita, ibu hamil, selain itu malaria secara langsung menyebabkan anemia dan dapat menurunkan produktivitas kerja.

Malaria adalah penyakit infeksi parasit pada manusia dan menjadi masalah kesehatan masyarakat, terutama di daerah endemis malaria, karena angka kesakitan dan kematiannya masih tinggi. Lebih dari 90 negara di dunia merupakan daerah endemis malaria yang didiami lebih kurang 2,4 milyar orang atau 40% dari penduduk dunia. Malaria menyebabkan 300 hingga 500 juta kasus dengan kematian 500 ribu hingga 2,4 juta orang setiap tahun, sebagian besar (> 90%) terjadi di Afrika.¹

Insiden malaria pada penduduk Indonesia tahun 2013 adalah 1,9% menurun dibanding tahun 2007 (2,9%), tetapi di Papua Barat mengalami peningkatan tajam jumlah penderita malaria. Dari 33 provinsi di Indonesia, 15 provinsi mempunyai prevalensi malaria diatas angka nasional yaitu diatas 6%, sebagian besar berada di Indonesia Timur.²

Pengendalian malaria selalu mengalami perkembangan, salahsatunya dalam hal pengobatan. Resistensi parasit terhadap obat-obatan malaria membuat penelitian terhadap obat-obat tradisional semakin berkembang. Kulit batang pulai dan meniran merupakan salah satu tanaman obat yang telah diteliti kemungkinannya sebagai obat antimalaria.

Dulu malaria diobati dengan klorokuin, setelah ada laporan resistensi, saat ini telah dikembangkan pengobatan baru yaitu dengan ACT (Artemisinin-based Combination Therapies). Penggunaan obat antimalaria merupakan salah satu upaya penting dalam pengobatan malaria. Masalah yang sering timbul adalah resistensi terhadap obat yang disebabkan oleh kemampuan parasit untuk melakukan mutasi gen, sehingga resisten terhadap obat antimalaria yang digunakan. Resistensi juga dapat disebabkan oleh penggunaan obat yang tidak tepat, perpindahan penduduk dari suatu daerah endemis ke daerah endemis lainnya, serta banyaknya penggunaan antibiotika golongan sulfa.¹

Penggunaan kombinasi obat lain juga telah banyak dilakukan sesuai kondisi resistensi suatu daerah seperti kombinasi antara amodiakuin, meflokuin, atau sulfadoksin-pirimetamin dengan obat dari turunan artemisin.¹

Dalam 30 tahun terakhir, *P. falciparum* telah resisten terhadap obat antimalaria yang ada. Di Asia, resistensi terhadap klorokuin dan sulfadoksin-pirimetamin makin meluas, manfaat dari kina makin berkurang, dan pada beberapa negara meflokuin mengalami 50 % kegagalan pengobatan. Akibatnya pengobatan malaria haruslah disesuaikan dengan kondisi geografis tiap daerah.¹

Salah satu faktor yang memperburuk masalah resistensi adalah tersedianya obat antimalaria secara bebas di toko obat terutama di daerah endemis, seperti klorokuin dan kina. Disisi lain masyarakat tidak sepenuhnya mengetahui cara pemakaian obat yang benar dan tepat. Pemakaian obat dengan dosis yang tidak adekuat akan memperbesar kemungkinan timbulnya resistensi.¹

Di Indonesia, kasus *P. falciparum* resisten klorokuin dilaporkan pertama kali pada tahun 1973 dari Kalimantan Timur, yang diikuti oleh propinsi lain di Indonesia. Hingga tahun 1992 kasus malaria falciparum resisten terhadap klorokuin sudah dijumpai di seluruh wilayah Indonesia. Kasus *P. falciparum* resisten terhadap sulfadoksin-pirimetamin dijumpai pertama kali pada tahun 1978. Hingga tahun 1992 sudah dijumpai di 10 propinsi di Indonesia yaitu propinsi Nanggroe Aceh Darussalam, Sumatera Utara, Riau, Lampung, Kalimantan Timur, Sulawesi Utara, Sulawesi Tengah, Sulawesi Selatan, Jawa Tengah, dan Papua dengan derajat resistensi.³

WHO merekomendasikan penggunaan ACT dalam pengobatan malaria untuk mencegah resistensi obat dan menghapuskan penggunaan artemisinin monoterapi yang dapat menyebabkan resistensi parasit.⁴ Menurut kebijakan Kementerian Kesehatan tahun 2007 mensyaratkan bahwa setiap kasus malaria harus dibuktikan dengan hasil pemeriksaan sediaan darah dan semua kasus positif harus diobati dengan pengobatan kombinasi berbasis artemisinin atau ACT.⁵

Tanaman pulai termasuk dalam famili *Apocynaceae*, suku kamboja-kambojaan yang secara luas digunakan sebagai obat berbagai penyakit seperti mengobati demam, merangsang nafsu makan, malaria dan pembesaran limpa.⁶ Kulit batang pulai mengandung saponin, flavanoid dan polifenol.⁷

Meniran (*Phyllanthus niruri* L) adalah salah satu tanaman yang mempunyai aktivitas imunomodulator, yang membantu tubuh untuk mengoptimalkan sistem imun yang berperan dalam pertahanan tubuh.⁸

Meniran mempunyai efek terhadap respon imun nonspesifik maupun spesifik. Efeknya terhadap respon imun non spesifik yaitu meningkatkan fagositosis dan kemotaksis makrofag, kemotaksis neutrofil, sitotoksitas sel NK dan aktivitas hemolisis komplemen, sedangkan terhadap respon imun spesifik, ekstrak meniran meningkatkan proliferasi sel limfosit T dan meningkatkan sekresi TNF α .⁹

Tanaman herba meniran merupakan salah satu tanaman yang digunakan secara tradisional oleh masyarakat untuk mengobati berbagai macam penyakit, antara lain adalah sebagai obat sakit perut, penyakit empedu, penolak demam dan antimalaria. Tanaman tersebut mengandung senyawa dari alkaloid, flavanoid serta lignan.¹⁰

Pada penelitian ini akan diuji kombinasi kulit batang pulai yang berperan sebagai antimalaria dengan meniran sebagai imunomodulator dengan harapan dapat meningkatkan status kesehatan mencit yang terinfeksi *Plasmodium berghei*. Dengan asumsi mencit yang terinfeksi plasmodium yang berarti dalam kondisi metabolisme rendah, diberikan ekstrak meniran yang diharapkan dapat meningkatkan imunitas dan metabolisme sehingga dapat meningkatkan kerja kulit batang pulai sebagai antimalaria.

Plasmodium berghei merupakan salah satu spesies malaria yang menyerang mamalia selain manusia, dan spesies ini adalah salah satu dari empat spesies yang menyerang rodensia di Afrika Barat. Parasit ini merupakan subyek yang praktis untuk penelitian dan percobaan mengenai parasit mamalia serta terbukti analog dengan malaria manusia pada segi-segi penting dari struktur, fisiologi dan siklus hidup. *Plasmodium berghei* merupakan model ideal untuk penelitian parasit malaria dibandingkan tiga spesies parasit rodensia yang lain, karena telah tersedianya teknologi kultivasi *in vitro* dan dapat dilakukan dalam skala besar, adanya data tentang pemetaan dan struktur gen, metode untuk memodifikasi parasit secara genetis, dan klon-klon yang khas dan galur-galur mutan yang dimodifikasi secara genetis.¹¹

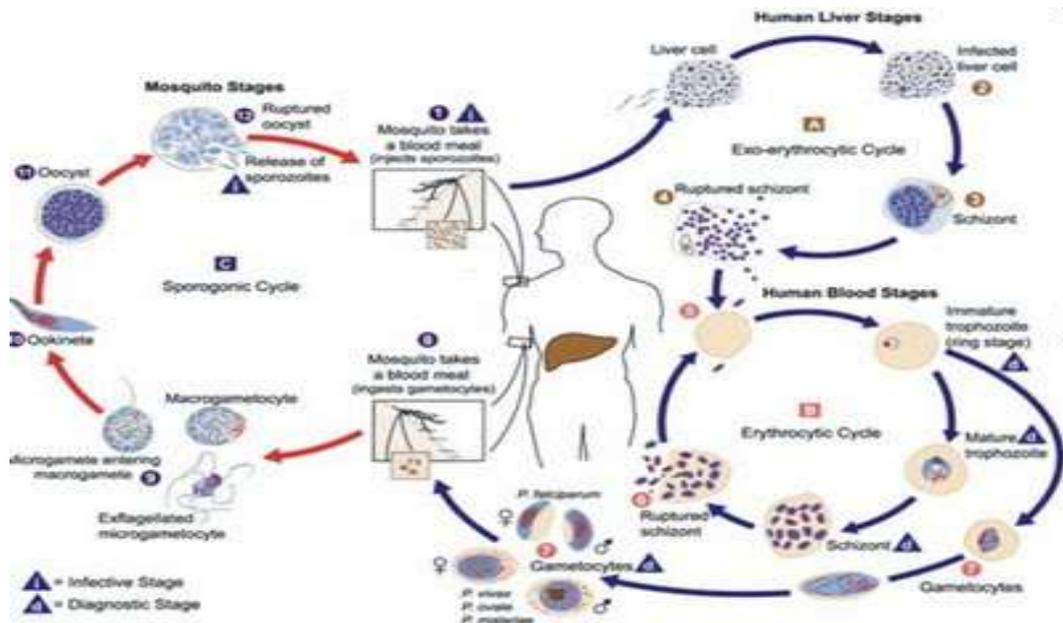
1.2. Rumusan masalah

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui peran ekstrak kombinasi kulit batang pulai dan meniran terhadap gambaran histopatologi limpa pada mencit yang diinfeksi *P. Berghei*. Pada penelitian ini akan dilakukan uji keamanan (toksisitas akut) dan uji antimalaria ekstrak kulit batang pulai dan meniran sebagai alternatif antimalaria.

Malaria termasuk penyakit endemis disebagian besar wilayah di Indonesia. Penggunaan obat antimalaria merupakan upaya penting dalam pengobatan malaria, namun sekarang ini sudah banyak terjadi resistensi pada beberapa obat antimalaria. Oleh karena itu perlu dicari alternatif pengobatan sebagai antimalaria. Indonesia kaya akan sumber daya tanaman obat dan masyarakatnya banyak yang menggunakan tanaman sebagai obat. Salah satu tanaman yang berkhasiat antimalaria adalah kulit batang pulai dan meniran sebagai tanaman imunomodulator. Pada penelitian ini akan dilihat pengaruh pemberian kombinasi ekstrak kulit batang pulai dan meniran sebagai antimalaria.

II. TINJAUAN PUSTAKA

Plasmodium berghei adalah hemoprotozoa yang menyebabkan penyakit malaria pada rodensia dan mempunyai sifat dasar biologi (morfologi, siklus hidup, genetika) sama dengan plasmodium yang menyerang manusia.¹² Siklus hidup parasit malaria berlangsung pada nyamuk anopheles untuk siklus seksual (sporogoni) dan pada inang vertebrata untuk siklus aseksual. Sebagian pertumbuhan parasit pada inang terjadi di dalam sel (intrasel), yaitu pada sel hati dan sel darah. Dalam perkembangbiakannya dalam sel hati dan darah, parasit mengalami perubahan terus menerus pada bentuk maupun struktur molekulnya, sehingga menimbulkan stimulus yang akan direspon oleh sistim imun tubuh. Parahnya penyakit malaria berhubungan dengan densitas parasit dan kemampuan parasit bermultiplikasi baik dalam sel hati maupun sel darah merah (eritrosit). Salah satu ciri patologis yang menjadi ciri khusus infeksi malaria adalah pembesaran organ limpa dan hati yang disebabkan oleh banyaknya eritrosit yang terinfeksi, limfosit dan sel makrofag yang terdeposit dalam kedua organ tersebut.¹³



Gambar 1. Siklus hidup plasmodium penyebab malaria¹⁴

Dihydroartemisinin+piperakuin merupakan suatu tablet fix dose yang mengandung 40 mg dihidroartemisinin dan 320 mg piperakuin. Obat ini diperlukan peroral selama 3 hari. Tujuan dari terapi kombinasi adalah untuk meningkatkan efikasi antimalaria maupun aktivitas sinergistik antimalaria dan memperlambat progresifitas resistensi parasit terhadap obat antimalaria yang baru. Proses pengobatan kombinasi dapat menggunakan lebih dari satu macam obat antimalaria yang bersifat skizontisida darah. Obat ini dapat dalam bentuk formulasi atau gabungan, yang mekanisme kerjanya bebas namun target biokimianya berbeda pada parasit malaria¹⁵

Darah merupakan cairan pembawa berbagai zat penting tubuh, dipompakan oleh jantung melalui suatu sistem pembuluh darah tertutup. Unsur seluler dari darah terdiri dari sel darah putih, sel darah merah dan trombosit yang tersuspensi di dalam plasma. Volume darah total yang beredar pada keadaan normal sekitar 8% dari berat badan. Sekitar 55% dari volume tersebut adalah plasma¹⁶

Leukosit adalah sistem pertahanan tubuh yang dibentuk sebagian dalam sumsum tulang dan sebagian lagi dalam organ limfoid seperti timus, bursa fabrisius dan limpa pada unggas Pada keadaan normal terdapat $6 - 15 \times 10^3$ /mm³ leukosit per mikroliter darah mencit. Dari jumlah tersebut, jenis terbanyak

adalah granulosit. Sel granulosit muda memiliki inti berbentuk sepatu kuda, yang akan berubah menjadi multilobular dengan meningkatnya umur sel. Sebagian besar sel tersebut mengandung granula netrofilik (neutrofil), sedangkan sebagian kecil mengandung granula yang dapat diwarnai dengan zat pewarna asam (eosonofil), dan sebagian lagi mengandung granula basofilik (basofil). Dua jenis sel lain yang lazim ditemukan dalam darah tepi adalah limfosit, yang memiliki inti bulat besar dan sitoplasma sedikit, serta monosit, yang mengandung banyak sitoplasma tidak bergranula dan mempunyai inti berbentuk menyerupai ginjal. Kerja sama sel-sel tersebut menyebabkan tubuh memiliki sistem pertahanan yang kuat terhadap berbagai tumor dan infeksi virus, bakteri serta parasit ¹⁶

Semua sel granulosit memiliki granula sitoplasmik mengandung substansi biologik aktif, yang berperan dalam reaksi peradangan dan alergi ¹⁶ Neutrofil dewasa berdiameter 10-12 μm dengan sitoplasma beraspek kelabu pucat dan terdapat butir-butir halus berwarna ungu serta inti bergelambir.

Untuk dapat mempertahankan kadar normal di dalam peredaran darah, diperlukan pembentukan lebih dari 100 milyar sel neutrofil per hari. Sebagian besar sel ini akan memasuki jaringan. Sel-sel ini ditarik dan bergulir di permukaan endothelium oleh kerja selektin. Selanjutnya sel-sel tersebut akan berikatan dengan kuat pada molekul perekat netrofil dari golongan integrin. Tahap berikutnya, sel-sel ini menyusup di antara sel endothelium, menembus dinding kapiler, melalui proses yang disebut diapedesis. Sejumlah besar sel yang meninggalkan sirkulasi dan masuk ke dalam saluran pencernaan akan hilang dari tubuh. ¹⁶

Limfosit adalah leukosit agranulosit yang mempunyai ukuran dan bentuk yang bervariasi. Variasi ukuran besarnya terdiri dari limfosit besar, sedang dan kecil. Limfosit kecil berukuran 9 μm , inti besar dan kuat mengambil warna, sitoplasma berwarna biru pucat, inti memiliki sedikit lekuk di satu sisi. Sedangkan limfosit sedang dan besar berukuran 12-15 μm , lebih banyak sitoplasma, inti lebih besar dan pucat dibandingkan limfosit kecil. Limfosit besar berdiameter 12-16 μm dan limfosit kecil 9-12 μm . ¹⁶

Limfosit merupakan unsur kunci pada proses kekebalan. Fungsi utama limfosit adalah memproduksi antibodi atau sebagai sel efektor khusus dalam

menanggapi antigen yang melekat pada makrofag. Limfosit tertentu mengikat dirinya pada agen-agen asing dan merusaknya¹⁷. Beberapa limfosit dibentuk di sumsum tulang, tetapi bagian terbesar dibentuk di dalam kelenjar limfe, timus dan limpa dari sel prekursor yang berasal dari sumsum tulang, setelah mengalami proses di dalam timus atau bursa ekivalen menjadi prekursor sel T atau sel B.¹⁶ Limfosit T berperan dalam membantu dalam proses tanggap kebal berperantara sel. Sedangkan limfosit B berperan dalam respon humoral dengan produksi sekresi utama adalah immunoglobulin (antibodi). Pada umumnya limfosit memasuki sistem peredaran darah melalui pembuluh limfe. Hanya sekitar 2% dari seluruh limfosit dalam tubuh terdapat di darah perifer, sebagian besar sisanya terdapat di organ limfoid.

Monosit adalah leukosit agranulosit, memiliki butir azurofil yang tidak spesifik dan merupakan sel leukosit terbesar dengan diameter 15-20 µm. Sitoplasmanya bersifat warna basofil dengan sitoplasma lebih banyak dibandingkan dengan limfosit besar. Inti monosit berbentuk seperti tapal kuda atau ginjal.

Monosit diproduksi di sumsum tulang. Monosit dari sumsum tulang masuk ke dalam darah dan beredar selama kurang lebih 72 jam¹⁶. Sel-sel ini kemudian masuk ke jaringan dan menjadi makrofag jaringan. Pada saat ini monosit telah mempunyai fungsi sebagai makrofag dan mampu melawan agen-agen asing. Makrofag jaringan, termasuk sel Kupffer di hati, makrofag alveolar paru, dan mikrogilia di otak, seluruhnya berasal dari sirkulasi¹⁷.

Sel makrofag akan diaktifkan oleh limfokin dari limfosit T. Makrofag yang aktif akan bermigrasi sebagai respon terhadap rangsangan kemotaksis, selanjutnya menelan dan membunuh bakteri melalui proses yang umumnya serupa dengan neutrofil.

Nilai normal diferensial leukosit¹⁸

Jenis Sel Darah	Rata-rata	Kisaran Normal
Leukosit*	19,6	5.12-5.66
Neutrofil (%)	15	6-40
Limfosit (%)	72	36-90
Monosit (%)	1	0.7-14
Eosinofil (%)	2	0-15
Basofil (%)	10	0-3

Limpa merupakan tempat respon imun utama yang merupakan saringan terhadap antigen asal darah.¹⁹ Limpa merupakan tempat terjadinya filtrasi eritrosit yang terinfeksi parasit, mengalami deformitas dan terikat dengan antibodi untuk selanjutnya dirusak oleh makrofag. Selain itu limpa juga merupakan tempat mempertemukan antigen parasit dengan sistem imun tubuh, dan diduga limpa adalah tempat utama pengaturan sistem imun untuk menentukan komponen imunitas yang akan diaktifkan⁹. Limpa pada penderita malaria berfungsi untuk menghilangkan eritrosit yang terinfeksi dan produknya seperti pigmen malaria dari aliran darah. Plasmodium dan pigmen malaria (haemozoin) difagositosis secara aktif oleh makrofag limpa sehingga pada pemeriksaan makroskopis limpa tampak membesar sedangkan secara mikroskopis terdapat peningkatan jumlah sel makrofag dan haemozoin yang tersebar²⁰. Limpa juga berperan dalam menurunkan persentase parasitemia²¹

Hemozoin adalah produk dari plasmodium, berkontribusi pada patogenesis anemia malaria. H₂O₂ yang dihasilkan dari pencernaan hemoglobin oleh parasit, menginduksi makrofag untuk mengeluarkan sitokin proinflamasi dan mediator lainnya dengan efek penghambatan pada eritropoiesis.²²

Pulai (*Alstonia scholaris*)

Taksonomi Pulai (*Alstonia scholaris*)

Pohon pulai merupakan tanaman yang toleran terhadap berbagai jenis tanah dan habitat. Pulai termasuk tanaman keras dan berkayu. Sistematika (taksonomi) tumbuh-tumbuhan menurut Heyne (1987) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Apocynales

Marga : Apocynaceae

Genus : *Alstonia*

Spesies : *Alstonia scholaris* (L.) R. Br

Penyebaran dan Morfologi Pulai (*Alstonia scholaris*)

Pulai tersebar luas di Asia Pasifik mulai India dan Srilanka sampai daratan Asia Tenggara dan China Selatan, seluruh Malaysia hingga Australia Utara

dan Kepulauan Solomon. Diintroduksi ke Amerika Utara sebagai tanaman hias. Toleran terhadap berbagai-macam tanah dan habitat, dijumpai sebagai tanaman kecil yang tumbuh di atas karang atau bagian tajuk dari hutan primer dan sekunder. Banyak dijumpai di dataran rendah/pesisir dengan curah hujan tahunan 1000-3800 mm. Juga dijumpai pada ketinggian diatas 1000 m dpl.

Salah satu sifat tanaman ini dapat tumbuh di atas tanah dangkal. Pulau tidak tumbuh pada sebaran alami yang suhunya kurang dari 8°C, yang menunjukkan jenis ini tidak tahan udara dingin. Pohon pulau (*Alstonia scholaris*) memiliki bentuk daun mirip dengan daun kamboja, dan bunga warna kuning yang indah. Batangnya lurus, tegak, berkayu, bulat, percabangan simpodia, putih kotor dan mengandung banyak getah berwarna putih, rasa getahnya sangat pahit. Rasa pahit tersebut didapatkan pula pada akar, kulit batang dan daunnya. Akar pohon pulau merupakan akar tunggang dan berwarna coklat. Pulau umumnya dapat mencapai tinggi 20 hingga 25 m dan diameter 40 hingga 60 cm. Pulau memiliki pertumbuhan yang sangat baik dan dapat dibiakkan dengan stek dan cabang. Daun pohon pulau merupakan daun tunggal, tersebar, lonjong, tepi rata, ujung, ujung dan pangkal meruncing, pertulangan menyirip, permukaan mengkilap, panjang 20-25 cm, lebar 8-10 cm, berwarna hijau. Bunga pohon pulau merupakan bunga majemuk, membentuk malai, berkelamin dua, berada di ujung cabang, kelopak bunga berbentuk tabung bercangap, benang sari silindris, kepala sari berbentuk ginjal, putik berbentuk tabung, mahkota berbentuk terompet, berwarna putih. Buahnya bumbung, berbentuk pita, berwarna putih kehijauan. Biji bulat, kecil, dan berwarna putih.

Kegunaan dan Manfaat Pulau (*Alstonia scholaris*)

Kayunya tidak awet, hanya memungkinkan untuk konstruksi ringan di dalam ruangan, atau untuk industri pulp dan kertas. Di Patana (Srilanka) digunakan untuk kayu bakar dan dikelola dengan daur pendek (6-8 tahun), tetapi kurang baik dijadikan arang. Kulitnya mengandung alkaloid sebagai bahan obat. Kayunya banyak digunakan untuk papan tulis sekolah, sehingga dinamakan *scholaris*.

Tanaman pulau digunakan sebagai obat tradisional di kawasan Asia. Di Kamboja, kulit kayu digunakan untuk melancarkan menstruasi dan untuk

mengobati malaria kronis, pembesaran limpa dan gangguan hati. Di Indonesia, tanaman ini digunakan untuk menghentikan diare, mengobati diabetes dan menyembuhkan wasir. Rebusan daun muda diminum untuk mengobati beri-beri.

Pucuk daun disangrai dengan kelapa digunakan untuk mengobati stomatitis. Di Malaysia, tanaman ini digunakan untuk mengobati malaria. Getah tanaman digunakan untuk meredakan sakit gigi. Rebusan kulit kayu diminum untuk mengobati demam, menguatkan tubuh, merangsang nafsu makan, dan mengobati frambusia (merupakan penyakit infeksi kulit yang disebabkan oleh bakteri *treponema*). Di Burma, getahnya digunakan untuk menyembuhkan bisul. Di India, kulit kayu digunakan untuk melancarkan ASI dan untuk mengobati kanker. Di Filipina, tanaman ini digunakan secara internal untuk mengobati demam, menghentikan disentri, menyembuhkan luka, dan mengobati epilepsi. Di Vietnam, kulit kayu digunakan untuk mengobati malaria, pembesaran limpa, sedangkan daun digunakan untuk melancarkan ASI.

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Taksonomi Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Kingdom : Plantae

Divisi : Magnoliophyta

Sub divisi : Angiospermae

Kelas : Magnoliopsida (Dicotyledoneae)

Sub kelas : Rosidae

Ordo : Euphorbiales

Famili : Euphorbiaceae

Genus : *Phyllanthus* (L) Murr.

Spesies : *Phyllanthus niruri* L.

(Herbal Guides, 2008)

Deskripsi Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Meniran (*Phyllanthus niruri* L.) merupakan tumbuhan semusim, tumbuh tegak, bercabang-cabang, tinggi 30-50 cm. Batang bulat, liat, tidak berbulu, licin, hijau pucat, diameter ± 3 mm, bagian bawah batang berwarna kecokelatan dan cabangnya hijau pucat. Daun majemuk berseling, warna hijau, anak daun 15-24 helai, bulat telur, tepi rata, pangkal membulat, ujung tumpul, panjang sekitar 1,5

cm, lebar sekitar 7 mm. Dalam 1 tanaman ada bunga betina dan bunga jantan. Bunga jantan keluar di bawah ketiak daun, sedangkan bunga betina keluar di atas ketiak daun, bunga berwarna kekuningan. Daun kelopak berbentuk bintang, mahkota putih kecil. Buah kotak, bulat, licin, bergaris tengah 2- 2,5 mm, berwarna hijau keunguan. Herba ini rasanya agak pahit, manis, sifatnya sejuk, astrigen. Berkhasiat membersihkan hati, antiradang, penurun demam (antiperik), diuretik, peluruh dahak, peluruh haid, menerangkan penglihatan dan menambah nafsu makan.

Kandungan Zat dalam Herba Meniran (*Phyllanthus niruri* L.)

Berbagai macam bahan organik telah ditemukan dalam herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.). Beberapa golongan zat utama yang terkandung adalah lignan, tanin, polifenol, alkaloid, flavonoid, terpenoid dan steroid. Berikut adalah zat yang telah diisolasi dari ekstrak herba meniran (*Phyllanthus niruri* L.):

1) Lignan

Golongan lignan yang terkandung dalam tanaman ini terbagi menjadi dua jenis yaitu *1,4-diarylbutane* (*phyllanthin, niranthin secoisolariciresinol trimethyl ether, hydroxy-niranthin, nirphyllin, linnanthin, dan demethylenedioxy-niranthin*) dan *1-aryl tetralin* (*hypo-phyllanthin, nirtetralin, phyltetralin, lintetralin, isolintetralin, dan neonirtetralin*).

2) Courmarin, tanin dan polifenol

Golongan courmarin, tanin dan polifenol yang telah diisolasi dari tanaman ini yaitu *gallic acid, ellagic acid, brevifolin carboxylic acid, ethyl brevifolin carboxylate, methyl brevifolin carboxylate, geraniin, corilagin, phyllanthusin D, amariin, amariinic acid, elaeocarpusin, geraniinic acid B, catechin, epicatechin, gallo-catechin, epigallocatechin, epicatechin 3-O-gallate, epigallo-catechin 3-O-gallate*.

3) Flavonoid

Golongan flavonoid yang telah diisolasi yaitu *quercetin, rutin, astragalin, quercitrin, isoquercitrin, kaempferol-4'-rhamnopyranoside, eridictyol rhamnopyranoside, quercetin-3-O-glucopyranoside, kaempferol-3-O-rutinoside*.

4) Terpenoid

Golongan terpenoid yang telah diisolasi yaitu : *lupeol*, *lupeol acetate*, *phyllantenol*, *phyllantenone*, *phyllanteol*, *tetracosahexa-cis-2-cis-6-cis-10-trans-14-trans-18-trans-22-en-1-ol,3-7-11-15-19-23-hexamethyl*.

5) Alkaloid

Golongan alkaloid yang telah diisolasi dari tanaman ini yaitu : *deca-trans-2-cis-4-dienamide*, *octa-trans-2-trans-4-dienamide* dan *pentacosanol ester*²³

III. TUJUAN DAN MANFAAT

3.1. Tujuan umum

Mendapatkan formula herbal untuk antimalaria yang aman dan berkhasiat.

3.2. Tujuan khusus

- Melakukan karakterisasi kimia ekstrak kulit batang pulai dan meniran
- Menentukan dosis toksisitas akut kombinasi ekstrak kulit batang pulai dan meniran.
- Menghitung nilai parasitemia pada semua kelompok percobaan.
- Menghitung nilai diferensiasi leukosit pada semua kelompok percobaan.
- Menghitung jumlah hemozoin pada limpa mencit pada semua kelompok percobaan.

3.3. Manfaat

Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi mengenai alternatif terapi antimalaria.

IV. METODE PENELITIAN

4.1. Kerangka Teori Penelitian

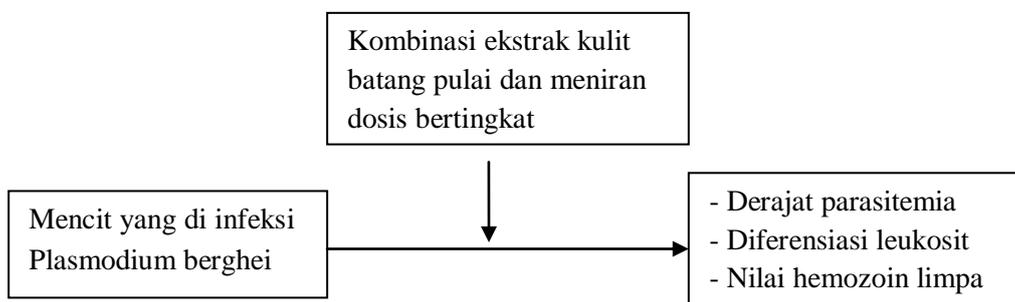
Imunitas tubuh seseorang dibutuhkan melawan infeksi secara alamiah. Respon imun seluler dan humoral dibutuhkan untuk eliminasi parasit malaria. Selain bersifat protektif, respon imun terhadap malaria dapat menjadi pemicu imunopatologi. Komplikasi malaria seperti malaria serebral atau anemia berat merupakan akibat proses imunologik baik pada manusia maupun pada hewan coba.²⁴

Hemozoin adalah pigmen malaria yang terbentuk dari proses detoksifikasi heme. Proses detoksifikasi ini dilakukan Plasmodium setelah menyerap haemoglobin yang terdapat di eritrosit inang. Selama siklus intraerithrositik, *P.falciparum* menyerap 25 – 75 % Hb yang selanjutnya didegradasi didalam food vacuole Plasmodium (pH 4,5 – 5,5) oleh protease spesifik dan asam amino yang dihasilkan selanjutnya digunakan sebagai sintesa protein. Selama degradasi Hb akan dikeluarkan free heme yang bersifat sitotoksik bagi Plasmodium dan akan menyebabkan kerusakan membran Plasmodium. Pada *P.falciparum* salah satu cara detoksifikasi heme dicapai dengan cara polimerisasi free heme menjadi bentuk kristal yang insoluble yang dikenal sebagai hemozoin (pigmen malaria).

Hemozoin saat ini menjadi fokus penelitian obat anti malaria, karena mekanisme obat antimalaria yang selama ini bekerja dengan cara menghancurkan sintesa nucleoprotein melalui ikatan dengan DNA dan menghambat metabolisme folat mengalami resistensi terutama terhadap *P.falciparum*. Obat anti malaria yang telah diketahui salah satu mekanisme kerjanya menghambat hemozoin adalah Chloroquine dan Artemisinin²⁵

Upaya pengobatan antimalaria (menggunakan kulit batang pulai) yang dikombinasikan dengan tanaman imunomodulator untuk meningkatkan imunitas tubuh (menggunakan meniran) diharapkan dapat meningkatkan efektifitas pengobatan.

4.2. Kerangka Konsep Penelitian



4.3. Desain dan Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium dengan desain penelitian dengan metode *post-test only control group* (pengambilan data

dilakukan setelah perlakuan dan dibandingkan dengan kontrol) dengan menggunakan hewan coba, yaitu mencit galur *Swiss webster*.

4.4. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat Penelitian :

Penelitian dilakukan di Laboratorium Hewan Coba Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kemenkes RI meliputi pemeliharaan dan perlakuan hewan coba, Laboratorium Farmasi Badan Litbangkes untuk melakukan pemeriksaan karakterisasi ekstrak, Laboratorium Patologi Anatomi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia untuk pembuatan preparat histopatologi.

Waktu penelitian: Penelitian dilakukan selama 8 bulan.

4.5. Populasi dan Sampel

Sampel tanaman kulit batang pulai dan meniran diambil dari daerah di Balitro Bogor Jawa Barat. Kulit batang pulai dan meniran dibuat menjadi ekstrak etanol 70% dengan perbandingan 1:8. Parasit yang digunakan adalah *Plasmodium berghei*. *Plasmodium berghei* galur ANKA ini didapatkan dari Laboratorium Parasit Badan Litbangkes Kemenkes RI.

Besar sampel dan cara pemilihan sampel

Uji LD50 menggunakan 50 ekor tikus (25 ekor jantan dan 25 betina) yang dibagi 5 kelompok masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor. Uji antimalaria menggunakan 72 ekor mencit yang dibagi dalam 6 kelompok yang masing-masing kelompok terdiri dari 12 ekor mencit. yaitu kelompok kontrol negatif, kelompok DHP dan kelompok perlakuan yang diberi terapi dosis dengan 3 tingkat dosis kombinasi ekstrak, yakni; D1, D2, D3, dan kelompok ekstrak pulai.

Ketentuan besar sampel untuk uji antimalaria dihitung berdasarkan rumus Federrer (1955) dengan rumus:^{26,27}

$$(t-1)(n-1) \geq 15$$

dimana : t = banyaknya kelompok perlakuan (t=5).

n = jumlah replikasi/ jumlah sampel dalam satu kelompok.

4.6. Kriteria inklusi dan eksklusi

Kriteria inklusi:

- a) Mencit strain swiss webster

- b) Menit berjenis kelamin jantan
- c) Mencit berumur 6-8 minggu
- d) Mencit memiliki berat 20-30 gram dan seragam
- e) Sudah terinfeksi *Plasmodium berghei*

Kriteria eksklusi:

- a. Setelah observasi selama 7 hari hewan coba mencit menunjukkan tanda-tanda sakit.
- b. aktifitas dan tingkah laku tidak normal (bulu berdiri dan kusam, ekor diangkat).

4.7. Variabel

- Uji toksisitas akut :
 - variabel bebas adalah variasi dosis.
 - variabel tergantung adalah jumlah tikus yang hidup atau mati.
- Uji antimalaria
 - .Variabel bebas : Dosis ekstrak kulit batang pulai dan meniran dosis 1, dosis 2 dan dosis 3.
 - Variabel tergantung : Jumlah kongesti pulpa merah limpa.
 - Variabel terkendali : Strain, jenis kelamin, berat badan, lingkungan hidup, dan perlakuan terhadap hewan uji, jumlah lapang pandang penghitungan.

4.8. Cara Pengumpulan Data

Pada uji toksisitas akut data dikumpulkan dengan menghitung jumlah tikus yang hidup dan yang mati. Untuk antimalaria data dikumpulkan dengan menghitung derajat parasitemia, menghitung diferensiasi leukosit, dan melihat gambaran histopatologi limpa.

Alat, Bahan dan Prosedur kerja

Alat

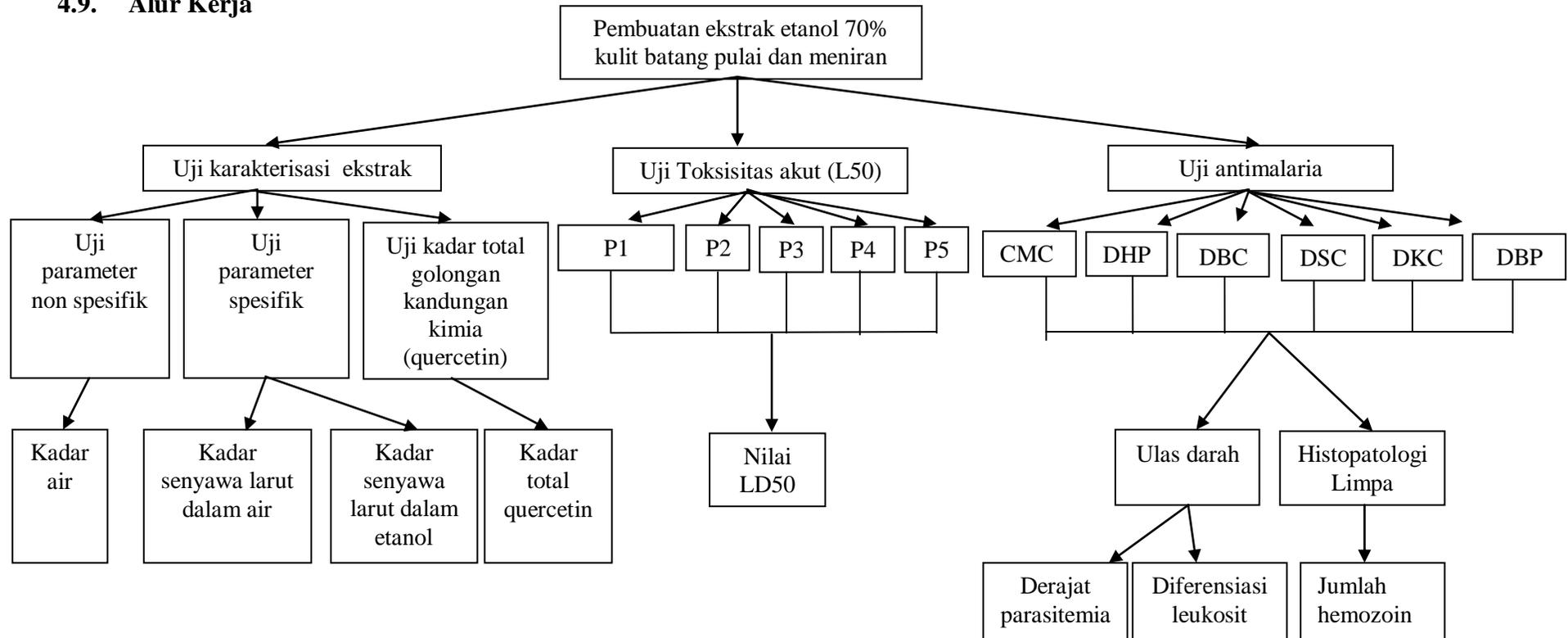
Alat-alat yang digunakan yaitu: kandang mencit, timbangan hewan, timbangan analitik, mikroskop cahaya, glass objek, kertas tisu, kertas saring, kapas, rak preparat, peralatan gelas, spatula, labu, rotary evaporator (Buchi), seperangkat alat bedah, spuit, tube 2 ml, pot plastik, kertas label.

Bahan

Bahan uji berupa ekstrak kulit batang pulai dan meniran, tablet DHP (Dihydroartemisinin-piperaquine) dan akuades. Parasit uji menggunakan biakan *Plasmodium berghei* strain ANKA. Hewan coba menggunakan mencit jantan strain *swiss webster*. Ketamine, xylazine, formalin, buffer citrate, pewarna giemsa, metanol, alkohol 70%, minyak imersi, RPMI, EDTA

Bahan untuk karakterisasi ekstrak: alkohol 95%, methanol, asam klorida, asam asetat, asam sulfat pekat, kloroform, etil asetat, toluene, heksan, vanillin sulfat, ammonium sulfat, asam indigo sulfat, kertas saring bebas abu, lempeng KLT, baku pembanding quercetin.

4.9. Alur Kerja



Keterangan:

P1: kelompok dosis LD50 konsentrasi 1

P2: kelompok dosis LD50 konsentrasi 2

P3: kelompok dosis LD50 konsentrasi 3

P4: kelompok dosis LD50 konsentrasi 4

DHP: kelompok dosis diberi DHP

D1: kelompok diberi ekstrak kombinasi dosis 1

D2: kelompok diberi ekstrak kombinasi dosis 2

D3: kelompok diberi ekstrak kombinasi dosis 3

DP : kelompok diberi ekstrak pulai

4.10. Prosedur Kerja

a. Pembuatan ekstrak bahan uji

Bahan simplisia yang telah bersih dikeringkan dibawah sinar matahari langsung setelah kering simplisia diserbuk dengan menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan dengan derajat ayakan no.40.

Simplisia berupa herba kulit batang pulai dan meniran diekstrak dengan cara maserasi menggunakan pelarut alkohol 70%. Masing-masing simplisia dikeringkan, kemudian diserbuk dan diayak dengan ayakan berukuran 40. Serbuk ditimbang sejumlah 250 gr dibasahi dengan pelarut etanol 70% didiamkan selama 18 jam dalam wadah tertutup dari gelas. Ekstrak cair yang diperoleh dikentalkan dengan *rotary evaporator*, ekstrak kental diuapkan dalam cawan porselen yang telah ditara kemudian diuapkan di atas tangas air dengan suhu $\pm 40^{\circ}$ C hingga etanol menguap dan diperoleh ekstrak kering, rendemen ekstrak dihitung.

Pembuatan kombinasi ekstrak kulit batang pulai dan meniran dilakukan dengan mencampur ekstrak-ekstrak tunggal dengan komposisi yang disesuaikan pada hasil LD50. Setelah itu diekstrapolasikan sesuai berat badan mencit.⁹

Kombinasi ekstrak diberikan dalam bentuk suspensi kombinasi ekstrak, Dimana pembuatan suspensi kombinasi ekstrak ini ditambahkan CMC 0,5% fungsi dari CMC untuk dapat melarutkan ekstrak dengan air sehingga mudah dibuat sediaan pemberian oral uji antimalaria.

b. Uji karakterisasi ekstrak²⁸

Penetapan golongan senyawa kimia

Parameter non spesifik

Kadar air

Cara Destilasi

Pereaksi: toluen. Sejumlah toluene P, kocok dengan sedikit air, biarkan memisah, buang lapisan air suling.

Cara Penetapan

Bersihkan tabung penerima dan pendingin dengan asam pencuci, bilasi dengan air, keringkan dalam lemari pengering. Kedalam labu kering masukkan sejumlah zat yang ditimbang saksama yang diperkirakan mengandung 2 ml sampai 4 ml air. Jika zat berupa pasta, timbang dalam sehelai lembaran logam dengan ukuran yang

sesuai dengan leher labu. Untuk zat yang dapat menyebabkan gejala mendadak, tambahkan pasir kering yang telah dicuci secukupnya hingga mencukupi dasar labu atau sejumlah tabung kapiler, panjang lebih kurang 100 mm yang salah satu ujungnya tertutup. Masukkan lebih kurang 200 ml toluene ke dalam labu, hubungkan alat. Tuang toluene ke dalam tabung penerima (R) melalui alat pendingin. Panaskan labu hati – hati selama 15 menit.

Setelah toluena mulai mendidih, suling dengan kecepatan lebih kurang 2 tetes tiap detik, hingga sebagian besar air tersuling, kemudian naikkan kecepatan penyulingan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air tersuling, cuci bagian dalam pendingin dengan toluene, sambil dibersihkan dengan sikat tabung yang disambungkan pada sebuah kawat tembaga dan telah dibasahi dengan toluene. Lanjutkan penyulingan selama 5 menit. Biarkan tabung penerima pendingin hingga suhu kamar. Jika ada tetesan air yang melekat pada pendingin tabung penerima, gosok dengan karet yang diikatkan pada sebuah kawat tembaga dan basahi dengan toluene hingga tetesan air turun. Setelah air dan toluene memisah sempurna, baca volume air. Hitung kadar air dalam %.

Uji parameter spesifik

Senyawa terlarut dalam pelarut tertentu

Prinsip: melarutkan ekstrak dengan pelarut (alkohol atau air) untuk ditentukan jumlah solut yang identik dengan jumlah senyawa kandungan secara gravimetri.

Tujuan: memberikan gambaran awal jumlah senyawa kandungan.

Nilai: nilai minimal atau rentang yang ditetapkan terlebih dahulu.

Prosedur:

- Kadar senyawa yang larut dalam air
Panaskan ekstrak pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam air, dihitung terhadap ekstrak awal.
- Kadar senyawa yang larut dalam etanol
Panaskan ekstrak pada suhu 105⁰C hingga bobot tetap. Hitung kadar dalam persen senyawa yang larut dalam etanol (95%), dihitung terhadap ekstrak awal.

Uji kadar total golongan kandungan kimia (quercetin)

Parameter kadar total golongan kandungan kimia

Tujuan: memberikan informasi kadar golongan kandungan kimia sebagai parameter mutu ekstrak dalam kaitannya dengan efek farmakologis .

Penetapan kadar quercetin

Quercetin ditetapkan kadarnya sebagai aglikon dengan terlebih dahulu dilakukan hidrolisis dan selanjutnya dilakukan pengukuran spektrometri dengan mereaksikan AlCl_3 yang selektif dengan penambahan Heksametilentetramina pada panjang gelombang maksimum.

Cara kerja hidrolisis:

Timbang tepat ekstrak yang setara 200 mg simplisia dan masukkan kedalam labu alas bulat. Tambahkan sistem hidrolisis, yaitu 1,0 ml larutan 0,5% b/v Heksametilentetramina, 20,0 ml aseton dan 2,0 ml larutan 25% HCl dalam air. Lakukan hidrolisis dengan pemanasan sampai mendidih selama 30 menit. Campuran hasil hidrolisis disaring menggunakan kapas kedalam labu ukur 100,0 ml, kocok rata. 20,0 ml filtrat hidrolisa dimasukkan corong pisah dan tambahkan 20 ml H_2O , selanjutnya lakukan ekstraksi kocok, pertama dengan 15 ml etilasetat. Kemudian 2 kali dengan 10 ml etilasetat, dan kumpulkan fraksi etilasetat kedalam labu ukur 50 ml, akhirnya tambahkan etilasetat sampai tepat 50 ml. Untuk replikasi spektrometri lakukan prosedur ini 3-4 kali.

Cara kerja spektrometri

Masukkan 10 ml fraksi etilasetat (hidrolisa) ke dalam labu ukur 25 ml, tambahkan 1 ml 2 g AlCl_3 dalam 100 ml larutan asam asetat glacial 5% v/v (dalam metanol). Tambahkan secukupnya asetat glacial 5% v/v (dalam metanol) secukupnya sampai tepat 25 ml. Hasil reaksi siap diukur pada spektrofotometer setelah 30 menit berikutnya pada panjang gelombang maksimum. Perhitungan kadar menggunakan bahan standar glikosida flavanoid (Hiperoksida, rutin, hesperidin), gunakan kurva baku dan nilai kadar terhitung sebagai bahan terstandar tersebut. Kalau menggunakan hiperoksida dapat langsung diukur dengan rumus: Kadar total flavanoid = $[(A^0 \times 1,25) \text{ berat sampel}] \%$.

c. Toksisitas Akut (LD_{50})

Prinsip dari toksisitas akut (LD_{50}) adalah pemberian dosis tunggal suatu bahan uji secara oral yang dapat menyebabkan kematian 50% dari hewan coba

dalam jangka waktu tertentu. Toksisitas akut ini adalah data kuantitatif yang berupa kisaran dosis letal atau toksik, dan data kualitatif yang berupa gejala klinis.

Perlakuan Hewan Coba

Hewan percobaan ditempatkan pada kandang ukuran 425 x 260 x 185 mm, yang terbuat dari polycarbonat. Hewan ditempatkan pada rak kandang dalam ruangan dengan pencahayaan dan sirkulasi udara yang baik. Suhu ruangan sesuai dengan suhu kamar, dengan kelembaban udara sekitar 30-70 %. Pencahayaan 12 jam terang dan 12 jam gelap. Pemberian makan dan minum dilakukan selama penelitian dan dilakukan setiap hari.

Pemberian senyawa pada hewan coba memiliki dosis maksimum yaitu 5000 mg/KgBB dan jika besar dari 15000 mg/KgBB digolongkan pada praktis tidak beracun¹⁵ dan juga mempunyai batas maksimum volume cairan yang boleh diberikan pada hewan uji. Dosis yang diberikan dapat diperhitungkan dengan cara berdasarkan kelipatan dosis yang disarankan untuk digunakan pada manusia. Pengamatan dilakukan 24 jam pertama sejak diberikan perlakuan. Sebaiknya mengamati hewan coba sebelum diberi perlakuan. Hal ini bertujuan untuk mengetahui perubahan gejala yang terjadi setelah diberi perlakuan dengan membandingkan gejala atau perilaku sebelum perlakuan.

Kriteria Pengamatan meliputi:

1. Pengamatan terhadap gejala-gejala klinis.
2. Perubahan berat badan.
3. Jumlah hewan yang mati pada masing-masing kelompok uji.

Data jumlah hewan yang mati digunakan untuk menentukan nilai LD₅₀. Jika pada batas dosis maksimum tercapai, namun belum diketahui LD₅₀-nya, maka hasil yang didapat tertulis "LD₅₀ lebih dari 5000 mg/Kg BB". Dan jika sampai pada batas volume maksimum yang boleh diberikan pada hewan uji, namun belum menimbulkan kematian, maka dosis tertinggi tersebut dinyatakan sebagai LD₅₀ semu (LD₀).

Jumlah hewan

LD₅₀ kombinasi ekstrak: terdiri dari 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor tikus jantan dan betina.

Dosis

Tikus dibagi menjadi 5 kelompok dosis uji toksisitas akut, yaitu kelompok akuades, dosis 1, dosis 2, dosis 3 dan dosis 4. Pemberian dosis LD50 diberikan dengan perbandingan satu bagian kulit batang pulai dan delapan bagian meniran. Perbandingan ini didapat dari nilai ED50 kulit batang pulai sebesar 29,78 mg/bb dan ED50 meniran sebesar 1018,59 mg/bb.²⁹. Setelah itu diekstrapolasikan sesuai berat badan tikus. Dosis terbesar didasarkan pada jumlah maksimal bahan uji yang secara teknis dapat diterima oleh hewan percobaan. kemudian dosis diturunkan dengan menggunakan kelipatan dosis.

Cara pemberian

Bahan uji diberikan secara oral sebanyak satu kali, menggunakan alat sonde lambung yang dipasangkan pada syringe 5 ml. Tikus dibagi secara acak kedalam 5 kelompok dosis, masing-masing tikus diberi bahan uji maksimal 4 ml/200 gram bobot badan, dengan cara ujung sonde dimasukkan ke dalam mulut, kemudian perlahan-lahan dimasukkan melalui tepi langit-langit ke belakang sampai esofagus.

Observasi

Selama 6 jam setelah pemberian bahan uji, hewan diamati secara seksama terhadap adanya gejala toksik dan kematian.

Pengamatan meliputi: Pengamatan dilakukan sampai 24 jam dan dicatat jumlah kematian dalam kelompok, apabila terdapat kematian, maka semua hewan dikorbankan untuk dilakukan pemeriksaan makroskopis. Apabila tidak ada kematian, pengamatan dilanjutkan sampai 14 hari, dilakukan penimbangan berat badan setiap hari, dicatat terjadinya gejala klinik /toksik yang terjadi, dicatat jumlah kematian, dan dilakukan pengukuran suhu badan. Pada akhir penelitian, tikus yang masih hidup dikorbankan dengan melakukan anestesi menggunakan ketamin dosis 75-100 mg/kg IP dan xylazine dosis 10 mg/kg IP, menggunakan syringe dan needle ukuran 23-26 G x 13-25 mm, dilakukan otopsi, dilakukan pengamatan secara makroskopis dan bangkai tikus dikubur.

Hewan coba tikus dipilih sudah memperhatikan prinsip 3R (Replacement penggunaan hewan dengan relative yaitu dengan menggunakan sel, jaringan atau organ dari hewan coba yang dimatikan dengan menggunakan ketamin,

Refinement penggunaan metoda yang mengurangi atau menghilangkan rasa nyeri dan kesusahan sehingga menjamin kesejahteraan hewan coba, Reducement telah dihitung penggunaan hewan coba sehingga didapat jumlah hewan coba yang sesuai untuk uji toksisitas akut dan uji antimalaria).

d. Uji Antimalaria

Hewan coba yang digunakan adalah mencit (*Swiss webster*) jantan, berumur 8-10 minggu dengan berat 25-30 gram diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba Badan Litbangkes Kementerian Kesehatan. Sebelum digunakan untuk penelitian, mencit dikarantina terlebih dahulu selama lebih kurang 7 hari. Mencit dipelihara dalam kandang *fiber glass* dengan tutup *stainless steel* serta diberi pakan pelet dan air minum secukupnya. Pada penelitian ini mencit dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, yaitu kelompok kontrol negatif (mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* tanpa diterapi apapun), kelompok DHP (mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi artemisinin), kelompok dosis 1 mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dosis 1), kelompok dosis 2 mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dosis 2), kelompok dosis 3 mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi dosis 3), kelompok dosis ekstrak pulai (mencit diinfeksi *Plasmodium berghei* yang diterapi ekstrak pulai). Pada setiap kelompok perlakuan digunakan 12 ekor mencit.

DHP diberikan dengan dosis 195 mg/kg BB dengan cara meminumkannya dengan menggunakan sonde berturut-turut setiap hari selama 3 hari. Ekstrak kombinasi diberikan peroral melalui sonde dengan dosis 1, dosis 2, dan dosis 3 setiap hari selama 4 hari.

Masing-masing kelompok perlakuan pada hari ke-4, hari ke-7 dan hari ke-14 dimatikan sebanyak 4 ekor per kelompok dan diambil limpanya, lalu dibuat menjadi preparat dengan metode pewarnaan HE. Mencit dimatikan menggunakan ketamine dosis 80-100 mg/kg IP dan xylazine dosis 10 mg/kg IP, menggunakan syringe dan needle ukuran 25-27 G x 13-25 mm. Pengambilan darah dari ekor dilakukan pada hari ke-0-7 (hari ke-0: 1 hari sebelum pemberian ekstrak) dan hari ke-14 untuk melihat level parasitemianya.

Proses inokulasi *Plasmodium berghei* diinfeksi secara intraperitoneal (i.p) sebanyak 10^7 parasit dalam 0,2 ml darah per ekor mencit secara ip pada 5

ekor mencit donor. Setelah 4-5 hari, mencit yang diinfeksi diambil darah perifer diambil setiap hari dengan cara memotong ujung ekor, kemudian kepadatan parasit dalam darah (parasitemia) diperiksa melalui pengamatan dengan mikroskop. Bila tingkat parasitemia mencit telah mencapai lebih dari 30% maka dilakukan pengambilan darah dari jantung menggunakan *syringe* setelah terlebih dahulu mencit dibius dengan ketamine dan xylazine. Darah yang diperoleh dari jantung ditampung dalam tabung yang mengandung antikoagulan EDTA. Semua darah tersebut dicampur dan dilakukan pengenceran lalu diinfeksi ke hewan coba. Tiap mencit disuntikkan ip 0,1 ml.

Pengujian aktivitas antimalaria *in vivo* dilakukan dengan menggunakan metode Peter, *The 4-day suppressive test of blood schizontocidal action*.³⁰ Perlakuan diberikan 4 hari berturut-turut, dan parasitemia diamati tiap hari sampai hari ke tujuh (D1-D7).²¹ Dosis DHP yang dipakai adalah 195 mg/kg BB. Berat badan mencit rata-rata adalah 30 g, sehingga 1 mencit membutuhkan 1,2 mg. Sediaan tablet DHP mengandung 40 mg dihydroartemisinin dan 320 mg piperakin. Tablet DHP yang telah ditimbang, digerus dengan mortar, kemudian diencerkan dengan menggunakan campuran aquadest dan CMC Na dan diaduk menggunakan vortex. Kombinasi ekstrak kulit batang pulai dan meniran diencerkan dengan CMC Na dan akuadest. Dosis kombinasi ekstrak untuk uji antimalaria didapat dari hasil dosis LD50 tikus yang dilakukan.

Perhitungan parasitemia dan diferensiasi leukosit

Pemeriksaan diferensiasi leukosit dan parasitemia dilakukan pada hari ke D1-D7, Pengambilan darah dilakukan dengan mengambil darah dari ekor mencit. Dilakukan pengurutan dari pangkal hingga ujung ekor untuk mengeluarkan darah kemudian ditaruh pada ujung gelas preparat kemudian dibuat apusan tipis. Setelah apusan kering kemudian difiksasi dengan metanol dan diwarnai dengan larutan Giemsa 10% didiamkan selama 30 menit setelah itu dicuci di air mengalir. Sediaan apus darah disiapkan untuk hitung parasitemia, dan diferensiasi leukosit. Pemeriksaan dengan mikroskop pembesaran 100 X dengan penambahan minyak imersi.

Parasitemia menunjukkan kepadatan sel darah terinfeksi parasit dalam sel darah merah. Pada apusan darah tipis, sel darah merah dihitung hingga mencapai

± 1000 eritrosit atau 10 lapang pandang. Rumus Perhitungan nilai persentase sel darah merah yang terinfeksi parasit malaria yang ditemukan pada sediaan darah tipis adalah :

$$\text{Parasitemia} = (\Sigma \text{ eritrosit yang terinfeksi parasit} / \Sigma \text{ total eritrosit}) \times 100\%$$

Sediaan apus darah tebal digunakan untuk melihat apakah sediaan darah tersebut positif atau negatif. Sediaan darah dinyatakan positif apabila pada apus darah tebal terdapat minimal 200 leukosit. Sediaan darah dinyatakan negatif apabila pada sediaan apus darah tebal sebanyak 10 lapang pandang tidak ditemukan parasit.

Penghitungan diferensiasi leukosit: setiap 100 leukosit yang ditemukan dihitung dan dikelompokkan ke dalam masing-masing jenis leukosit, yaitu neutrofil, eosinofil, basofil, limfosit, dan monosit. Perhitungan leukosit menggunakan beberapa lapang pandang sepanjang apusan yang digeser ke arah tengah kemudian bergeser sejajar dengan tepi apusan dan bergerak ke tepi kembali dan seterusnya sampai mencapai jumlah leukosit sebanyak 100. Nilai relatif setiap jenis leukosit yang ditemukan dinyatakan dalam satuan persen.

Pada hari ke-4, ke-7, dan hari ke-14 hewan percobaan pada setiap kelompok dimatikan sebanyak masing-masing 4 ekor dengan melakukan anestasi menggunakan ketamine dan xylazine, dilakukan otopsi. Organ limpa diambil, organ dipotong menggunakan *scalpel*, gunting, dan pinset dan disimpan di formalin untuk dibuat preparat histopatologi (lampiran 1 dan 2).

Kelainan patologis pada limpa ditentukan berdasarkan jumlah haemozoin pada limpa dihitung dengan perangkat lunak pengolahan citra digital yaitu Niss element D. Pengambilan citra digital dilakukan dengan mikroskop cahaya Nikon eclipse Ci series yang dilengkapi kamera *Digital DS-U3 Digital camera control units*. Jumlah hemozoin dihitung pada perbesaran 1000x dan diambil rerata dari 5 lapang pandang yang dipilih secara acak.

Data didapat dari pemeriksaan ulas darah terhadap parasitemia, dan diferensiasi leukosit. Pembacaan dan pengamatan preparat histopatologi limpa secara mikroskopis.

4.11. Analisis data

Pengujian dilakukan dengan uji ANOVA one ways yang dilanjutkan dengan uji posthoc

V. HASIL

1. Karakterisasi ekstrak

a. Rendemen ekstrak

Pada penelitian ini ekstrak kulit batang pulai dan meniran dibuat dengan pelarut alkohol 70% menggunakan cara maserasi. Jumlah masing-masing rendemen dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Rendemen ekstrak kulit batang pulai dan meniran

No	Jenis ekstrak	Berat simplisia	Berat Ekstrak	Rendemen
1	Kulit batang pulai	1300 gram	170,9 gram	13,15 %.
2	Meniran	925 gram	129 gram	13,94 %.

Dari hasil perhitungan rendemen ekstrak terlihat bahwa kulit batang pulai dan meniran memiliki jumlah persen rendemen yang hampir sama.

b. Karakterisasi kimia ekstrak

Karakteristik ekstrak kulit batang pulai dan meniran yang diperiksa pada penelitian ini meliputi pemeriksaan: penapisan fitokimia (meliputi pemeriksaan tanin, flavonoid, saponin, alkaloid dan terpenoid dan penetapan kadar air dan kadar quercetin. Hasil pemeriksaan dapat dilihat pada tabel 2 dan tabel 3.

Tabel 2. Identifikasi kualitatif ekstrak kulit batang pulai dan meniran

No	Golongan senyawa kimia	Reaksi warna/pengendapan	Kesimpulan
A	Kulit batang pulai		
1	Tanin	Coklat muda → Hitam kehijauan	Positif
2	Flavonoid	Coklat muda → ungu (langsung hilang)	Positif
3	Saponin	Berbuih	Positif
4	Alkaloid	Uji meyer Uji dragendorf	Positif Positif
5	Terpenoid	Coklat muda → biru	Positif glikosida kadenoid
B	Meniran		
1	Tanin	Coklat tua → Hitam kehijauan	Positif

2	Flavonoid	Coklat tua → tidak berubah warna	Negatif
3	Saponin	Tidak berbuih	Negatif
4	Alkaloid	Uji meyer Uji dragendorf	Negatif Negatif
5	Terpenoid	Coklat tua → biru kehijauan	Positif triterpenoid dan glikosida kadenoid

Hasil uji kadar ekstrak alkohol 70% kulit batang pulai dan meniran, kulit batang pulai positif mengandung tanin, saponin, flavanoid, terpenoid dan alkaloid, sedangkan meniran mengandung tanin, terpenoid dan glikosida.

Tabel 3. Penetapan kadar air dan kadar quercetin pada ekstrak kulit batang pulai dan meniran

No	Golongan senyawa kimia	Hasil (%)
A	Kulit batang Pulai	
1	kadar air	13,68
2	Kadar quercetin	1,49
B	Meniran	
1	Kadar air	17,31
2	Kadar quercetin	1,44

Hasil pemeriksaan penetapan kadar air pada ekstrak kulit batang pulai lebih rendah dibanding kadar air ekstrak meniran, sedangkan penetapan kadar quercetin kulit batang pulai lebih tinggi dibandingkan meniran.

2. Toksisitas akut (LD₅₀) oral

Pengaruh pemberian bahan uji single dose (dosis sekali pemberian) terhadap bobot badan tikus jantan dan betina, melalui penimbangan hewan setiap hari, selama 14 hari pengamatan. Hasil penimbangan bobot badan, rata-rata dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Rata-rata berat badan tikus pada uji toksisitas akut (LD50)

Kelompok/ Dosis	Hari ke-(gram)							
	1	2	3	4	5	7	11	14
Jantan								
3717g/kgbb	246	246	249	256,4	264,4	266	268	271
5205g/kgbb	245	246	250	252,4	257	260	263	266
7287g/kgbb	234	233	238	244,6	253,6	257,8	262	260
10203g/kgbb	221,4	226	235	238	244	246	241,4	245,4
14285g/kgbb	235,4	228	230	236	240	246	255	262

Betina								
3717g/kgbb	177	178	180,4	183	186	189	189	191
5205g/kgbb	178	179	181,8	183	179	178	179,4	185
7287g/kgbb	171	177	179,4	184	186	187	187,4	191
10203g/kgbb	164	166,4	168,4	173	173	176	179	182,8
14285g/kgbb	167	165	165	167	171	176	179,4	182

Hasil pengamatan gejala klinis dan penimbangan berat badan tikus pada uji toksisitas akut yang sudah dilakukan, tampak bahwa baik pada tikus jantan dan betina terlihat kenaikan rata-rata berat badan pada semua kelompok dosis percobaan. Hal ini kemungkinan pemberian herbal tidak mempengaruhi nafsu makan tikus percobaan.

3. Uji antimalaria

Perhitungan persen parasitemia dilakukan dengan cara membuat ulas darah pada hari ke- 1-7 dan hari ke-14 setelah infeksi kemudian dihitung jumlah sel darah merah yang terinfeksi plasmodium berghei dari 1000 sel darah merah. Pengambilan darah dilakukan dengan mengambil darah dari ekor mencit. Persentase parasitemia mencit selama infeksi plasmodium berghei dapat dilihat pada tabel 5 berikut ini :

Tabel 5. Persen parasitemia mencit selama infeksi *P. berghei*

Kelo mpok	Hari perlakuan setelah infeksi							
	1	2	3	4	5	6	7	14
	mean± SD	mean ±SD	mean ±SD	mean± SD	mean± SD	mean± SD	mean± SD	mean± SD
CMC	0,23± 0,17b	1,03± 0,13b	4,80± 0,98b	8,80± 1,61d	20,76± 4,76b	32,50± 5,00d	38,00± 4,76b	78,75± 2,50b
DHP	0,00± 0,23a	0,23± 0,17a	0,00± 0,00a	0,00± 0,00a	0,00± 0,00a	0,00± 0,00a	0,00± 0,00a	0,00± 0,00a
DBC	0,05± 0,10a	0,85± 0,44b	4,28± 1,65b	4,40± 0,42b	5,90± 1,45ab	7,55± 0,19b	1,63± 0,62a	0,00± 0,00a
DSC	0,08± 0,15ab	0,75± 0,06b	4,58± 2,20b	3,95± 0,99b	10,48± 1,78b	12,90± 0,67c	1,15± 0,44a	0,00± 0,00a
DKC	0,03± 0,05a	0,85± 0,37b	4,20± 0,36b	5,33± 1,51bc	20,00± 8,16d	6,60± 0,85d	1,28± 0,67a	0,00± 0,00a
DBP	0,05± 0,06a	0,85± 0,50b	4,15± 1,45b	6,45± 1,87c	7,20± 2,34c	10,98± 0,84bc	1,50± 0,24a	0,00± 0,00a

Keterangan Gambar:

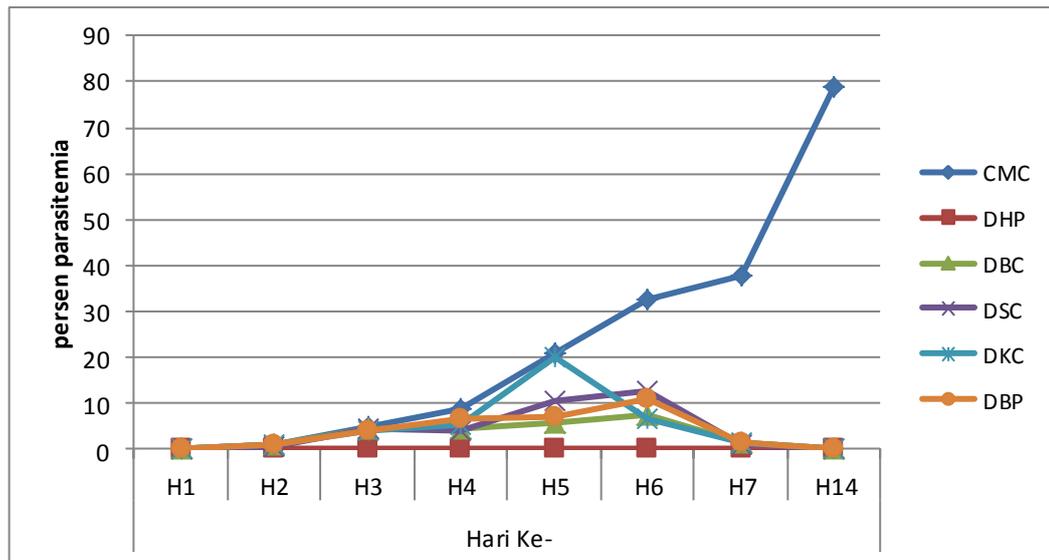
CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%;

DHP Dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6mg; piperakuin 124,5mg/kgbb);

DBC=Pulai 1330 mg/kgbb + meniran 1330 mg/kgbb;

DSC= Pulai 443,34 mg/kgbb + meniran 443,34 mg/kgbb;
 DKC= Pulai 147,78 mg/kgbb + meniran 147,78 mg/kgbb;
 DBP= Pulai 1330 mg/kgbb.

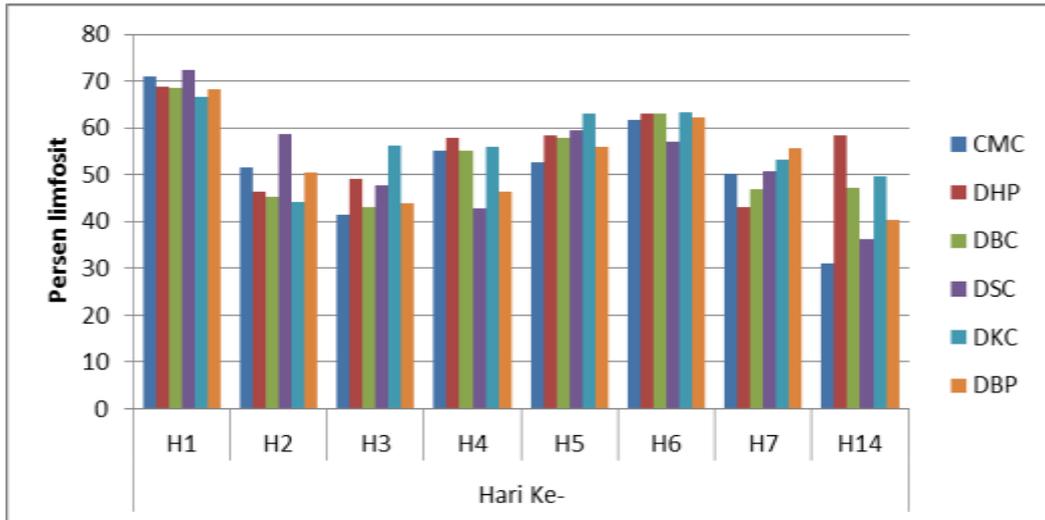
Dari tabel persen rata-rata dan standar deviasi yang telah digunakan menggunakan anova one way terlihat bahwa dosis sedang campuran memiliki nilai yang bermakna secara signifikan. Bila nilai diatas digambarkan dalam grafik garis akan terlihat pola perubahan persen parasitemia mencit selama infeksi plasmodium berghei.



Gambar 2. Grafik persen parasitemia mencit selama infeksi P. berghei

Dari gambar 2 terlihat bahwa pada awal infeksi belum terlihat peningkatan jumlah parasit, kemudian puncak infeksi plasmodium berghei terjadi pada hari ke-5 dan pada kelompok yang diberi kombinasi ekstrak kulit batang pulai dan meniran selama 14 hari sekali sehari, terjadi perbaikan pada hari ke 14 setelah infeksi.

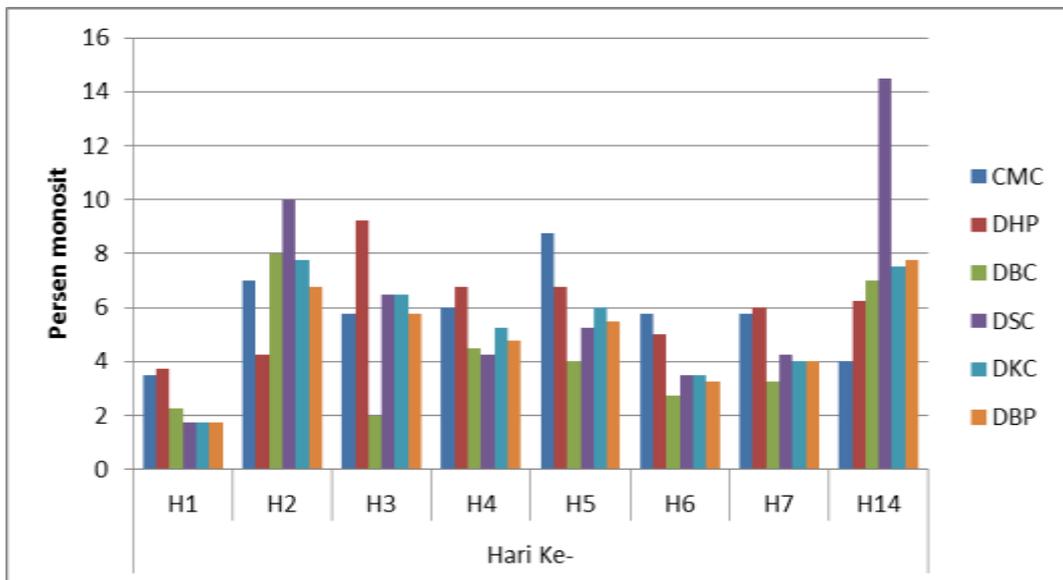
Pemeriksaan diferensiasi leukosit hari ke D1-D7 dan D-14. Pengambilan darah dilakukan dengan mengambil darah dari ekor mencit dan dilakukan pewarnaan giemsa 10%. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 100x. Dari setiap 100 leukosit yang ditemukan dihitung dan dikelompokkan ke dalam masing-masing jenis leukosit, yaitu neutrofil, limfosit, dan monosit. Hasil hitung jumlah limfosit, monosit dan neutrofil dapat dilihat pada gambar 3, 4 dan 5 berikut:



Gambar 3. Perubahan persentase limfosit mencit selama infeksi *P. berghei*

Dari gambar 3, terlihat bahwa pada awal infeksi nilai limfosit masih dalam kisaran normal, kemudian sedikit menurun dan meningkat kembali pada puncak infeksi (hari ke-5) dan pada akhir infeksi kembali pada rentang nilai normal.

Sama halnya dengan cara perhitungan limfosit, monosit juga dihitung dari 100 sel darah putih. Nilai perhitungan persen monosit dapat dilihat pada gambar 4 berikut,



Gambar 4. Perubahan persentase monosit mencit selama infeksi *P. berghei*

Keterangan gambar:

CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%;

DHP Dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6mg; piperakuin 124,5mg/kgbb);

DBC= Pulai 1330 mg/kgbb + meniran 1330 mg/kgbb;

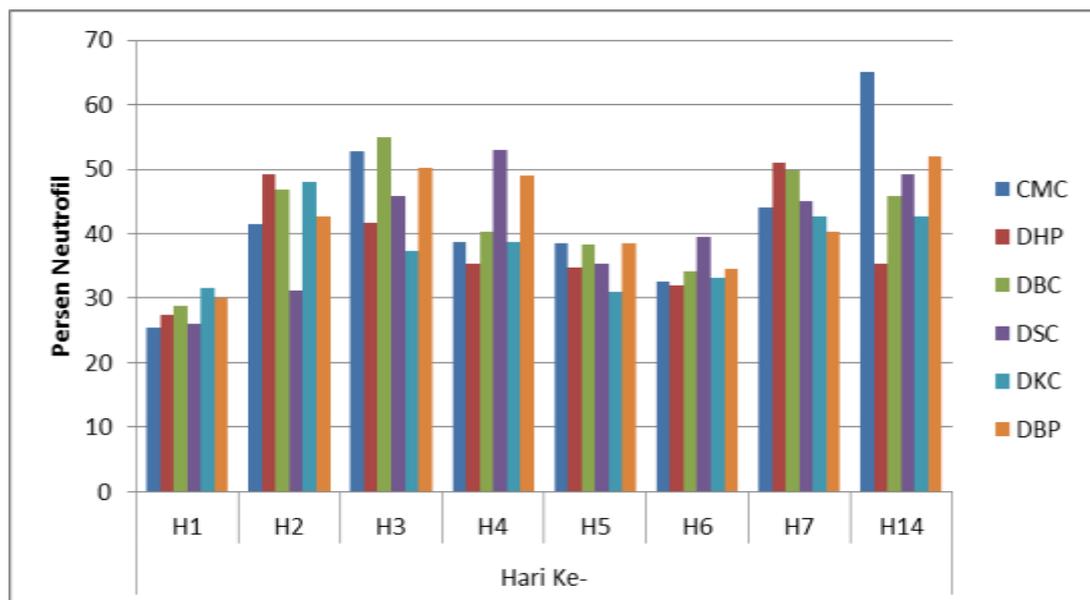
DSC= Pulai 443,34 mg/kgbb + meniran 443,34 mg/kgbb;

DKC= Pulai 147,78 mg/kgbb + meniran 147,78 mg/kgbb;

DBP= Pulai 1330 mg/kgbb.

Dari gambar 4 terlihat bahwa pada awal infeksi nilai monosit masih dalam rentang normal, kemudian dihari berikutnya terjadi sedikit pola naik turun setelah hari pertama infeksi, dan pada akhir nya dihari ke-14 infeksi nilai persen monosit masih berada dalam rentang normal.

Penilaian persentase neutrofil juga dihitung pada hari ke 1-7 dan hari ke-14. Hasil perhitungan persen neutrofil pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar 5 berikut.



Gambar 5. Perubahan persentase neutrofil mencit selama infeksi *P. berghei*

Keterangan Gambar:

CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%;

DHP Dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6mg; piperakuin 124,5mg/kgbb);

DBC= Pulai 1330 mg/kgbb + meniran 1330 mg/kgbb;

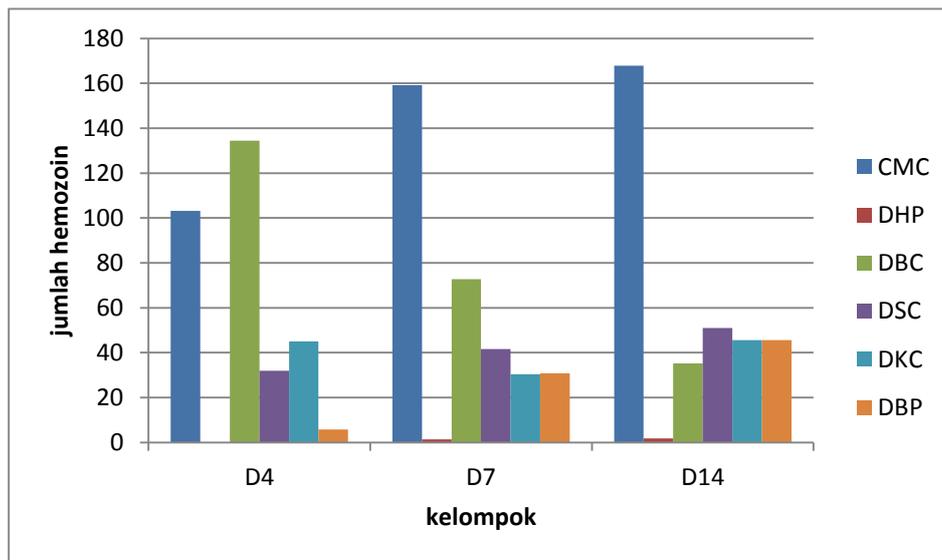
DSC= Pulai 443,34 mg/kgbb + meniran 443,34 mg/kgbb;

DKC= Pulai 147,78 mg/kgbb + meniran 147,78 mg/kgbb;

DBP= Pulai 1330 mg/kgbb.

Nilai persentase neutrofil pada gambar 5 terlihat bahwa pada awal infeksi nilainya masih normal, kemudian meningkat pada hari ke-2 sampai dengan hari ke-4 infeksi.

Interpretasi preparat histopatologi limpa dinilai dari jumlah hemozoin menggunakan perangkat lunak pengolahan citra digital yaitu Niss element D dengan mikroskop cahaya Nikon eclipse Ci series yang dilengkapi kamera *Digital DS-U3 Digital camera control units*. Jumlah hemozoin dihitung pada perbesaran 100x dan diambil rerata dari 5 lapang pandang yang dipilih secara acak. Nilai hemozoin dapat dilihat pada gambar 6 berikut:



Gambar 6. Nilai rata-rata hemozoin mencit selama infeksi plasmodium berghei

Keterangan Gambar:

CMC= Carboxymethyl cellulose 0,5%;

DHP Dehidroartemisinin piperakuin (dehidroartemisinin 15,6mg; piperakuin 124,5mg/kgbb);

DBC= Pulai 1330 mg/kgbb + meniran 1330 mg/kgbb;

DSC= Pulai 443,34 mg/kgbb + meniran 443,34 mg/kgbb;

DKC= Pulai 147,78 mg/kgbb + meniran 147,78 mg/kgbb;

DBP= Pulai 1330 mg/kgbb.

Pada gambar 6 terlihat bahwa nilai hemozoin yang tinggi pada awal infeksi di kelompok CMC dan dosis Pulai 1330 mg/kgbb + meniran 1330 mg/kgbb. Sedangkan pada kelompok perlakuan lainnya terjadi kenaikan yang tidak signifikan terhadap jumlah hemozoin.

VI. PEMBAHASAN

1. Karakterisasi ekstrak

Penelitian ini menggunakan campuran ekstrak dari dua tanaman yaitu kulit batang pulai dan meniran yang simplisianya didapat dari Balitro Bogor. Kedua simplisia dibuat ekstrak menggunakan alkohol 70% dengan metode maserasi.

Pelarut alkohol 70% dipilih karena pelarut alkohol atau campurannya dengan air merupakan pelarut pengestraksi yang terbaik untuk hampir semua senyawa dengan berat molekul rendah seperti saponin dan flavonoid³¹. Jenis pelarut pengestraksi juga mempengaruhi jumlah senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak, dimana senyawa yang bersifat polar akan larut dalam pelarut polar dan senyawa yang bersifat non polar akan larut dalam pelarut non polar.

Dari uji identifikasi kualitatif dan kuantitatif kulit batang pulai mengandung tanin, saponin, flavanoid dan terpenoid dan alkaloid, sedangkan meniran mengandung tanin, terpenoid dan glikosida kadenoid. Uji kuantitatif kadar air kulit batang pulai lebih rendah dibanding meniran, sedangkan kadar quercetin kulit batang pulai lebih tinggi dibandingkan meniran.

Kulit batang pulai mengandung alkaloid, steroid, triterpenoids and Phenolic yang tinggi. Kandungan alkaloid pada kulit batang pulai efektif melawan malaria. Pemberian kulit batang pulai pada hewan terinfeksi plasmodium berghei memperlihatkan perbaikan kondisi dan menunda kematiannya. Selain mengandung alkaloid dan fenolic, alstonia juga mengandung flavonoid, yang semua senyawa diatas memiliki kemampuan antioksidan invitro, pengambilan radikal bebas, analgesik, anti inflamasi, antidepresan dan efek imunostimulasi. Menurut penelitian lain juga dikatakan bahwa ekstrak kulit batang pulai berpotensi dalam aktivitas antiplasmodial dan meniran ditujukan untuk meningkatkan imunitas tubuh.

2. Toksisitas akut (LD50) oral

Hasil penelitian LD50 oral, ramuan ekstrak kulit batang pulai dan meniran menunjukkan pada dosis 14285 mg/kg bb, tidak terjadi kematian pada hewan coba, sehingga LD50 semu untuk ekstrak kulit batang pulai dan meniran adalah lebih besar dari 14285 mg/kg bb (practically no toxic).

Pengamatan selama 6 jam setelah pemberian bahan obat terhadap tingkah laku tingkah laku meliputi: tingkah laku (aktivitas spontan, peka sentuhan, rasa nyeri) dan eksitasi sistem syaraf pusat (gejala strarub, melompat, tremor, konvulsi) pada pemberian dosis besar pada semua ramuan hewan dalam keadaan normal yaitu peka terhadap sentuhan dan rasa nyeri. Tidak terjadi straub, melompat, tremor dan konvulsi pada hewan coba.

3. Uji antimalaria

Pada tabel 5 terlihat bahwa pada hari ke-5, terdapat perbedaan yang signifikan pada persen parasitemia antara DHP (Dehidroartemisinin piperakuin) dengan kelompok CMC (Carboxymethyl cellulose 0,5%), dosis sedang campuran (dosis sedang), dosis kecil campuran (dosis kecil), dosis besar pulai (dosis pulai). Hal ini menunjukkan bahwa DHP dapat menekan jumlah parasitemia pada mencit

terinfeksi. Hasil uji duncan yang dilakukan terlihat bahwa dosis sedang memiliki persentase yang paling kecil diantara semua kelompok namun tidak berbeda secara signifikan dengan DHP. Namun bila dosis besar dibandingkan dengan kelompok dosis sedang juga tidak berbeda secara signifikan. Hal ini menunjukkan bahwa dosis besar dan dosis sedang dapat menekan jumlah parasit dibandingkan dengan kelompok dosis kecil dan dosis pulai. Jadi dosis sedang lebih baik dalam menurunkan jumlah parasitemia diantara semua kelompok percobaan. Data parasitemia pada hari ke-7 menunjukkan tidak ada perbedaan yang signifikan antara DHP dengan dosis besar, sedang, kecil dan pulai. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian herbal dengan berbagai dosis dapat menurunkan jumlah parasitemia. Begitu juga pada hari ke-14 tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok DHP dengan semua kelompok perlakuan ekstrak, karena nilai persen parasit semua kelompok selain CMC adalah 0%. Hal ini menunjukkan bahwa semua kelompok perlakuan ekstrak an DHP telah mengalami kesembuhan.

Artemisinin diketahui mempunyai struktur molekul yang mengandung jembatan peroksida (peroxide bridge), mekanisme kerja Artemisinin menurunkan derajat parasit sangat berkaitan dengan struktur molekulnya yang pada proses digesti haemoglobin diputus oleh ion Fe^{2+} menjadi radikal bebas yang sangat reaktif. Radikal-radikal Artemisinin ini kemudian menghambat dan memodifikasi berbagai macam molekul dalam Plasmodium yang mengakibatkan Plasmodium tersebut mati. Kerja Artemisinin melalui penghambatan enzim the malarial calcium-dependent ATP ase (PfATP6) yang terletak dalam kompartemen intrasel terbungkus membran yang disebut retikulum endoplasma. Pada Plasmodium, kompartemen ini tersebar luas dalam sitoplasma di luar food vacuole. Radikal bebas yang dihasilkan Artemisinin mengikat dan menghambat PfATP6 secara ireversibel dan spesifik sehingga mengakibatkan pertumbuhan parasit terhambat.³²

Persentase parasitemia kelompok CMC terus naik sampai dengan 78,25%. Dalam 10 hari pertama infeksi, terdapat peningkatan enzim NADPH oksidase dan NO pada serum mencit percobaan. Enzim NADPH oksidase memberikan elektron dari NADPH yang berada pada membran sitoplasma bagian dalam ke ekstraseluler menghasilkan O_2^- (superoksida). NO bereaksi dengan O_2^-

menghasilkan peroksinitril yang dapat berinteraksi dengan berbagai molekul biologi dan bersifat merusak.³³

Diferensiasi leukosit

Leukosit berfungsi sebagai sistem imun dan melawan penyakit di dalam tubuh. Nilainya akan normal pada beberapa kondisi seperti terluka dan kehamilan, jumlah leukosit akan tidak normal dalam kondisi kehilangan banyak darah, kanker dan pada kebanyakan infeksi.

Aktivitas proliferasi sel leukosit diteliti dengan mengamati perubahan jumlah sel selama terjadinya infeksi. Perubahan sel yang diidentifikasi meliputi sel limfosit, monosit, dan granulosit. Peningkatan wbc juga bisa terjadi pada penderita malaria. Pada keadaan malaria akut jumlah leukosit pada umumnya akan tetap normal atau rendah³⁴.

Parasit yang masuk ke dalam sirkulasi darah direspons oleh sistem imun tubuh secara non spesifik dan selanjutnya secara spesifik. Respons imun non spesifik merupakan efektor pertama dalam memberikan perlawanan terhadap infeksi.

Sel limfosit merupakan jenis sel darah putih yang agranulosit. Didalam apusan darah sel limfosit mempunyai inti bulat yang kadang-kadang sedikit bertakik. Limfosit merupakan unsur kunci pada proses kekebalan. Beberapa limfosit dibentuk di sumsum tulang, tetapi bagian terbesar dibentuk di dalam kelenjar limfe, timus dan limpa dari sel prekursor yang berasal dari sumsum tulang.³⁵

Hasil pengamatan perubahan jumlah sel limfosit disajikan pada Gambar 1. Pada hari pertama infeksi belum terjadi perbedaan antara kelompok DHP dengan kelompok perlakuan lainnya. Pada hari ke-2 dosis sedang nilainya berbeda secara signifikan bila dibandingkan dengan kelompok DHP dan nilai limfositnya terus meningkat sampai puncaknya hari ke-6, kemudian nilainya turun pada hari ke-7 dan hari ke-14.

Kulit batang pulai mengandung alkaloid sehingga jumlah parasit yang terdapat di dalam tubuh dapat ditekan dengan pemberian tanaman ini.

Rata-rata persentase limfosit kelompok perlakuan ekstrak dan DHP yang tinggi pada hari-hari terakhir pengamatan dapat disebabkan oleh kandungan

flavonoid pada kulit batang pulai yang masih ada pada tubuh mencit. Flavonoid dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit³⁶. Adanya benda asing (*P.berghei*) akan merangsang terbentuknya *antigen presenting cell* (APC), APC ini akan merangsang tubuh untuk membentuk sel limfosit T. IL-2 akan diproduksi dengan adanya sel limfosit T, IL-2 ini akan merangsang sel T sitotoksik untuk menghancurkan benda asing (*P. berghei*) yang masuk ke dalam tubuh¹. Pemberian ekstrak meningkatkan jumlah limfosit, sehingga dengan adanya kerjasama antara sistem kekebalan tubuh dan ekstrak dalam tubuh mencit dapat mengeliminasi jumlah parasit yang ada.

Monosit (jenis granulosit) sel yang terbesar diantara jenis leukosit didalam apusan darah. Sel monosit inti dapat berbentuk oval, sebagai tapal kuda atau tampak seakan akan terlipat. Butir-butir khromatinnya lebih halus dan tersebar rata dari pada butir kromatin limfosit.

Hasil pengamatan jumlah monosit disajikan dalam grafik. Pada semua kelompok jumlah monosit hari pertama nilai nya masih normal, kemudian pada kelompok cmc terus meningkat sampai hari ke-5, dan mulai menurun pada hari ke-6, 7 dan 14 yang bila dibandingkan dengan kelompok DHP menunjukkan nilai yang signifikan. sedangkan pada kelompok perlakuan ekstrak, hari pertama sampai hari ke-5 cenderung terjadi kenaikan nilai, dan mulai mengalami penurunan dihari ke-6 tapi masih tetap lebih tinggi dibandingkan kelompok cmc dan berbeda signifikan pada kelompok dosis sedang dibanding DHP pada hari ke14.

Monosit merupakan jenis sel fagosit yang akan menghancurkan antigen dengan cara menelannya. Monosit mampu mengadakan gerakan dengan jalan membentuk pseudopodia sehingga dapat bermigrasi menembus kapiler untuk masuk ke dalam jaringan pengikat. Dalam jaringan pengikat monosit berubah menjadi sel makrofag atau sel-sel lain yang diklasifikasikan sebagai sel fagositik. Didalam jaringan mereka masih membelah diri. Selain berfungsi fagositosis makrofag dapat berperan menyampaikan antigen kepada limfosit. Meningkatnya jumlah sel monosit yang cukup tinggi pada mencit yang diinfeksi menunjukkan terjadinya fagosit parasit sebagai mekanisme pertahanan tubuh³⁷

Dalam penelitian ini kenaikan jumlah monosit yang tinggi pada kelompok yang diberi ekstrak terutama dosis sedang, menunjukkan terjadinya respon imun dimana sel makrofag berperan menyampaikan antigen kepada limfosit untuk bekerjasama dalam sistem imun. Tingginya rata-rata persentase ini dapat disebabkan oleh senyawa flavonoid yang terkandung di dalam kulit batang pulai. Flavanoid berpotensi bekerja terhadap limfokin yang dihasilkan oleh sel T, sehingga akan merangsang sel-sel fagosit (monosit) untuk melakukan respon fagositosis³⁸. Dengan adanya flavonoid, jumlah monosit di dalam tubuh akan meningkat. Monosit tersebut akan memfagosit parasit yang ada, sehingga jumlah parasit di dalam tubuh dapat menurun.

Monosit merupakan salah satu sel yang berperan penting dalam respon imun, baik berperan fungsional dalam fagositosis maupun perannya sebagai *antigen presenting cells* (APC)³⁹. Dengan demikian, pemberian ekstrak dapat meningkatkan jumlah monosit di dalam tubuh.

Neutrofil adalah tipe leukosit yang penting dalam tubuh pada proses inflamasi, terutama yang disebabkan oleh mikroba. Pemusnahan mikroba oleh neutrofil dilakukan dengan cara endositosis (fagositosis) dan eksositosis. Sumsum tulang akan dirangsang untuk menghasilkan dan melepaskan sejumlah besar neutrofil jika dicurigai adanya sel tubuh yang rusak. Sel-sel tubuh yang rusak atau dirusak oleh mikroba akan membebaskan sinyal kimiawi yang menarik neutrofil dari darah untuk datang (kemotaksis). Neutrofil akan memasuki jaringan yang terinfeksi, merusak, dan menelan mikroba.⁴⁰

Granulosit (jenis sel leukosit yang mempunyai granula spesifik), diantara granulosit, netrofil merupakan jenis sel yang terbanyak, merupakan garis depan pertahanan seluler terhadap invasi jasad renik, memfagosit partikel kecil dengan aktif⁴¹. Perubahan jumlah netrofil disajikan pada Gambar. Pada hari pertama setelah diinfeksi jumlah netrofil semua kelompok masih dalam rentang normal, kemudian terjadi pola naik turun sampai pada hari ke-14 terjadi kenaikan jumlah netrofil dibanding nilai nomal.

Rata-rata persentase neutrofil di dalam darah mencit normal adalah 15%.⁴² Neutrofil berfungsi sebagai sel pertahanan pertama terhadap patogen-patogen yang masuk ke dalam tubuh⁴³. Patogen tersebut akan mengeluarkan

bahan kemotaktik yang dapat menarik neutrofil untuk datang, kemudian neutrofil akan datang ke daerah asal kemotaktik tersebut dan melakukan fagositosis⁴⁴. Parasit akan dicerna oleh enzim lisozim yang terdapat di dalam neutrofil, kemudian neutrofil akan mengalami autolisis setelah proses fagositosis selesai. Histamin dan faktor leukopoietik (sitokin dan interleukin) yang dilepaskan setelah lisisnya neutrofil akan merangsang sumsum tulang melepaskan cadangan neutrofil, sehingga produksi neutrofil akan meningkat⁴⁵. Pada hari pertama sampai hari ke-4 setelah infeksi persentasi neutrofil pada perlakuan menunjukkan peningkatan dibandingkan kelompok DHP, hal ini dikarenakan neutrofil berperan sebagai basis pertahanan pertama dalam menghancurkan atau mengeliminasi benda asing yang masuk ke dalam tubuh.^{46,47}

Pada hari ke-5 sampai ke-7 setelah infeksi, nilai neutrofil lebih rendah dibandingkan kelompok DHP. Rendahnya rata-rata persentase neutrofil mencit kelompok ekstrak pada hari-hari terakhir ini dapat disebabkan oleh fungsi neutrofil yang berperan sebagai pemberi tanda pertama untuk membunuh parasit hanya memiliki paruh waktu selama 2 hari dan hanya efektif pada hari-hari pertama terjadinya serangan parasit.⁴⁸

Histopatologi limpa

Limpa pada penderita malaria berfungsi untuk menghilangkan eritrosit yang terinfeksi dan produknya seperti pigmen malaria dari aliran darah. Plasmodium dan pigmen malaria (haemozoin) difagositosis secara aktif oleh makrofag limpa sehingga pada pemeriksaan makroskopis limpa tampak membesar sedangkan secara mikroskopis terdapat peningkatan jumlah sel makrofag dan haemozoin yang tersebar.⁴⁹ Limpa juga berperan dalam menurunkan persentase parasitemia.⁵⁰

Pada gambar 6 terlihat bahwa terjadi kenaikan jumlah hemozoin pada semua kelompok kecuali kelompok dosis besar seiring berjalannya waktu mulai dari hari ke-4, ke-7 dan ke-14. Tampak ada perbedaan bermakna pada semua kelompok di hari ke-4 kecuali pada dosis sedang dan dosis kecil. Dan pada hari ke-14 terlihat perbedaan yang signifikan antara DHP, dosis besar, dosis sedang, dimana nilai terendah terdapat pada kelompok dosis besar.

Haemozoin atau pigmen malaria adalah substansi *biocrystalline* yang merupakan heme hasil produk samping dari proses detoksifikasi oleh plasmodium. Haemozoin diduga berkontribusi terhadap anemia pada penderita malaria, meskipun masih terdapat kontroversi apakah yang berperan adalah haemozoin yang berada pada makrofag atau pada sel lainnya⁵¹. Haemozoin pada limpa terutama ditemukan pada pulpa merah (*red pulp*).⁵² Meskipun haemozoin juga ditemukan di pulpa putih (*white pulp*) pada beberapa hari pasca infeksi *P. berghei*.³

Pada siklus malaria tahap akhir replikasi plasmodium, RBC yang terinfeksi pecah dan melepaskan merozoit bersama dengan hemozoin ke dalam aliran darah. Hemozoin yang bebas dalam aliran darah akan difagosit oleh sel fagosit sekitarnya. Jumlah hemozoin setelah infeksi malaria berkaitan dengan fungsi sistem imun, terutama dengan terjadinya infeksi.⁵³

Hasil uji antara kelompok cmc dan kelompok perlakuan lainnya, didapatkan kecenderungan kenaikan hemozoin kecuali pada kelompok dosis besar terjadi kecenderungan penurunan hemozoin. Pada kelompok DHP, terjadi kenaikan yang sangat kecil. Hal ini membuktikan bahwa salah satu mekanisme kerja artemisinin adalah menghambat pembentukan hemozoin. Hemozoin merupakan polimer heme yang berkaitan dengan sensitifitas Artemisinin, hal ini ditunjukkan pada penelitian yang dilakukan terhadap RC strain *P.berghei*, didapatkan hasil bahwa Artemisinin tidak aktif disebabkan karena kurangnya kadar hemozoin yang terdapat pada RC strain *P.berghei*. Artemisinin mampu menghambat biosintesis hemozoin, pada penelitian yang dilakukan terhadap cel free condition pada konsentrasi mikro molar (EM) mampu menghambat pembentukan Hemozoin.⁵⁴

Dengan jumlah hemozoin yang meningkat diasumsikan Plasmodium dapat melakukan proses detoksifikasi heme dengan baik sehingga Plasmodium tetap hidup (derajat parasit meningkat). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya (pada hewan coba) yang menyebutkan bahwa pada jaringan yang ditemukan jumlah hemozoin yang tinggi ternyata didapatkan derajat parasit tinggi juga.⁵⁵

VII. KESIMPULAN DAN SARAN

7.1. KESIMPULAN

Dari penelitian yang telah dilakukan, ekstrak kulit batang pulai mengandung tanin, saponin, flavanoid dan terpenoid dan alkaloid, sedangkan meniran mengandung tanin, terpenoid dan glikosida kadenoid. Berdasarkan uji toksisitas akut kombinasi kulit batang pulai dan meniran, LD50 semu untuk ekstrak kulit batang pulai dan meniran adalah lebih besar dari 14285 mg/kg bb.

Kombinasi kulit batang pulai 443,34 mg/kgbb dan meniran 443,34 mg/kgbb memberikan hasil yang bermakna dalam menekan angka parasitemia pada puncak infeksi dan nilai diferensial leukosit baik itu limfosit, monosit dan neutrofil memperlihatkan nilai yang hampir sama dibandingkan kelompok DHP.

Pemberian kombinasi kulit batang pulai 443,34 mg/kgbb dan meniran 443,34 mg/kgbb memberikan hasil penurunan nilai hemozoin pada limpa secara bermakna bila dibandingkan kelompok perlakuan lainnya pada hari ke-14 setelah infeksi sehingga memberikan efek samping yang lebih rendah pada limpa.

7.2. SARAN

- Perlu dilakukan pengambilan data nilai eritrosit dan hemoglobin sehingga dapat diketahui tingkat anemia mencit percobaan.
- Perlu dilakukan penelitian kearah respon imun yang terlibat dalam eliminasi parasit.
- Perlu penelitian toksisitas subkronik untuk mengetahui keamanan kombinasi ekstrak.

VIII. UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih kami ucapkan kepada teman-teman laboratorium hewan coba dan laboratorium farmasi yang telah membantu terlaksananya penelitian ini.

IX. DAFTAR KEPUSTAKAAN

1. Emil Azlin. Uji Klinis Acak Tersamar Ganda Gabungan Sulfadoksin Pirimetamin Dengan Klorokuin Pada Malaria. Bagian Ilmu Kesehatan Anak, Fakultas Kedokteran Universitas Sumatera Utara. USU digital Library. 2003.
2. Riset Kesehatan Dasar. Riskesdas 2013. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan. Kementerian Kesehatan RI. 2013.
3. Pedoman penatalaksanaan kasus malaria di Indonesia. Direktorat Jenderal Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Departemen Kesehatan RI. 2008.
4. WHO releases new malaria guidelines for treatment and procurement of medicines. World Health Organization. 9 March 2010. Geneva. http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2010/malaria_20100308/en/. Di akses 23 September 2014 pukul 08.44.
5. Epidemiologi Malaria Di Indonesia. Buletin Jendela Data Dan Informasi Kesehatan. Triwulan I, 2011.
6. Wiarat christophe. 2006. Medicinal plants of the asia-pacific: Drugs for the future. World scientific publishing Co. Pte. Ltd., Singapore, pp 447-450.
7. Lesty H. M. Sumaha, Maria Nindatu, Pieter Kakisina. Efek Pemberian Ekstrak Metanol Kulit Batang Pohon Pulai (*Alstonia Scholaris* L. R. Br.) Terhadap Hasil Diferensiasi Leukosit Mencit (*Mus Musculus*) Yang Diinfeksi *Plasmodium Berghei* Anka. Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan Program Studi Pendidikan Dokter Universitas Pattimura. Molluca Medica. 40 Molucca Medica, Volume 5, Nomor 1, Oktober 2012, Hlm. 39-53.
8. Suhiman S, Winarti C. Prospek dan fungsi tanaman obat sebagai imunomodulator. (www.balittro.litbang.deptan.go.id/ind/images, diakses 11 Maret 2014)
9. Suprpto Ma'at. Tanaman Obat Untuk Pengobatan Kanker (Bagian 3). Jurnal Bahan Alam Indonesia. Vol. 3, No. 2. Juli 2004.
10. Lolita, V.S. Uji Aktivasi Antimalaria Ekstrak Metanol Herba Meniran (*Phyllanthus Niruri* Linn) Pada Mencit Terinfeksi *Plasmodium berghei*, Skripsi. Unair. Surabaya. 2003.

-
11. Leiden University Medical Center (Lumc), 2002. *The Plasmodium berghei Research Model Of Malaria*. 12 Januari 2014. (cited) available from: <http://www.lumc.nl/1040/Research/Malaria/Model01>. html.
 12. Malaria Cases In Indonesia Increases To About 3m In 2007: Health Official Say. Jakarta Post 2008 Jan 21.
 13. Nugroho A, Harijanto PN, Datau EA. Imunologi Malaria. In: Harijanto Pn, Editor. *Malaria: Epidemiologi, Patogenesis, Manifestasi Klinis Dan Penanganan*. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran (Egc); 2003.
 14. http://www.cdc.gov/dpdx/resources/pdf/benchAids/malaria/Parasitemia_and_LifeCycle.pdf. Diakses 22 September 2014 pukul 22.00.
 15. Simamora D, Fitri LE. 2007. Resistensi obat malaria. Mekanisme dan peran obat kombinasi obat antimalarial untuk mencegah antimalarial drug resistance. *Jurnal kedokteran brawijaya*, 23(2).
 16. Ganong, William F. 2002. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Ed ke-20. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
 17. Guyton AC, Hall JE. 1996. *Buku ajar fisiologi kedokteran*. Ed ke-9. Setiawan I, editor. Jakarta: Penerbit Buku Kedokteran EGC.
 18. Douglas L. 1978. *Biology of the Laboratory Mouse*. Second edition. Dover Publications, inc., New york.
 19. *Imunologi Dasar Edisi Ke-8* Karnen Garna B, Iris Rengganis. Fkuibslsi Penerbit . Jakarta 2009. Hal 43.
 20. Wijayanti AM, Hendrina E, dan Mardihusodo Ys. (2003), Efek Bee Propolis Terhadap Infeksi Plasmodium berghei Pada Mencit Swiss. *Berkala Ilmu Kedokteran*. 2003. 35: 81-89.
 21. Alves Hj, Weidanz W., Dan Weiss L, The Spleen In Murine Plasmodium Chabaudi Adami Malaria: Stromal Cells, T Lymphocytes, And Hematopoiesis. *Am J Trop Med Hyg*. 1996. **55**: 370-378.
 22. Thawani, N. 2013. Plasmodium product contribute to severe malarial anemia by inhibiting eritropoietin induce proliferation of erytroid precursors. *Journal of infectious disease advance acces*, published september 12. Major artikel.
 23. Herbal Guides. 2008. *Chanca Piedra (Stonebreaker)*. <http://herbalguides.com/guides/chanca-piedra>. (2 Maret 2010).

-
24. Combe V, Coltel N, Grau Ge. Cerebral Malaria: Role Of Microparticle And Plateletes In Alteration Of The Blood –Brain Barrier. *International Journal For Parasitology*. 2006.36(5) 541-546.
 25. Noer Aini, Soebaktiningsih, Loeki Enggar Fitri. Pengaruh Ekstrak Biji Nimba (*Azadirachta Indica*) Terhadap Penurunan Derajat Parasit Dan Jumlah *Hemozoin* Pada Kultur *Plasmodium Falciparum*. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*, Vol. Xx, No.3, Desember 2004
 26. Hanafiah Ka. Rancangan Percobaan : Teori Dan Aplikasi. Edisi Revisi. Raja Grafindo Persada, Jakarta. 2001. 1-9.
 27. Suryatno. Menghitung Besar Sampel Penelitian Kesehatan Masyarakat. Fakultas Kesehatan Masyarakat-Undip. Semarang
 28. Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat. Departemen Kesehatan RI Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan Direktorat Jenderal Pengawasan Obat Tradisional. 2000.
 29. Atun S. dan Arianingrum R. Aktivitas AntiPlasmodial Ekstrak Metanol Beberapa Tumbuhan Obat Herbal Secara In Vivo. *Jurnal Penelitian Saintek*, Vol.17, No. 1, April 2012.
 30. Phillipson Jd, Wright Cw., 1991, Antiprotozoal Agents From Plant Sources, *Planta Medica*, 57 (Suppl. 1), P.53-59.
 31. Wijesekera.ROB. 1991. The Medicinal Plant industry. Washington DC: CRC press, pp. 85-90.
 32. Ludwig et al. Artemisinin Target The SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 2003; 424.
 33. Tripathy, S., Prasad S., Chakraborty, Roy S. 2012. Superoxide Radica; Generation Mediated *Plasmodium Berghei* Infection In Swiss Mice. *Al Ameen Journal Of Medical Science*, 5(1), 69-81.
 34. Mojisola Christianah Cyril-Olutayo¹, Akhere A. Omonkhua² Effects of *Anogeissus leiocarpus* on Haematological Parameters of Mice Infected With *Plasmodium berghei* *Journal of Plant Studies*; Vol. 2, No. 2; 2013. ISSN 1927-0461 E-ISSN 1927-047X Published by Canadian Center of Science and Education

-
35. Ganong, William F. 2002. Buku Ajar Fisiologi Kedokteran. Ed Ke-20. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC.
 36. Jiao Y, Wen J, Yun. 2005. Influence Of Flavonoid Of Astragalus Membranaceus's Stem And Leaves On The Function Of Cell Mediated Immunity In Mice. Heilongjiang University. [Terhubung Berkala]. [Http://Www.Nebi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed](http://www.Nebi.Nlm.Nih.Gov/Pubmed).
 37. Maggio-Price, L, Brookoff, D., And Weiss, L., 1985, Changes In Hematopoietic Stem Cells In Bone Marrow Of Mice With *Plasmodium Berghei* Malaria *Blood* 66:1080-1084
 38. Kusmardi, Shirly K, Dwita W. 2006. Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol Daun Johar (*Cassia Siamea* Lamk.) Terhadap Peningkatan Aktivitas Dan Kapasitas Fagositosis Sel Makrofag. Di Dalam: MakaraKesehatan 10(2). [Terhubung Berkala]. [Http://Repository.Ui.Ac.Id/Contents/Koleksi/2/4f702e17d281682b79b314a0d264077514c67e13.Pdf](http://Repository.Ui.Ac.Id/Contents/Koleksi/2/4f702e17d281682b79b314a0d264077514c67e13.Pdf) [6 Januari 2011].
 39. Bratawidjaja Kg. 2003. *Imunologi Dasar*. Ed Ke-6. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Ui.
 40. Ganong WF. 2002. *Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Ed Ke-20. Widjajakusumah D, Irawati D, Siagian M, Moeloek D, Pendit BU, Penerjemah; Widjajakusumah D, Editor. Jakarta: EGC. Terjemahan Dari: *Riview Of Medical Physiology*.
 41. WYLER DJ: Peripheral Lymphocyte Subpopulation In Human Falciparum Malaria, *Clin Exp Immunol* 23:471, 1976).
 42. Douglas L. 1978. *Biology Of The Laboratory Mouse*. Second Edition. Dover Publications, Inc., New York.
 43. Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, Moldawer LL. 2001. Apoptosis In Sepsis: A New Target For Therapeutic Exploration. *The FASEB Journal* 15:879-892.
 44. Meyer DJ, Coles EH, Rich LJ. 1992. *Veterinary Laboratory Interpretation And Diagnosis*. Philadelphia: WB Saunders Company.
 45. Hafizhiah NH. 2008. Total Leukosit Dan Diferensiasinya Pada Kambing Peranakan Etawa (*Capra Aegagrus Hircus*) Di Cariu, Bogor Dan Cipanas-

-
- Cianjur, Jawa Barat [Skripsi]. Bogor: Fakultas Kedokteran Hewan, Institut Pertanian Bogor.
46. Effendi Z. 2003. *Peranan Leukosit Sebagai Anti Inflamasi Alergik Dalam Tubuh*. Medan: Fakultas Kedokteran, Universitas Sumatra Utara.
47. Mojisola Christianah Cyril-Olutayo¹, Akhere A. Omonkhua² Effects of *Anogeissus leiocarpus* on Haematological Parameters of Mice Infected With *Plasmodium berghei* Journal of Plant Studies; Vol. 2, No. 2; 2013 ISSN 1927-0461 E-ISSN 1927-047X
Published by Canadian Center of Science and Education
48. Hartono. 1988. *Histologi Veteriner, Sitologi Dan Jaringan Dasar*, Jilid I. Bogor : Laboratorium Histologi Bogor FKH IPB
49. Wijayanti MA, Soeripto N, Supargiyono., dan Fitri LE., (1997), Pengaruh Imunisasi Mencit dengan Parasit Stadium Eritrositik Terhadap Infeksi *Plasmodium berghei*. *Berkala Ilmu Kedokteran* **2**: 53-59.
50. Alves HJ, Weidanz W., dan Weiss L., (1996), The spleen in murine *Plasmodium chabaudi* adami malaria: stromal cells, T lymphocytes, and hematopoiesis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **55**: 370-378.
51. Frita R, Carapau D, Mota MM., dan Hanscheid, T., (2012), In Vivo Hemozoin Kinetics after Clearance of *Plasmodium berghei* Infection in Mice. *Malaria Research and Treatment* **2012**: 1-9.
52. Carvalho LJM, Ribeiro CTD., dan Goto H., (2002), Malaria Vaccine: Candidate Antigens, Mechanisms, Constraints and Prospects. *Scandinavian Journal of Immunology* **56**: 327-343.
53. Rosangela Frita, Daniel Carapau, Maria M. Mota, And Thomas H. Anscheid. In Vivo Hemozoin Kinetics After Clearance Of *Plasmodium Berghei* Infection Inmicehindawi Publishing Corporation Malaria Research And Treatment Volume 2012, Article ID 373086, 9 Pages
54. Noer Aini, Soebaktiningsih, Loeki Enggar Fitri. Pengaruh Ekstrak Biji Nimba (*Azadirachta Indica*) Terhadap Penurunan Derajat Parasit Dan Jumlah *Hemozoin* Pada Kultur

Plasmodium Falciparum. Jurnal Kedokteran Brawijaya, Vol. Xx, No.3,
Desember 2004

55. Sullivan DJ, Gluzman Ilya Y, Russell DG and Goldberg DE. On The
Molecular Mechanism Of Chloroquine's Antimalarial Action.
Medical sciences, 1996; 93: 11865 –11870.