

**AKTIVITAS ANTIMALARIA (IN VIVO) KOMBINASI BUAH SIRIH (*Piper betle* L),
DAUN MIYANA (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR.) MADU DAN KUNING TELUR
PADA MEN CIT YANG DIINFEKSI *Plasmodium berghei***

Yun Astuti Nugroho

Pusat Biomedis & Teknologi Dasar Kesehatan Jakarta, Email: astuti_1955@yahoo.com

**IN VIVO ANTI-MALARIAL ACTIVITIES OF *Piper betle* L., FRUIT (BUAH SIRIH),
Plectranthus scutellarioides (L.) R. BR., (DAUN MIYANA), HONEY AND EGG YOLK
COMBINATION AGAINST *Plasmodium berghei***

Abstract.

Background : Malaria is a major public health problem in the world and developing countries in particular, causing an estimated 1-2 million deaths per year, an annual incidence of 300-500 million clinical cases and more than 2 billion people were at risk of infection from it. But it is also becoming more difficult to treat malaria due to the increasing drug resistance. Therefore, the need for alternative drugs is acute. This study aims at investigating the in vivo antiplasmodial activity of *Piper betle* L., fruit (buah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (daun miyana), honey and egg yolk combination. **Methods:** A rodent malaria parasite, *Plasmodium berghei*, was inoculated into Swiss albino mice. The mice were infected with 1×10^5 parasites intraperitoneally. The *Piper betle* L., fruit (buah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (daun miyana), honey and egg yolk combination were combined and administered by an intra gastric tube daily for seven days starting from the day of parasite inoculation. The control groups received the same amount of solvent (vehicle) used to suspend each dose of the herbal drug. Chloroquine was used as a standard drug, administered through the same route. **Results:** Combination of *Piper betle* L., fruit (buah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (daun miyana), honey and egg yolk were observed to inhibit *Plasmodium berghei* parasitaemia in the Swiss albino mice 100 % on the sixth day. **Conclusion:** The study could partly confirm the claim in East Sulawesi traditional medicine that the *Piper betle* L., fruit (buah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (daun miyana), honey and egg yolk combination has therapeutic values in human malaria. There was, thus, the need to initiate further in-depth investigation by using different experimental models.

Keywords: Traditional medicine, Antimalaria Invivo

Abstrak.

Latar Belakang: Malaria merupakan masalah kesehatan masyarakat yang utama di dunia dan negara-negara berkembang pada khususnya, menyebabkan kematian diperkirakan 1-2 juta per tahun, sebuah kejadian tahunan 300-500 juta kasus klinis dan lebih dari 2 miliar orang menghadapi risiko infeksi dari itu. Tetapi juga menjadi lebih sulit untuk mengobati malaria karena resistensi obat

meningkat. Oleh karena itu, kebutuhan untuk obat alternatif adalah penting. Penelitian ini bertujuan untuk menyelidiki aktivitas anti plasmodial *in vivo* dari *Piper betle* L., buah (huah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (Daun miyana), madu dan telur kombinasi kuning. **Metode** : Sebuah malaria parasit hewan pengerat, *Plasmodium berghei*, diinokulasi ke tikus Swiss albino. Tikus terinfeksi dengan parasit *IxIO5* intraperitoneal. *Piper betle* L., buah (huah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (Daun miyana), madu dan telur kombinasi kuning digabungkan dan dikelola oleh tabung lambung intra setiap hari selama tujuh hari mulai dari hari inokulasi parasit. Kelompok kontrol menerima jumlah yang sama pelarut (vehicle) digunakan untuk menanggulangi setiap dosis dari obat herbal. Klorokuin digunakan sebagai obat standar, diberikan melalui rute yang sama. **Hasil** : Kombinasi dari *Piper betle* L., buah (huah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (daun miyana), madu dan kuning telur diamati untuk menghambat *Plasmodium berghei* parasitemia pada tikus Swiss albino 100% pada hari keenam. **Kesimpulan** : Penelitian ini sebagian bisa mengkonfirmasi klaim dalam pengobatan tradisional Timur Sulawesi bahwa *Piper betle* L., buah (huah sirih), *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. BR., (daun miyana), madu dan telur kombinasi kuning telah terapeutik. nilai-nilai dalam malaria manusia. Dengan demikian, ada kebutuhan untuk memulai investigasi lebih lanjut dan mendalam dengan menggunakan model percobaan yang berbeda.

Kata kunci : obat tradisional, antimalaria *in vivo*

PENDAHULUAN

Malaria adalah penyakit infeksi yang penyebarannya di dunia sangat luas meliputi 100 negara yang beriklim tropis dan subtropis. Di seluruh dunia setiap tahunnya ditemukan 300-500 juta kasus malaria yang mengakibatkan 1-3 juta orang meninggal dunia. Di negara tropis seperti Indonesia, malaria masih merupakan penyakit endemik (1). Di Indonesia, diperkirakan 50 persen penduduk masih tinggal di daerah endemis malaria. Angka kesakitan malaria yang terbesar terdapat di propinsi propinsi Indonesia bagian timur. Spesies plasmodium yang banyak dijumpai adalah *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) dan *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), sedangkan *Plasmodium malariae* (*P. malariae*) ditemukan di beberapa daerah namun prevalensinya sangat rendah. *Plasmodium ovale* (*P. ovale*) hanya ditemukan di daerah Papua (2).

Di negara-negara endemik malaria tanaman obat tradisional sering digunakan untuk mengobati malaria. Analisis obat tradisional yang digunakan untuk pengobatan malaria merupakan potensi untuk penemuan senyawa baru untuk pengembangan obat antimalaria (3). Misalnya, turunan kina dimodelkan pada struktur molekul, ditemukan dari kulit pohon kina (4). Baru-baru ini dirumuskan turunan artemisinin yang efektif yang diisolasi dari *Artemisia annua* (5). Keberhasilan isolasi artemisinin telah menginspirasi banyak peneliti untuk mencari obat antimalaria baru dari tanaman obat yang digunakan untuk mengobati malaria oleh pengobatan tradisional.

Tanaman obat tradisional Indonesia merupakan sumber yang potensial sebagai sumber bahan antimalaria baru. Salah satu diantaranya adalah ramuan buah sirih (*Piper betle* L.), daun

miyana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.), madu dan kuning telur. Ramuan ini telah lama dikenal oleh masyarakat di Sulawesi Utara sebagai bahan obat tradisional (6). Berdasarkan uji toksisitas akut menggunakan tikus galur *wistar* menunjukkan bahwa pemberian ramuan sampai dengan 6,328 *mU200* gBB tidak menunjukkan gejala toksik (7). Selain data penelitian yang telah ada sebelumnya, sirih diketahui memiliki kandungan kimia arekolin pada seluruh bagian tanaman (8,9,10). Arekolin merupakan senyawa alkaloid yang bersifat sebagai antibakteri dan dapat meningkatkan imunitas (11). Daun miyana telah diteliti mengandung alkaloid yang bersifat sebagai antibakteri (12). Suatu senyawa baru atau ramuan dapat digunakan sebagai obat apabila telah dilakukan uji di beberapa tempat dan menghasilkan hasil yang baik dan memuaskan. Mengingat di daerah lain seperti beberapa daerah di Nusa Tenggara Timur (NTT), merupakan daerah endemis malaria yang tinggi dan masyarakatnya mempunyai kebiasaan makan sirih, maka perlu dilakukan penelitian tentang efek antiparasit ramuan buah sirih, daun miyana, madu dan kuning telur dengan menggunakan bahan dari Kupang terhadap mencit yang diinfeksi *P. berghei*.

Penelitian yang dilakukan merupakan penelitian eksperimental secara *in vivo*, bertujuan mengetahui efek pemberian ramuan buah sirih (*Piper betle* L.), daun miyana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.), madu dan kuning telur yang berasal dari Kupang (NTT) berdasarkan penurunan angka parasitemia, dan daya tahan hidup (*survival*) mencit yang terinfeksi *P. berghei*.

BAHAN DAN CARA

Bahan penelitian

Bahan penelitian adalah buah sirih, daun miyana, madu dan kuning telur yang diperoleh dari Kupang (NTT). Tanaman yaitu buah sirih dideterminasi di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B₂P₂ T₀ T) Tawangmangu, Solo dan daun miyana dideterminasi di Herbarium Bogoriensis, Bogor.

Hewan Percobaan

Hewan coba yang digunakan adalah mencit jantan, galur *swiss derived*, berat badan ± 25-30 gram, umur ± 2 bulan, sebanyak 50 ekor, diperoleh dari Laboratorium Hewan Coba, Pusat Biomedis dan Teknologi Dasar Kesehatan Balitbang Kesehatan, Kementerian Kesehatan, RI. Jakarta. Sebelum digunakan dalam percobaan mencit dipelihara terlebih dahulu selama 1 minggu untuk penyesuaian lingkungan, mengontrol kesehatan, berat badan serta menyerasakan makanan.

Cara

Pembuatan ramuan

Pembuatan ramuan dengan cara sebagai berikut : Buah sirih dan daun miyana dibersihkan dan dicuci dari kotoran-kotoran. Sebanyak 40 g buah sirih dijus tanpa air lalu disaring, 5 g daun miyana dijus tanpa air lalu disaring, ditambah 2 sendok makan madu dan 1 butir kuning telur kemudian dicampur lalu disaring. Bahan uji dibuat tiga hari sekali dengan penyimpanan di kulkas.

Parasit dan infeksi:

Infeksi parasit malaria dilakukan dengan menyuntikkan secara intraperitoneal (ip) pada lima ekor mencit donor. Setelah positif, diambil darahnya dari mata menggunakan pipa kapiler berisi heparin,

lalu dihitung angka parasitemianya. Kelima darah meneit tersebut kemudian dieampur dan dieneerkan dengan RPMI untuk mendapatkan jumlah parasit dalam volume tertentu. Tiap meneit untuk pereobaan disuntikkan darah yang mengandung *P.berghei* sebanyak $\pm 10^5$ parasit/O,2 ml seeara ip. Pemeriksaan angka parasitemia dilakukan dengan membuat sediaan apus darah tipis tebal dari ekor, bila sudah positif maka dilakukan pemberian obat seeara oral.

Aktivitas antimalaria ramuan

Hewan coba meneit jantan, galur *swiss derived* yang diinfeksi dengan *P.berghei* 10^5 parasit/O,2 ml seeara ip dibagi seeara aek menjadi 5 kelompok @ 9 meneit/kelompok. Meneit yang terinfeksi seeara aek dibagi menjadi 3 kelompok uji dan 2 kelompok kontrol (klorokuin sebagai obat standar dan akuades sebagai kontrol negatif).

Ramuan disiapkan dalam 3 dosis berbeda (0,25mVekor; 0,50mL/ekor; 1mL/ekor) dan diberikan seeara oral sebagai dosis tunggal per hari, dosis klorokuin adalah 25mg/kg dan akuades 0.5mVekor.

Pemberian bahan uji dimulai 3 jam setelah positif terinfeksi pada hari -0 dan kemudian dilanjutkan setiap hari selama empat hari (hari - 3) untuk kelompok kontrol positif dan tujuh hari (hari - 6) untuk ramuan dan akuades.

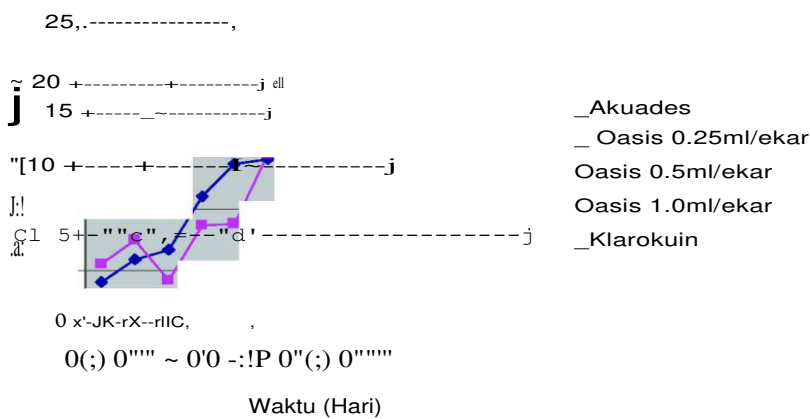
Pemeriksaan parasitemia dan pengamatan efek pengobatan

Untuk pemeriksaan parasitemia dibuat sediaan apus darah tebal maupun tipis dari darah ekor dan dihitung persentase (%) angka parasitemia (13).

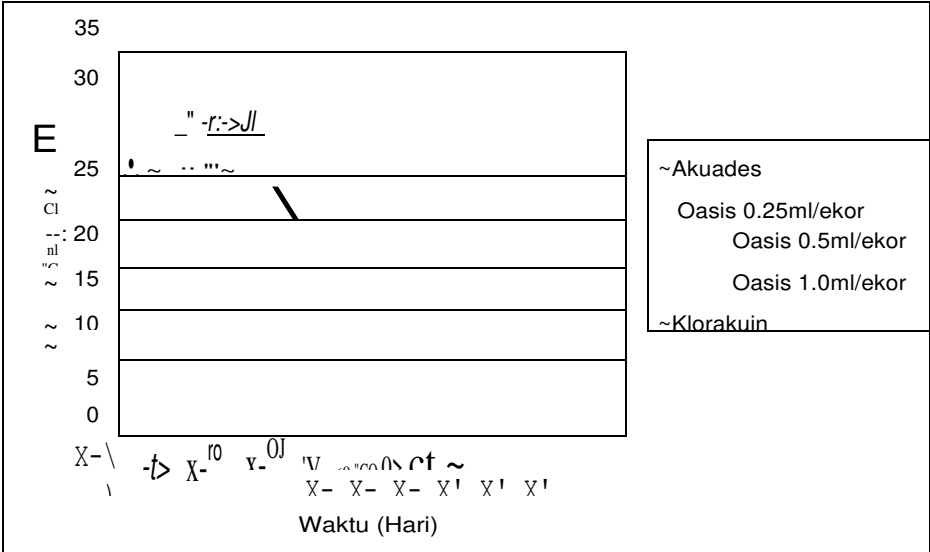
Pengamatan efek pengobatan dilakukan terhadap keadaan fisik meliputi berat badan, temperatur dan sikap tubuh serta terhadap daya tahan hidup (*survival*) yang dilakukan setiap hari setelah meneit diinfeksi dengan *P.berghei* ataupun selama dan sesudah pengobatan (14).

HASIL

Hasil pemeriksaan sediaan apus darah (tebal dan tipis) meneit didapatkan data angka parasitemia (%) untuk tiap-tiap kelompok kontrol dan perlakuan setelah pemberian seeara oral ramuan buah sirih, daun miyana, madu dan kuning telur.



Gambar 1. Grafik Perkembangan Angka Parasitemia (%) pada Semua Kelompok Perlakuan Selama Pengamatan 28 hari



Gambar 2. Grafik Berat Badan (Gram) Mencit pada Semua Kelompok Perlakuan

Tabell. Daya Tahan Hidup (*Survival*) Mencit yang Terinfeksi *Piberghei*

Hari	Jumlah mencit yang hidup (ekor)				
	Kontrol negative	Dosis 0,25 ml	Dosis 0,5 ml	Dosis 1,0 ml	Kontrol positif
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
H-O	9(100)	9(100)	9(100)	9(100)	9(100)
H-1	9(100)	9(100)	9(100)	9(100)	9(100)
H-2	8(88.89)	9(100)	9(100)	9(100)	9(100)
H-3	7(77.77)	9(100)	9(100)	9(100)	9(100)
H-4	4(44.44)	3(33.33)	9(100)	9(100)	9(100)
H-5	4(44.44)	2(22.22)	9(100)	9(100)	9(100)
H-6	4(44.44)	X	9(100)	9(100)	9(100)
H-7	3(33.33)	X	9(100)	9(100)	9(100)
H-8	3(33.33)	X	9(100)	9(100)	9(100)
H-9	3(33.33)	X	9(100)	9(100)	9(100)
H-10	3(33.33)	X	9(100)	9(100)	9(100)
HII-28	X	X	9(100)	9(100)	9(100)

Keterangan :
Kontrol negatif : akuades
Kontrol positif : klorokuin
X : hewan uji mati

Pengamatan keadaan fisik meneit didapatkan dengan mengukur berat badan (gram), yang ditimbang setiap tiga hari sekali. Pada kelompok kontrol negatif (akuades) tampak penurunan berat badan sampai meneit mati. Demikian juga dengan kelompok dosis 0,25 ml/ekor. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (klorokuin), kelompok dosis 0,5 ml serta 1,0 ml/ekor tidak terjadi penurunan berat badan namun terjadi sedikit peningkatan pada akhir pengamatan (Gambar 2).

Daya tahan hidup (*survival*) untuk tiap-tiap kelompok kontrol dan perlakuan dihitung berdasarkan jumlah hewan yang mati setiap hari. Pada kelompok kontrol negatif (akuades) dan kelompok dosis 0,25 ml/ekor tampak penurunan daya tahan hidup yang mengakibatkan meneit lebih cepat mati. Sedangkan pada kelompok kontrol positif (klorokuin), kelompok dosis 0,5 ml dan 1,0 ml/ekor tidak tampak penurunan daya tahan hidup sampai akhir pengamatan (Tabell).

PEMBAHASAN

Pada pengujian efek antiplasmodium, hewan percobaan yang digunakan adalah meneit jantan dengan umur $\pm$ 2 bulan dan berat yang relatif seragam (2530 g). Pada penelitian ini digunakan meneit jantan, karena jika digunakan meneit betina terjadi masa estrus yang dapat mempengaruhi fisiologisnya, sehingga kondisi masing-masing meneit menjadi tidak seragam.

Sebelum penelitian dilakukan pada manusia, maka terlebih dahulu dilakukan pada hewan coba (meneit) yang terinfeksi parasit *P.berghei* (penyebab malaria pada rodent). Semua spesies plasmodium memiliki siklus hidup yang sama, yang berbeda adalah masa inkubasi (intrinsik dan

ekstrinsik). *P.berghei* mempunyai kesamaan dengan *P. falciparum* dalam hal menyerang semua umur eritrosit, maka *P.berghei* sering digunakan pada penelitian

malaria pada hewan coba^(15,16). Disamping itu secara analisis molekuler dilaporkan adanya persamaan antara *P. berghei* dengan *P. falciparum*. Untuk memelihara kelangsungan hidup plasmodium ini adalah dengan 2 cara yaitu menyimpannya pada suhu rendah (-80°C atau -120°C) atau menginokulasikan parasit tersebut pada meneit. Pasase (transfer dari meneit ke meneit lain) sangat diperlukan karena meneit akan mati dalam jangka waktu tertentu (7 sampai 10 hari)⁽¹⁷⁾.

Pada kelompok kontrol negatif (akuades) tidak tampak adanya penurunan angka parasitemia melainkan terjadi peningkatan angka parasitemia. Hal ini didukung oleh hasil penelitian lain bahwa meneit yang terinfeksi *P.berghei* tanpa pengobatan dan dipelihara pada suhu kamar mengalami peningkatan angka parasitemia dengan cepat⁽¹⁸⁾. Pada kelompok dosis 0,25 mL/ekor tidak memperlihatkan adanya perubahan ke arah perbaikan meneit yang diinfeksi *P.berghei*. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian dosis tersebut kurang memadai untuk pengobatan malaria. Dosis yang biasa digunakan secara empirik oleh masyarakat untuk pengobatan malaria adalah 50 mg dan apabila disetarakan dengan meneit (30 g) yaitu 0,50 mL. Pada kelompok dosis 0,50 mL dan 1,0 mL/ekor memperlihatkan penurunan angka parasitemia dan perbaikan keadaan meneit. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian dosis tersebut mempunyai efek sebagai antiplasmodium.

Buah sirih memiliki kandungan saponin, steroid, minyak atsiri (golongan terpenoid termasuk di dalamnya) dan tanin⁽¹⁹⁾. Golongan senyawa tanin telah terbukti

menghambat perkembangan parasit malaria pada spesies primata *Microcebus murinus* (20), disamping itu juga diketahui bahwa golongan terpen (*artemisininpiperaquine*) terbukti sebagai antimalaria. Senyawa ini merupakan derivat terbaru terpen yang tengah diunggulkan sebagai senyawa antimalaria untuk menghadapi kasus *multidrug-resistant* (MDR) pada *P. falciparum* dan *P. vivax* (21). Golongan saponin dari ekstrak akar *Vangueria infausta* (Rubiaceae) dapat menghambat *uptake* dari [*G3H*]-*hypoxanthine* yang merupakan suplemen dalam perkembangan *P. falciparum* secara *in vitro* dan mempunyai aktivitas sebagai antimalaria pada *P. berghei* (22). Pada daun miyana diketahui memiliki golongan senyawa minyak atsiri, tanin, tanin katekat dan flavonoid.

Derivat flavonoid (*dehidrosilybin* dan *8-(1;1)-DMA-kaempferide*) mempunyai aktivitas sebagai antiplasmodium secara *in vitro* (23). Selain itu minyak atsiri dari daun *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. juga dilaporkan memiliki aktivitas antimalaria dan mampu menghambat (secara sempurna) pertumbuhan fase trophozoit menuju skizon setelah masa inkubasi 48 jam (24). Madu dan kuning telur merupakan sumber energi sehingga penambahan kedua unsur tersebut pada ramuan kemungkinan dapat meningkatkan sistem metabolisme dan berakibat peningkatan sistem kekebalan tubuh, sehingga mencit memiliki daya tahan hidup yang baik walaupun telah terinfeksi malaria. Mekanisme ramuan dalam menghambat perkembangan parasit belum diketahui, kemungkinan ada persamaan dengan obat antimalaria lainnya seperti klorokuin yang bekerja pada vakuola makanan parasit. Pada kelompok kontrol positif (klorokuin) memperlihatkan penurunan angka parasitemia yang lebih tinggi dan parasit lebih cepat hilang dibandingkan kelompok dosis

yang lain. Terdapat suatu kesamaan persepsi bahwa klorokuin berperan menghambat proses degradasi hemoglobin, suatu proses yang sangat penting bagi kelangsungan hidup parasit di dalam tubuh manusia (25).

Pengamatan terhadap keadaan fisik dan daya tahan hidup memperlihatkan penurunan berat badan, temperatur dan perubahan keadaan fisik mencit. Penurunan berat badan terjadi karena mencit kehilangan nafsu makan kemungkinan adanya gangguan pencernaan akibat terinfeksi *P. berghei*. Hal ini terlihat pada sikap tubuh kiposis pada hewan yang terinfeksi. Sikap tubuh kiposis merupakan indikasi atau gejala yang menunjukkan bahwa hewan mengalami rasa sakit di daerah abdomen. *P. berghei* dapat menyebabkan diare dan menyerang ginjal (*glomerulonefritis* akut). Pada manusia, salah satu gejala yang menonjol pada penderita malaria adalah mual dan gangguan pencernaan. Peningkatan temperatur pada awal infeksi terjadi karena hewan mengalami demam setelah terinfeksi, setelah itu diikuti dengan penurunan temperatur. Hal ini terjadi karena adanya gangguan pada susunan syaraf pusat terutama pada sistem termoregulator (pengatur suhu tubuh) yang tidak berfungsi dengan baik atau panas yang terbentuk akibat radang lebih banyak terbuang daripada menaikkan suhu tubuh, dan ini sesuai dengan penelitian lain bahwa mencit yang terinfeksi *P. berghei* tidak menunjukkan adanya demam melainkan penurunan temperatur (26). Penurunan terhadap temperatur diikuti perubahan keadaan fisik seperti pucat pada selaput mata, kaki dan ekor karena anemia berat, hal ini disebabkan banyaknya sel darah merah yang terserang dan kemudian pecah atau hilang pada saat pecahnya skizon. Banyaknya eritrosit yang terinfeksi menyebabkan banyak eritrosit yang hilang/pecah dan hal ini menyebabkan anemi yang berat.

Kematian pada mencit yang terinfeksi *P.berghei* terutama karena anemi berat (27).

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil pengamatan, pengukuran dan pemeriksaan mencit yang terinfeksi *P. berghei* dengan pemberian ramuan buah sirih (*Piper betle* L.), daun miyana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br.), madu dan kuning telur dari Kupang (NTT) maka dapat disimpulkan bahwa aktivitas antimalaria ramuan terhadap *P. berghei* mengindikasikan ramuan tersebut mengandung beberapa senyawa antiplasmodial namun harus ada penelitian lebih lanjut.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih penulis ucapkan kepada Drh. Rita Marleta Dewi, MKes; Drh. Hasbullah, MSc., PhD; Budi Nuratmi, BSc; dan Indratna Budiawan atas kontribusi dan dukungannya sehingga penelitian ini dapat selesai dengan baik.

DAFTAR RUJUKAN

1. Hardman J.G and Limbird L.E. Drugs used in the chemotherapy of malaria. In: Me GrawHill eds. Goodman and Gilman's. The pharmacological bases of therapeutics 10th ed. USA. 2001;PP.1069.
2. Anonim. Malaria pada manusia, info penyakit menular. Dirjen Pemberantasan Penyakit Menular & Penyehatan Lingkungan. Departemen Kesehatan. Republik Indonesia; 2004.
3. David, A.F., Philip, J. R., Simon, t.c., Reto B., and Solomon N. Antimalarial drug discovery: Efficacy models for compound screening. Nature Reviews.2004;3:509-520.
4. Coleman PG, Morel C, Shillcutt S, Goodman C, Mills AJ. A threshold analysis of the costeffectiveness of artemisinin-based combination therapies in sub-Saharan Africa. Am J Trop Med Hyg. (2004). 71(2 Suppl): 196-204.
5. Kiseko K., Hiroyuki M., Syun-ichi F., Ryuiichi F.,Tomotaka K., Seiji M., et al. AntiMalarial Activity of leaf - extract of *Hydrangea macrophylla*, a common Japanese plant. Acta Med Okayama. 2000;54 (5):227232.
6. Andries L. Uji efektifitas ramuan buah sirih terhadap malaria tanpa komplikasi. Laporan penelitian. Manado: Fakultas Kedokteran Universitas Sam Ratulangi 2004: 1-3.
7. Nugroho YA. "Upaya menurunkan angka kesakitan malaria di daerah terpencil menggunakan ramuan lokal". Observasi klinis pemakaian ramuan buah sirih, daun miyana, madu dan kuning telur untuk malaria. Laporan penelitian. Jakarta: Badan Litbangkes Depkes 2006.
8. Prayogo B, Sutaryadi. Pelayanan sirih untuk pelayanan kesehatan primer. Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1992; 1: 1. hal. 9.
9. Suwondo S, Sidik, Sumadilaga, Sularko. Aktivitas antibakteri daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap bakteri gingivatis dan bakteri pembentuk plak atau karies gigi (*Streptococcus mutans*). Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1992; 1: 1. hal. 1.
10. Sundari S. Koenseomardijah, Nusratini. Minyak atsiri daun sirih dalam pasta gigi: Stabilitas fisis dan daya antibakteri. Warta Tumbuhan ObatIndonesia 1992; 1: 1. hal. 5.
11. Darwis. Potensi sirih (*Piper betle* L.) sebagai tanaman obat. Warta Tumbuhan Obat Indonesia 1992; 1: 1. hal. 9.
12. Nugroho Y A. Karakterisasi, uji toksisitas akut oral dan uji mukolitik tanaman miyana (*Plectranthus scutellarioides* (L) R. Br.). Laporan Penelitian. Jakarta: Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan 2003: hal. 5.
13. Murdiani L. Uji identifikasi alkaloid secara kromatografi lapis tipis dan uji efek antimalaria ekstrak daun papaya gantung (*Carica papaya* L.) pada mencit yang diinfeksi *Plasmodium berghei* [skripsi]. Jakarta: Fakultas Farmasi Universitas Pancasila; 2000.
14. Sadikin M. Peningkatan daya tahan tubuh oleh kenaikan suhu tubuh pada mencit terinfeksi dengan *Plasmodium berghei* ANKA. Cermin Dunia Kedokteran 1989; 55: hal. 32-7.

15. Bruce Chat LJ. Essensial malariology. London: William Heine Mawon Medical Books Ltd; 1988.
16. Nobel ER, Nobel GA. Parasitologi: Biologi parasit hewan. Edisi 5. Diterjemahkan oleh Drh. Wardiarto. Yogyakarta: Gajah Mada University Press; 1989.
17. Dewi RM. Pengaruh pasase terhadap gejala klinis pada mencit strain "*swiss derived*" yang diinfeksi *Plasmodium berghei* ANKA. Cermin Dunia Kedokteran 1996; 106: hal. 34-6.
18. Sadikin M. Peningkatan daya tahan tubuh oleh kenaikan suhu tubuh pada mencit terinfeksi dengan *Plasmodium berghei* ANKA. Cermin Dunia Kedokteran 1989; 55: hal. 32-7.
19. Lisdawati V, Mutiatikum D, Alegantina S, Nugroho Y A. Karakterisasi daun miana (*Plectranthus scutellarioides* (L.) Bth.) dan buah sirih (*Piper betle* L.) secara fisikokimia dari ramuan lokal antimalaria daerah Sulawesi utara. Media Litbang Kesehatan 2008; XVIII:4. hal. 214.
20. Iaconelli S, Simmen B. Taste thresholds and suprathreshold responses to tanin-rich plant extracts and quinine in a primate species (*Microcebus murinus*), J Chern Ecol 2002; 28(11).
21. Hasugian AR, et al. Dihydroartemisinin/piperaquine versus artesunate-amodiaquine: superior efficacy and posttreatment prophylaxis against multidrug-resistant *Pfalciparum* and *P. vivax* malaria. Clin Infect Dis; 2007; 44(8).
22. Abosl AO, et al. *Vangueria infausta* root bark: *in vivo* and *in vitro* antiplasmodial activity: Br J Biomed Sci 2006; 63(3). hal 33-129.
23. de Monbrison F, et al. *In vitro* antimalarial activity of flavonoid derivatives dehydrosilibin and 8-(1;1)-DMA-kaempferide: Acta Trop; 2006; 97(1). hal 7-102.
24. Lopes NP, et al. Antimalarial use of volatile oil from leaves of *Virola surinamensis* (Rol.) Warb. By Waiapi Amazons Indians; J ethnopharmacology 1999; 67(3). hal 9-313.
25. Dewi RM. Angka kegagalan pengobatan klorokuin pada penderita malaria falsiparum ringan di daerah dengan beda endemisitas : Kajian dengan teknik PCR dan konvensional [tesis]. Y ogyakarta: Universitas Gajah Mada; 2004. hal. 28-29.
26. Dewi RM, Sulaksono E. Pengaruh pasase *P.berghei* pada mencit strain *swiss*. Cermin Dunia Kedokteran 1994; 94: hal. 61-3.
27. Dewi RM. Keadaan hematologis mencit yang diinfeksi dengan *Plasmodium berghei*. Cermin Dunia Kedokteran 1996: hal. 37-9.