

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian antimalaria ekstrak umbi Ashitaba (*Angelica keiskei* K) terhadap penghambatan pertumbuhan *Plasmodium falciparum* dengan konsentrasi 100 µg/ml, 10 µg/ml, 1 µg/ml, 0,1 µg/ml dan 0,01 µg/ml secara *in vitro* yang dilakukan di Laboratorium ITD Universitas Airlangga.

4.1. Simplisia

Bahan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah umbi Ashitaba yang diperoleh dari salah satu kebun warga di Desa Sembalun Bumbung, Kabupaten Lombok Timur, Provinsi NTB. Umbi Ashitaba yang akan digunakan pada penelitian ini telah melalui proses pencucian dan sortasi untuk mendapatkan simplisia dengan kualitas baik, kemudian dilakukan pengeringan menggunakan oven dengan suhu 60°C selama 3 hari di Laboratorium Farmakognosi Universitas Muhammadiyah Mataram.



Gambar 4.1. Simplisia umbi Ashitaba (*Angelica keiskei* K)

Tujuan pengeringan adalah untuk mendapatkan simplisia yang tidak mudah rusak, sehingga dapat disimpan dalam waktu yang lebih lama dengan mengurangi kadar air dan menghentikan reaksi enzimatik akan mencegah penurunan mutu atau perusakan simplisia (Prasetyo dan Inorih, 2013).

Selanjutnya umbi *Ashitaba* dibuat serbuk menggunakan *blender* dan ditimbang untuk mengetahui susut pengeringannya.

4.2. Ekstraksi

Ekstraksi pada penelitian ini menggunakan metode maserasi karena tidak dilakukan pemanasan sehingga dapat digunakan untuk mengekstraksi senyawa yang bersifat termolabil. Maserasi adalah proses penyarian simplisia menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur kamar (Ditjen POM, 2000). Pada penelitian ini maserasi dilakukan dengan cara mencampurkan serbuk dengan pelarut etanol 70% dalam toples kaca dengan pengadukan selama 30 menit kemudian diendapkan selama 24 jam pada suhu kamar. Maserasi yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan pelarut etanol 70% karena menurut Tiwara *et al.* (2011) etanol dengan konsentrasi 70% dapat menarik senyawa aktif bioflavonoid yang tinggi dibandingkan dengan menggunakan etanol yang murni. Hal ini disebabkan karena etanol 70% terdiri dari 30% kandungan air sehingga mengakibatkan kepolaran dari pelarut akan meningkat sehingga akan mempermudah dalam proses ekstraksi, etanol 70% akan mengakibatkan penetrasi ke dalam membran seluler untuk mengekstraksi bahan material intraseluler (Tiwari *et al.*, 2011).

Flavonoid merupakan senyawa fenol yang memiliki sistem aromatik yang terkonjugasi (Harborne, 1996 dalam Hudaya, 2015). Sistem aromatik yang terkonjugasi mudah rusak pada suhu tinggi. Selain itu, beberapa golongan flavonoid memiliki ikatan glikosida dengan molekul gula. Ikatan

glikosida akan mudah rusak atau putus pada suhu tinggi (Rijke, 2005). Berdasarkan Soehendro (2015), kelarutan fenol dalam air berkisar antara 0-65°C sedangkan menurut penelitian Kosasih (2017) terhadap daun sirsak membuktikan bahwa “kandungan flavonoid dan total fenol pada daun sirsak yang dipanaskan pada suhu 60°C lebih tinggi dibandingkan kandungan flavonoid dan total fenol pada daun sirsak yang dipanaskan pada suhu 40°C”. Oleh sebab itu, pada penelitian ini ekstrak kental umbi Ashitaba diperoleh dengan cara penguapan menggunakan *waterbath* dengan suhu 60°C. Data hasil simplisia dan rendemen dari proses ekstraksi umbi Ashitaba disajikan pada tabel 4.1.



Gambar 4.2. Ekstrak Kental Umbi Ashitaba

Tabel 4.1. Hasil simplisia dan rendemen

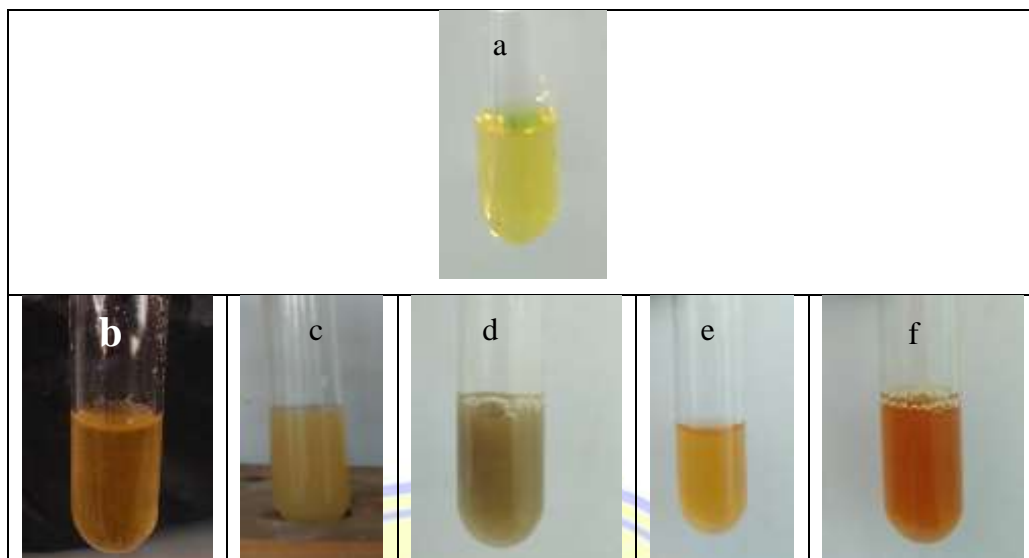
Bahan yang digunakan	Berat basah (g)	Berat kering (g)	Berat ekstrak (g)	Rendemen (%)
Umbi Ashitaba	4.100	1.200	13,23	1,102

Hasil ekstraksi menunjukkan bahwa 1.200 gam serbuk kering umbi ashitaba menghasilkan 13,23 gam ekstrak kental berwarna coklat tua, berbentuk pasta, dan rendemen ekstrak etanol 70% umbi ashitaba memiliki persentase sebesar 1,102% b/b. Rendemen adalah perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal. Rendemen menggunakan

satuan persen (%), semakin tinggi nilai rendemen yang dihasilkan menandakan nilai ekstrak yang dihasilkan semakin banyak (Armando, 2009). Rendemen suatu ekstrak dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor salah satunya adalah metode ekstraksi yang digunakan (Depkes RI, 2000). Menurut penelitian Wijaya (2018) rendemen ekstrak pada metode maserasi memiliki rendemen yang lebih kecil dibandingkan dengan metode refluks dan soxhletasi. Nurasih (2010) menyatakan bahwa karena tidak adanya bantuan gaya lain pada maserasi yang hanya dilakukan perendaman sehingga osmosis pelarut ke dalam padatan berlangsung statis meskipun telah dilakukan pergantian pelarut dengan metode remaserasi.

4.3. Skrinning Fitokimia

Skrinning fitokimia merupakan analisis kualitatif terhadap senyawa-senyawa metabolit sekunder. Suatu ekstrak dari bahan alam terdiri atas berbagai macam metabolit sekunder yang berperan dalam aktivitas biologisnya. Senyawa-senyawa tersebut dapat diidentifikasi dengan pereaksi-pereaksi yang mampu memberikan ciri khas dari setiap golongan dari metabolit sekunder (Harborne, 1987).



Gambar 4.3. Hasil Skrinning Fitokimia (a) Ekstrak Umbi Ashitaba yang telah dilarutkan dengan etanol (b) Flavonoid (c) Saponin (d) Tanin (e) Alkaloid (dragendroff) (f) Alkaloid (Mayer)

Ekstrak kental yang didapatkan dilarutkan dengan etanol kemudian disaring hingga menghasilkan filtrat berwarna kuning bening. Selanjutnya filtrat dibagi kedalam 5 tabung, masing-masing sebanyak 2 ml untuk direaksikan dengan beberapa pereaksi sebagai tahap pengujian skrinning fitokimia umbi ashitaba seperti pada gambar 4.3.

Hasil skrinning fitokimia secara kualitatif menunjukkan bahwa umbi Ashitaba memiliki senyawa Flavonoid golongan kalkon, Tanin dan Saponin (Tabel 4.2).

Tabel 4.2. Data Hasil Skrinning Fitokimia

No	Golongan Senyawa	Hasil Skrinning Fitokimia Ekstrak Umbi Ashitaba		
		Positif	Negatif	Keterangan
1	Flavonoid (kalkon)	✓		Merah Jingga
2	Saponin		✓	Tidak ada busa
3	Tanin	✓		Hijau kehitaman
4	Alkaloid (Dragendroff)		✓	Tak ada endapan
	Alkaloid (Mayer)		✓	Tak ada endapan

Uji flavonoid menunjukkan hasil positif, hal tersebut dapat dilihat dari perubahan warna kuning bening menjadi merah jingga. Semakin pekat warna merah yang dihasilkan dapat mengidentifikasi kandungan senyawa flavonoid tinggi. Berdasarkan warna yang dihasilkan dapat diidentifikasi jenis senyawa flavonoid tergolong senyawa kalkon (Suhendi, 2011).

Penambahan HCl pekat dalam uji flavonoid dimaksudkan untuk menghidrolisis flavonoid menjadi aglikonnya yaitu dengan menghidrolisis O-glikosil. Glikosil akan terganggu oleh H^+ dari asam karena sifatnya yang elektrofilik. Glikosida berupa gula yang biasa dijumpai yaitu glukosa, galaktosa dan ramnosa. Reduksi dengan Mg dan HCl pekat ini menghasilkan senyawa kompleks yang berwarna merah atau jingga pada flavonol, flavanon, flavanonol dan xanton (Marliana, 2005).

Uji saponin tidak menunjukkan hasil positif karena buih yang terbentuk setelah pengocokan tidak bertahan lama selama 10 menit. Busa yang ditimbulkan saponin karena adanya kombinasi struktur senyawa penyusunnya yaitu rantai saponin nonpolar dan rantai samping polar yang larut dalam air sehingga busa yang ditimbulkan dapat bertahan selama 10 menit dengan ketinggian 1-3cm (Faradisa, 2008).

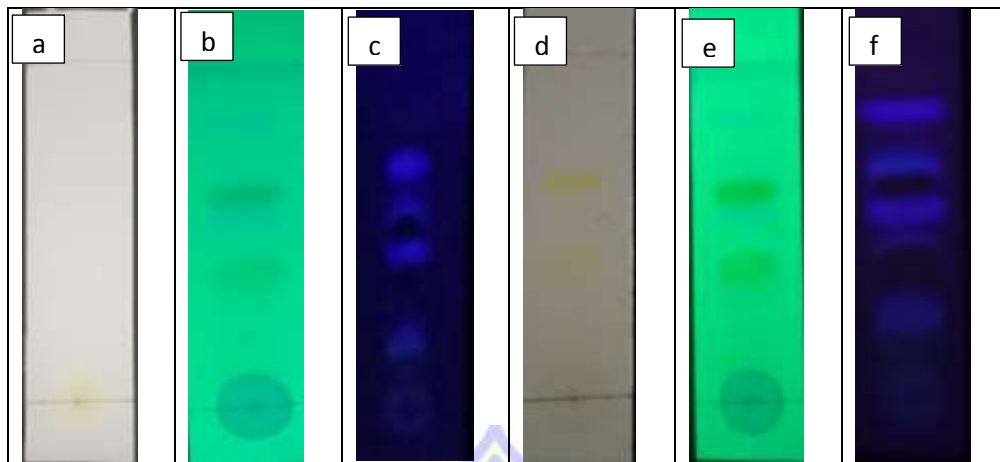
Uji tanin menunjukkan hasil positif dengan perubahan warna dari kuning bening menjadi hijau kehitaman. Perubahan warna menjadi hijau kehitaman terjadi akibat pembentukan senyawa kompleks antara tanin dengan $FeCl_3$. Tanin merupakan golongan polihidroksi fenol (polifenol) yang dapat

dibedakan dari fenol lain karena kemampuannya mengendapkan protein (Ikalinus, 2015).

Uji alkaloid menunjukkan hasil negatif dengan tidak terbentuknya endapan jingga setelah direaksikan dengan pereaksi *dragendroff*. Senyawa alkaloid bereaksi dengan *Dragendroff* menghasilkan endapan jingga hingga merah kecokelatan. Pada reaksi tersebut terjadi penggantian ligan dimana nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraidobismutat menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Haryati *et al.*, 2015).

4.4. Penegasan Senyawa Flavonoid

Senyawa yang diidentifikasi pada penelitian ini adalah senyawa flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT), KLT yang digunakan terbuat dari silika gel dengan ukuran 8cm x 2cm GF₂₅₄ sebagai fase diam. Ekstrak kental hasil ekstraksi dilarutkan dengan etanol, kemudian ditotolkan dengan menggunakan pipet mikro pada jarak 1 cm dari garis bawah dan 1 cm dari garis atas. Selanjutnya dielusi dengan menggunakan eluen etil asetat : n-heksan (7:3). Bercak pada fase diam dapat diamati pada cahaya tampak dan dibawah sinar UV. Hasil KLT dapat dilihat pada gambar 4.5.



Gambar 4.5. Hasil KLT Identifikasi Senyawa Golongan Flavonoid. (a) Pengamatan pada sinar tampak, (b) Pengamatan pada sinar UV 254 nm, (c) Pengamatan pada sinar UV 366 nm, (d) Pengamatan pada sinar tampak setelah diuapkan ammonia, (e) Pengamatan pada sinar UV 254 nm setelah diuapkan ammonia, (f) Pengamatan pada sinar UV 366 nm setelah diuapkan ammonia.

Hasil uji identifikasi senyawa seperti yang terlihat pada gambar 4.5 menunjukkan adanya perbedaan penampakan bercak sebelum dan setelah plat GF_{254} diuapkan ammonia. Bercak terlihat lebih jelas pada plat GF_{254} yang telah diuapkan ammonia. Pada UV 254 nm, lempeng akan berfluoresensi sedangkan sampel akan tampak berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 254 nm karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan indikator fluoresensi yang terdapat pada lempeng. Pada UV 366 nm noda akan berfluoresensi dan lempeng akan berwarna gelap. Penampakan noda pada lampu UV 366 nm karena adanya daya interaksi antara sinar UV dengan gugus kromofor yang terikat oleh auksokrom yang ada pada noda tersebut. Fluoresensi cahaya yang tampak merupakan emisi cahaya yang dipancarkan oleh komponen tersebut ketika elektron yang tereksitasi dari tingkat energi dasar ke tingkat energi yang lebih tinggi kemudian kembali ke keadaan

semula sambil melepaskan energi. Sehingga noda yang tampak pada lampu UV 366 terlihat terang karena silika gel yang digunakan tidak berfluoresensi pada sinar UV 366 nm (Gibbons, 2006).

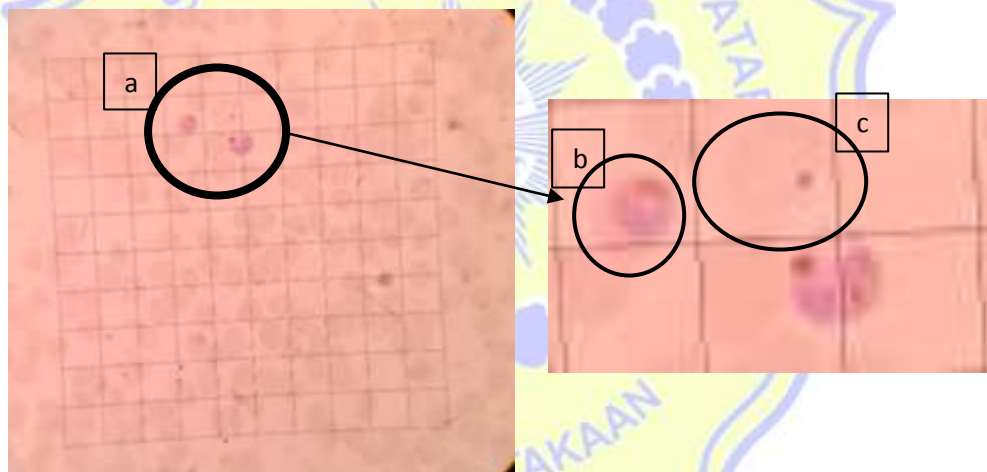
Identifikasi senyawa flavonoid setelah diuapkan ammonia timbul noda berwarna kuning terang dibawah sinar tampak dan UV 254 nm serta berwarna biru pada UV 366 nm menegaskan adanya kandungan flavonoid pada ekstrak umbi Ashitaba. Flavonoid yang bersifat polar terikat pada fase diam. Fase gerak yang bersifat semi polar akan membawa flavonoid melewati fase diam dan akan memisah, adanya uap ammonia akan menyebabkan gugus hidroksi fenolik pada flavonoid membentuk warna kuning (Erlita *et al.*, 2014) Hal ini sesuai dengan pendapat Wagner dan Bladt (2001) yang menyebutkan bahwa flavonoid dapat berfluoresensi dan memberikan warna kuning, hijau, maupun biru serta berwarna kuning lebih intens setelah diuapkan ammonia. Flavonoid yang berwarna kuning terang atau coklat kuning setelah direaksikan dengan ammonia merupakan jenis flavonol glikosida (Harborne, 2006).

4.5. Uji Aktivitas Antimalaria *In vitro*

Penelitian aktivitas antimalaria ekstrak etanol umbi ashitaba (*Angelica keiskei* Koidzumi) dilakukan terhadap *Plasmodium falciparum* strain 3D7 secara *in vitro*. Uji aktivitas *in vitro* dengan *P.falcifarum* dilakukan sebagai uji pendahuluan untuk mengevaluasi bahan alam hayati yang diduga memiliki aktivitas antimalaria. Skrinning ekstrak dari tanaman yang digunakan untuk pengobatan tradisional, uji *in vitro* menawarkan keuntungan karena dapat menggunakan *P.falcifarum*, penyebab malaria pada manusia yang memiliki

beberapa strain yang resisten terhadap banyak obat antimalaria sebagai parasit uji (Philipson, 1991). Pengujian antimalaria secara *in vitro* dilakukan dengan berbagai konsentrasi melalui beberapa tahapan yaitu, preparasi sampel, cek parasit dan uji malaria.

Sampel yang digunakan yaitu 5,3 mg ekstrak kental umbi Ashitaba yang dilarutkan dalam 530 ml DMSO 50% kemudian dilakukan serial pengenceran (100 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$ dan 0,01 $\mu\text{g/ml}$) untuk mengetahui rentang aktivitas antimalariannya. Tahap selanjutnya mengecek parasit dengan melakukan pengamatan di bawah mikroskop seperti pada gambar 4.6.



Gambar 4.6. Sepuluh lapang pandang pertama (a) pengamatan 1000 eritrosit (b) parasit stadium syzon (c) parasit stadium ring

Parasit yang dihitung adalah parasit dengan stadium ring yang ditunjukkan dengan titik atau lingkaran kecil berwarna hitam di dalam eritrosit, parasitema tersebut yang dihitung per 1000 eritrosit untuk menemukan persen penghambatan yang terjadi. Cek kultur dilakukan dengan membuat hapusan darah tipis yang diwarnai dengan giemsa 10%. Kualitas dari hasil pewarnaan giemsa berpengaruh terhadap pemeriksaan mikroskopik malaria. Hasil pewarnaan dikatakan baik apabila lapisan darah cukup tipis sehingga eritrosit dan leukosit jelas terpisah satu dengan yang lainnya. Leukosit tidak boleh menggerombol pada bagian terakhir dari hapusan, hapusan tidak boleh mengandung cat, bersih dari partikel zat warna giemsa, sel leukositnya tidak berlubang-lubang dan sel leukositnya tidak pecah (Prasetyaningrum, 2009). Prinsip dari pewarnaan giemsa adalah presipitasi hitam yang terbentuk dari penambahan larutan metilen biru dan eosin yang dilarutkan di dalam metanol. Pewarnaan giemsa digunakan untuk membedakan inti sel dan morfologi sitoplasma dari sel darah merah, sel darah putih, trombosit dan parasit yang ada di dalam darah (Dinas Kulon Progo, 2012).

Kontrol negatif pada penelitian ini menggunakan DMSO bertujuan untuk memastikan bahwa aktivitas antimalaria pada saat penelitian berasal dari sampel uji. Pemilihan DMSO sebagai kontrol negatif karena DMSO merupakan pelarut yang dapat melarutkan senyawa polar maupun nonpolar. Selain itu, DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan parasit sehingga tidak mengganggu hasil pengamatan uji aktivitas antimalaria

(Handayani *et al.*, 2005). Sedangkan kontrol positifnya menggunakan klorokuin. Berdasarkan struktur kimianya klorokuin fosfat merupakan turunan 4-aminokuinolin. Turunan 4-aminokuinolin mempunyai aktifitas antimalaria yang relatif tinggi dibandingkan kinin. Toksisitasnya relatif rendah, pemakaian jangka panjang dengan dosis besar dapat mempengaruhi pendengaran dan penglihatan. Cara kerja obat klorokuin adalah dengan menghancurkan bentuk eritrosit seksual (gametosit) dari parasit malaria sehingga mencegah penyebaran plasmodium ke nyamuk anopheles (Siswandono, 1995).

Pada tahun 1973 ditemukan pertama kali adanya kasus resistensi *P.falcifarum* terhadap klorokuin di Kalimantan Timur. Sejak itu kasus resistensi terhadap klorokuin yang dilaporkan semakin meluas. Sejak tahun 1990, dilaporkan telah terjadi resistensi *P.falcifarum* terhadap klorokuin di seluruh provinsi di Indonesia. Selain itu dilaporkan juga adanya kasus resistensi terhadap *Plasmodium* terhadap Sulfadoksin-Primethamin (SP) di beberapa tempat di Indonesia. Dari penelitian-penelitian yang dilakukan oleh Litbangkes dan Lembaga penelitian lainnya telah ditemukan adanya resistensi terhadap *P.vivax* terhadap klorokuin di beberapa wilayah di Indonesia (Bangka, Papua). Keadaan tersebut perlu dicegah dengan pengobatan yang tepat dan efektif sehingga dapat menurunkan morbiditas dan mortalitas akibat penyakit malaria (Kemenkes RI, 2011).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh Antonius *et al.* (2001) menyatakan bahwa “Prevalensi kasus resisten klorokuin ditemukan sebesar

40,8%. Suatu daerah dinyatakan resisten klorokuin dan pengobatan diganti dengan pengobatan antimalaria alternatif, maka dipakai hasil pertemuan WHO di Kuala Lumpur, Malaysia tahun 1981. Pertemuan tersebut menetapkan jumlah subjek yang perlu diuji minimal 30 penderita *P.falcifarum endogenous* dan hasil uji *in vivo* ditemukan 5% derajat RI (resisten I) dan atau R II atau R III, atau 1% derajat R II dan atau R III (Depkes RI, 1993). Atas dasar ketetapan tersebut, maka daerah tersebut dapat dinyatakan daerah resisten klorokuin. Kasus resistensi klorokuin yang paling banyak di desa pertanian dan perkebunan (87,1%), pekerjaan subjek sebagian besar adalah buruh (21,0%), tidak berpergian atau berkunjung ke daerah resisten sampai menginap (39,5%), tidak ada tamu yang menginap berasal dari daerah yang dinyatakan resisten (35,5%) dan tidak ada daerah yang dinyatakan resisten yang berjarak kurang dari 2,5 Km. Fakta tersebut menyatakan bahwa *endogenous P.falcifarum* yang resisten terhadap klorokuin bukan kasus *import*. Pada penelitian yang dilakukan di Kecamatan Kintap, Kabupaten Tanah Laut Provinsi Kalimantan Selatan dinyatakan sebagai daerah resisten terhadap klorokuin”.

Salah satu upaya penemuan alternatif pengobatan antimalaria adalah dengan menemukan senyawa bahan alam yang efektif untuk mengobati malaria. Menurut Bero *et al.* (2009), senyawa-senyawa yang positif pada skrinning fitokimia merupakan gugup senyawa yang sering menjadi senyawa aktif antimalaria. Senyawa-senyawa tersebut umumnya metabolit sekunder golongan alkaloid, terpen, kuasinoid, flavonoid, limonoid, kalkon, peptida,

xanton, kuinon, kumarin dan beberapa obat antimalaria bahan alam lainnya (Kaur *et al.*, 2009). Pada uji skrining fitokimia kali ini menunjukkan bahwa ashitaba mengandung senyawa flavonoid golongan kalkon, tanin dan saponin sedangkan Sembiring (2011) membuktikan bahwa umbi Ashitaba mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, triterpenoid dan glikosida yang sangat kuat.

Hasil uji aktivitas antimalaria *in vitro* ekstrak umbi Ashitaba dengan 5 konsentrasi diperoleh rerata pertumbuhan, hambatan dan nilai IC_{50} (Tabel 4.3). Persen pertumbuhan diperoleh dari persentasi jumlah eritrosit terinfeksi per 1000 eritrosit. Ekstrak etanol umbi ashitaba menunjukkan daya hambat terhadap pertumbuhan *P.falciparum* pada konsentrasi 100 μ l/ml (66,36%), 10 μ l/ml (42,90%), 1 μ l/ml (29,32%), 0,1 μ l/ml (12,81%) dan 0,01 μ l/ml (2,62%).

Menurut Pouplin *et al.* (2007) suatu ekstrak dikatakan aktif dalam menurunkan parasitemia apabila ekstrak tersebut dapat menurunkan parasitemia >30%. Berdasarkan hal tersebut, pada konsentrasi 100 μ g/ml dan 10 μ g/ml, ekstrak umbi Ashitaba ini dapat dikatakan aktif dalam menurunkan parasitemia.

Tabel 4.3 Data Hasil Uji Aktivitas Antimalaria secara *in vitro*

Bahan Uji	Konsentrasi (µg/ml)	Pertumbuhan (%)	Hambatan (%)	IC ₅₀ (µg/ml)
Ekstrak umbi ashitaba	100	1,09 ± 0,03	66,36 ± 0,72	16,09
	10	1,85 ± 0,01	42,90 ± 0,18	
	1	2,29 ± 0,01	29,32 ± 0,13	
	0,1	2,82 ± 0,02	12,81 ± 1,04	
	0,01	3,15 ± 0,01	2,62 ± 0,21	
Kontrol positif (Klorokuin)	100	0	100	0,007
	10	0,28 ± 0,28	91,35 ± 0,91	
	1	0,55 ± 0,49	82,86 ± 1,60	
	0,1	0,97 ± 0,21	70,22 ± 0,53	
	0,01	1,42 ± 0,01	56,17 ± 0,63	
Kontrol negatif (DMSO)		3,24 ± 0,01		

Hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan besarnya aktivitas penghambatan terhadap pertumbuhan *P.falcifarum*, dianalisis menggunakan probit dari program SPSS sehingga diketahui nilai *inhibition concentration* (IC₅₀). Hasil analisis didapatkan nilai IC₅₀ *P.falcifarum* pada kultur ekstrak umbi ashitaba dan klorokuin berturut-turut adalah 16,09 µg/ml dan 0,007 µg/ml. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin besar efektivitas penghambatan ekstrak terhadap pertumbuhan *P.falcifarum* (Rinidar *et al.*, 2013).

Menurut Kohler (2002) Ekstrak yang memiliki nilai IC₅₀ <50 µg/ml dan fraksi yang memiliki nilai IC₅₀ <25 µg/ml dapat dikatakan efektif sebagai antimalaria. Hal tersebut menunjukkan bahwa nilai IC₅₀ umbi ashitaba lebih kecil dari nilai yang disebutkan. Dengan demikian dapat dinyatakan bahwa ekstrak etanol umbi ashitaba efektif sebagai antimalaria. Selain itu, kriteria ekstrak yang memiliki aktivitas antimalaria menurut Bickii *et al.* (2007) disajikan dalam Tabel 4.4

Tabel 4.4 Kriteria nilai IC₅₀ aktivitas antimalaria

No	Kriteria	Nilai IC ₅₀ (µg/ml)
1	Sangat aktif	<05
2	Aktif	5 – 50
3	Kurang aktif	50-100
4	Tidak aktif	>100

Dari data tersebut dapat dinyatakan bahwa ekstrak umbi Ashitaba dapat dikategorikan aktif sebagai agen antimalaria.



BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian uji aktivitas antimalaria ekstrak etanol umbi ashitaba terhadap *Plasmodium falcifarum* dengan pendekatan *In vitro* menggunakan metode *mix gass*, dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak umbi Ashitaba memiliki potensi sebagai antimalaria yang ditunjukkan dengan nilai IC_{50} sebesar 16,09 $\mu\text{g/ml}$
- b. Konsentrasi efektif pada uji antimalaria ekstrak umbi Ashitaba yaitu pada konsentrasi 100 $\mu\text{g/ml}$ (66,36%) dan 10 $\mu\text{g/ml}$ (42,90%)

5.2. SARAN

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap isolasi senyawa kalkon dalam umbi Ashitaba
- b. Perlu dilakukan lebih lanjut tentang aktivitas antimalaria ekstrak etanol umbi Ashitaba dengan pendekatan *in vivo* untuk mengetahui dosis keamanan dan toksisitasnya
- c. Diharapkan peneliti selanjutnya menggunakan pelarut dan metode lain dalam pembuatan ekstrak umbi Ashitaba

DAFTAR PUSTAKA

- Abdalla SH, Geoffrey P. 2011. *Malaria: A Haematological Perspective*. Imperial College Press. London.
- Acang, N. 2002. *Kasus Malaria Resisten Klorokuin*. Majalah Kedokteran Indonesia 52(11): 383-389
- Agoes G. 2007. *Teknologi Bahan Alam, Edisi Revisi*. Bandung: penerbit ITB
- Akihisa T, Tokuda H, Ukiya M, Iizuka M, Schneider S, Ogasawara K, Mukainaka T, Iwatsuki K, Suzuki T, Nishino H. 2003. *Chalcones, coumarins, and flavanones from the exudate of Angelica keiskei and their chemopreventive effects*. Cancer Lett; 201: 133–137
- Akihisa T, Tokuda H, Hasegawa D, Ukiya M, Kimura Y, Enjo F, Suzuki T, Nishino H. 2006. *Chalcones and other compounds from the exudates of Angelica keiskei and their cancer chemopreventive effects*. J Nat Prod, 29: 38-42
- Ameta KL, Rathore NS, Kumar B. 2011. *Synthesis of Some Novel Chalcones and Their Facile One-Pot Conversion to 2-Aminobenzene-1,3-Dicarbonitriles Using Malononitrile*. Analele Universitatii din Bucuresti 20(1): 15
- Armando dan Rochim. 2009. *Memproduksi Minyak Atsiri Berkualitas*. Cetaka 1. Jakarta : Penerbit Penebar Swadaya
- Arnida, Sahi ER, Sutomo. 2017. *Aktivitas Antiplasmodium In vitro dan Identifikasi Golongan Senyawa Dari ekstrak Etanol Batang Manuran (Coptosapelta tomentosa Valetton ex k.Heyne) asal Kalimantan Selatan*. Jurnal Ilmiah Ibnu Sina, 2(2), 270-278. Universitas Lambung Mangkurat Kalimantan Selatan
- Aru W, Sudoyo. 2009. *Buku ajar ilmu penyakit dalam, jilid II, edisi V*. Jumbita: Interna Publishing.
- Azwar Saifuddin. 2011. *Metode penelitian*. Pustaka pelajar. Yogyakarta
- Baba, K. 1995. *Healthy Vegetable Ashitaba*. Chikuya Shuubansha. Hlm 125
- Battenberg OA, Yang Y, Verhelst SH, Sieber SA. 2013. *Target profiling of 4-hydroxyderricin in S. aureus reveals seryl-tRNA synthetase binding and inhibition by covalent modification*. Mol Biosyst; 9: 343–351
- Beom-tae Kim, Kwang-Joong O, Jae-Chul Chun, and Ki-Juni Hwang. 2008. *Banteng*. Chem. Soc Korea. Vol. 29, No.6
- Bero J, Frederich M, Lechlger JQ. 2009. *Antimalarial Compounds Isolated from Plants Used in Traditional Medicine*. J. Pharm. Pharmacol. DOI: 10.1211/jpp/61.11.0001. Source: PubMed

- Bickii J, Tchooya GRF, Tchouankeu JC & Tsamo E. 2007. *Antimalarial Activity in Crude Extracts of Some Cameroonian Medicinal Plants*. AFR J Trad CAM 4(1) 107-111
- Builders M, Alemika T, Aguiyi J. 2014. *Antimalarial Activity and Isolation of Phenolic Compound from Parkia Biglobosa IOSR. J. Pharm. Biolog. Sciences (IOSR-JPBS)*. 9(3). 78-85
- Caesar LK, Cech NB. 2017. *A Review of the Medicinal Uses and Pharmacology of Ashitaba*. Departemen of Chemistry and Biochemistry. University of North Carolina at Geensboro. USA
- Ceremuga TE, Johnson LA, Adams-Henderson J, McCall S, Johnson D. 2013. *Investigation of the anxiolytic effects of xanthohumol, a component of Humulus lupulus (Hops), in the male Sprague-Dawley rat*. AANA J; 81: 193–198
- Depkes RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Jumbita: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- Depkes RI. 2008. *Pedoman Penatalaksanaan Kasus Malaria di Indonesia*. Direktorat Jendral Pengendalian Penyakit dan Penyehatan Lingkungan. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jumbita. 1-8
- Dinas Kesehatan Provinsi NTB. 2017. *Profil Kesehatan Provinsi NTB 2017*. Dinas Kesehatan Provinsi NTB. Mataram. Hlm 38
- Dinas Kulon Progo. 2012. *Diagnosis Malaria pada Sediaan Darah Tebal dan Tipis*. Yogyakarta: Pelatihan Diagnosis Mikroskopi Malaria
- Ditjen POM. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan pertama. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. Halaman 3-5, 10-11
- Eris S, Aulia U, Erlindha G, Partomuan S. 2017. *Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Heme Ekstrak Daun Sembung (Blumea balsamifera) Sebagai Antimalaria*. Bul. Littro Vol. 28 No. 1 Hlm. 29-36
- Gibbons, S. 2006. *An Intoduction to Planar Chromatography*. Humana Press: Totowa Ner Jersey
- Hans RH, Guantai EM, Lategan C, Smith PJ, Wan B, Franzblau SG. 2010. *Synthesis, Antimalarial, and Antitubercular Activity of Acetylenic Chalcones*. Bioorg Med Chem Lett; 20(3): 924-4
- Harborne JB. 1996. *Metode fitokimia*. Bandung: penerbit ITB

- Hussien AA, Kateb BA, Husen SS, Kulkarni PA. 2016. *Synthesis, Characterization, And Antimicrobial Screening of Novel Ortho Hydroxy Chalcones*. Int.J.Curr.Microbial.App.Sci 5(3): 785-791
- Indraswari, A. 2008. *Optimasi Pembuatan Ekstrak Daun Dewan Daru (Eugenia uniflora L.) Menggunakan Metode Maserasi dengan Parameter Kadar Total Senyawa Fenolik dan Flavonoid*. Surumbita: Tugas Akhir Teknik Kimia. Universitas Muhammadiyah Surumbita
- Kaur K, Jain M, Kaur T, Jain R. 2009. *Antimalarial from Nature*. Bloorg Med Chem. 1-78
- Keishor VG, Sandip VG, Satish BJ, and Shantilal DR. 2010. *Synthesis of Some Novel Chalcones of Phthalimidoester Prossesing Good Antiinflammatory and Antimicrobial Activity*. Indian Journal of Chemistry, 49B : 131-136
- Khail MMH, Ramadan RM, Salem MAI, Marzouk MI, Moftah MS. 2011. *Reactions of 2'hydroxy Methoxylated Chalcone with Goup 6 and 8 Metal Carbonyl Complexes Under Sunligt Irradiation: Synthesis, Characterization, Spectroscopic Investigation and Biological Activities*. Egy. J. Pure & Appl. Sci: 019-029
- Khan MK, Zill EH, Dangles O. 2014. *A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols*. J Food Comp Anal; 33: 85–104
- Khoddami A, Wilkes MA, Roberts TH. 2013. *Techniques For Analysis of Plant Phenolic Compounds*. Molecules. 18: 2328-2375
- Kim DW, Curtis-long MJ, Yuk HR, Wang Y, Song YH, Jeong SH, Park KH. 2014. *Quantitative analysis of phenolic metabolites form different parts of Angelica keiskei by HPLC-ESI MS/MS and their xanthine oxidase inhibition*. Food Chem. 153: 20-27
- Kohler I, Suem SJ, Siems K & Hernandez MA. 2002. *In Vitro Antiplasmodial Investigation of Medical Plants From El Savador*. Journal Bioscience. 57
- Li J, Gao L, Meng F, Tang CL, Zhang RJ, Li JY, Luo C, Li J, Zhao WM. 2015. *PTP1B inhibitors from stems of Angelica keiskei (Ashitaba)*. Bioorg Med Chem Lett; 25: 2028–2032
- Lim SS, Kim HS, Lee DU. 2007. *In vitro Antimalarial Activity of Flavonoids and Chalcones*. Bull Korean Chem Soc 28 (12): 2495.
- Lusiana H. 2009. *Isolasi dan Uji Anti Plasmodium secara In Vitro Senyawa Alkaloid dari Albertisia papuana BECC*. Institut Pertanian Bogor
- Mahapatra DK, Asati V, Bharti SK. 2015. *Chalcones and their therapeutic targets for the management of diabetes: structural and pharmacological perspectives*. Eur J Med Chem, 92: 839-865

- Markham KR. 1998. *Cara Mengidentifikasi Flavonoid*. Diterjemahkan oleh Kosasih Padmawinata. 15. Penerbit ITB. Bandung
- Mei Liu, Prapon Wilairat, Simon L. Croft. 2003. *Bioorganic & medicinal kimia* 11. 2729-2738
- Mustofa. 2009. *Obat Antimalaria Baru: Antara Harapan dan Kenyataan*. Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar pada Fakultas Kedokteran. Yogyakarta
- Nurasiah ES. 2010. *Pengoptimuman ekstraksi andrografolida dari sambiloto dengan rancangan fraksional faktorial*. Bogor: Institute Pertanian Bogor
- Nishimura R, Tabata K, Arakawa M, Ito Y, Kimura Y, Akihisa T, *et al.* 2007. *Isobavachalcone, a chalcone constituent of Angelica keiskei, induces apoptosis in neuroblastoma*
- Notoatmodjo S. 2005. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Rineka Cipta. Jumbita
- . *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 30(10):1878-1883
- Ogawa H, Nakamura R, Baba K. 2005. *Beneficial effect of laserpitin, a coumarin compound from Angelica keiskei, on lipid metabolism in strokeprone spontaneously hypertensive rats*. *Clin EXP Pharmacol Physiol*, 32: 1104-1109
- Okuyama T, Takata M, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, Nishino A, Nishino H, Iwashima A. 1991. *Anti-tumor-promotion by principles obtained from Angelica keiskei*. *Planta Med*; 57: 242-246
- Pouplin JN, *et al.*, 2007. *Antimalarial and Cytotoxic Activities of Ethnopharmacologically Selected Medicinal Plants from South Vietnam*. *J of Ethnopharmacology*. 109
- Prabowo A. 2004. *Malaria: mencegah dan mengatasinya*. Halaman 13-14
- Prasetyaningrum F. 2009. *Pengaruh Lama Penyimpanan Cat Giemsa Enceran terhadap Hasil Pewarnaan Sediaan Apus Darah*. Skripsi. Universitas Muhammadiyah Semarang
- Prasetyo dan Inorah E. 2013. *Pengaruh Budidaya Tanaman Obat-obatan*. Bahan simplisia. Bengkulu: Badan Penerbitan Fakultas Pertanian UNIB
- Purwantiningsih. 2003. *Artemisinin dari Artemisia seacrorum, Ledeb dan Turunannya Sebagai Komponen Bioaktif Antimalaria*. Sekolah Pascasarjana, IPB. Bogor
- Rijke E. 2005. *Trace-level Determination of Flavonoids and Their Conjugates Application to Plants of the Leguminosae Family*. Amsterdam : Universitas Amsterdam

- Santjaka A. 2013. *Malaria Pendekatan Model Kausalitas*. Nuha Medika. Yogyakarta
- Salomon VR, Lee H. 2012. *Anti-Breast Cancer Activity of Heteroaryl Chalcone Derivatives*. Biomedicine Pharmacotherapy 66:213
- Sembiring BB, Manoi F. 2011. *Identifikasi Mutu Tanaman Ashitaba*. Bull. Littro, 22(2): 177-185
- Soehendro AW, Manuhara GJ, Nurhantadi E. 2015. *Pengaruh Suhu Terhadap Aktivitas Antioksidan dan Antimikrobia Ekstrak Biji Melinjo (Gnetum gnemon L) dengan Pelarut Etanol dan Air*. Jurnal Teknosains Pangan. Universitas Sebelas Maret. Vol IV No.4
- Suhartati R & Nurasih I. 2016. *Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Daun Ashitaba (Angelica keiskei) terhadap Bakteri Pseudomonas aeruginosa secara In Vitro*. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada, 16(1): 113-118.
- Suhartati R & Virgianti DP. 2015. *Daya Hambat Ekstrak Etanol 70% Daun Ashitaba (Angelica keiskei) terhadap Bakteri Staphylococcus aureus yang Diisolasi dari Luka Diabetes*. Jurnal Kesehatan Bakti Tunas husada, 14(1): 162-172
- Suhendi A, Sjahid RL, Hanwar D. 2011. *Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (Eugenia uniflora L)*. Pharmacon Vol 12 No 2, 73-81
- Sutanto I dan Ismid IS. 2008. *Parasitologi kedokteran*. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. 189-212
- Suwandi JF, Wijayanti MA, Mustofa. 2008. *Aktivitas Penghambatan Polimerisasi Hem Antiplasmodium Ekstrak Daun Sungkai (Peronema canescens) in vitro*. Prosiding. Lampung: Seminar Nasional Sains dan Teknologi-II, Universitas Lampung. IV:113-120
- Syafii W, Sari RK, Cahyaningsih U, Anisah LN. 2016. *Aktivitas Antimalaria Ekstrak Kayu Bidara Laut (Antimalarial Activity of Bidara Laut Wood Extracts)*. Jurnal Ilmu Teknologi. Kayu Tropis Vol.14 No.1
- Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. 2011. *Phytochemical screening and extraction*. A review, international pharmaceutica scientia 1(1), 98-106
- Tuti S. 1992. *Resistensi Plasmodium falciparum terhadap Beberapa Obat Antimalaria di Indonesia secara Kontinu*. Buletin Penelitian Kesehatan 22(1) 1994
- WHO. 2010. *Global Report on Antimalarial Drug Efficacy and Drug Resistance: 2000-2010*. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Hlm 9

- WHO. 2011. *World Malaria Report: 2011*. Switzerland: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. Hlm 66
- Widyawaruyanti A, Zaini NC, Syafruddin. 2011. *Mekanisme dan Aktivitas Antimalaria dari Senyawa Flavonoid yang Diisolasi dari Cempedak (Artocarpus champeden)*. Fakultas Farmasi UNAIR dan Fakultas Kedokteran UNHAS. JBP Vol. 13, No. 2, Hlm. 67-77
- Wijaya H, Novitasari & Jubaidah S. 2018. *Perbandingan Metode Ekstraksi Terhadap Rendemen Ekstrak Daun Rambai Laut (Sonneratia caseolaris L.Engl)*. Jurnal Ilmiah Manuntung 4(1) 79-83. Kalimantan timur: Akademi Farmasi Samarinda.
- Wiser MF. 2011. *Protozoa and Human Disease*. New York and London, Garland Science.
- Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. 2011. *The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer*. Int Immunopharmacol; 11: 295–309
- Yamin IS, Sayono, Nurulita U. 2017. *Surveilans Vektor Malaria di Kawasan Peternakan Sapi*. Universitas Muhammadiyah Semarang.
- Zhang T, Yamashita Y, Yasuda M, Yamamoto N, Ashida H. 2015. *Ashitaba (Angelica keiskei) extract prevents adiposity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice*. Food Funct, 6: 135-145
- Zhang H, Liu JJ, Sun J, Yang XH, Zhao TT, Lu X, Gong HB, Zhu HL. 2012. *Design, synthesis, and biological evaluation of novel chalcone derivatives as antitubulin agents*. Bioorg Med Chem; 20: 3212–3218

LAMPIRAN



Lampiran 1. Proses pembuatan simplisia umbi ashitaba



Sortasi Kering



Pencucian



Perajangan



Pengeringan



Penimbangan simplisia



Pembuatan serbuk simplisia

Lampiran 2. Proses ekstraksi dengan metode maserasi



1
Penyiapan alat dan bahan



2
Melarutkan simplisia dengan etanol 70%



3
Penyaringan



4
Maserat umbi Ashitaba



5
Ekstrak Umbi Ashitaba



6
Penimbangan ekstak kental

Lampiran 3. Hasil Skrinning Fitokimia



1

Uji Senyawa Flavonoid



2

Uji Senyawa Saponin



3

Uji Senyawa Tanin



4

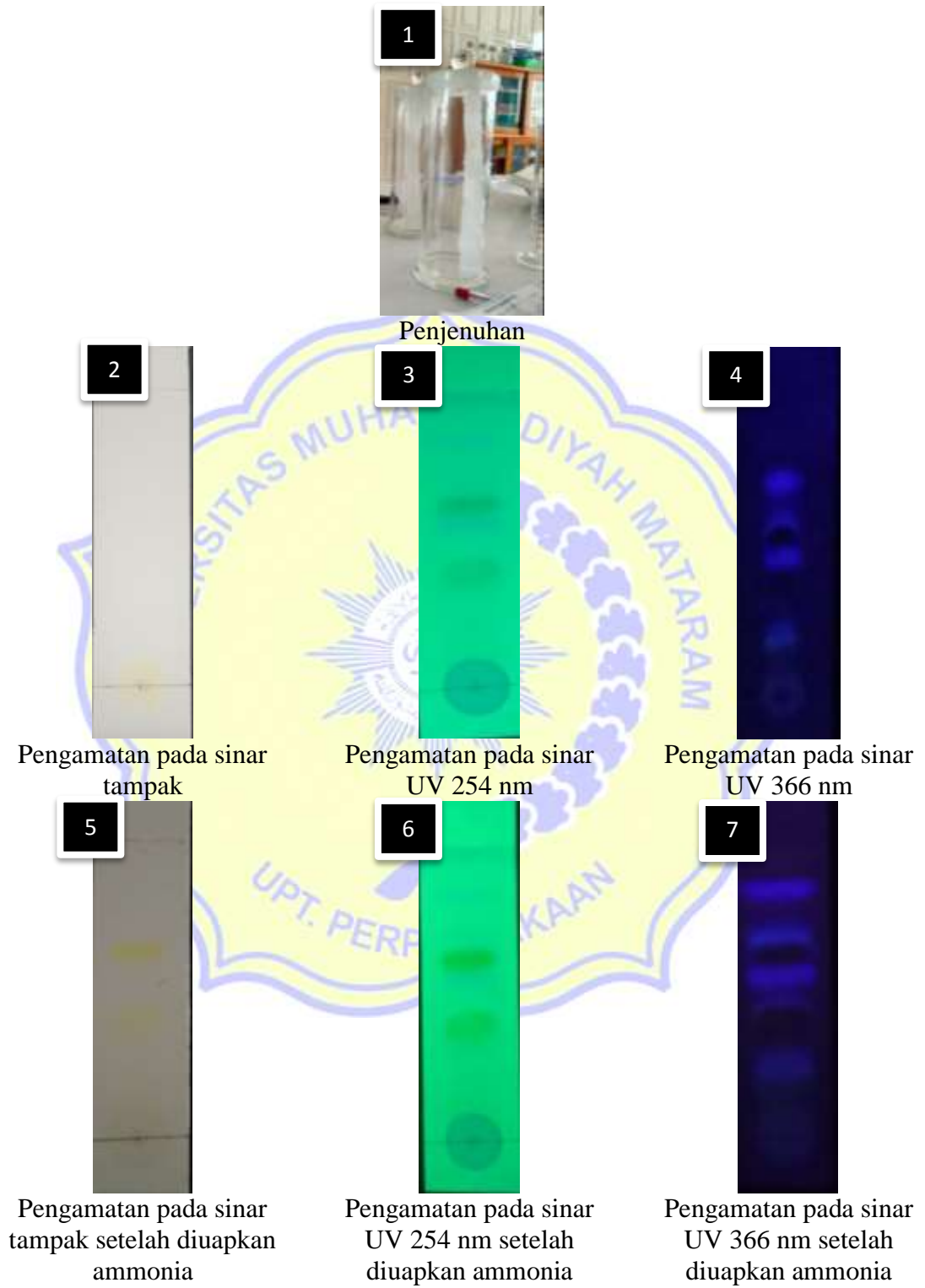
Uji Senyawa Alkaloid (Dragendroff)



5

Uji Senyawa Alkaloid (Mayer)

Lampiran 4. Proses Kromatografi Lapis Tipis (KLT)



Lampiran 5. Preparasi sampel uji



1

Penimbangan sampel



2

Ekstrak umbi ashitaba 5,3 μg



3

Sampel dilarutkan dalam 530 μl
DMSO 50%



4

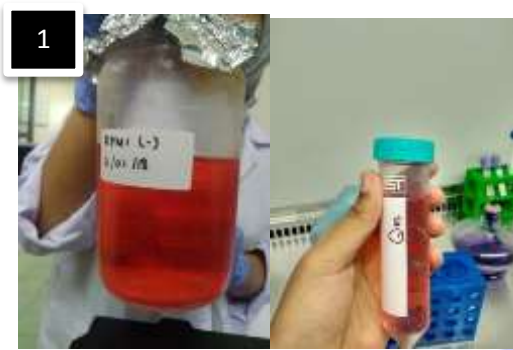
Pengadukan menggunakan *shaker*
hingga homogen



5

Sampel siap di uji

Lampiran 6. Preparasi parasit uji



1 RPMI (Medium uji) atau M- (medium tidak lengkap)



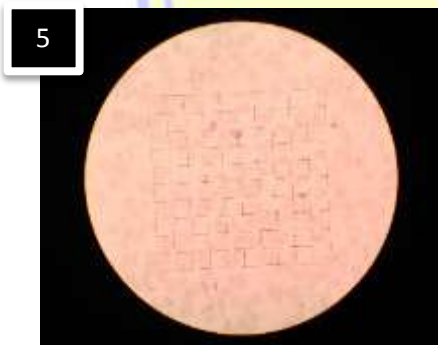
2 M+ (Medium lengkap) → 90 ml M- dan 10 ml serum



3 Kultur yang telah diinkubasi selama 24 jam



4 Cek parasit menggunakan mikroskop dengan pembesaran 10 x 100



5 Pengamatan parasit



6 Pengenceran kultur dengan sorbitol 5%



7

Sentrifuge kultur



8

Menghilangkan supernatant



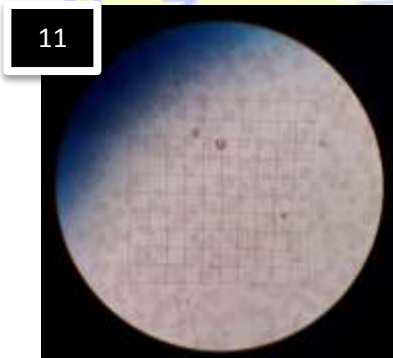
9

Fiksasi menggunakan metanol



10

Pewarnaan hapusan darah dengan giemsa



11

Amati hapusan darah lagi di bawah mikroskop hingga mendapatkan stadium ring >80%



12

Counter = alat untuk menghitung parasit, kanan untuk menghitung eritrosit yang kiri untuk parasit

13



Kultur sisa sinkronisasi dimasukkan ke dalam tube 15ml

14



Beri oksigen ke dalam kultur menggunakan mix gas

15



Kultur di masukkan kembali ke dalam inkubator untuk digunakan pada uji selanjutnya

16



Kultur diletakkan dalam posisi melintang agar kultur menyebar



Lampiran 7. Prosedur uji aktivitas antimalaria



1

Masukkan sampel ke dalam mikroplate



2

Membuat serial pengenceran (konsentrasi) di atas mixmate



3

Beri tanda antara sampel, kontrol positif dan kontrol negatif



4

Tambahkan kultur ke dalam mikroplate yang berisi sampel, kontrol positif dan kontrol negatif



5

Menyiapkan tempat sebagai pengganti candle jar



6

Tambahkan oksigen menggunakan mix gass



7

Mix gass



8

Inkubasi selama 24 jam

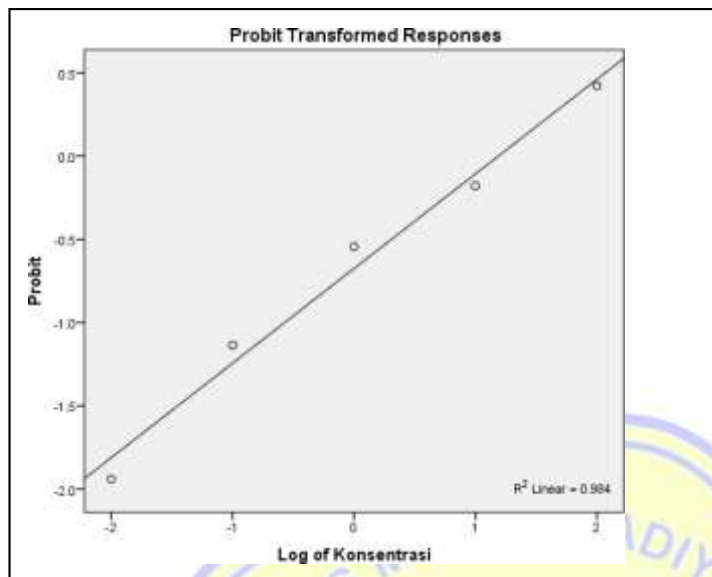
Lampiran 8. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria yang diberi Ekstrak Umbi Ashitaba

Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	R	% Parasitemia		% Pertumbuhan	% Hambatan	% Hambatan rata-rata
		0 jam	48 jam			
Kontrol (-)	1	0.80	4.03	3.23	-	-
	2	0.80	4.05	3.25	-	
100	1	0.80	1.87	1.07	66.87	66.36
	2	0.80	1.91	1.11	65.85	
10	1	0.80	2.64	1.84	43.03	42.90
	2	0.80	2.66	1.86	42.77	
1	1	0.80	3.08	2.28	29.41	29.32
	2	0.80	3.10	2.30	29.23	
0.1	1	0.80	3.64	2.84	12.07	12.81
	2	0.80	3.61	2.81	13.54	
0.01	1	0.80	3.95	3.15	2.48	2.62
	2	0.80	3.96	3.16	2.77	

Lampiran 9. Hasil Uji Aktivitas Antimalaria yang diberi Klorokuin

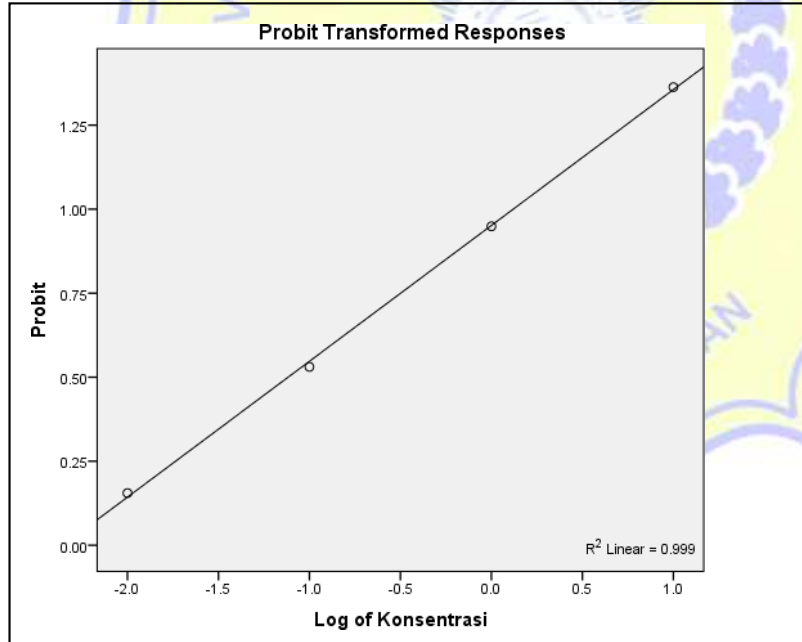
Konsentrasi ($\mu\text{g/ml}$)	R	% Parasitemia		% Pertumbuhan	% Hambatan	% Hambatan rata-rata
		0 jam	48 jam			
Kontrol (-)	1	0.8	4.03	3.23	-	-
	2	0.8	4.05	3.25	-	
100	1	0.8	0.34	0	100	100
	2	0.8	0.35	0	100	
10	1	0.8	1.10	0.3	90.71	91.36
	2	0.8	1.06	0.26	92.00	
1	1	0.8	1.39	0.59	81.73	82.87
	2	0.8	1.32	0.52	84.00	
0.1	1	0.8	1.75	0.95	70.59	70.22
	2	0.8	1.78	0.98	69.85	
0.01	1	0.8	2.23	1.43	55.73	56.17
	2	0.8	2.21	1.41	56.62	

Lampiran 10. Data Analisis Probit Ekstrak Umbi Ashitaba pada Program SPSS



IC₅₀ = 16.09 µg/ml

Lampiran 11. Data Analisis Probit klorokuin pada Program SPSS



IC₅₀ = 0.007 µg/ml